UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO "STRICTO SENSU" EM ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE FIBROÍNA DA SEDA COMO DISPOSITIVOS ADSORVENTES PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

VINÍCIUS MÜLLER

TOLEDO – PR - BRASIL Julho de 2014

VINÍCIUS MÜLLER

ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE FIBROÍNA DA SEDA COMO DISPOSITIVOS ADSORVENTES PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Elvio Antônio De Campos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Soraya Moreno Palácio

TOLEDO – PR - BRASIL Julho de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais, Armando e Neise, as minhas irmãs Márcia e Eliane e a minha namorada Marilia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pelo material, equipamentos e laboratório cedidos para realização de parte deste trabalho, além do apoio e amizade.

A Prof. Dr. Silvia Luciana Fávaro, pela amizade, ajuda e apoio nas análises de MEV.

Aos colegas e amigos do PD&I da Prati-donaduzzi pela ajuda nas análises cromatográficas e validação de metodologia, especialmente Willaine, Juliana e Natália.

Aos colegas e amigos de mestrado, pela amizade, apoio e ajuda durante as aulas, trabalhos e seminários.

À UNIOESTE, pelo programa de mestrado e viabilização de execução deste trabalho

À UEM pelo material, equipamentos e laboratórios cedidos para realização de parte do preparo do material e análises, especialmente aos colegas do laboratório 18.

Aos professores, colega e funcionários do Departamento de Engenharia Química da UNIOESTE.

A Prati-donaduzzi pelo apoio e suporte na execução das análises cromatográficas e validação de metodologia.

A meus pais, irmãs, cunhados e sobrinhos, e toda minha família pelo amor, apoio, educação e força.

A todos os meus amigos pela amizade, carinho e apoio.

A minha namorada, Marília, pelo amor, paciência, companheirismo e ajuda durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

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

"Se você quer descobrir os segredos do Universo, pense em termos de energia, frequência e vibração.".

Nikola Tesla

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Microextração em Fase Sólida – SPME	5
3.1.1. Técnicas de Extração e Vantagens da SPME	5
3.1.2. Princípio de Extração e Dessorção em SPME	6
3.1.3. Modos de Extração em SPME	7
3.1.4. Tipos de fibras recobertas para SPME	9
3.2. Eletrofiação1	1
3.2.1. Desenvolvimento da Técnica de Eletrofiação1	1
3.2.2. Processo de Formação de Nanofibras via Eletrofiação 12	2
3.2.3. Aplicações da Eletrofiação1	5
3.3. Fibroína da Seda 10	6
3.4. Delineamento Experimental Fatorial1	7
3.5. Metodologia Analítica Aplicada a SPME 18	8
3.5.1. Cromatografia Gasosa18	8
3.5.2. Desenvolvimento Analítico e Validação1	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS 2 ⁷	1
4.1. Obtenção da Fibroína da Seda Regenerada2	1
4.1.1. Remoção da Sericina das Fibras dos Casulos do Bicho-da-Seda 2	1
4.1.2. Preparação da Solução de FS2	1
4.2. Preparação das Nanofibras de FSR como Dispositivos Adsorventes para	а 2

SUMÁRIO

4.2.1. Preparo da Solução da FSR 22					
4.2.2. Processo de Eletrofiação da FSR 22					
4.3. Delineamento Experimental Fatorial 2 ²					
4.4. Caracterização dos Dispositivos para SPME Compostos por Nanofibras de					
4.4.1. Microscopia Eletrônica De Varredura					
4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e					
Reflexão Total Atenuada 26					
4.4.3. Análises Térmicas 26					
4.5. Tratamento Térmico dos Dispositivos para SPME Recobertos com Nanofibras de FSR					
4.6. Medidas Cromatográficas e Otimização dos Parâmetros de					
Extração/Dessorção27					
4.6.1. Sistema de Cromatografia Gasosa 27					
4.6.2. Preparo da Solução Analítica de Álcool Isopropílico					
4.6.3. Otimização dos Parâmetros de Extração e Dessorção 28					
4.7. Validação da Metodologia Analítica 29					
4.7.1. Linearidade					
4.7.2. Especificidade					
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31					
5.1. Caracterização dos Dispositivos para SPME					
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura					
5.1.2. Delineamento Experimental Fatorial 2 ²					
5.1.3. Análises Térmicas 42					
5.2. Tratamento Térmico dos Dispositivos para SPME Recobertos com Nanofibras de FSR 43					
5.3. Análise por Espectroscopia na Região do Infravermelho – FTIR-ATR 46					

	5.4. Ar	nálises cromatográficas	. 48
	5.4.1.	Desenvolvimento analítico	. 48
	5.4.2.	Tempo de Extração	. 50
	5.4.3.	Tempo de Dessorção	. 51
	5.5. Va	lidação do Método Analítico	. 52
	5.5.1.	Linearidade	. 52
	5.5.2.	Especificidade	. 54
	6. CONCL	USÃO	. 56
-	7. REFERÉ	ÈNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 58
8. APÊNDICE			

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Dispositivo adsorvente constituído por fibra adsorvente acoplado a um adaptador para SPME
Figura 3.2: Microextração em fase sólida, processo de adsorção (a) e processo de dessorção (b) de analitos07
Figura 3.3: Modos de operação de SPME: (A) extração direta; (B) <i>headspace</i> SPME; e (C) proteção por membrana
Figura 3.4: Processo de extração e posterior dessorção térmica de uma amostra a partir de SPME via a) extração direta e b) <i>headspace</i> 09
Figura 3.5. Nanofibras poliméricas (ao fundo) em relação a um grão de pólen (esquerda) e a um fio de cabelo humano (direita)12
Figura 3.6. Representação esquemática do processo de eletrofiação aplicado na produção de nanofibras poliméricas13
Figura 3.7. Representação da estrutura molecular da FS. Adaptada de SHANG <i>et al.</i> (2013)
Figura 4.1. Processo de extração e purificação da FSR a partir de casulos do bicho- da-seda por meio do processo de solubilização/regeneração
Figura 4.2. Representação esquemática dos componentes para o processo de
eletrofiação aplicado na produção de nanofibras poliméricas coletadas em uma
fibra para SPME23
Figura 5.1: Microscopia eletrônica de varredura das fibras de sílica fundida recobertas com nanofibras de FSR nas condições: vazão de 0,5 mL h ⁻¹ e distância de 9 cm (a e b), vazão em 0,35 mL h ⁻¹ e distância de 7 cm (c e d) e vazão em

0,2 mL h⁻¹ e distância de 12 cm (e e f)......32

Figura 5.3: Imagens obtidas por MEV 5.000 x de ampliação a) e b) distribuição dos diâmetros médios das nanofibras de FSR. Diâmetro médio 304 ± 46 nm.......34

Figura 5.8. Mapa de contorno a) e superfície de resposta b) para os resultados experimentais do delineamento experimental fatorial 2². Resposta diâmetro médio (nm) em função da vazão (mL h⁻¹) e distância (cm)......41

Figura 5.13: Cromatograma de uma injeção "branco", com o dispositivo para SPME recoberto com nanofibras de FSR na ausência de analitos......49

Figura 5.14: Cromatograma de uma injeção com dispositivo SPME recoberto com nanofibras de FSR de uma solução contendo AIS a 50 ppm de concentração.......49

Figura 8.4: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 4)......70

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Tabela comparativa entre os diferentes tipos de fibras recobertas paraSPME disponíveis comercialmente
Tabela 4.1. Variáveis e níveis utilizados no delineamento experimental fatorial 2 ² .24
Tabela 4.2. Planejamento fatorial 2 ² para as variáveis codificadas: vazão (mL h ⁻¹) e distância (cm). Experimentos efetuados em duplicata nos pontos axiais e triplicada no ponto central
Tabela 4.3. Sistema cromatográfico: CG Varian® 3900, detector de ionização dechama (FID); coluna: G43, 30m x 0,53 mm, 3 µm
Tabela 4.4. Diluições e concentrações das soluções de AIS para estudo de linearidade
Tabela 4.5. Diluições e concentrações da solução padrão de Metanol, AIS eAcetado de Etila para estudo de Especificidade
Tabela 5.1. Delineamento experimental fatorial 2² para as variáveis vazão (mL h-¹)e distância (cm) em duplicata com triplicada no ponto central e resposta diâmetromédio (nm) das nanofibras de FSR
Tabela 5.2. Analise de variância (ANOVA) para superfície de resposta do modelolinear para o diâmetro médio das nanofibras de FSR
Tabela 5.3. Principais tipos de revestimentos para SPME: Temperatura máxima efaixa de temperatura recomendada para o processo de dessorção térmico45
Tabela 5.4 . Bandas características presentes nos espectros de FTIR-ATR da FSRe das fibras obtidas da FSR por eletrofiação e tratadas com metanol47
Tabela 5.5 . Área dos picos cromatográficos de AIS, média e desvio padrão em diferentes tempos de extração, mantendo o tempo de dessorção fixo em 10 minutos

