

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CAMPUS DE CASCAVEL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA  
DETECÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM ÁGUA RESIDUARIA DE FECULARIA**

**ELEONE APARECIDA TOZO GUZI**

**CASCAVEL**

**JULHO/2013**

**ELEONE APARECIDA TOZO GUZI**

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA  
DETECÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM ÁGUA RESIDUARIA DE FECULARIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração Sistemas Biológicos e Agroindustriais.

**Orientadora:** Profa. Dra. Silvia Renata Machado Coelho

**CASCADEL**

**JULHO/2013**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

**Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362**

G999m Guzi, Eleone Aparecida Tozo  
Microextração em fase sólida em cromatografia gasosa para  
detecção de ácidos orgânicos em água residuária de fecularia. / Eleone  
Aparecida Tozo Guzi — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2013.  
45 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Renata Machado Coelho  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná.  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola,  
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.  
Bibliografia.

1. Cromatógrafo. 2. Manipueira. 3. Planejamento experimental I.  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21. ed. 628.4

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

ELEONE APARECIDA TOZO GUZI, filha de Otavio Tozo e Iracy Tessaro Tozo, nasceu em Cascavel, Paraná, em 06 de outubro de 1968.

Em março de 2000, iniciou o Curso de Graduação em Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia, pela Universidade Paranaense – UNIPAR, diplomando-se como bacharel e licenciada em março de 2004.

Em 2005, iniciou a Especialização em Controle de Qualidade de Alimentos pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, diplomando-se Especialista em 2006.

Em fevereiro de 2011, iniciou o curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, nível de mestrado, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Atualmente é docente – SENAI – Departamento Regional do Paraná/Curso de Técnico em Alimentos, Universidade Dom Bosco/Curso Superior de Tecnologia de Alimentos e Técnica do Laboratório de Análise de Farinhas de Trigo na FAG – Faculdade Assis Gurgacz. Experiência em análises bromatológicas, ambientais e cromatográficas.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Deus, que pela sua infinita bondade me concedeu a oportunidade de mais uma conquista na vida, dando-me força e esperança nos momentos mais difíceis da caminhada.

## AGRADECIMENTO

À minha orientadora, Professora Dra. Sílvia Renata Machado Coelho, pela orientação criteriosa, paciência e atenção, além da oportunidade que me deu de desenvolver esse trabalho;

A Adenilson Guzi, meu esposo e companheiro, que durante essa jornada esteve sempre ao meu lado, incentivando e apoiando com paciência, amor e carinho;

À minha filha, Bruna Caroline Guzi, razão da minha vida, pelo apoio, pelo incentivo e pela paciência nas horas de ausência;

À minha mãe, Iracy Tessaro Tozo, que sempre me abençoou em todos os desafios da minha vida;

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, que, sempre, de alguma forma me incentivaram a essa conquista;

Ao professor Divair Christ pela presteza e simpatia, sempre esclarecendo dúvidas e incentivando todos os momentos;

E a outros que contribuíram de forma direta ou indireta à realização desse trabalho.

## RESUMO

### MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DE FECULARIA

A manipueira é gerada no processo de fabricação de farinha pela prensagem da massa ralada da mandioca, resultando em um resíduo líquido que apresenta uma composição rica em nutrientes e um elevado teor poluente e, por isso, existem propostas, baseadas em pesquisas de diversos autores, com o objetivo de agregar valor à manipueira como subproduto para diminuir a poluição ambiental. A crescente demanda pela segurança ambiental eleva a importância dessa análise a fim de proporcionar o aproveitamento desses resíduos. Com isso, amplia a necessidade dos analistas em desenvolver métodos rápidos, confiáveis e precisos. A Microextração em fase sólida (MEFS) é uma evolução técnica que reduz o preparo da amostra e, assim, reduz o tempo de análise e também da extração com solvente. Existem poucos trabalhos na literatura com a utilização dessa técnica na análise de ácidos orgânicos voláteis e na detecção e na quantificação de ácidos orgânicos em manipueira, podendo ser uma técnica promissora e de baixa geração de resíduos orgânicos na análise, uma vez que não há utilização de solvente na extração e no método cromatográfico. O processo de digestão anaeróbia ocorre na manipueira formando os ácidos voláteis, como: acético, propiônico e butírico, entre outros. O objetivo deste trabalho é propor a implantação de método de análise em cromatógrafo a gás utilizando o MEFS para detectar e quantificar ácidos orgânicos em manipueira. Para a otimização das condições do método foi utilizado o planejamento experimental DCCR 2<sup>3</sup>, com os fatores tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento que contribuíram para determinar as melhores condições do método. Os fatores que mais influenciaram na recuperação dos ácidos: acético – foram o tempo de exposição da fibra e a concentração de NaCl; para propiônico – foram concentração de NaCl e aquecimento; e, para o ácido butírico – aquecimento e concentração de NaCl. A técnica de desejabilidade permitiu a avaliação simultânea das respostas e as condições ótimas para o método. O processo apresentou desejabilidade global de 91,86%, sendo os níveis dos fatores definidos na seguinte condição: tempo de exposição da fibra de 23:24 minutos, concentração de NaCl a 40% e aquecimento da solução igual a 65 °C.

**Palavras Chave:** cromatógrafo, manipueira, planejamento experimental.

## ABSTRACT

### MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM CROMATOGRAFIA GASOSA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM ÁGUA RESIDUARIA DE FECULARIA

Manipueira is generated in the process of making flour by pressing the grated cassava, resulting in a liquid residue which has a composition rich in nutrients and a high level of pollutant substances, so there are proposals based on research by several authors, with the goal to add value to manipueira as a byproduct in order to reduce environmental pollution. The growing demand for environmental safety elevates the importance of this analysis in order to provide the use of such waste. As a result, there is an increase in the need for analysts to develop fast, reliable and accurate methods. The solid phase microextraction (SPME) is a technical evolution, which reduces the sample preparation and therefore reduces the time of analysis and solvent extraction. There are few reports in the literature using this technique in the analysis of volatile organic acids and detection and quantification of organic acids in cassava, and it may be a promising technique for low generation of organic waste in the analysis, since there is no use of solvents in the extraction and in the chromatographic method. The anaerobic digestion process occurs in manipueira, in which there is the formation of volatile acids such as acetic, propionic, butyric. The objective of this study is to implement a method of analysis in a gas chromatograph using SPME – Solid Phase Microextraction to detect and quantify organic acids in manipueira. To optimize the conditions of the method, the DCCR 2<sup>3</sup> experimental design was used, with the factors of exposure time of the fiber, NaCl concentration and heating, which contributed to determine the best conditions of the method. The factors that most influenced the determining recovery of the acids: acetic acid– the time of exposure of the fiber and the concentration of NaCl; propionic acid – concentration of NaCl and heating; and butyric acid – heating and NaCl concentration. The desirability technique allowed the simultaneous evaluation of responses and the optimal conditions for the method. The process presented overall desirability of 91.86% and levels of the factors defined in the following condition: exposure time of the fiber of 23.24 minutes, NaCl concentration to 40% and heating of the solution equal to 65 °C.

**Keywords:** Chromatograph, manipueira, validation.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 Cultura da mandioca .....	4
3.2 Mandioca como matéria prima e na produção de resíduos.....	5
3.3 Ácidos orgânicos voláteis .....	6
3.4 Cromatografia.....	8
3.5 Microextração em Fase Sólida (MEFS) .....	9
3.5 Planejamento experimental .....	12
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 Extração e quantificação dos ácidos .....	14
4.2 Condições cromatográficas .....	15
4.3 Planejamento experimental .....	16
4.4 Recuperação dos ácidos .....	17
4.5 Análise estatística .....	17
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>18</b>
5.1 Resultados relativos ao planejamento DCCR 2 <sup>3</sup> .....	19
5.2 Efeito da condição de recuperação do ácido acético utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento .....	20
5.3 Efeito da condição de recuperação do ácido propiônico utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento .....	22
5.4 Efeito da condição de recuperação do ácido butírico utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento .....	24
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>29</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>
<b>9 APÊNDICE.....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Matriz do planejamento e níveis dos fatores estabelecidos para extração de ácidos orgânicos voláteis acético, butírico e propiônico.....	16
Tabela 2	Valores codificados e reais entre parênteses dos fatores utilizados para determinação da recuperação dos ácidos orgânicos.....	16
Tabela 3	Tempo de retenção e de qualificação dos íons para os compostos identificados .....	17
Tabela 4	Valores de concentração e porcentagem de recuperação (entre parênteses) dos ácidos orgânicos para os ensaios realizados após o planejamento DCCR 2 <sup>3</sup> .....	19
Tabela 5	Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a concentração do ácido acético .....	21
Tabela 6	Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a concentração do ácido propiônico .....	23
Tabela 7	Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a concentração do ácido butírico.....	26
Tabela 8	Valores codificados e reais para os fatores de recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico resultantes da otimização global do processo .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Agulha de aço inox com a fibra de sílica fundida revestida com a fase extratora MEFS.....	10
Figura 2 Dispositivo de MEFS.....	10
Figura 3 Cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos voláteis, (1) acético, (2) propionico e (3) butírico.....	18
Figura 4 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido acético. *: significativo ao nível de 10% de significancia, ns: não significativo. ....	20
Figura 5 Superfície de resposta para o parâmetro de concentração do ácido acético (mg.L-1) em função dos fatores tempo de exposição da fibra (min) e concentração de NaCl (%).....	22
Figura 6 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido propionico. *: significativo ao nível de 10% de significancia, ns: não significativo.....	23
Figura 7 Superfície de resposta para o parâmetro concentração do ácido propiônico (mg.L-1) em função dos fatores aquecimento (°C) e concentração de NaCl (%) .....	24
Figura 8 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido butírico. *: significativo ao nível de 10% de significancia, ns: não significativo.....	25
Figura 9 Superfície de resposta para o parâmetro concentração do ácido butírico (mg.L-1) em função dos fatores aquecimento (°C) e concentração de NaCl (%) .....	26
Figura 10 Análise de desejabilidade para a recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico em função dos fatores tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

A manipueira, gerada no processo de fabricação de farinha pela prensagem da massa ralada da mandioca, é um resíduo líquido e apresenta uma composição rica em nutrientes tais como carboidratos, açúcares solúveis, matérias graxas e ácido cianídrico. Esse resíduo tem um elevado teor poluente e por isso existem propostas, baseadas em pesquisas de diversos autores, com o objetivo de agregar valor à manipueira como subproduto para diminuir a poluição ambiental. Porém, a manipueira continua sem uso comercial (CASSONI, 2008).

O estado do Paraná possui o maior e mais moderno parque industrial feculeiro do país. Em 2009 foram produzidas 420,7 mil toneladas de fécula de mandioca que equivale a 71,1% da produção nacional (PINTO, 2008; ALVES et al., 2010).

A crescente demanda pela segurança ambiental eleva a importância da análise para aproveitamento dos resíduos de manipueira. Isso aumenta a necessidade dos analistas em desenvolver uma forma rápida, confiável e mais precisa de realizar procedimentos analíticos.

A manipueira contém uma grande concentração de matéria orgânica com altas concentrações de açúcares solúveis. Os açúcares são de fácil fermentação e degradam-se rapidamente a ácidos orgânicos que são indicativos do tipo e estágio de fermentação. A quantificação rápida e exata de ácidos orgânicos é útil na avaliação do processo fermentativo para melhor aproveitamento desse resíduo.

No entanto, essa é uma tarefa difícil, pois os resíduos ambientais contêm uma ampla gama de componentes e, por isso, novos métodos analíticos de injeção da amostra, separação e detecção estão sendo cada vez mais utilizados.