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AF	Ácido Fórmico
AIS	Álcool Isopropílico
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DVB	Divinilbenzeno
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DESVPAD	Desvio Padrão
DMF	Dimetilformamida
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
FID	Detector de Ionização de Chama
FS	Fibroína da Seda
FSR	Fibroína da Seda Regenerada
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e
	acessório de Reflexão Total Atenuada (Fourier Transform Infrared
	Spectroscopy with Attenuated Total Reflection)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
QbD	Qualidade pelo Desenho (<i>Quality by Design</i>)
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietileno glicol
PS	Poliestireno
R	Coeficiente de Correlação Linear
R²	Coeficiente de Determinação
R ² pred	Coeficiente de Determinação Predito
R ² adj	Coeficiente de Determinação Ajustado
RSF	Regenerated Silk Fibroin
SPME	Microextração em Fase Sólida (Solid Phase Microextraction)
TGA	Análise Termogravimétrica
THF	Tetrahidrofurano

ELETROFIAÇÃO DE NANOFIBRAS DE FIBROÍNA DA SEDA COMO DISPOSITIVOS ADSORVENTES PARA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

AUTOR: VINÍCIUS MÜLLER

ORIENTADOR: PROF. DR. ELVIO ANTONIO DE CAMPOS

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defendida em 04 de julho de 2014. 77 p.

RESUMO

A técnica de eletrofiação foi aplicada no revestimento de fibras de sílica fundida por nanofibras de fibroína de seda regenerada (FSR). Os parâmetros do processo de eletrofiação foram avaliados por meio de delineamento experimental fatorial 2². Este estudo mostrou que as variáveis vazão da solução e distância entre capilar-coletor foram estatisticamente significativas na resposta diâmetro médio. O modelo obtido foi validado através da análise de variância (ANOVA) e metodologia de superfície de resposta. O material foi empregado em Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction* "SPME") na extração de amostras contendo um álcool de cadeia pequena, aplicado em cromatografia gasosa (CG).

O dispositivo recoberto foi caracterizado por meio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR-ATR) e análises térmicas (DSC e TGA). As fibras recobertas com nanofibras de FSR foram avaliadas morfologicamente através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por meio dos resultados das análises de MEV, observou-se que foi possível obter fibras em escala nanométrica, com diâmetro médio em torno de 304 ± 46 nm. As fibras também foram submetidas a tratamento térmico em forno (100°C a 250°C). Não ho uve fusão das fibras até 250°C (até 4 h de tratamento), e poucos danos estru turais. As análises térmicas da FSR e do dispositivo recoberto com as nanofibras de FSR mostraram que o material eletrofiado manteve a estabilidade térmica, com perda por degradação térmica a

partir de 250 °C. Os ensaios em CG demonstraram que o branco com o dispositivo de SPME recoberto não interferiu no método proposto para a análise de álcool isopropílico (AIS). Os tempos de extração e dessorção do analito foram otimizados em 20 min e 10 min, respectivamente. A metodologia foi avaliada quanto à linearidade e especificidade. Na faixa de concentração de 10 a 500 ppm de AIS, o método foi linear, com R=0,9927 e seletivo, apresentando alta resolução entre os picos de metanol, AIS e acetato de etila. O processo de eletrofiação da FSR como recobrimento do dispositivo mostrou grande potencial para emprego em SPME devido a sua grande área superficial, estabilidade térmica e facilidade no processo, bem como potencial para aplicação em extração de alcoóis e análise em CG.

Palavras-chave: eletrofiação, nanofibras, fibroína da seda, microextração em fase sólida, adsorção, cromatografia gasosa.

SILK FIBROIN NANOFIBERS ELECTROSPUN AS ADSORBENTS DEVICE FOR SOLID PHASE MICROEXTRACTION

AUTHOR: VINÍCIUS MÜLLER

SUPERVISIOR: PROF. DR. ELVIO ANTONIO DE CAMPOS

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on July, 4th 2014. 77 p.

ABSTRACT

Electrospinning technique was applied in the covering of fused silica fibers by regenerated silk fibroin nanofibers (RSF). The parameters of electrospinning process were evaluated through factorial experimental design 2². This study showed the variables flow of solution and capillary-collector distance were statistically significant in the medium diameter response. The model obtained was validated through variance analysis (ANOVA) and response surface methodology. The material was used at solid phase micro extraction (SPME) in the extraction of samples containing a small chain alcohol, applied at gas chromatography (GC).

The recovered device was characterized through Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) and thermal analysis (DSC and TGA). The RSF nanofibers covered fibers were morphologic evaluated through scanning electronic spectroscopy (MEV). The results of MEV showed that was possible to obtain fibers in nanoscale, medium diameter around 304 ± 46 nm. The fibers were also submitted to simulated thermal treatment (100° to 250°). There was no fusion between the fibers until 250° (4 hours of treatment), and a little structural damage. The thermal analysis of FRS and covered FRS nanofibers device showed that the electrospun material maintained the thermal stability, with loss due thermal degradation from 250° . The GC ass ay demonstrated the standard SPME covered device didn't interfere on the suggested method to the alcohol isopropyl analysis (AIS). The times of extraction and desorption were

optimized in 20 minutes and 10 minutes, respectively. The methodology was evaluated about linearity and specificity. In the concentration between 10 to 500 ppm of AIS, the method was linear, with R^2 = 0,9927 and selective, with high resolution between peaks of methanol, AIS and ethyl acetate. Electrospinning process of RSF as covering device showed great potential to use in SPME due its high surface area, thermal stability and easiness process, as well as potential to application in extraction of alcohols and GC analysis.

Keywords: electrospinning, nanofibers, silk fibroin, solid phase microextraction, adsorption, gas chromatography.

1. INTRODUÇÃO

A Microextração em Fase Sólida (do inglês Solid Phase Microextraction SPME) foi desenvolvida como alternativa às técnicas de extração usuais (ZHANG *et al.*, 1994). Essa técnica dispensa o uso de solventes orgânicos extratores ou longos ciclos de purificação de amostras conforme nas técnicas tradicionais. Os dispositivos adsorventes em SPME podem ser seletivos, o que minimiza as perdas de analitos, mesmo de amostras diminutas ou voláteis. Outra vantagem é a ausência de várias etapas de extração, purificação e concentração da amostra, tendo em vista que essas etapas se fundem em apenas uma quando se utiliza a SPME.

Na SPME, o dispositivo adsorvente é constituído por uma fibra recoberta com material adsorvente, que atuará como fase extratora. Os analitos serão extraídos e concentrados na superfície adsorvente desse dispositivo, regido pela afinidade entre as espécies. O mecanismo de extração ocorre imergindo-se a fibra recoberta com material adsorvente na amostra de forma direta, ou no seu *headspace*. Os analitos que têm afinidade pela superfície da fibra migram da amostra e adsorvem no material até se obter o equilíbrio entre o analito e o filme adsorvente. A quantidade extraída dos analitos é uma função da constante de equilíbrio entre o recobrimento e o analito. Em determinadas condições de extração, haverá um limite em que a massa do analito extraída pelo filme adsorvente não irá aumentar com o tempo, atingindo-se assim o equilíbrio. Transcorrido o tempo de extração, essa fibra é recolhida do contato com a amostra e dessorvida termicamente para separação e detecção em cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os principais fatores que podem influenciar nas condições de equilíbrio incluem a força iônica da solução contendo a amostra, a temperatura da amostra no momento da extração, a temperatura de dessorção, o pH, a velocidade de agitação da amostra, além das características intrínsecas ao dispositivo adsorvente, como espessura do filme de recobrimento e natureza física e química

(ZEWE *et al.,* 2010). A escolha correta do material que compõe o dispositivo ou de seu recobrimento possibilita extrações seletivas e eficientes.

Atualmente, o que tem contribuído para a contínua expansão da técnica de SPME é o desenvolvimento de novos revestimentos adsorventes, procurando-se melhorar suas características, como eficiência de extração e seletividade. As fibras disponíveis comercialmente são geralmente consistidas por fibras de sílica fundida revestidas com polímeros, que variam desde polidimetilsiloxano (PDMS) para compostos apolares ou poliacrilato (PA) para os compostos polares (SHIREY, 2012). Um dos principais desafios desta técnica é desenvolver recobrimentos para os dispositivos empregados na SPME que sejam de baixo custo, seletivos, estáveis termicamente e de fácil produção (DIETZ *et al.,* 2006). Muitos métodos diferentes podem ser utilizados para gerar diferentes recobrimentos de fibras aplicadas a SPME. Para tanto, a eletrofiação de soluções poliméricas apresenta vantagens pela sua versatilidade, diversidade de materiais que podem ser utilizados, dispensa "colas" e resulta em materiais de grande área superficial e pode ser reutilizada.

Os dispositivos convencionais de SPME podem ser modificados através de revestimento físico (DUARTE *et al.*, 2010), modificação química da superfície ou técnicas de preparação (FENG *et al.*, 2013). A técnica de eletrofiação empregada em SPME possibilita revestimentos poliméricos sob hastes convencionais ou preparo de filmes finos (JIANG & PAWLISZYN, 2012). Em hastes revestidas via eletrofiação, a fase extratora é composta por nanofibras poliméricas, depositadas em um pequeno suporte de aço inoxidável ou vítreo. Os dispositivos para SPME recobertos com nanofibras fornecem uma alta área de superfície adsorvente que promove baixo limite de detecção e alta eficiência de extração. As fibras de SPME eletrofiadas podem superar os dispositivos para SPME disponíveis no mercado, apresentando alta estabilidade química e térmica (OLESIK *et al.*, 2012).

Eletrofiação envolve o emprego de um elevado campo elétrico entre uma solução de polímero passando em um capilar e um coletor condutor. Quando o campo elétrico é suficientemente alto para induzir cargas na superfície das cadeias poliméricas na solução, as gotas deformam-se num cone conhecido como cone de Taylor, formado na extremidade do capilar. Com o aumento da voltagem e a repulsão ultrapassando a tensão superficial da gota, nanofibras poliméricas são ejetadas da ponta do cone. Na trajetória até o coletor, as cadeias esticam e os jatos ficam cada vez mais finos enquanto o solvente volatiliza, formando o polímero seco em forma de fibras muito finas (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

A eletrofiação de fibras poliméricas é capaz de produzir fibras em escala micrométrica e até mesmo nanométrica, através de um método barato e simples. Nanofíbras a partir de eletrofiação têm sido aplicadas em diversos campos da pesquisa, como na engenharia de tecidos (ZHOU *et al.*, 2010) (ZHANG *et al.*, 2009), filtração e isolamento térmico, fabricação de roupas, adesivos (GUERRINI *et al.*, 2006), sensores, dispositivos condutores e curativos (PARK, 2010). Com este método empregado em revestimentos, uma grande gama de polímeros diferentes ou suas misturas de podem ser utilizados para fabricar os dispositivos para SPME com diferentes composições químicas.

A fibroína da seda (FS) é uma proteína, ou seja, um polímero natural, e principal constituinte dos casulos fabricados pelo bicho-da-seda (Bombyx mori). A estrutura química da FS mostra que ligações de hidrogênio intermoleculares são formadas, o que beneficia a geração de uma estrutura termodinamicamente estável e insolúvel em alguns solventes (HA et al., 2005). São geralmente compostas por estruturas β -folhas, com a predominância de domínios hidrofóbicos intercalados com pequenos domínios hidrofílicos que promovem a montagem da seda e dá força e resistência às fibras (VEPARI & KAPLAN, 2007). A FS produzida pelo bicho-da-seda tem ótimas propriedades mecânicas além de estabilidade térmica, biodegradabilidade, boa permeabilidade a vapores de água e outros solventes, tornando-se um candidato potencial para o emprego em eletrofiação e então na extração de analitos voláteis para SPME.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Preparar e caracterizar fibras de vidro recobertas por nanofibras de fibroína da seda regenerada, por meio da técnica de eletrofiação para emprego em microextração em fase sólida.

2.2. Objetivos Específicos

- Extrair a fibroína da seda a partir de casulos do bicho-da-seda por meio de métodos convencionais;
- Purificar a fibroína da seda extraída pelo método de diálise e caracterizar o material obtido por meio de análises térmicas e de espectroscopia na região do infravermelho;
- Obter nanofibras de fibroína da seda regenerada por meio da técnica de eletrofiação;
- Revestir fibras de sílica fundida com fibroína da seda regenerada para posterior estudo em microextração em fase sólida;
- Estudar as variáveis de processo por meio de metodologia de delineamento experimental fatorial;
- Caracterizar o material obtido por meio de microscopia eletrônica de varredura, avaliando morfologia e diâmetro médio das nanofibras;
- Estudar o comportamento e estabilidade térmica dos dispositivos adsorventes em temperaturas elevadas e vários tempos;
- Aplicar as nanofibras como dispositivo adsorvente em microextração em fase sólida em cromatografia gasosa no modo *headspace*;
- Avaliar as melhores condições cromatográficas na eficiência da extração de amostras contendo o analito álcool isopropílico;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica de preparo de amostra e separação cromatográfica;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Microextração em Fase Sólida – SPME

3.1.1. Técnicas de Extração e Vantagens da SPME

SPME é uma das várias técnicas de preparação, extração e préconcentração de amostras. SPME foi desenvolvida no início dos anos noventa pelo Professor Janusz Pawliszyn da Universidade de Waterloo, em Ontário, Canadá. Foi projetada como uma alternativa às técnicas convencionais de extração e integra amostragem, extração, concentração e introdução de amostras em uma única etapa. Permite que a extração ocorra sem o uso de solventes, por meio de uma fibra de sílica fundida ou fibra de aço inoxidável revestido com uma película fina de polímero, que atua como o solvente durante a extração de compostos (PAWLISZYN, 2012).

Ao contrário de uma extração convencional líquido-líquido, a SPME não necessita de grandes volumes de solventes orgânicos, normalmente tóxicos. Em comparação com a extração em fase sólida, a SPME apresenta vantagens, como por exemplo, minimizar a perda de analitos voláteis ou semi-voláteis e de exigir amostras pouco volumosas. A fibra é montada em um aparato semelhante a uma seringa, e atua como dispositivo para a extração de substâncias a partir de várias matrizes para posterior introdução em um sistema cromatográfico (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A técnica de SPME é simples e baseia-se principalmente na sorção dos analitos por meio de uma fibra de sílica fundida, muitas vezes modificada ou mesmo recoberta por outros materiais. O dispositivo possui diâmetro que gira em torno de 100 a 500 μ m, e cerca de 10 cm de comprimento, com recobrimento não ultrapassando poucos micrometros de espessura (DIETZ *et al.*, 2006).

Por adsorção física ou química, a superfície da sílica pode receber um recobrimento sólido adsorvente. O dispositivo é montado de forma a proteger o recobrimento da fibra adsorvente, por meio de um tubo de aço, semelhante a uma agulha, onde a fibra pode ser exposta e recolhida sem sofrer danos. A Figura 3.1 mostra os componentes básicos de um dispositivo para SPME (PAWLISZYN, 2012).



Fonte: Adaptado de PAWLISZYN, (2012).

Figura 3.1: Dispositivo adsorvente constituído por fibra adsorvente acoplado a um adaptador para SPME.

3.1.2. Princípio de Extração e Dessorção em SPME

O princípio da extração pode ser descrito como um processo de equilíbrio de partição do analito entre a fibra e a fase aquosa. Esta tecnologia foi patenteada, nos Estados Unidos da América, sob número de aplicação US 5691206, na Europa, com número de aplicação 523.092, e pedido de patente internacional número W091/15745, depositada pela Universidade de Waterloo. Inicialmente a SPME foi comercializado pela Supelco[®], Varian[®], Leap Technologies[®] e Gerstel[®].