A Microextração em Fase Sólida (MEFS) é uma evolução técnica que reduz o preparo da amostra, o tempo de análise e também a extração com solvente. Esta técnica foi proposta pela primeira vez por Arthur e Pawilszyn (1990). O manuseio do dispositivo de MEFS é simples, semelhante ao manuseio de uma seringa. Porém, apesar de bem adaptado, com o método de MEFS deve-se considerar a matriz e os compostos-alvos para identificar a complexidade da amostra.

Esse método pode ser usado de duas maneiras, a extração direta, na qual a fibra de sílica revestida de material sorvente (polímero ou adsorvente sólido) é inserida na amostra e os analitos são extraídos, e no método headspace, em que o analito contidos na amostras, extraídos por meio de aquecimento, fica armazenado no espaço existente do frasco de vial, acima da amostra.

Nas técnicas convencionais de cromatografia gasosa / espectrometria de massa (GC / MS), a preparação da amostra, embora eficiente, é ainda demorada e, muitas vezes, utiliza um volume significativo de reagentes, o que não acontece com a técnica de MEFS.

Existem poucos trabalhos na literatura utilizando essa técnica na análise de ácidos orgânicos voláteis e na detecção e na quantificação de ácidos orgânicos em manipueira. A técnica de MEFS pode ser promissora, pois tem baixa geração de resíduos orgânicos na análise.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Detectar e quantificar ácidos orgânicos em manipueira utilizando método de MEFS – Microextração em Fase Sólida em Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrometria de Massa CG/MS.

### **2.2 Objetivos específicos**

Determinar a metodologia para análise de ácidos orgânicos voláteis em cromatografia gasosa/MS.

Determinar as melhores condições de extração de padrões de ácidos orgânicos voláteis por extração em MEFS utilizando técnicas de planejamento experimental.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cultura da mandioca

Com a necessidade de aumentar a produção de alimentos para atender à demanda mundial está se estimulando o crescimento das culturas agrícolas, principalmente dos produtos da cesta básica. Isso tem sido observado na cultura da mandioca ao longo das últimas décadas. Segundo dados da organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação – FAO – a produção mundial de mandioca continua com crescimento expressivo, passando de 99,1 milhões de toneladas em 1970 para 233,8 milhões de toneladas em 2009. No período entre 1980 e 2009, registrou-se um aumento médio anual de 2,1%; porém nos últimos 5 anos esta taxa cresceu em torno de 4% (GROXK, 2011).

Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor corresponde em média de 70 a 75% da produção mundial, ocupando a 2ª colocação no ranking mundial, com 26 milhões de toneladas. Mesmo tendo a liderança de produção, o Brasil teve sua produção estabilizada entre 26 milhões e 27 milhões de toneladas, contra 30 milhões já alcançados em 1970, período em que houve um considerável avanço tecnológico na pesquisa de mandioca (GROXK, 2011).

A região Sul do Brasil, com a maior concentração de indústrias de fécula no país, representa 24% da produção brasileira de mandioca na safra de 2010/11. O estado do Paraná é o principal produtor, responsável em média por 70% da produção agrícola na região Sul e com 65 a 70% do volume brasileiro de fécula. Santa Catarina é o estado pioneiro na produção de fécula; contudo, atualmente, sua participação é bastante reduzida, já que a maioria das indústrias foi transferida para o estado do Paraná, na década de 80 (GROXK, 2011).

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) é uma planta originária da América do Sul, provavelmente da Amazônia, cultivada desde o descobrimento do Brasil pelos indígenas, que já a processavam. Ela apresenta elevada variabilidade genética e é cultivada em todas as regiões brasileiras. A raiz da mandioca é considerada uma importante cultura de subsistência para muitas comunidades, principalmente para a de baixa renda, podendo ser utilizada diretamente para o consumo ou destinada para a indústria na fabricação de farinha ou fécula (PASTORE, 2010; ASSIS et al., 2012).

As raízes de mandioca são compostas, basicamente, por água e carboidratos. Em termos nutricionais, é importante fonte de energia. Um dos fatores que determina a forma de aproveitamento das raízes de mandioca é seu teor de compostos cianogênicos, potencialmente tóxicos, presentes em todas as partes da planta, sendo variável para diferentes cultivares de mandioca. Assim, as raízes de cultivares que apresentam baixo teor

de compostos cianogênicos, popularmente denominadas de mandiocas mansas, aipim ou macaxeira, podem ser consumidas cozidas ou fritas. As raízes de cultivares com alto teor de compostos cianogênicos, mandiocas “bravas”, são destinadas ao processamento industrial, principalmente na forma de farinha e fécula. As raízes de mandioca também possuem compostos que, em presença de oxigênio, levam à formação de estrias escuras nas raízes, provando deterioração fisiológica. Portanto, o processamento das raízes deve ocorrer no máximo em 2 ou 3 dias após a colheita, conforme o produto a ser elaborado, a variedade e o manuseio pós-colheita (ocorrência de danos mecânicos, exposição à luz solar ou a temperaturas elevadas) (FOLEGATTI; MATSUURA, 2006; ASSIS et al., 2012). Assim, deve-se planejar um fluxo contínuo entre a colheita e a industrialização, de forma que as raízes permaneçam o mínimo de tempo na área de estocagem.

### **3.2 Mandioca como matéria-prima e produção de resíduos**

A mandioca tem diversos usos correntes e potenciais, classificados conforme o tipo de raiz, em duas grandes categorias: mandioca de mesa e mandioca para a indústria. Além dos processos que têm as raízes como matéria-prima principal, há produtos gerados a partir da parte aérea, folhas e hastes, que são usadas na alimentação animal ou humana (BARROS et al., 2003).

Para a indústria, a mandioca, tem uma grande variedade de usos, dos quais as farinhas, farofas e a fécula são os mais importantes. A farinha tem, essencialmente, uso alimentar, com elevada especificidade regional que, em muitos casos, torna o produto cativo a mercados locais. A fécula e seus derivados têm sido utilizados em produtos amiláceos para a alimentação humana ou como insumos em diversos ramos industriais, sendo: alimentos embutidos, embalagens, colas, mineração, têxtil e farmacêutica (BARROS et al., 2003).

No Brasil, a farinha, a fécula e a farofa, obtida das raízes são as formas mais comuns de aproveitamento da mandioca para alimentação humana. Sua fabricação ocorre em todo o país, sendo um alimento rico em carboidratos e fibras; também é a principal fonte de energia para a população das Regiões Norte e Nordeste. As exigências dos consumidores variam conforme os costumes da região (MATSUURA; FOLEGATTI; SARMENTO, 2003).

O processamento das raízes para a produção de farinha de mandioca ocorre basicamente em empresas artesanais, pequenas e médias empresas e é o mesmo quanto às operações unitárias, diferindo apenas nos equipamentos e nas fontes de energia utilizadas.

No processamento da raiz de mandioca são gerados diversos resíduos, que podem ser sólidos, casca e farelo, ou líquidos, como a manipueira.



Os resíduos líquidos são gerados durante a prensagem da mandioca para fabricar a farinha e durante a extração do amido e podem ser divididos em duas categorias básicas: as águas de lavagem das raízes e a água proveniente da prensagem da massa de mandioca, denominada água da prensa ou manipueira. As águas de lavagem, embora em maior quantidade, possuem menor poder poluente do que a manipueira, que é bem mais agressiva ao ambiente, tanto pelo alto teor de cianeto total quanto pela carga orgânica (CASSONI, 2008).

Segundo Cereda e Takahashi (1996), as feculárias geram em torno de 600 litros de manipueira diluída por tonelada de mandioca, causando uma poluição urbana equivalente à produzida por 150 a 250 habitantes por dia.

A manipueira gerada, na maioria das indústrias, tem como destino as lagoas de estabilização. O resíduo permanece depositado sob ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local, sem haver qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo para o aproveitamento deste efluente como subproduto para a produção de outros produtos de maior valor agregado. Esses resíduos tendem à percolação, alcançando lençóis freáticos, contaminando aquíferos e ainda produzindo odor desagradável e problemas com insetos e vetores (PASTORE, 2010).

### **3.3 Ácidos orgânicos voláteis**

Os ácidos orgânicos possuem várias utilizações nas indústrias de alimentos e química. Na indústria de alimentos atuam como flavorizantes e conservantes, retardando a degradação enzimática, como inibidores do crescimento microbiano, podendo ter uso na preservação de alimentos, grãos e rações e como aditivo promotor de crescimento na ração em substituição aos antibióticos. Podem ser úteis também como agentes quelantes, se ligando a metais que formam os quelatos metálicos, prevenindo ou reduzindo a oxidação de metais (REGINATTO et al., 2009).

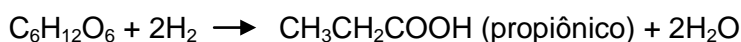
O processo de digestão anaeróbia que ocorre na manipueira tem início com a ação de bactérias fermentativas, que podem ser hidrolíticas e acidogênicas, hidrolisando as moléculas complexas por meio da produção de enzimas extracelulares, que podem, assim, ser assimilados pela célula bacteriana. No interior da célula, por oxi-redução, tem-se a formação de dióxido de carbono, hidrogênio e ácidos voláteis, como: acético, fórmico, propiônico, butírico e lático, além do etanol (CORDEIRO, 2006).

Segundo Kunzler (2010), a digestão anaeróbia que ocorre nos reatores é um processo fermentativo em que algumas bactérias atuam na ausência de oxigênio livre, hidrolizando compostos orgânicos complexos, tais como proteínas, carboidratos e lipídeos, produzindo compostos mais simples, como gás metano, dióxido de carbono e ácidos

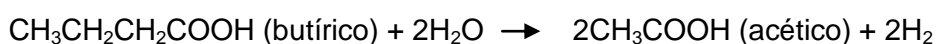
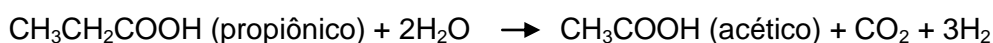
orgânicos. O processo de digestão anaeróbia envolve, basicamente, quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese.

Na hidrólise, o material orgânico particulado é hidrolisado a compostos dissolvidos de menor peso molecular e essa etapa pode ser afetada pelo tamanho das partículas que compõem o substrato, o pH e a composição desse material orgânico, onde pode atuar como fator limitante do processo de digestão anaeróbio.

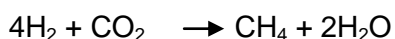
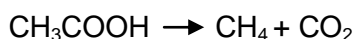
Na acidogênese, compostos dissolvidos são formados na hidrólise e, então, absorvidos pela parede celular das bactérias fermentativas, sendo, então, convertidos a substâncias mais simples, como os ácidos orgânicos voláteis. As bactérias acidogênicas, após a hidrólise da glicose, geram ácidos acéticos, propiônicos e butíricos, conforme as reações:



Os produtos excretados pelas bactérias fermentativas na produção de ácido butírico e propiônico são metabolizados pelas bactérias acetogênicas e convertidos em ácido acético, conforme as equações.



Esses produtos, na etapa final, são transformados por meio das bactérias metanogênicas em  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ . As reações que ocorrem nessa fase são:



Muitos tratamentos de resíduos e aplicações ambientais necessitam da determinação de ácidos orgânicos voláteis, na faixa de concentração de 1 a 5000  $\text{mg L}^{-1}$ , e envolvem uma variedade de matrizes.

Considerando a importância dos níveis dos ácidos orgânicos voláteis (acético, propiônico e butírico) no processo de produção de hidrogênio, utilizaram para desenvolver e

validar um método analítico (cromatografia gasosa e cromatografia líquida), para monitorar as concentrações dos AOVs em efluentes de reatores anaeróbios, as soluções analíticas nas concentrações entre 7,5 e 300,0 mg L<sup>-1</sup>.