Os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis podem ser extraídos por imersão das fibras em uma amostra líquida ou expô-las ao *headspace*, espaço superior de uma amostra sólida, líquida ou gasosa. O analito pode ser extraído por partição ou adsorver no revestimento polimérico sobre as fibras (Figura 3.2 a). Os analitos adsorvidos podem ser então dessorvidos termicamente no injetor de um CG para separação e posterior quantificação (Figura 3.2 b). Compostos de média a baixa volatilidade podem ser extraídos por fibras destinadas à utilização em CLAE. Os analitos são dessorvidos em uma interface de SPME/CLAE ou ainda extraídos em um solvente próprio para dessorção e injetados de modo convencional ou com amostrador automático.

Além das vantagens de uma técnica de preparação da amostra sem utilização de solventes, SPME é rápido de simples automação e fácil de usar. Como outras técnicas de preparação de amostras, os usuários ainda precisam entender a natureza dos analitos-alvo e da complexidade da matriz.





Figura 3.2: Microextração em fase sólida, processo de adsorção (a) e processo de dessorção (b) de analitos.

O desenvolvimento de novas aplicações e métodos progrediu rapidamente nos últimos anos. Muitas aplicações vêm ganhando destaque em termos ambientais, alimentícios, forense, em laboratórios clínicos e farmacêuticos. Tornaram-se comuns para a análise de compostos semi-voláteis e voláteis no ar, em matrizes aquosas, incluindo argilas e amostras de solo (PAWLISZYN, 2012).

3.1.3. Modos de Extração em SPME

Três modos de operação básicos de extração podem ser realizados utilizando SPME: extração direta, extração em *headspace* e uma extração envolvendo a proteção da membrana. A Figura 3.3 ilustra as diferenças entre estes modos. No modo de extração direta (Figura 3.3 A), a fibra revestida é inserida na amostra e os analitos são transportados diretamente a partir da matriz da amostra para a fase de extração. Para facilitar a extração, a agitação é necessária para

aumentar o transporte de analitos a partir da maior parte da solução para a periferia da fibra. Para amostras gasosas, a convecção natural do ar é suficiente para facilitar o rápido equilíbrio. No modo *headspace*, a fibra é inserida no espaço de cima da matriz aquosa. Apenas os analitos relativamente voláteis são extraídos. O modo *headspace* de amostragem é vantajoso para as amostras com interferentes de elevada peso molecular (Figura 3.3 B). Para as amostras contendo ambos os analitos, compostos voláteis, não-voláteis e de alto peso molecular e ainda compostos interferentes, tais como os ácidos húmicos ou proteínas, a aplicação da técnica direta ou *headspace* pode ser um desafio. Em tais casos, o uso de uma membrana para SPME protegida resulta em melhor reprodutibilidade e precisão (Figura 3.3 C) (PAWLISZYN, 2012).



Fonte: Adaptado de PAWLISZYN (2012).

Figura 3.3: Modos de operação de SPME: (A) extração direta; (B) *headspace* SPME; e (C) proteção por membrana.

O desempenho da SPME é criticamente dependente da natureza e da seleção do revestimento apropriado. O revestimento da fibra de SPME é responsável pelas substâncias à extrair e analisar. A técnica SPME é capaz de extrair uma vasta gama de analitos, voláteis e não-voláteis, polares e apolares, mas para tanto, é importante ter revestimentos da fibra que possam extrair esta gama de analitos. Sendo assim, diferentes tipos de revestimentos têm sido desenvolvidos. Diferentes materiais de revestimento permitem a extração de uma variedade de analitos com o aumento da seletividade. A Figura 3.4 a) e b) mostra as duas principais formas de extração em SPME (PAWLISZYN, 2012).



Fonte: Adaptado de PAWLISZYN, (2012).

3.1.4. Tipos de fibras recobertas para SPME

Para SPME ser amplamente aceita como uma técnica de extração qualitativa e quantitativa, as reprodutibilidades entre as fibras e a durabilidade dos revestimentos são muito importantes. Estas duas condições permitem que o analista use uma fibra para várias extrações e para se obter resultados semelhantes quando várias fibras são usadas. A reprodutibilidade das extrações

Figura 3.4: Processo de extração e posterior dessorção térmica de uma amostra a partir de SPME via a) extração direta e b) *headspace*.

usando uma única fibra é grandemente dependente da durabilidade do revestimento da fibra. Se o revestimento mantém a sua integridade, a extração repetida das mesmas amostras deve produzir resultados reproduzíveis. Depois de muitas extrações, a fibra pode lentamente perder a eficiência. Quando isto ocorre, a fibra deve ser substituída por uma nova fibra da mesma espessura e revestimento. Se o preparo das fibras for reprodutível, a nova fibra deve produzir resultados semelhantes em comparação com a fibra substituída (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Os revestimentos para SPME podem ser classificados principalmente em quatro categorias: pelo tipo de revestimento, pela espessura do revestimento, pela polaridade e pelo fato de o revestimento ser um absorvente ou um adsorvente. Um perfil de fibras comercialmente disponíveis é mostrado na Tabela 3.1. O tipo de fase aplicada determina a polaridade do revestimento. A polaridade pode proporcionar seletividade pelo aumento da afinidade do material de revestimento com analitos polares, em comparação com um revestimento apolar. Essencialmente, todas as fibras possuem bipolaridade em certo grau, porque irá extrair ambos os analitos polares e não polares. Porém são as propriedades globais do revestimento que decidem a polaridade da fibra. A superfície de PDMS, por exemplo, torna a fibra menos polar, mas se analitos polares entram em contato com os poros da fibra, podem ser extraídos. Como adsorventes porosos extraem essencialmente pelo tamanho da substância a analisar, os dois analitos, polar e apolar, podem ser extraídos. Esta é a razão pela qual essas fibras são classificadas principalmente como bipolares (PAWLISZYN, 1997).

O mecanismo de extração é determinado pelo fato de um revestimento ser do tipo absorvente ou do tipo adsorvente. A espessura do revestimento determina a capacidade analítica da fibra e o tempo de extração necessária para se alcançar o equilíbrio. Mais tempo é necessário para atingir o equilíbrio com um revestimento mais espesso em comparação com um revestimento fino (PAWLISZYN, 2012). **Tabela 3.1:** Tabela comparativa entre os diferentes tipos de fibras recobertas para SPME disponíveis comercialmente.

Tipos de Revestimentos	Mecanismo de Extração	Polaridade
7 μm PDMS*	Absorção	Apolar
30 µm PDMS	Absorção	Apolar
100 μm PDMS	Absorção	Apolar
85 μm PA**	Absorção	Polar
60 µm PEG*** (Carbowax)	Absorção	Polar
15 μm Carbopack Z-PDMS	Adsorção	Bipolar
65 μm PDMS/DVB****,	Adsorção	Bipolar
55 μm /30 μm DVB/Carboxen-PDMS	Adsorção	Bipolar
85 μm Carboxen-PDMS	Adsorção	Bipolar

* polidimetilsiloxano; **poliacrilato; ***polietileno glicol; ****divinilbenzeno Fonte: PAWLISZYN (2012).

3.2. Eletrofiação

3.2.1. Desenvolvimento da Técnica de Eletrofiação

Historicamente, os fenômenos eletrostáticos e magnéticos, bem como suas influências na produção de novos materiais, são conhecidos e estudados desde o século XVI (GILBERT, 1958). Observações mostravam que corpos carregados eletricamente tinham a capacidade de deformar gotas de água e também ejetar pequenas gotículas da ponta dessas. Vários trabalhos e pesquisas foram desenvolvidos para produção de materiais através dessa técnica. Trabalhos sobre o comportamento de fios finos produzidos a partir de soluções de diversos materiais suportados em materiais carregadas eletricamente foram reportados desde então (BOYS, 1887). Mas foi somente no final do século XIX e começo do século XX que o processo de eletrofiação ou *eletrospinning,* foi patenteado e empregado para produção de fios têxteis em dimensões bastante pequenas em escala industrial (FORMHALS, 1934).