Barros (2009) utilizou a cromatografia gasosa para a determinação de ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, butírico, propionico e láctico) nas concentrações de 0,0 a 1200,0 mg L<sup>-1</sup>, produzido por reator anaeróbio de leito fluidizado contendo diferentes materiais de suporte (poliestireno, pneu triturado e PET). Foi observado que os ácidos orgânicos voláteis foram os metabolitos solúveis dominantes nos três reatores, de 0,2 a 800 mg L<sup>-1</sup>, o que indica que as bactérias foram eficientes na produção de H<sub>2</sub>.

Grande parte da matéria orgânica da manipueira é devida à presença de açúcares solúveis. Segundo Barana (2008), os teores dos açúcares glicose e frutose em manipueira podem chegar a 14,7 g/L de glicose e 22 g/L de frutose. Por serem açúcares solúveis de fácil fermentação, degradam-se rapidamente a ácidos orgânicos, o que inviabiliza o tratamento deste resíduo por processos físicos (SANTOS, 2009).

### 3.4 Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O termo cromatografia foi inicialmente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) por meio de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (chrom = cor e graphie = escrita), podendo levar à errônea ideia de que o processo seja dependente da cor (BECKER, 2012).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura. Os processos cromatográficos são nomeados de acordo com o estado físico da fase móvel. Dessa forma, por exemplo, quando se utiliza um gás como fase móvel (gás de arraste), chama-se o processo de cromatografia a gás (CG) e quando a fase móvel é líquida, designa-se como cromatografia líquida (CL). Na escolha do CG ou CL como método

de separação, devem-se levar em consideração algumas propriedades como volatilidade e estabilidade térmica dos analitos a serem analisados (BECKER, 2012).

Na cromatografia gasosa, a injeção da amostra é realizada em colunas capilares, sendo os injetores utilizados do tipo split/splitless. No modo split ocorre a diluição da amostra pelo gás de arraste, sendo esse modo de injeção utilizado quando os compostos de interesse estão em altas concentrações e o modo splitless não ocorre essa diluição, o que é desejado para análise em nível de traços, pois, nesse caso, maiores quantidades de amostras necessitam entrar na coluna cromatográfica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

### **3.5 Microextração em Fase Sólida (MEFS)**

A qualidade de um método analítico é determinada pela qualidade de suas etapas. Essa qualidade depende da técnica de amostragem, com a qual se seleciona uma fração presumivelmente representativa da amostra primária que deve identificar e quantificar os analitos, componentes químicos que a definem (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Não se analisa, comumente, matrizes na forma bruta, por conterem interferentes e incompatibilidade com equipamentos analíticos. Para evitar esses problemas são empregados procedimentos de preparo de amostra, na qual isola-se e concentra-se os analitos em níveis adequados de limpeza, para não comprometer a análise química. Esse preparo de amostra inclui, também, a sua compatibilização com a técnica que fornecerá os dados químicos. A microextração em fase sólida – MEFS é uma opção relativamente recente, que tem sido empregada para essas operações que criam o elo entre a matriz química e o instrumental analítico, sendo particularmente interessante para Cromatografia Gasosa (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A Microextração em fase sólida (MEFS) foi introduzida em 1990 por Artur e Pawliszyn, que utilizaram, nos primeiros experimentos, fibra ótica com e sem revestimento com fases poliméricas líquidas e sólidas. O desenvolvimento dessa técnica resulta na incorporação de fibras revestidas com fases poliméricas dentro de uma microseringa, determinando o primeiro dispositivo de MEFS (NICOLLI, 2009).

A técnica de extração por MEFS foi desenvolvida para facilitar o preparo rápido das amostras. Permite concentração simples e rápida, que dispensa o uso de solventes extratores e a manipulação excessiva de amostra, diminuindo custo e tempo de análise. A extração e a concentração de solutos ocorrem por meio de processos de adsorção ou absorção em uma fina camada de fase extratora, que varia de 7 a 100  $\mu\text{m}$  de espessura, podendo ser polimérica ou adsorvente, que reveste a superfície externa de fibra de sílica fundida, 10 mm de comprimento e 110 a 160  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A fibra de sílica fundida fica dentro de uma agulha de aço inox que é rosqueada junto ao dispositivo de MEFS (Figura 1).

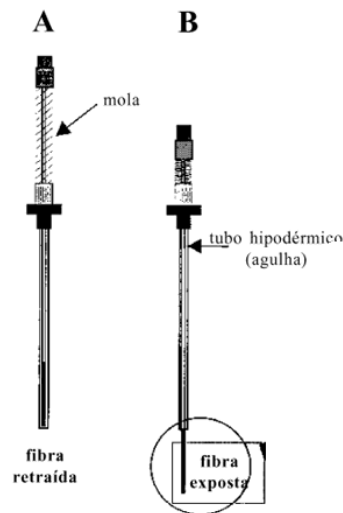


Figura 1 Agulha de aço inox com a fibra de sílica fundida revestida com a fase extratora MEFS.

Fonte: (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

O seu princípio básico é simples: a adsorção é realizada expondo a fibra de sílica recoberta com um filme de material sorvente (polímeros ou adsorventes sólidos), diretamente na amostra ou ao seu espaço confinante (headspace), e a desorção ocorre em um instrumento analítico adequado para a sua separação, identificação e quantificação (Figura 2) (ARTHUR, 1990; SARTORATTO, 2006; NICOLLI, 2009;).

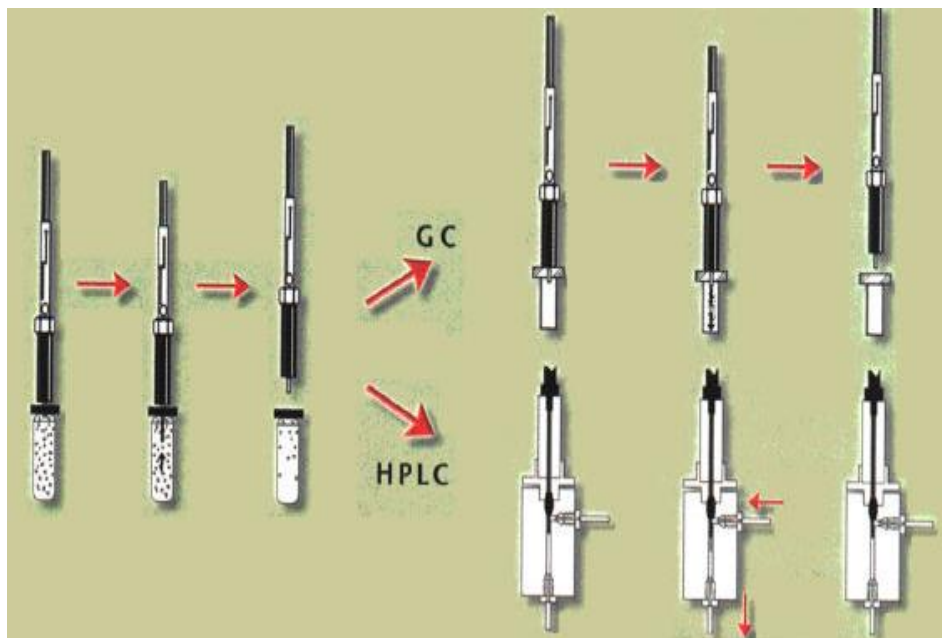


Figura 2 Dispositivo de MEFS. Fonte: VALENTE; AUGUSTO, 2000.

Helena *et al.* (2010) usaram MEFS-CG para otimização e validação de método para avaliação de compostos de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos) em água. Foi utilizada a fibra MEFS Carboxen/Polydimethylsiloxane, agulha 24 ga, 75 mm (Supelco™). Na

otimização das condições analíticas foram escolhidos três métodos analíticos mais comuns utilizados para esse fim: extração dos analitos por headspace com determinação por CG-DIC (Detector de Ionização de Chama) e por CG-EM (Espectrometria de Massa) e extração dos analitos por headspace e MEFS com determinação por CG-EM. Vários parâmetros analíticos foram otimizados, tais como tempo e temperatura de extração, quantidade de sal na solução, relação entre as fases líquida e vapor, além do controle de temperatura e tempo para a extração por MEFS.

Poppi, Gebara e Prates (2011) analisaram pesticidas organoclorados em água usando MEFS em CG/MS. Foram avaliadas cinco fibras comerciais com diferentes recobrimentos: polidimetilsiloxano 100  $\mu\text{m}$  (PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno 65  $\mu\text{m}$  (PDMS/DVB), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30  $\mu\text{m}$  (DVB/CAR/PDMS) e poliacrilato 85  $\mu\text{m}$  (PA), todas da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA), e a fibra NiTi-ZrO<sub>2</sub>, produzida na Universidade Federal de Santa Catarina. As extrações dos pesticidas foram realizadas usando uma alíquota da amostra de 5 mL em vial de 15 mL com tampa fenólica, septo de Politetrafluoretileno/silicone de 11 mm e holder manual. Os recobrimentos de fibra foram avaliados em extrações headspace em banho-maria sem agitação com tempos de extração e dessorção de 60min e 2 min, respectivamente, temperatura de extração de 70 °C e solução de pH 6. A fibra DVB/CAR/PDMS 50/30  $\mu\text{m}$  mostrou melhor resposta e menores coeficientes de variação para as triplicatas, sendo selecionada para outros experimentos. Foram analisados quantitativamente 18 pesticidas organoclorados em 31 amostras de água, das quais 16 apresentaram pesticidas.

Sartoratto (2006) desenvolveu metodologias em Microextração em Fase Sólida (MEFS) para utilização em cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou uma interface de dessorção por MEFS e uma fibra sol-gel Carbowax 20M ormosil para análise de pesticidas organofosforados, onde foram avaliados os principais parâmetros de validação: sensibilidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. O autor relacionou também a composição química de compostos voláteis de plantas analisados por MEFS-GC-MS com a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Essa avaliação dos voláteis foi feita utilizando-se dois tipos de fibras comerciais: PDMS (polidimetilasiloxano) e PDMS/DVB (Polidivinilbenzeno) e também pela análise do óleo essencial obtido por métodos tradicionais. A análise de voláteis de plantas por meio da técnica MEFS-GC mostrou-se eficiente quando comparada com a análise dos óleos essenciais obtidos por técnicas tradicionais (hidrodestilação em sistema Clevenger), com a vantagem do uso de pequena quantidade de amostra e eliminação do uso de solventes orgânicos. A fibra PDMS/DVB (65  $\mu\text{m}$ ) mostrou-se mais eficiente para extração dos voláteis em comparação com a fibra PDMS (100  $\mu\text{m}$ ).

Ábalos, Bayona e Pawliszyn (2000) desenvolveram um procedimento analítico baseado em MEFS por headspace acoplada a GC/MS para a determinação de ácidos

orgânicos voláteis livres em amostras de água residuária avaliando cinco diferentes revestimento de fibra de MEFS. A polidimetilsiloxano-Carboxen foi mais eficiente na extração de ácidos orgânicos de cadeia mais curta (acético e propiônico) e os parâmetros tempo de extração, temperatura, tempo de dessorção, agitação e volume de amostra, pH e adição de NaCl (Cloreto de Sódio). A extração foi realizada em 20 min a 25 °C com agitação vigorosa, solução com pH de 1,5 e saturada de NaCl, e a dessorção no injetor ocorreu em 5 min a 300 °C. O procedimento mostrou-se confiável para o monitoramento de águas residuárias de efluentes urbanos.

Em sua pesquisa, Spinhirne *et al.* (2002) testou a viabilidade da recuperação de ácido acético, butírico e propiônico na fermentação do líquido ruminal pelo método de headspace por MEFS. Inicialmente, seis tipos de revestimentos de fibra de MEFS foram avaliados quanto à sua capacidade de extrair os compostos a partir de padrões de ácidos orgânicos voláteis em tempos de amostragem de 1 minuto. A partir desse experimento foi selecionada para o estudo a fibra com revestimento DVB / Carboxen / PDMS 50/30µm. A amostragem foi realizada a cada hora com a exposição da fibra em dois erlenmeyers com septo, que estavam em banho-maria a 39 °C, sendo agitados por 2 min após cada amostragem. O espaço superior de cada erlenmenyer (headspace) foi amostrado sequencialmente, cada hora, utilizando a fibra de MEFS. Amostras coletadas por MEFS foram analisadas utilizando um cromatógrafo Varian 3800 CG acoplada a um MS Saturn 2000 e os analitos encontrados foram inicialmente identificado com o NIST – National Institute of Standards and Technology (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia).

### **3.6 Planejamento experimental**

A necessidade crescente da otimização de experimentos, minimização de custo e de tempo para conseguir resultados e obter o máximo de rendimento, produtividade e qualidade de produtos leva profissionais multidisciplinares a buscarem novas técnicas sistemáticas de planejamento experimental.

O método de planejamento fatorial, juntamente com a análise de superfície de resposta, ferramenta fundamentada na teoria estatística, fornece informações seguras do processo, diminuindo o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Nos diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, permitindo avaliar simultaneamente o efeito de variáveis que podem influenciar na resposta, partindo de um número reduzido de ensaios experimentais quando comparado a processos univariados (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

O planejamento fatorial tem diversas vantagens, tais como redução de número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação; estudo simultâneo de diversas variáveis e

determinação da confiabilidade dos resultados. Esse planejamento é uma técnica estatística utilizada para determinar variáveis que exercem maior influência no desempenho de determinado processo e, com isso, obter melhorias, tais como: aumento de rendimento, reduções de tempo, diminuindo o custo operacional, redução da variação do processo e melhor concordância entre valores encontrados experimentalmente e os previstos (CALADO; MONTGOMERY, 2003; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes, controladas no processo, também chamadas de fatores ou regressores da faixa de variação dessas e a da variável resposta. Quando necessita desenvolver ou melhorar um processo, o pesquisador precisa planejar um experimento para avaliar os efeitos que suas variáveis independentes têm sobre as respostas. Entre as técnicas, com o objetivo de reduzir o número de pontos experimentais, existe uma, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que utiliza os delineamentos compostos para estudo em que o erro experimental, em geral, é bem pequeno, e as condições do experimento são mais facilmente controláveis. Um dos caminhos para a resolução de um problema experimental pode ser apresentado de forma esclarecedora na condução de duas ou três variáveis independentes, utilizando o DCCR, tratamento, no caso, relativo ao ponto central (MATEUS, 2001; CALADO; MONTGOMERY, 2003; CHAVES, 2008).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do método de Microextração em Fase Sólida – MEFS foi realizado no Laboratório de Análises Agro Ambientais (LAAA) da Universidade do Oeste do Paraná (UNIOESTE), localizado no *Campus* de Cascavel.

### 4.1 Extração e quantificação dos ácidos

Para otimizar as condições do método cromatográfico, selecionou-se a fibra que seria adequada para extrair os ácidos orgânicos voláteis (AOV), considerando a polaridade dos compostos a serem analisados e a sua volatilidade. Inicialmente, três tipos de revestimentos de fibra de MEFS foram avaliados (polidimetilsiloxano, poliacrilato e carbowax) quanto à sua capacidade de extrair os compostos a partir das soluções de padrão de AOV. As fibras foram previamente condicionadas no injetor do cromatógrafo CG/MS a 250 °C por 6 horas.

As duas colunas avaliadas foram Rtx®-5MS (5% fenil, 95% dimetilpolissiloxano), da Restek® de 30 m x 0,25 mm ID revestida com 0,25 µm, e a Nukol de 30 m x 0,25 mm ID revestida com 0,25 µm (Supelco™).

Para o preparo da solução mãe de 15.000 mg L<sup>-1</sup> para cada composto (acético, butírico e propiônico), utilizou-se os padrões de ácido butírico (pureza ≥ 99%) e propiônico (pureza > 99,5%) da marca Vetec (Brasil). O ácido acético (pureza 99,7%) foi adquirido da Sigma-Aldrich. A água utilizada foi obtida por destilador, o NaCl da Vetec (Brasil) e o HCl (0,1 M) preparado a partir do reagente da Vetec (Brasil). As soluções foram preparadas em balões volumétricos de 100 mL utilizando água destilada.

Para identificar os íons dos compostos de interesse foram utilizados os padrões de ácido acético, propiônico e butírico na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As soluções foram preparadas em vial de 40 mL lacrados com septos de silicone (Pierce, Rockford, IL – EUA) contendo barras para agitação magnética, saturadas com 6 g de NaCl, pH 2,0 e aquecidas em banho-maria a 60 °C, sob agitação, por 20 min, e o tempo de exposição da fibra no headspace foi de 10 min. Essa concentração foi utilizada para obter o sinal suficiente na detecção de massa.

Baseando-se nos resultados da primeira fase, a fibra de Polidimetilsiloxano/Carboxem, agulha 24 ga, 85 mm (Supelco™) e a coluna cromatográfica Nukol de 30 m x 0,25 mm ID revestida com 0,25 µm (Supelco™) foram selecionada para esse estudo.

Após o preparo da solução de trabalho, a análise desses compostos consistiu na injeção da fibra no injetor do cromatógrafo, realizando a dessorção, separação e determinação dos tempos de retenção dos picos referentes a cada composto.

Para a determinação das melhores condições de identificação dos picos dos compostos, o equipamento foi operado no modo SCAN. Os analitos foram inicialmente identificados com União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Foi utilizada a biblioteca do usuário do CG/MS para determinação dos tempos de retenção e de qualificação dos íons para todos os compostos, ácido acético, propiônico e butírico.

A análise cromatográfica foi efetuada utilizando um Cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrometria de massa GCMS-QP2010 SE (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão).

#### **4.2 Condições cromatográficas**

Após serem obtidas as condições necessárias para separação cromatográfica e posterior detecção, foram injetadas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mg.L<sup>-1</sup> de padrões de ácido acético, butírico e propiônico individuais, realizando para cada um deles uma curva de calibração.

As soluções foram preparadas em vial de 40 mL lacrados com septos de silicone (Pierce, Rockford, IL – EUA) contendo barras para agitação magnética, saturadas com 6 g de NaCl, pH 2,0. O vial foi mergulhado em banho de óleo mineral e aquecido a 65 °C, sob agitação, por 20 min.

Em seguida, o vial foi retirado do banho, para o processo de adsorção dos compostos, a fibra foi colocada em suporte apropriado (Supelco PN 57330 U) e introduzida no espaço confinante (headspace) do vial por 10 min.

A análise cromatográfica foi efetuada no Cromatógrafo gasoso – Espectrometria de massa GCMS-QP2010 SE (Shimadzu Corporation, Kioto, Japão), utilizando-se uma coluna Nukol de 30 m x 0,25 mm ID revestida com 0,25 µm (Supelco™), fibra com revestimento de Polidimetilsiloxano/Carboxem, agulha 24 ga, 85 mm (Supelco™). Como gás de arraste foi utilizado Hélio 99,9% pureza (White Martins) com fluxo constante de 1,52 mL/min. A temperatura do forno foi programada a partir de 60 °C por 3 min, em uma taxa de 4 °C por min, estabilizando a 180 °C por um min, com tempo de corrida total de 34 min. O injetor foi mantido a 200 °C, sem divisão de fluxo (modo splitless), e o detector foi mantido a 260 °C, temperatura indicada para a fibra.

Na sequência, procedeu-se injeções cromatográficas dos padrões de ácidos acético, propiônico e butírico com concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup>, para quantificar a recuperação dos ácidos, com soluções preparadas nas mesmas condições que os padrões da curva de calibração.

### 4.3 Planejamento experimental

Para otimizar a quantificação do AOV, as variáveis estudadas após determinar as condições do método foram tempo de exposição da fibra (min), concentração de NaCl (%) e temperatura de aquecimento (°C) para extração dos compostos.

Para realizar o experimento foi utilizado o delineamento composto central rotacional  $2^3$ . Os fatores selecionados e seus respectivos níveis estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Matriz do planejamento e níveis dos fatores estabelecidos para extração dos ácidos orgânicos voláteis acético, butírico e propiônico

FATORES	Níveis				
	- $\alpha$	- 1	0	+ 1	+ $\alpha$
Tempo de exposição da fibra (min)	6:36	10	15	20	23:24
Concentração de NaCl (%)	0	8,10	20	31,9	40
Aquecimento (°C)	35	41	50	59	65

$\alpha = \pm 1,68$

A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento composto central rotacional com seus valores reais entre parênteses e codificados. Foram realizados de forma aleatória oito ensaios principais, seis ensaios nos pontos axiais e três repetições no ponto central.

Tabela 2 Valores codificados e reais entre parênteses dos fatores utilizados para determinação da recuperação dos ácidos orgânicos

Ensaio	Fatores		
	Tempo de exposição da fibra (minutos)	Concentração de NaCl (%)	Aquecimento (°C)
01	-1 (10)	-1 (8,10)	-1 (41)
02	+1 (20)	-1 (8,10)	-1 (41)
03	-1 (10)	+1 (31,9)	-1 (41)
04	+1 (20)	+1 (31,9)	-1 (41)
05	-1 (10)	-1 (8,10)	+1 (59)
06	+1 (20)	-1 (8,10)	+1 (59)
07	-1 (10)	+1 (31,9)	+1 (59)
08	+1 (20)	+1 (31,9)	+1 (59)
09	0 (15)	0 (20)	0 (50)
10	0 (15)	0 (20)	0 (50)
11	0 (15)	0 (20)	0 (50)
12	-1,68 (6:36)	0 (20)	0 (50)
13	+1,68 (23:24)	0 (20)	0 (50)
14	0 (15)	-1,68 (0)	0 (50)
15	0 (15)	+1,68 (40)	0 (50)
16	0 (15)	0 (20)	-1,68 (35)
17	0 (15)	0 (20)	+1,68 (65)

\* O número do ensaio não indica a ordem que ele foi realizado

#### 4.4 Recuperação dos ácidos

A recuperação dos ácidos foi calculada tendo como base a concentração teórica dos padrões, 50 mg.L<sup>-1</sup>.

$$\% \text{ de recuperação} = \frac{\text{concentração em cada ensaio} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

#### 4.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Estatistic versão 8.0 (STATSOFT INC, 2007). Foi possível avaliar o erro puro e a reprodutibilidade do processo por meio dos resultados obtidos nos ensaios na condição de ponto central. Estabeleceu-se o nível de 10% de significância, pois em delineamentos de seleção de fatores ou quando se trabalha com processos complexos é mais prudente se trabalhar com esse nível. Com tal estratégia, minimiza-se o risco de excluir da etapa seguinte algum fator importante para o processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os dados obtidos após realizar o planejamento DCCR 2<sup>3</sup> foram analisados de maneira a calcular os efeitos principais e de interações das variáveis sobre as respostas, determinando-se quais os fatores significativos ( $p < 0,1$ ) e ajustando-se um modelo de segunda ordem para correlacionar as variáveis e suas respostas. Os coeficientes significativos do modelo foram avaliados por meio do teste “t” (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), na qual foi possível verificar a validade estatística e a capacidade de predição dos modelos matemáticos obtidos para as respostas, por meio do valor da relação entre F calculado/F tabelado. Quanto maior é o F calculado em relação ao F tabelado, melhor é o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. O valor F da falta de ajuste (média quadrática da falta de ajuste / média quadrática do erro puro) também foi comparado ao F tabelado ( $F_{FA} / F_{tab}$ ) e, nesse caso, quanto menor o valor, menor é a falta de ajuste do modelo matemático aos dados experimentais (CHRIST, 2006).