Segundo BAJI *et al.* (2010), a técnica de eletrofiação pode produzir fibras com diâmetros diminutos, que vão de alguns nanômetros a alguns micrômetros. A fabricação de nanofibras pelo método de eletrofiação tem mostrado grandes vantagens frente a outras técnicas, devido a sua versatilidade para produzir fibras em escala nanométrica com controle da estrutura, porosidade, orientação e

dimensão. As nanofibras podem ser eletrofiadas a partir de soluções poliméricas ou do polímero fundido, ou ainda de outros materiais como cerâmicas e misturas desses (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005). Na Figura 3.5 está representado o diâmetro diminuto das nanofibras eletrofiadas em relação a um grão de pólen e a um fio de cabelo humano.



Fonte: Adaptado de ELMARCO® NANO FOR LIFE.

Figura 3.5. Nanofibras poliméricas (ao fundo) em relação a um grão de pólen (esquerda) e a um fio de cabelo humano (direita).

3.2.2. Processo de Formação de Nanofibras via Eletrofiação

Na eletrofiação via solução polimérica, é aplicada uma alta voltagem entre um capilar, por onde a solução é forçada a passar, e um coletor metálico (condutor). Isso induz a formação de cargas na solução polimérica que juntamente com o campo elétrico externo iniciarão o processo de eletrofiação (DOSHI & RENEKER, 1995). Inicialmente, a solução é mantida pela sua tensão superficial na forma de uma gota na extremidade do capilar. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se alonga para formar um cone, conhecido como cone de Taylor (TAYLOR, 1964). Quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da solução, um jato eletricamente carregado da solução é ejetado da extremidade inferior do cone de Taylor. Durante a trajetória do jato, as cadeias poliméricas carregadas com cargas iguais tendem a se repelir umas das outras, enquanto o solvente evapora, deixando o polímero sólido, livre de solvente, formando uma manta nanofibrílica carregada que se deposita no coletor. Na Figura 3.6 é ilustrado o processo de eletrofiação na produção de nanofibras poliméricas.



Fonte: Adaptado de GATFORD (2008).



Eletrofiação é um processo bastante versátil e possibilita o preparo de fibras com diferentes características. Essas diferenças são provenientes das possíveis composições das soluções poliméricas ou do processo. Combinação com outras técnicas também proporcionam materiais com potenciais aplicações, como por exemplo, em combinação com nanopartículas (YANILMAZ *et al.*, 2014; BAGHERI & ROOSTAIE, 2014). Sistemas coaxiais produzem fibras a partir de diferentes polímeros, preparados separadamente e juntos no sistema capilar coaxial apenas no momento da eletrofiação (XIA *et al.*, 2014). Essa técnica forma fibras com um material específico em sua superfície e outro em seu interior (*core/shell*) (WANG *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2014). Um exemplo é a constituição do material do capilar, pois o mesmo pode influenciar nas cargas eletrostáticas que formam o jato e consequentemente no aspecto final das fibras (XIANG *et al.*, 2013). Os aspectos da solução também influenciam nas características das fibras, como por exemplo, alta temperatura da solução polimérica (GIVENS *et al.*, 2007), adição de agentes

para polimerização e reticulação no momento da eletrofiação (KIM *et al.,* 2005; KLIMOV *et al.,* 2010) e eletrofiação em combinação com CO₂ supercrítico (SHEN *et al.,* 2006).

O aumento da tensão aplicada aumenta a força de repulsão eletrostática sobre o jato de solução polimérica, o que favorece a redução do diâmetro da fibra. Na maioria dos casos, uma tensão mais elevada provoca um maior alongamento da solução devido às maiores forças coulômbicas do jato, bem como um campo elétrico forte. Estes efeitos levam à redução do diâmetro da fibra e também a rápida evaporação do solvente. Em uma tensão maior há também uma maior probabilidade de formação de grânulos. Assim, a tensão aplicada influencia no diâmetro médio das fibras, mas o nível de significância varia com o polímero, a concentração da solução e a distância capilar-coletor (SILL & VON RECUM, 2008).

A taxa de fluxo da solução polimérica também tem um impacto sobre o tamanho, a porosidade, a forma das fibras e no processo de eletrofiação. Uma taxa de alimentação inferior é mais desejável de tal forma que haja tempo suficiente para a completa evaporação do solvente. Deve haver sempre uma taxa de fluxo mínima da solução de fiação (RAMAKRISHNA *et al.*, 2005). Segundo TAYLOR (1964), a forma de cone na ponta do capilar não pode ser mantida se o fluxo de solução através do capilar é insuficiente para substituir a quantidade de solução ejetada. MEGELSKI *et al.* (2002) examinaram efeitos da taxa de fluxo na estrutura de fibras eletrofiadas de uma solução de poliestireno (PS)/ tetrahidrofurano (THF). Eles demonstraram que tanto o diâmetro das fibras quanto o tamanho médio de poros aumentam com o aumento da taxa de fluxo. Além disso, em altas taxas de fluxo quantidades significativas de grânulos eram perceptíveis, devido à incapacidade das fibras para secarem completamente antes de chegar ao coletor (BHARDWAJ & KUNDU, 2010).

A distância capilar-coletor foi examinada como abordagem para controlar os diâmetros das fibras e respectiva morfologia. Descobriu-se que uma distância mínima é necessária para dar as fibras tempo suficiente para secar antes de alcançar o coletor. Caso contrário, com distâncias muito pequenas ou muito longas, há formação de aglomerados. Assim, há uma distância ideal entre a ponta do

14

capilar e o coletor que favoreçe a evaporação do solvente para a formação das nanofibras (SILL & VON RECUM, 2008).

3.2.3. Aplicações da Eletrofiação

As nanofibras poliméricas podem ser aplicadas em diversas áreas e produtos, incluindo sistemas de liberação modificada de drogas (YANG *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2014; SON *et al.*, 2014), engenharia de tecidos (SILL & VON RECUM, 2008; CESTARI *et al.*, 2014), sistemas de filtração (SHIN *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2014), aplicações biomédicas (AGARWAL *et al.*, 2008), sensores (ORRIACH-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014), transistores (BABEL *et al.*, 2005), eletrônicos (AGARWAL *et al.*, 2005) erecentemente como dispositivos adsorventes para SPME (CHIGOME *et al.*, 2011). Na engenharia de tecidos, a eletrofiação vem sendo empregada para o preparo de matrizes de sustentação *scaffolds*. Esses *scaffolds* podem ser constituídos por nano e microfibras poliméricas sintéticas e naturais e mimetizam o ambiente de crescimento celular (MATTHEWS *et al.*, 2002).

As variáveis da solução e dos parâmetros do processo de eletrofiação nas respostas estudadas podem ser avaliados através de estudos que utilizam *design* de experimentos. Nesses estudos, os parâmetros investigados são variados de acordo com o modelo estatístico específico a ser estudado, avaliando-se as respostas pós processo, como por exemplo, diâmetro médio das fibras, homogeneidade e coalescência (CUI *et al.,* 2007; SARLAK *et al.,* 2012). Abordagens mais recentes fazem uso dos estudos estatísticos para construção da qualidade final daro produto. Essa abordagem é conhecida como Qualidade pelo Desenho, ou do inglês *Quality by Design* (QbD), e traz uma abordagem inovadora ao desenvolvimento de produtos baseados na ciência e na análise de riscos da composição do material e do processo (BADAWI & EL-KHORDAGUI, 2014).

3.3. Fibroína da Seda

Sedas são produzidas por bichos-da-seda, aranhas, escorpiões, ácaros e moscas, e são diferentes em componentes, estrutura e propriedades de acordo com a fonte específica (ALTMAN et al., 2003). Atualmente, a seda mais estudada em têxteis, biotecnologia e campos biomédicos são os bichos-da-seda domesticados, identificados como Bombyx mori (VEPARI & KAPLAN, 2007). A seda obtida do casulo do bicho-da-seda Bombyx mori apresenta características únicas. A seda produzida pelo bicho-da-seda tem ótimas propriedades mecânicas térmica química, flexibilidade além de estabilidade е morfológica. boa permeabilidade ao vapor de água e solventes. É composta por duas proteínas principais: a fibroína e a sericina. A FS é o principal constituinte dos casulos fabricados pelo bicho-da-seda. Já a sericina reveste a FS, age como um adesivo e está presente em menor quantidade (ZHAO & ASAKURA, 2001).