Por fim, utilizou-se a metodologia de otimização simultânea por meio do método de Derringer e Suich (1980). Esse, por sua vez, está baseado na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo [0,1], sendo zero um valor inaceitável e um o valor mais desejável (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). No mesmo software citado anteriormente, foi possível estabelecer valores para otimizar simultaneamente as três respostas principais

avaliadas no processo: tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os cromatogramas típicos de amostras de AOV coletadas no headspace são apresentados na Figura 3. Os compostos apresentaram um perfil cromatográfico distinto para os ácidos acético, propiônico e butírico.

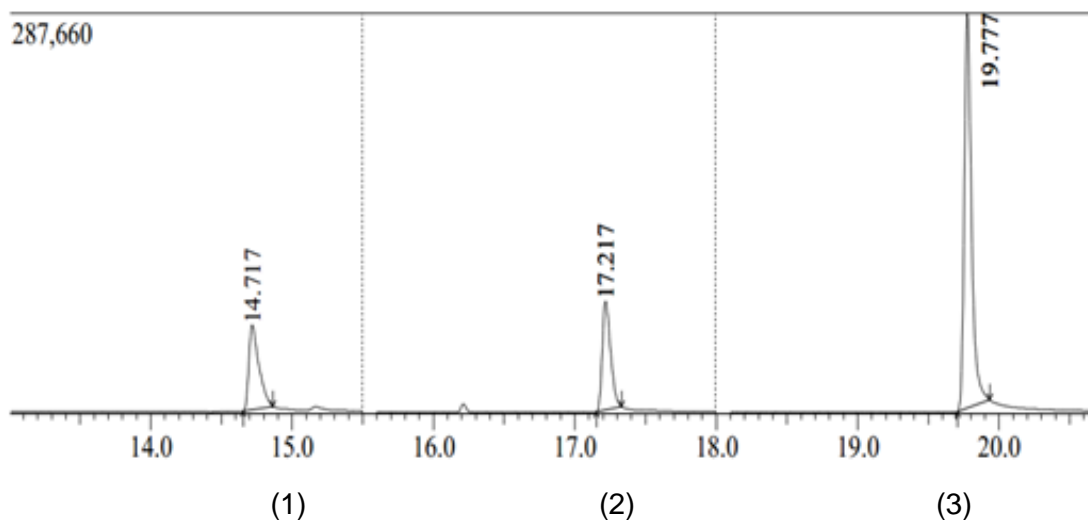


Figura 3 Cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos voláteis, (1) acético, (2) propiônico e (3) butírico.

Os tempos de retenção e de qualificação íons para todos os compostos identificados positivamente estão resumidos na Tabela 3. Detectando os AOV de baixo peso molecular, considera-se consistente a suposição de volatilização eficiente dos compostos da fase líquida para o espaço livre (headspace).

Tabela 3 Tempo de retenção e de qualificação dos íons para os compostos identificados

Picos	Compostos	Tempo de retenção (min)	Cas nº	Íons qualificados
1	Acético	14,52	64-19-7	43 e 60
2	Butírico	19,7	107-92-6	54 e 83
3	Propiônico	17,1	79-09-4	45 e 74

Os resultados encontrados utilizando o método de headspace por MEFS com a fibra PDMS/Carboxen de 85 foram ácido acético, tempo de retenção (14,52 min) e íons (43 e 60), ácido butírico, tempo de retenção (19,7) e íons (54 e 83) e ácido propiônico, tempo de retenção (17,1) e íons (45 e 74).

Em sua pesquisa, Spinhirne, Koziel e Chirase (2002) também verificaram a viabilidade da recuperação de ácido acético, butírico e propiônico, pelo método de headspace por MEFS selecionando para o estudo a fibra com revestimento DVB / Carboxen / PDMS 50/30µm, e identificaram o ácido acético, tempo de retenção (6,57min) e íons (43,

45 e 60), propionico, tempo de retenção (7,53) e íons (73,74 e 45) e butírico com tempo de retenção 8,55 e íons de 73,60 e 42. Os analitos foram inicialmente identificados com União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Foi utilizada a biblioteca do usuário do CG/MS para determinação dos tempos de retenção e de qualificação dos íons para todos os compostos, ácido acético, propiônico e butírico

### 5.1 Resultados relativos ao planejamento DCCR 2<sup>3</sup>

Na Tabela 4 são apresentados os resultados e as porcentagens de recuperação para as concentrações de ácido acético, propionico e butírico definidas pelo planejamento delineamento composto central rotacional que avaliou os fatores: tempo de exposição da fibra (min), concentração de NaCl (%) e aquecimento (°C).

A concentração de ácido acético apresentou média geral de 37 mg.L<sup>-1</sup> com variações de 15,8 a 71 mg.L<sup>-1</sup> para os ensaios 01 e 08, respectivamente. A condição do ensaio 01, que utilizou o tempo de exposição da fibra em 10 min, a concentração de NaCl em 8,10% e aquecimento a 41 °C, quando comparada ao ensaio 08, em que a exposição da fibra foi de 20 min, concentração de NaCl 31,9% e aquecimento 59 °C, observa-se que, no ensaio 08, o efeito de tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento com condições superiores ao ensaio 01, aumentaram a concentração de ácido acético.

Tabela 4 Valores de concentração e porcentagem de recuperação (entre parênteses) dos ácidos orgânicos para os ensaios realizados após o planejamento DCCR 2<sup>3</sup>

Ensaio	Acético (mg.L <sup>-1</sup> )	Propiônico (mg.L <sup>-1</sup> )	Butírico (mg.L <sup>-1</sup> )
01	36,0 (72,0%)	28,4 (56,8%)	25,9 (51,8%)
02	35,3 (70,6%)	28,6 (57,2%)	26,3 (52,6%)
03	61,2 (122,4%)	54,4 (108,8%)	54,9 (109,8%)
04	15,8 (31,6%)	11,0 (22,0%)	8,7 (17,4%)
05	50,0 (100,0%)	21,7 (43,4%)	16,5 (33,0%)
06	35,0 (70,0%)	28,6 (57,2%)	26,3 (52,6%)
07	21,6 (43,2%)	17,1 (34,2%)	15,0 (30,0%)
08	49,8 (99,6%)	42,6 (85,2%)	42,0 (84,0%)
09	19,3 (38,6%)	15,1 (30,2%)	12,8 (25,6%)
10	21,0 (42,0%)	16,2 (32,4%)	13,9 (27,8%)
11	19,7 (39,4%)	12,9 (25,8%)	9,6 (19,2%)
12	28,6 (57,2%)	21,1 (42,2%)	17,5 (35,0%)
13	19,8 (39,6%)	13,6 (27,2%)	10,5 (21,0%)
14	71,4 (142,8%)	63,3 (126,6%)	63,6 (127,2%)
15	42,6 (85,2%)	30,6 (61,2%)	26,0 (52,0%)
16	55,8 (111,6%)	40,0 (80,0%)	35,3 (70,6%)

17	43,4 (86,8%)	36,4 (72,8%)	34,0 (68,0%)
----	--------------	--------------	--------------

Os valores para a concentração de ácido propiônico apresentaram média 28 mg.L<sup>-1</sup> com variação de 11,0 a 63,3 mg.L<sup>-1</sup>, para as condições do ensaio 01 e 08, respectivamente.

Para a concentração do ácido butírico observou-se a média de 29 mg.L<sup>-1</sup>, com variação de 8,7 (ensaio 01) a 63,6 mg.L<sup>-1</sup> (ensaio 08).

Os valores para a recuperação dos ácidos apresentaram uma média de 73,68% com variação de 31,6 a 142,8% (acético), 56,66% com variação de 22,0 a 126,6% (propiônico) e 51,62% com variação de 17,4 a 127,2% (butírico) nos ensaios 01 e 08, respectivamente.

## 5.2 Efeito da condição de concentração do ácido acético utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento

Os resultados das análises dos efeitos das condições de tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento sobre a concentração do ácido acético estão apresentados em anexo na Tabela 1. Observam-se significativos os termos lineares de tempo de exposição da fibra, que, mesmo apresentando um valor de  $p > 0,10$  (0,12), mostrou-se importante para a recuperação do ácido, e o termo linear de concentração de NaCl ( $p < 0,10$ ).

Na Figura 4 apresenta-se a estimativa dos efeitos lineares e quadráticos sobre a concentração do ácido acético. Observa-se que todos os fatores contribuíram para a recuperação, porém, somente o tempo de exposição da fibra (13,1) e a concentração de NaCl (28,8) foram significativos, demonstrando que contribuem para o aumento da recuperação do ácido, com destaque para o fator de concentração de NaCl, que apresentou maior efeito positivo quando comparado ao tempo de exposição da fibra.

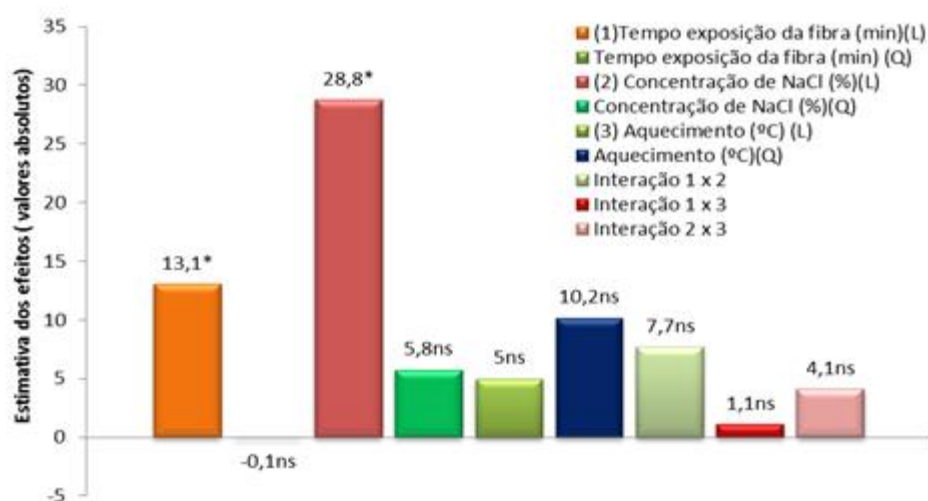




Figura 4 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido acético. \*: significativo no nível de 10% de significância, ns: não significativo.

A Equação 1 descreve a concentração do ácido acético (CAC) em mg.L<sup>-1</sup> previsto pelo modelo em função do tempo de exposição da fibra (EF), da concentração de NaCl (C) e do aquecimento (AQ). Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância.

$$CAC = 36,84 + 6,55 EF + 14,4 C \quad \text{Eq. (1)}$$

O modelo foi avaliado por meio da análise de variância apresentada na Tabela 5. Observa-se que o valor da medida de adequação de ajuste, o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi igual a 0,7658, havendo, portanto, uma boa explicação da variação total dos resultados (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 5 Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo em função da concentração do ácido acético

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F <sub>c</sub>	F <sub>tab</sub>	F <sub>c</sub> /F <sub>tab</sub>
Regressão	3.416,56	2	1708,28	22,88	2,73	8,38
Resíduo	1.045,12	14	74,65	-	-	-
Falta de ajuste	866,57	12	72,21	0,81	9,41	0,09
Erro Puro	178,55	2	89,28	-	-	-
<b>Total</b>	<b>4.461,68</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Coeficiente de correlação R<sup>2</sup> = 76,58%; F<sub>c</sub>: valor calculado; F<sub>tab</sub>: 10% significância.

Para a regressão, o valor da relação entre F<sub>c</sub>/F<sub>tab</sub> foi igual a 8,38, sendo, deste modo, maior que 1, e, dessa forma, o modelo para a concentração do ácido acético foi significativo. Para a falta de ajuste, o valor de F<sub>c</sub>/F<sub>tab</sub> foi igual a 0,09, sendo, portanto, menor que 1, o que resulta em um modelo ajustado para esse parâmetro (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Considerando que o modelo linear foi validado e ajustado aos dados experimentais, foi possível gerar a representação gráfica da superfície de resposta, que está apresentada na Figura 5.

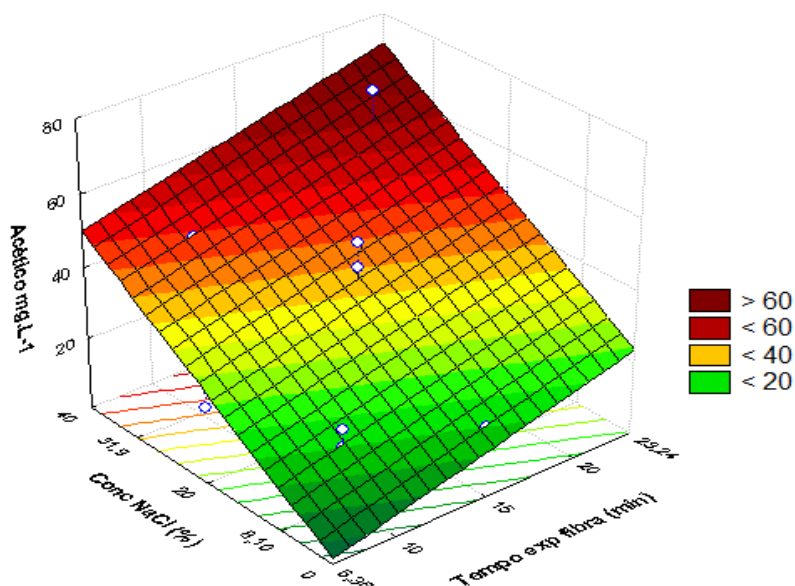


Figura 5 Superfície de resposta para o parâmetro de concentração do ácido acético ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função dos fatores tempo de exposição da fibra (min) e concentração de NaCl (%).

Na Figura 5 observam-se os efeitos lineares da concentração de NaCl (%) e do tempo de exposição da fibra (min). Com o aumento da concentração de NaCl de 0% a 40% e do tempo de exposição da fibra de 6,36 a 23,24 min, houve aumento da concentração do ácido acético, demonstrando o efeito positivo desse fator.

A análise permite inferir que em um máximo de tempo de exposição da fibra, nas condições estabelecidas, em máxima concentração de NaCl, que aumenta a transferência dos ácidos da fase aquosa para a fase do gás, há um aumento na concentração de ácido acético.

### 5.3 Efeito da condição de concentração do ácido propiônico utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento

Os resultados das análises dos efeitos das condições de tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento sobre a concentração do ácido propiônico estão apresentados em anexo na Tabela 2. Para essa resposta foi significativo ( $p < 0,10$ ) o termo linear de concentração de cloreto de sódio. O termo linear aquecimento, mesmo apresentando um valor de  $p > 0,10$  (0,12), foi considerado significativo para o processo de recuperação do ácido propiônico.

Apresenta-se, na Figura 6, a estimativa dos efeitos lineares e quadráticos sobre a concentração do ácido propiônico. Observa-se que todos os fatores contribuíram para a recuperação, porém, a concentração de NaCl (26,7) e o aquecimento (10,9) foram os fatores que mostraram-se significativos, demonstrando que contribuem para o aumento da recuperação do ácido. O fator de concentração de NaCl apresentou maior efeito positivo

quando comparado ao aquecimento.

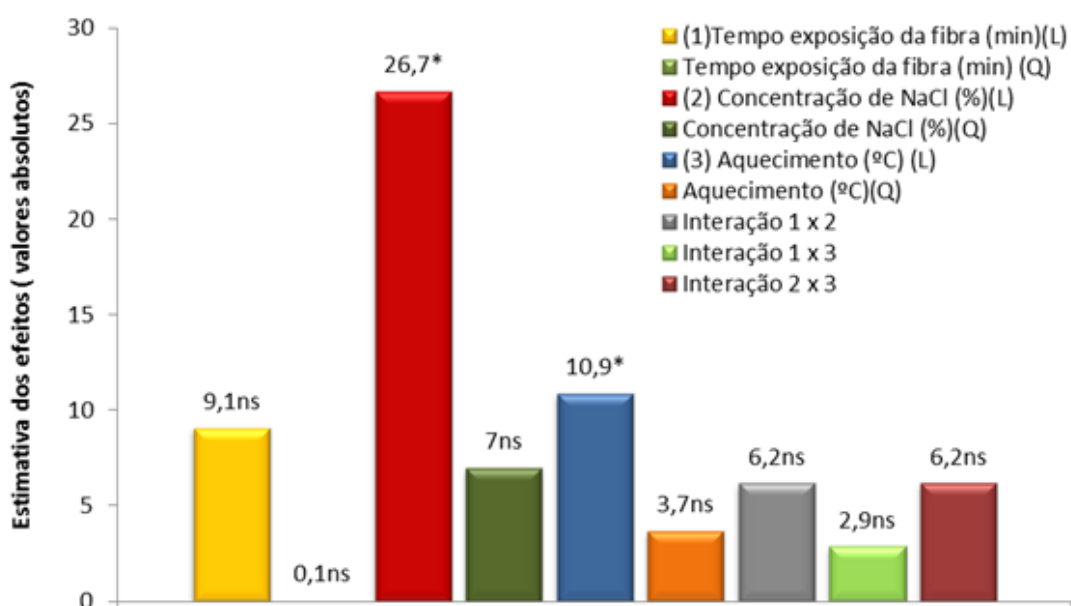


Figura 6 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido propionico. \*: significativo ao nível de 10% de significância, ns: não significativo.

A Equação 2 descreve a concentração do ácido propionico (CAP) em  $\text{mg.L}^{-1}$  previsto pelo modelo em função da concentração de NaCl (C) e do aquecimento (AQ). Os parâmetros não significativos foram adicionados a falta de ajuste para análise de variância.

$$CAP = 28,34 + 13,35 C + 5,47 AQ \quad \text{Eq. (2)}$$

Avaliou-se, por meio da análise de variância, o modelo para o resultado da concentração do ácido propiônico (Tabela 6). Observou-se que a medida de adequação do ajuste do modelo, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é igual a 0,7874, sendo considerado de boa qualidade, explicando a variação total dos resultados.

Tabela 6 Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a concentração do ácido propiônico

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Quadrado Médio	$F_c$	$F_{\text{tab}}$	$F_c/F_{\text{tab}}$
Regressão	2.843,71	2	1421,86	25,93	2,73	9,50
Resíduo	767,65	14	54,83	-	-	-
Falta de ajuste	649,45	12	54,12	0,92	9,41	0,10
Erro Puro	118,20	2	59,10	-	-	-
<b>Total</b>	<b>3.611,36</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Coeficiente de correlação  $R^2 = 78,74\%$ ;  $F_c$ : valor calculado;  $F_{\text{tab}}$ : 10% significância.

Para a regressão, o valor da relação entre  $F_c/F_{\text{tab}}$  foi igual a 9,50, sendo, portanto, maior que 1 e, dessa forma, o modelo para a concentração do ácido propiônico foi

significativo. Para a falta de ajuste, o valor de  $F_c/F_{\text{tab}}$  foi igual a 0,10, sendo, portanto, menor que 1, o que resulta em um modelo ajustado para esse parâmetro (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Considerando que o modelo quadrático foi validado e ajustado aos dados experimentais, foi possível gerar a representação gráfica, superfície de resposta que é apresentada na Figura 7.

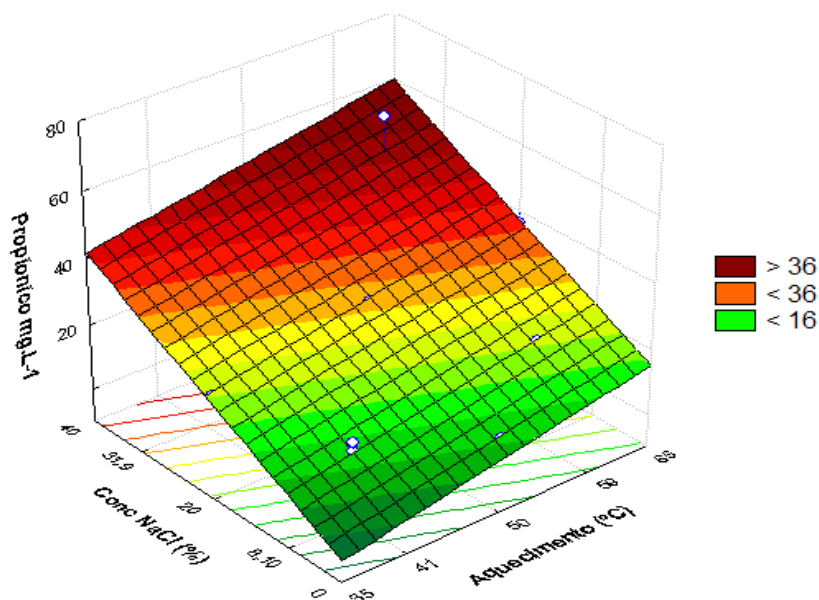


Figura 7 Superfície de resposta para o parâmetro concentração do ácido propiônico ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função dos fatores aquecimento ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de NaCl (%).

Observando a Figura 7, verificam-se os efeitos lineares da concentração de NaCl (%) e do aquecimento ( $^{\circ}\text{C}$ ). Com o aumento da concentração de NaCl de 0% a 40% e do aquecimento de 35 a 65  $^{\circ}\text{C}$ , houve aumento da concentração do ácido propiônico, demonstrando o efeito positivo desses fatores.

A concentração máxima de NaCl, nas condições estabelecidas, com um máximo de aquecimento observa-se a elevada concentração de ácido propiônico.

#### 5.4 Efeito da condição de concentração do ácido butírico utilizando tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento

Em anexo, na Tabela 3, estão apresentados os resultados das análises dos efeitos das condições de tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl (28,2) e aquecimento (12,5) sobre a concentração do ácido butírico. Foram significativos ao nível de 10% os seguintes termos: linear do fator de concentração de NaCl e linear do fator de aquecimento.

Observa-se, na Figura 8, a estimativa dos efeitos lineares e quadráticos sobre a

concentração do ácido butírico. Todos os fatores contribuíram para a recuperação, porém, observa-se que a concentração de NaCl e o aquecimento foram os fatores que mostraram-se significativos, demonstrando que contribuem para o aumento da concentração do ácido. O fator de concentração de NaCl apresentou maior efeito positivo quando comparado ao aquecimento.