Em comparação com outras proteínas, a FS é caracterizada por uma sequência primária composta por alanina e glicina (VEPARI & KAPLAN, 2007), conduzindo a conformações regulares no seu nível primário (ALTMAN *et al.*, 2003). Recentemente, a sequência do gene da seda *Bombyx mori* foi concluída. A região de repetição compreende várias unidades, incluindo Glicina – Alanina - Serina (GAS) na forma GAGAGS altamente repetitivas e também através de unidade de Tirosina (Y) GAGAGY menos repetitiva (a sequência menos organizada) e / ou através da Valina (V) AGVGYGAG (HA *et al.*, 2005) (ZHOU *et al.*, 2000). A partir da Figura 3.7 pode ser visto que ligações de hidrogênio, intermoleculares, são formadas, o que beneficia a geração de uma estrutura termodinamicamente estável e insolúvel em alguns solventes. Por outro lado, as regiões menos ordenadas contêm grande quantidade de resíduos de aminoácidos (VALLUZZI *et al.*, 1999).

Sedas são geralmente compostas por estruturas β -folhas, devido à predominância de domínios hidrofóbicos, consistindo de aminoácidos com cadeias laterais curtas na sequência primária. Grandes domínios hidrofóbicos intercalados com pequenos domínios hidrofílicos promovem a montagem da seda e dá força e resistência às fibras (VEPARI & KAPLAN, 2007).


Figura 3.7. Representação da estrutura molecular da FS. Adaptada de SHANG *et al.* (2013).

Assim para regenerar a FS, é necessário um processo de dissolução para destruir as estruturas cristalinas β -folhas. Dois tipos de solventes são comumente usados para dissolver a FS: soluções aquosas concentradas de sal de lítio e sistemas sal-água-álcool. Em qualquer caso, estes sais (sódio, lítio ou cálcio) devem ser removidos por diálise devido a alta concentração utilizada (HA, 2004). Nanofibras de FS podem ser produzidas a partir da fibroína da seda regenerada (FSR), solubilizadas em solventes adequados. Porém, o material obtido pode facilmente se dissolver em água. As mantas nanofibrílicas formadas precisam então ser tratadas com metanol, isso porque as macromoléculas de FSR reorganizam suas estruturas, voltando a forma cristalina. Isso ocorre devido às mudanças nas ligações de hidrogênio causadas por substâncias químicas, como metanol, etanol e glutaraldeído (YIN et al., 2009), transformando-se de conformação bobina aleatória para β -folhas e ficando assim, novamente, insolúvel em água.

3.4. Delineamento Experimental Fatorial

A aplicação do delineamento experimental fatorial facilita a interpretação de forma mais rápida e eficiente da crescente gama de dados originados de um sistema. É uma importante ferramenta estatística e devido a sua simplicidade, vem

sendo cada vez mais utilizada. Possibilita a interpretação dos resultados considerando todos os parâmetros experimentais envolvidos, além de fornecer o efeito das possíveis interações entre as variáveis selecionadas (NETO *et al.*, 2001). Neste trabalho, a técnica delineamento experimental fatorial completo 2² com ponto central, foi utilizada para executar experimentos planejados de maneira sistemática de tal forma que possibilite determinar os efeitos dos parâmetros vazão e distância capilar-coletor na resposta diâmetro médio das nanofibras de FSR obtidas por meio da técnica de eletrofiação.

3.5. Metodologia Analítica Aplicada a SPME

3.5.1. Cromatografia Gasosa

A principal aplicação da técnica de SPME está intimamente ligada à técnica de CG. A CG está voltada para detecção e quantificação de substâncias voláteis (ou volatilizáveis). As fibras de SPME podem adsorver esses analitos e seguir para análise em CG. Muitas áreas da indústria utilizam a técnica de CG em seus controles de qualidade, Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, principalmente áreas farmacêuticas e químicas.

O processo de separação e quantificação em CG envolve a vaporização da amostra contendo o analito, e posterior introdução da mistura em um fluxo de um gás de arraste no CG. A amostra vaporizada é então levada à coluna cromatográfica, que tem por função separar os diferentes compostos de uma matriz. A separação ocorre principalmente pela interação diferencial das espécies com o material constituinte da coluna. Massa molar, natureza química e diferentes afinidades regem a separação dos compostos na coluna. Os analitos separados são quantificados por detectores específicos a cada análise (LANÇAS, 2004).

3.5.2. Desenvolvimento Analítico e Validação

Em SPME, alguns fatores podem alterar as condições de análise: tempo de extração, dessorção, força iônica da solução, temperatura da amostra, temperatura de extração e dessorção, pH, velocidade de agitação da amostra, além da natureza física e química do dispositivo adsorvente utilizado (ZEWE *et al.,* 2010). A metodologia analítica prevê desde o preparo da amostra, até a separação cromatográfica. Os procedimentos envolvidos no preparo e também na análise devem ser estabelecidos durante o desenvolvimento analítico, para posteriormente, ser submetidos à validação do método. A otimização desses parâmetros se faz necessária, tendo em vista melhores resultados analíticos, atrelados a menores tempos/custos de análise (RIBANI *et al.,* 2004).

O processo de validação de uma metodologia analítica garante que o resultado de um novo método traga informações e resultados confiáveis e reprodutíveis. O método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos para cada finalidade metodológica. A validação deve ser executada quando se desenvolve ou se faça adaptações em metodologias já existentes, novos procedimentos ou mesmo uso de diferentes equipamentos (dispositivos). As validações geralmente abordam critérios como exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, robustez e especificidade (RIBANI *et al.*, 2004).

3.5.2.1. Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Esse resultado deve estar contido dentro de um intervalo especificado, sendo obtido por padronização interna ou externa. A equação matemática que relaciona as duas variáveis, concentração do analito e resposta (área do pico), para cada analito, é representada por uma equação linear (curva de calibração). Por meio da equação da reta, o coeficiente de correlação linear (R) pode ser calculado. O critério mínimo aceitável de R deve ser igual ou maior que 0,990 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

3.5.2.2. Especificidade

É a capacidade que o método analítico possui em medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas e componentes da matriz (RIBANI *et al.,* 2004).

Para avaliar a especificidade do método, foram analisadas uma solução padrão, contendo Metanol, AIS e Acetato de Etila, e uma solução diluente. A resolução com relação a quaisquer outros picos deve ser maior que 1,5 para que exista a separação cromatográfica eficiente (LANÇAS, 2004).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção da Fibroína da Seda Regenerada

4.1.1. Remoção da Sericina das Fibras dos Casulos do Bicho-da-Seda

Os casulos do bicho-da-seda da espécie *Bombyx mori* (Cocamar, Maringá-PR, Brasil) primeiramente foram degomados por duas vezes através de lavagem com solução de NaHCO₃ 0,5% (m/v) a 100°C por 30 minutos cada, intercalad a com lavagem com água destilada a 70°C. No final da dego magem os casulos foram lavados novamente com água destilada a 70°C por trê s vezes para total remoção da sericina e NaHCO₃.

4.1.2. Preparação da Solução de FS

A FS degomada foi dissolvida em uma solução etanol/água 20/80 (v/v) contendo CaCl₂ 5,0 mol L⁻¹ a 80°C até a completa solubilização por cerca de 3 0 minutos. Após a solubilização a solução de FS foi colocada para diálise em membrana de acetato de celulose (limite de exclusão de 16.000 Da) por três dias em água destilada, trocada a cada 12 h. Após esse período, a solução de FS livre de CaCl₂ foi filtrada a vácuo, congelada em nitrogênio líquido. O material congelado foi liofilizado (Christ Alpha 1-2 LD Freeze Dryer) para a obtenção de esponjas de FSR. O procedimento para a obtenção e purificação da FSR foi baseado nos trabalhos de WANG *et al.* (2011) e MIYAGUCHI & HU (2005).

A Figura 4.1 mostra o processo utilizado para extração e purificação da FSR a partir de casulos do bicho-da-seda, por meio do processo de solubilização/regeneração.



Figura 4.1. Processo de extração e purificação da FSR a partir de casulos do bichoda-seda por meio do processo de solubilização/regeneração.

4.2. Preparação das Nanofibras de FSR como Dispositivos Adsorventes para SPME

4.2.1. Preparo da Solução da FSR

Para o processo de eletrofiação, uma quantidade suficiente de FSR foi dissolvida em ácido fórmico (AF) 98% (m/m), por meio de agitação magnética por cerca de 30 min até completa solubilização. A concentração de FSR em relação ao AF foi fixada em 12 % (m/v).

4.2.2. Processo de Eletrofiação da FSR

A solução obtida foi introduzida em uma seringa de polietileno de 10 mL com uma agulha de metal sem ponta, acopladas a uma bomba controladora de vazão. Uma fonte de alta tensão (0 - 30 kV) foi conectada ao capilar e a um coletor metálico aterrado. Entre o coletor e a agulha, foi colocado um aparato giratório (agitador mecânico) contendo uma fibra de sílica fundida (0,180~0,380 mm de diâmetro, circular). Ao mesmo tempo em que as nanofibras de FSR foram formadas, também foram imobilizadas na superfície da fibra de sílica fundida em forma de emaranhados (Figura 4.2).

4.2.2.1. Avaliação Preliminar dos Parâmetros de Eletrofiação

Para a avaliação preliminar dos parâmetros do processo de eletrofiação, as condições estudadas foram: tensão do campo elétrico: 20 kV, vazão: 0,2 mL h⁻¹, 0,5 mL h⁻¹ e 0,35 mL h⁻¹, distância entre o capilar e o coletor: 13 cm , 10 cm e 8 cm. Entre o coletor e a fibra de sílica fundida foi mantido uma distância de 1 cm, totalizando 12 cm, 9 cm e 7 cm, entre o capilar e a fibra de sílica fundida, respectivamente (WANG *et al.*, 2011). Ao término do processo de eletrofiação das nanofibras, as mesmas foram deixadas imersas em solução contendo metanol por 24 h. O material final foi seco à temperatura ambiente e depois caracterizado.

A Figura 4.2 mostra representativamente os principais componentes para processo de eletrofiação. Neste modelo, o sistema foi adaptado para o preparo de nanofibras poliméricas coletadas em uma fibra para SPME, por meio de um aparato giratório entre o capilar e o coletor.



Figura 4.2. Representação esquemática dos componentes para o processo de eletrofiação aplicado na produção de nanofibras poliméricas coletadas em uma fibra para SPME.

4.3. Delineamento Experimental Fatorial 2²

A partir do estudo preliminar do processo de eletrofiação, a otimização dos parâmetros pode ser avaliada. Para o estudo da influência das variáveis de processo na eletrofiação, foram realizados experimentos baseados em um delineamento experimental fatorial completo com dois fatores em dois níveis 2² com ponto central. As variáveis estudadas foram vazão e distância, bem como a interação vazão x distância na resposta diâmetro médio das fibras. A tensão elétrica (20 kV) e a concentração da solução (12%) foram fixados, tendo em vista resultados promissores nos estudos preliminares. Para a vazão, os valores dos níveis inferior (-1) e superior (1) foram: 0,20 mL h⁻¹ e 0,50 mL h⁻¹, respectivamente. A distância entre o capilar e o coletor foi ajustada para 7,0 cm no nível inferior (-1) e 12,0 cm no nível superior (1). O ponto central (0) foi fixado na vazão de 0,35 mL h⁻¹ e distância de 9,5 cm.

Os experimentos foram realizados em duplicata nos pontos axiais, de forma randômica e triplicada no ponto central. A matriz fatorial utilizada para o delineamento dos experimentos está mostrada nas Tabelas 4.1 e 4.2 (variáveis codificadas). Os valores de diâmetro médio para cada experimento foram obtidos por meio da medida de 20 fibras, cada fibra medida em 3 pontos diferentes nas imagens de MEV, utilizando-se o software Size Meter 1.1[©]. Os dados experimentais de diâmetro médio, bem como a análise da superfície de resposta e validação do modelo proposto foram processados utilizando o software estatístico Design Expert[®] versão 7.1.3. A significância dos fatores foi confirmada pela análise de variância (ANOVA).

Variávaia		Níveis	
variaveis	-1	0	1
Vazão (mL h ⁻¹)	0,20	0,35	0,50
Distância (cm)	7,0	9,5	12,0

Tabela 4.1. Variáveis e níveis utilizados no delineamento experimental fatorial 2².

Experimente	Corrido	Variáveis			
Experimento	Comua	Vazão (mL h ⁻¹)	Distância (cm)		
1	2	-1	-1		
2	9	-1	-1		
3	4	1	-1		
4	11	1	-1		
5	10	-1	1		
6	3	-1	1		
7	1	1	1		
8	7	1	1		
9	8	0	0		
10	6	0	0		
11	5	0	0		

Tabela 4.2. Planejamento fatorial 2² para as variáveis codificadas: vazão (mL h⁻¹) e distância (cm). Experimentos efetuados em duplicata nos pontos axiais e triplicada no ponto central.

4.4. Caracterização dos Dispositivos para SPME Compostos por Nanofibras de FSR Eletrofiados

4.4.1. Microscopia Eletrônica De Varredura

A fibra de sílica fundida sem recobrimento e recoberta com nanofibras de FSR após tratamento com metanol, foram secas, congeladas e fragmentadas manualmente, em pequenas seções para análise morfológica. Os fragmentos foram colocados em um porta-amostra metálico e fixados com fita adesiva de carbono. Os mesmos foram recobertos por um filme fino de ouro (metalizador Shimadzu–LC-50, utilizando uma corrente de 4 mA por um período de 3 minutos). A morfologia foi analisada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um equipamento SHIMADZU, modelo SS-550 Superscan (Japão). O diâmetro médio para cada experimento na avaliação preliminar e delineamento experimental foram calculados por meio do software SIZE METER[®], versão 1.1.

4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier e Reflexão Total Atenuada

Os dispositivos para SPME compostos por nanofibras de FSR eletrofiados sobre sílica fundida tratadas com metanol, bem como a FSR antes da eletrofiação, foram caracterizadas por meio de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e acessório de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros foram obtidos em um equipamento modelo Bomem MB-100, operando na região de 4000 a 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 37 aquisições por minuto. Cada espectro de FTIR-ATR foi obtido de 64 aquisições.

4.4.3. Análises Térmicas

As análises termogravimétricas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) foram realizadas com o uso de um analisador termogravimétrico Netzsch (Alemanha), modelo STA 409 PC Luxx®. As amostras de FSR pura e do dispositivo recoberto por FSR foram pesadas (2,87 e 10,72 mg, respectivamente) e acondicionados em panelas de alumínio com tampa perfurada. As condições operacionais utilizadas foram estudadas preliminarmente, sendo estabelecidas: Taxa de aquecimento de 10°C mi n⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio e com vazão de 20 mL min⁻¹, intervalo de temperatura de 22 a 600°C.

4.5. Tratamento Térmico dos Dispositivos para SPME Recobertos com Nanofibras de FSR

Os dispositivos recobertos por nanofibras foram submetidos a tratamento térmico por 1 h a 100°C, 150°C, 200°C e 250°C, em um formo elétrico (Fischer, 50°C-320℃) com temperatura controlada. Os dispositivos também foram submetidos à condição de 250°C por 3 h e 4 h. Após os tratamentos térmicos, a morfologia das fibras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, a fim de detectar possíveis danos às mesmas.

4.6. Medidas Cromatográficas e Otimização dos Parâmetros de Extração/Dessorção

Os dispositivos para SPME utilizados nas medidas cromatográficas, foram montados utilizando-se as fibras recobertas por nanofibras de FSR. Essas fibras foram fixadas no êmbolo de uma seringa de 10 mL com agulha de metal. Deste modo, as fibras ficaram protegidas do meio externo, envoltas pela agulha. Para extração e dessorção térmica, o êmbolo foi movido a fim de expor a fibra ao *headspace* da amostra, recolhido, e exposto ao injetor.