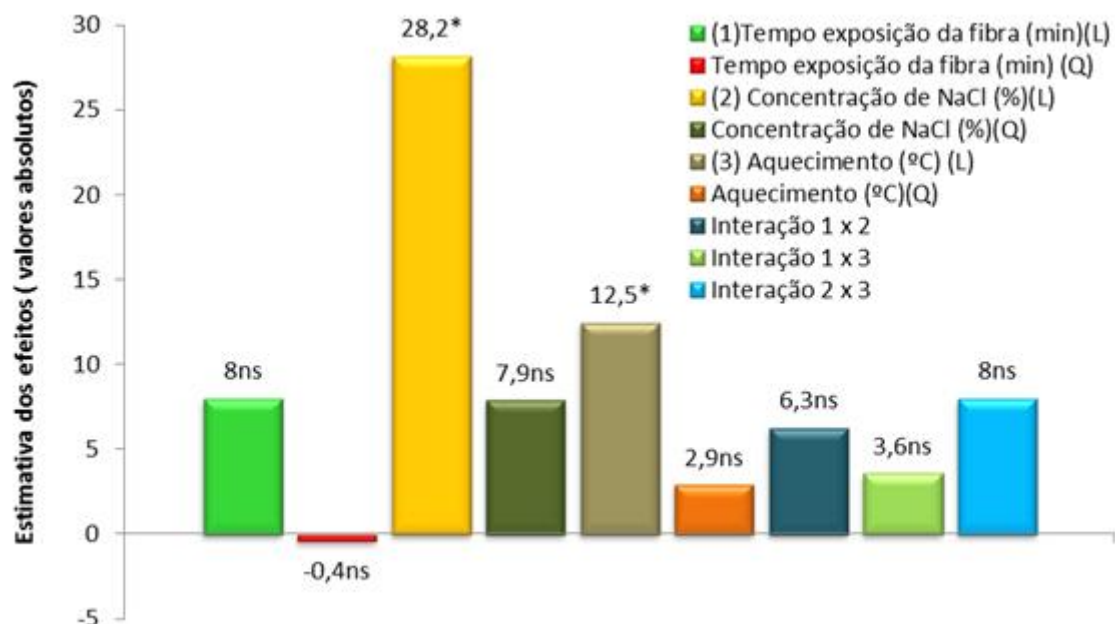


Figura 8 Estimativa dos efeitos lineares com erro padrão dos fatores avaliados sobre a concentração de ácido butírico. \*: significativo ao nível de 10% de significância, ns: não significativo.

Na Equação 3 descreve-se a concentração do ácido butírico (CAB) em  $\text{mg.L}^{-1}$  em função da concentração de NaCl (C) e do aquecimento (AQ). Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para análise de variância.

$$\text{CAB} = 25,81 + 14,12 \text{ C} + 6,27 \text{ AQ} \quad \text{Eq. (3)}$$

O modelo para a concentração do ácido propiônico foi avaliado na análise de variância apresentada na Tabela 7. Observa-se que o valor da medida de adequação do ajuste do modelo foi igual a 0,8010, o modelo explica bem a variação total dos resultados (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 7 Resumo da análise de variância para o ajuste do modelo para a concentração do ácido butírico

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Quadrado Médio	$F_c$	$F_{\text{tab}}$	$F_c/F_{\text{tab}}$
Regressão	3.257,93	2	1628,97	28,17	2,73	10,32
Resíduo	809,62	14	57,83	-	-	-
Falta de ajuste	691,14	12	57,60	0,97	9,41	0,10
Erro Puro	118,48	2	59,24	-	-	-
<b>Total</b>	<b>4.067,55</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Coefficiente de correlação  $R^2 = 80,10\%$ ;  $F_c$ : valor calculado;  $F_{tab}$ : 10% significância

A regressão foi considerada significativa, devido ao fato da relação entre o valor de  $F_c/F_{tab}$  ter sido maior que um. Na análise da falta de ajuste, com relação ao  $F_c/F_{tab}$  foi menor que um, o modelo foi considerado ajustado.

Com a validação e o ajuste do modelo aos dados experimentais, foi possível gerar a representação gráfica e a superfície de resposta que são apresentadas na Figura 9.

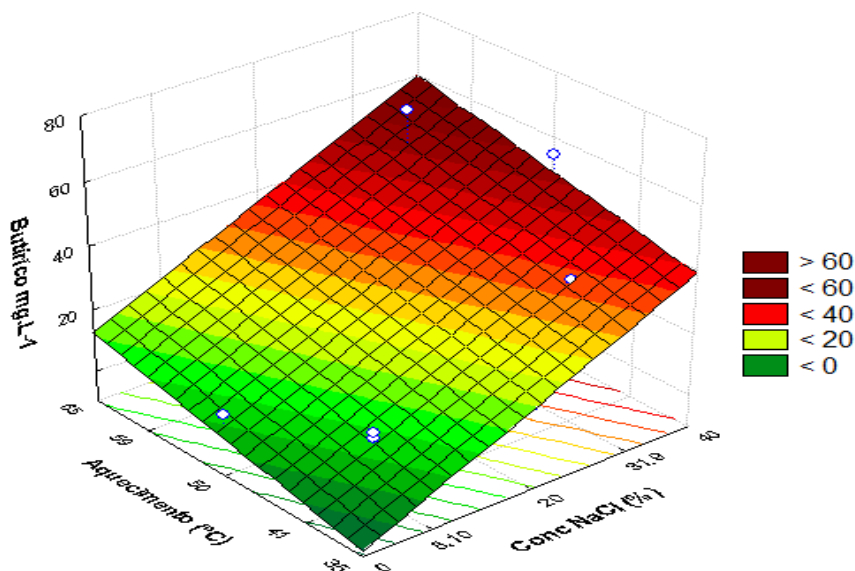


Figura 9 Superfície de resposta para o parâmetro concentração do ácido butírico ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) em função dos fatores aquecimento ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de NaCl (%).

Na Figura 9 verificam-se os efeitos lineares do aquecimento ( $^{\circ}\text{C}$ ) e da concentração de NaCl (%). Observa-se que o aumento do aquecimento de 35 a 65  $^{\circ}\text{C}$  e a concentração de NaCl de 0% a 40% inferem no aumento da concentração do ácido butírico, demonstrando o efeito positivo desses fatores.

O máximo de aquecimento, nas condições estabelecidas, com a máxima concentração de NaCl, observa-se o aumento da concentração do ácido butírico.

Helena *et al.* (2010) usaram MEFS-CG para otimização e validação de método para avaliação de compostos de BTEX em água. Foi utilizada a fibra MEFS Carboxen/Polydimethylsiloxane, 24 *ga*, 75 mm (Supelco™). Na otimização das condições analíticas do método foi escolhido o CG-EM (Espectrometria de massa) e extração por *headspace* e MEFS. Vários parâmetros analíticos foram otimizados, tais como tempo e temperatura de extração, quantidade de NaCl na solução, relação entre as fases líquida e vapor, além do controle de temperatura e tempo para a extração por MEFS. A condição que proporcionou a resposta mais satisfatória para o método definido foi: temperatura de 80  $^{\circ}\text{C}$ , tempo de exposição da fibra (extração) de 30 min, 2,50 g (25%) de cloreto de sódio e fração de fase de 50%, ou seja, 10,0 mL de solução e 10,0 mL de *headspace*.

No estudo de Komatsu e Vaz (2004), foi verificado que para a determinação de pesticidas em água o melhor tempo de exposição da fibra para extração do analito foi de 30 min, a sensibilidade do método de extração aumenta na presença de NaCl na solução, pois com o aumento da concentração iônica da fase aquosa, os analitos são conduzidos do meio da solução para a fibra, devido ao efeito “salting out”. Observou-se que para os compostos com grupamentos ácidos ou básicos, o método de extração para amostras aquosas no modo direto pode ser dificultado, devido à alta afinidade do analito com a matriz; por esse motivo o pH baixo facilitou a extração.

Àbalos, Bayona e Pawliszyn (2000) desenvolveram um procedimento analítico baseado em MEFS por headspace acoplada a GC/Espectrometria de Massa para a determinação de ácidos orgânicos voláteis livres em amostras de água residuária. A fibra de MEFS com revestimento de polidimetilsiloxano-Carboxen foi mais eficiente na extração de ácidos orgânicos de cadeia mais curta (acético e propiônico). Para favorecer a volatilização dos compostos da fase aquosa para o headspace reduziram o pH da amostra e os ácidos demonstraram maior afinidade com a fibra. Observaram também que a saturação da fase aquosa com NaCl aumenta a transferência dos ácidos da fase aquosa para a fase do gás, as condições ótimas relatadas foram pH 1,5 e solução saturada de NaCl. A extração foi realizada em 20 min a 25 °C com agitação vigorosa e a dessorção no injetor ocorreu em 5 min a 300 °C; o procedimento mostrou-se confiável para o monitoramento de águas residuárias.

Na Figura 10 estão apresentadas as condições otimizadas para cada um dos fatores do processo e os valores previstos para as respostas. A desejabilidade global foi igual a 91,9% das respostas desejadas.

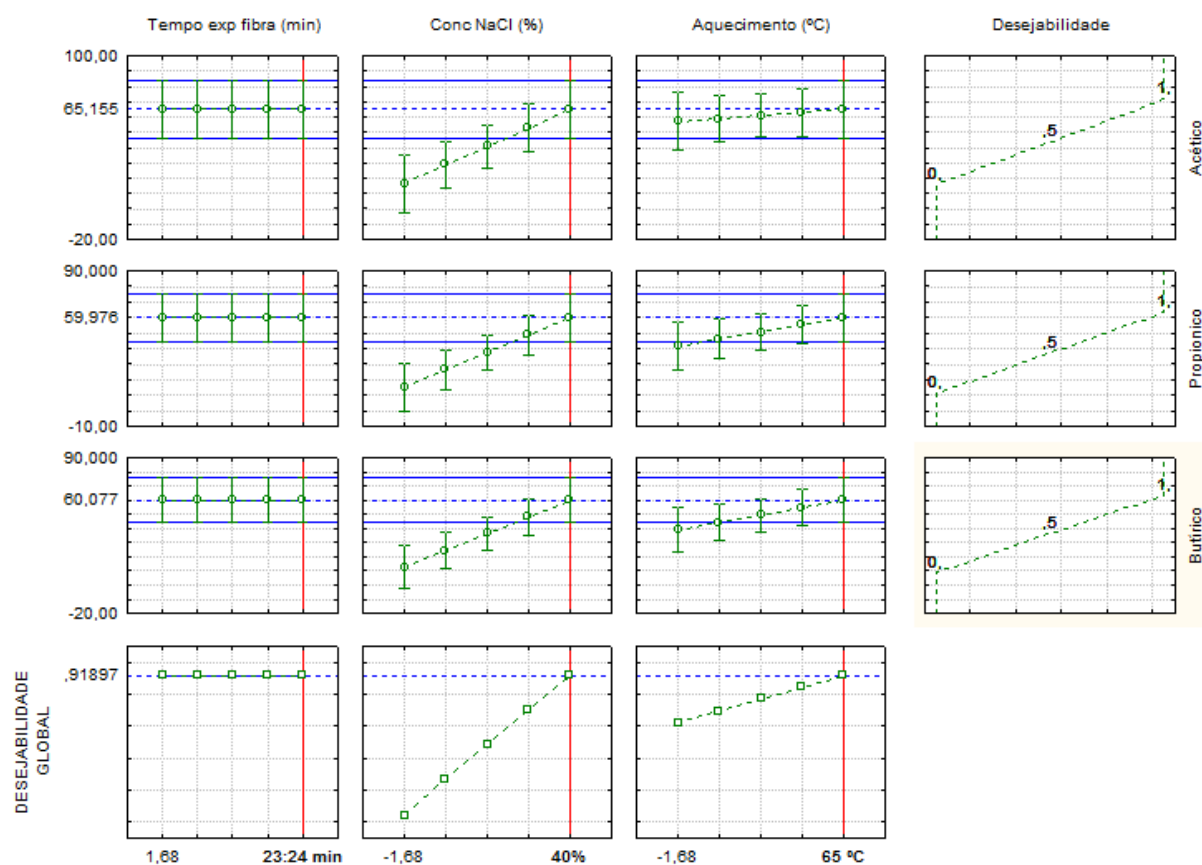


Figura 10 Análise de desejabilidade para a recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico em função dos fatores tempo de exposição da fibra, concentração de NaCl e aquecimento.

Na Tabela 8 apresentam-se os valores otimizados para as condições de recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico. O tempo de exposição da fibra deverá ser de 23:24 minutos, a concentração de cloreto de sódio deverá ser de 40% e a temperatura de aquecimento igual a 65 °C.

Tabela 8 Valores codificados e reais para os fatores de recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico resultantes da otimização global do processo

Fator	Valor codificado	Valor real
Tempo de exposição da fibra	1,68	23:24 min
Concentração de NaCl	1,68	40%
Aquecimento	1,68	65 °C

As respostas para essas condições estão também apresentadas na Figura 10 e tem-se: para o ácido acético, 65,15%; para o ácido butírico, 59,98%; e para o ácido butírico, 60,08% de recuperação. Porém, esses valores podem apresentar, nas condições de recuperação estabelecidas pela Tabela 11, uma variação de 8% devido à desejabilidade global ter sido 91,9%, sendo inferior a 1, o que representaria 100%.



## 6 CONCLUSÕES

O aumento do tempo de exposição da fibra, a concentração de NaCl e o aquecimento da solução contribuíram significativamente para a recuperação dos ácidos acético, propiônico e butírico.

A avaliação simultânea das respostas e as condições ótimas para o processo foram definidas como: tempo de exposição da fibra a 23:24 minutos, concentração de NaCl igual a 40% e aquecimento a 65 °C.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível, durante a condução desse trabalho, realizar a etapa de correlação dos resultados obtidos dos ácidos acético, propiônico e butírico por MEFS com resultados da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC. Sugere-se, então, que sejam efetuadas análises nas condições experimentais ótimas encontradas e os dados comparados com o método HPLC.

## 8 REFERÊNCIAS

ÀBALOS M.; BAYONA J. M.; PAWLISZYN J. Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. **Journal of Chromatography A**. p. 107–115, 2000.

ALVES, L. R. A.; FELIPE, F. I.; GEROTO, C. G.; CARDOSO, C. E. L. **Produção paranaense de fécula sustenta oferta brasileira em 2009**. CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, ESALQ/USP – Piracicaba, 2010.

ASSIS, L. H. B.; CARVALHO, S. P.; SOUZA, G. A.; BALIZA, D. P.; OLIVEIRA, M. V. C. Caracterização de clones de mandioca utilizando marcadores microssatélites. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 1, jan./mar., 2012.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, New York, v. 62, p. 2145-2148, october, 1990.

BARANA, A C. Despoluição da manipueira e uso em fertilização do solo. I Simpósio Nacional sobre a Manipueira. Vitória da Conquista-Bahia, 2008. (Palestra durante o I Simpósio Nacional sobre a Manipueira).

BARROS, A. R. Influência de diferentes materiais suporte na produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leite fluidizado. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Carlos. São Carlos, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas - SP, 2010.

BARROS, G.S.C.; CARDOSO, C.E.L.; GAMEIRO, A.H.; GUIMARÃES, V. D. A.; OLIVEIRA, P.A.; BARBARI, S. A. G. **Melhoria da competitividade da cadeia agroindustrial de mandioca no estado de São Paulo**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2003.

BECKER, R. W. Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, Derivatização e CG-MS. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. Planejamento de experimentos usando o Statistic. **E-Papers Serviços Editoriais**. Rio de Janeiro, 2003, 260p.

CASSONI, V. Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (manipueira) por acetificação. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp. Botucatu, 2008.

CEREDA, M.P.; TAKAHASHI, M. **Cassava wastes**: their characterization, and uses and treatment in Brazil. In: DUFOUR, D.; O'BRIEN, G.M.; BEST, R. (Eds.). Cassava flour and starch: Progress in research and development. Colombia: CIAT. Publicação n°. 271, 1996.

CHAVES, A. T. C. A. Otimização do processo de produção de biodiesel etílico do óleo de girassol (*Helianthus annuus*) aplicando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.

CHRIST, D. **Secagem de clara de ovo em leite de jorro fluidizado bidimensional**. 2006. Tese (Doutorado – Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas - SP, 2006.

CORDEIRO, G. Q. Tratamento de manipueira em reator anaeróbio compartimentado. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2006.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. **Mandioca e derivados**. Embrapa Mandioca e Fruticultura. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>. > Acesso em 24 jan. 2012.

GROXK, M. **Análise da conjuntura agropecuária Safra 2011/12**. Out. 2011. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/mandiocultura\\_2011\\_12.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/mandiocultura_2011_12.pdf)>. Acesso em 23 jan. 2012.

HELENO, F.F.; LIMA, A. C.; AFONSO, R.; COUTRIM. M. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por *headspace* e microextração em fase sólida. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.2, p 329-336, 2010.

KOMATSU, E.; VAZ, J.M.; Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de Pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.5, p 720-724, 2004.

KUNZLER, K. R. Desempenho de reatores anaeróbios com meio suporte de bambu sob diferentes cargas orgânicas em duas relações comprimento:diâmetro no tratamento de efluentes de fecularia. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, 2010.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central . **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI, M.I.S.; SARMENTO, S.B.S. **Processamento de mandioca**: iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial. Brasília DF: EMBRAPA/SEBRAE, parte 1, cap. 2, p.19-30. (Série Agronegócios), 2003.

NICOLLI, K. P. Novo revestimento de fibra MEFS sintetizada pelo método sol-gel para análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.

PASTORE, N. S. Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e concentração de sacarose na produção de ácido cítrico por *aspergillus niger* usando manipueira como substrato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Toledo, 2010.

PINTO, P. H. M. Tratamento de manipueira de fecularia em biodigestor anaeróbio para disposição em corpo receptor, rede pública ou uso em fertirrigação. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

POPPI, N.; GEBARA, S. S.; PRATES, C. B. Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por *headspace* com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. XY, n. 00, p. 1-5, 2011.

REGINATTO, V.; KURTZ, D.; MARCON, M. J. A.; XAVIER, J. J. M.; SCUSSEL, V. M.; AMANTE, E. R. Modificação do processo de produção de polvilho azedo visando o aumento na concentração de ácidos orgânicos na água residuária. **2<sup>nd</sup> International Workshop | Advances in Cleaner Production**. São Paulo, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Editora Cárita, 2009. 353 p.2a. ed.

SANTOS, A. **Usos e impactos ambientais causados pela manipueira na microrregião sudoeste da Bahia – Brasil**. Tese Doutorado. Universidade de Barcelona. Barcelona, 2009.

SARTORATTO, A. **Desenvolvimentos metodológicos em microextração em fase sólida acoplada a cromatografias gasosa e líquida**. Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

SPINHIRNE, J.P.; KOZIEL, J.A.; CHIRASE, N.K.; Characterizing volatile fatty acids and other gases in a rumen closed in vitro fermentation system using solid phase microextraction. **American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v.46, p. 585-588, 2002.

STATSOFT, INC. STATISTICA for Windows (Data analysis software system), versão 8 Tulsa, OK: 2005.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Revista Química Nova**, Campinas-SP, v. 23, p. 523-530, 2000.

## 9 APÊNDICES

**Tabela 1** Efeitos lineares, quadráticos e das interações do planejamento DCCR 2<sup>3</sup> para a resposta de concentração de ácido acético

Fator	Efeito	Desvio Padrão (erro puro)	t (2)	P	Limite de confiança - 90%	Limite de confiança +90%
Média	30,43210	5,443666	5,590369	0,030540	14,5367	46,32753
(1) Tempo exposição da fibra (min)(L)	13,09458*	5,115774	2,559648	0,124711	-1,8434	28,03257
Tempo exposição da fibra (min) (Q)	-0,11112	5,635933	-0,019716	0,986060	-16,5680	16,34573
(2) Concentração de NaCl (%) (L)	28,81152*	5,115774	5,631897	0,030111	13,8735	43,74950
Concentração de NaCl (%) (Q)	5,83418	5,635933	1,035175	0,409347	-10,6227	22,29102
(3) Aquecimento (°C) (L)	4,89047	5,115774	0,955958	0,439978	-10,0475	19,82845
Aquecimento (°C) (Q)	10,25772	5,635933	1,820057	0,210356	-6,1991	26,71456
Interação 1 x 2	7,73900	6,681130	1,158337	0,366352	-11,7698	27,24780
Interação 1 x 3	1,12100	6,681130	0,167786	0,882184	-18,3878	20,62980
Interação 2 x 3	4,12400	6,681130	0,617261	0,599974	-15,3848	23,63280

Em que: \*Coeficiente estatisticamente significativo (p&lt;010)

**Tabela 2** Efeitos lineares, quadráticos e das interações do planejamento DCCR 2<sup>3</sup> para a resposta de concentração de ácido propiônico

<b>Fator</b>	<b>Efeito</b>	<b>Desvio Padrão (erro puro)</b>	<b>t (2)</b>	<b>p</b>	<b>Limite de confiança - 90%</b>	<b>Limite de confiança +90%</b>
Média	23,99902	4,429204	5,418359	0,032415	11,0658	36,93223
(1)Tempo exposição da fibra (min)(L)	9,13495	4,162417	2,194626	0,159411	-3,0192	21,28915
Tempo exposição da fibra (min)(Q)	0,08556	4,585641	0,018659	0,986807	-13,3044	13,47557
(2)Concentração de NaCl (%)(L)	26,71860*	4,162417	6,419012	0,023420	14,5644	38,87280
Concentração de NaCl (%)(Q)	6,99599	4,585641	1,525630	0,266621	-6,3940	20,38600
(3)Aquecimento (°C)(L)	10,94326*	4,162417	2,629065	0,119328	-1,2109	23,09746
Aquecimento (°C)(Q)	3,73600	4,585641	0,814717	0,500818	-9,6540	17,12601
Interação 1 x 2	6,17725	5,436059	1,136347	0,373634	-9,6960	22,05046
Interação 1 x 3	2,90325	5,436059	0,534073	0,646707	-12,9700	18,77646
Interação 2 x 3	6,18925	5,436059	1,138555	0,372895	-9,6840	22,06246

Em que: \*Coeficiente estatisticamente significativo (p<010)

**Tabela 3** Efeitos lineares, quadráticos e das interações do planejamento DCCR 2<sup>3</sup> para a resposta de concentração de ácido butírico

Fator	Efeito	Desvio Padrão (erro puro)	t (2)	p	Limite de confiança - 90%	Limite de confiança +90%
Média	21,61652	4,434460	4,874667	0,039600	8,6680	34,56508
(1)Tempo exposição da fibra (min)(L)	7,97442	4,167356	1,913544	0,195795	-4,1942	20,14304
Tempo exposição da fibra (min)(Q)	-0,38923	4,591083	-0,084780	0,940159	-13,7951	13,01666
(2)Concentração de NaCl (%) (L)	28,24687*	4,167356	6,778128	0,021080	16,0783	40,41550
Concentração de NaCl (%) (Q)	7,92993	4,591083	1,727246	0,226265	-5,4760	21,33582
(3)Aquecimento (°C)(L)	12,53711*	4,167356	3,008408	0,095007	0,3685	24,70573
Aquecimento (°C)(Q)	2,93028	4,591083	0,638255	0,588639	-10,4756	16,33618
Interação 1 x 2	6,31325	5,442510	1,159989	0,365811	-9,5788	22,20530
Interação 1 x 3	3,58825	5,442510	0,659301	0,577465	-12,3038	19,48030
Interação 2 x 3	7,97975	5,442510	1,466189	0,280251	-7,9123	23,87180

Em que: \*Coeficiente estatisticamente significativo (p<010)