4.6.1. Sistema de Cromatografia Gasosa

O CG utilizado foi da marca Varian[®] (EUA), modelo 3900 operando com detector de ionização de chama (FID), coluna: G43 (6%-cianopropilfenil-94%-dimetilpolisiloxano) 30m x 0,53 mm, 3 μ m de filme de revestimento; gás de arraste: hélio; velocidade linear: 35 cm s⁻¹; operado em modo *splitles*; temperatura na coluna: 40°C por 20 minutos, após uma taxa de 10°C min⁻¹ até 240°C, mantida durante 20 minutos. As temperaturas de injeção e no detector foram mantidas em 140°C e 250°C, respectivamente. O resumo da rampa d e aquecimento da coluna, temperatura do injetor e detector utilizados são mostrado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Sistema cromatográfico: CG Varian® 3900, detector de ionização de chama (FID); coluna: G43, 30m x 0,53 mm, 3 μ m.

Parte do	Tempo	Temperatura	
Equipamento	(min)	(°C)	
	0-20	40	
Coluna	20-40	40→240	
	40-60	240	
Injetor	-	140	
Detector	-	250	

4.6.2. Preparo da Solução Analítica de Álcool Isopropílico

O material obtido foi aplicado para qualificação e quantificação em CG de um álcool de cadeia curta. Através desta análise, foi possível avaliar-se o método analítico proposto e o desempenho do dispositivo preparado. Para as medidas cromatográficas foi preparada uma solução de álcool isopropílico (AIS) (densidade=0,786 g/mL). Foi transferida uma alíquota de 0,398 mL de AIS para balão volumétrico de 50 mL contendo 40 mL de dimetilformamida (DMF). Completou-se o volume com DMF. Dessa solução, foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 25 mL contendo 15 mL de DMF. O volume foi completado com DMF. Transferiu-se 1 mL dessa solução para vial de 20 mL contendo 4 mL de água purificada. Vedou-se com septo de borracha e *crimp* de alumínio, totalizando uma solução com concentração de 50 ppm de AIS.

4.6.3. Otimização dos Parâmetros de Extração e Dessorção

A temperatura de incubação da solução foi fixada em 60°C por 40 minutos, em uma incubadora com agitação tipo orbital (*shaker* acoplado ao CG). A fibra recoberta por nanofibras de FSR foi exposta ao *headspace* do vial, por perfuração do septo de borracha e exposição de 5 mm da fibra. Após o tempo determinado de extração, a fibra foi recolhida e novamente exposta ao injetor para dessorção térmica. Os tempos de extração e dessorção foram avaliados para se obter as melhores respostas, variando de 5 a 30 minutos cada.

4.6.3.1. Extração

Para o estudo da influência do tempo de extração, as condições experimentais foram: tempo de dessorção fixo em 10 min, variando-se o tempo de extração entre 5 e 30 minutos. Para todos os experimentos os parâmetros do sistema cromatográfico foram mantidos constantes.

4.6.3.2. Dessorção

No estudo da capacidade de dessorção em relação ao tempo de exposição da fibra no injetor do CG, o tempo de extração foi fixo em 20 minutos. O tempo de

dessorção variou entre 5 – 30 min. Também para estes experimentos, os parâmetros do sistema cromatográfico foram mantidos constantes.

As análises para quantificação do analito, em cada experimento, foram realizadas por meio da relação das áreas dos picos cromatográficos obtidos pela integração da área sobre a curva dos picos do analito (software integrado ao equipamento). Cada experimento foi executado em triplicata.

4.7. Validação da Metodologia Analítica

Neste trabalho a linearidade e a especificidade foram avaliados na validação da metodologia analítica.

4.7.1. Linearidade

Para o estudo de linearidade, foi preparada uma solução estoque de AIS a 500 ppm, sendi uma alíquota de 3,980 mL de AIS transferido para balão volumétrico de 50 mL contendo 40 mL DMF. Completou-se o volume com DMF. Dessa solução, foi transferido 1 mL para balão volumétrico de 25 mL contendo 15 mL de DMF. O volume foi completado com DMF. Transferiu-se 1 mL dessa solução para vial de 20 mL contendo 4 mL de água purificada. Vedou-se com septo de borracha e *crimp* de alumínio, totalizando uma solução com concentração de 500 ppm de AIS. Desta solução, foram feitas diluições apropriadas em água, para obter as concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500 ppm (Tabela 4.4).

Concentração Solução Estoque (ppm)	Volume Pipetado (mL)	Volume Diluição (mL)	Concentração Final (ppm)
	1	50	10
	1	10	50
500	1	5	100
	5	10	250
	-	-	500

Tabela 4.4. Diluições e concentrações das soluções de AIS para estudo de linearidade.

4.7.2. Especificidade

Para a avaliação da especificidade do método, foi analisada uma solução padrão, contendo os seguintes solventes: Metanol (250 ppm), AIS (50 ppm) e Acetato de Etila (250 ppm). O resumo do preparo da solução é mostrado na Tabela 4.5. Cada solvente foi preparado separadamente, e diluídos em um mesmo vial, na última diluição (Diluição 3). Todas as diluições foram feitas com DFM, exceto a diluição 3, com água, diretamente no vial de análise.

Tabela 4.5. Diluições e concentrações da solução padrão de Metanol, AIS e Acetado de Etila para estudo de Especificidade.

	Densidade		Volume (mL)					Concentração
Solvente	(g/mL)	Pipetado 1	Diluição 1	Pipetado 2	Diluição 2	Pipetado 3	Diluição 3	Final (ppm)
Metanol	0,792	1,263	20	1	20	1		250
AIS	0,786	0,398	50	1	25	2	10	50
Acetato de Etila	0,897	0,558	20	1	10	1	10	250

Os parâmetros cromatográficos utilizados foram os mesmos utilizados no estudo de otimização da extração e dessorção: 20 minutos de extração e 10 minutos de dessorção. Os cromatogramas foram analisados frente a solução branco do diluente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos Dispositivos para SPME

5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises microscópicas das fibras de sílica fundida recobertas com nanofibras de FSR no estudo de avaliação preliminar dos parâmetros de eletrofiação são mostradas na Figura 5.1. Foi possível observar grande diferença de morfologia entre os materiais obtidos, variando de fibras finas sem coalescência a fibras grossas com presença de gotículas e formação de filme coalescente.

O material obtido com a vazão de 0,5 mL h⁻¹ e distância de 9 cm entre o capilar e a fibra (Figura 5.1 a e b), apresentou sinais de coalescência entre as nanofibras e formação de gotículas na sua superfície. As nanofibras de FSR apresentaram formação de um filme superficial, mostrando que ao se depositar, as nanofibras de FSR não estavam totalmente livres do solvente (AF), interagindo entre as mesmas após a deposição. Isso pode ser atribuído à vazão relativamente alta para o processo e também pela distância pequena.

O mesmo também pode ser observado para as fibras recobertas obtidas na vazão de 0,35 mL h⁻¹ e distância de 7 cm (Figura 5.1 c e d). Houve a formação tanto de pontos de coalescência quanto formação de aglomerados, indicando que, nesta condição de vazão e distância, também não houve tempo suficiente para evaporação completa do solvente e alongamento das cadeias poliméricas. A coalescência foi maior que a condição anterior, mostrando que neste caso, principalmente a distância entre o capilar e o coletor rege a morfologia das nanofibras. Mesmo com a diminuição da vazão em relação à condição anterior, as fibras apresentaram características estruturais semelhantes.

Na Figura 5.1 e) e f) estão as micrografias obtidas para condição de vazão de 0,2 mL h⁻¹ e distância de 12 cm entre o capilar e a fibra de sílica fundida.



Figura 5.1: Microscopia eletrônica de varredura das fibras de sílica fundida recobertas com nanofibras de FSR nas condições: vazão de 0,5 mL h⁻¹ e distância de 9 cm (a e b), vazão em 0,35 mL h⁻¹ e distância de 7 cm (c e d) e vazão em 0,2 mL h⁻¹ e distância de 12 cm (e e f).

As fibras se apresentaram homogêneas, sem sinais de coalescência e poucos pontos de aglomeração. Esse resultado mostrou que ao se utilizar uma vazão menor, a quantidade de solvente que precisa evaporar durante o trajeto ponta da agulha-coletor é menor. Com uma distância maior entre o capilar e a fibra de sílica, houve tempo suficiente para a evaporação completa do solvente e o

alongamento das cadeias poliméricas. Nesta condição, as fibras estavam secas ao atingir o coletor.

A Figura 5.2 a) e b) mostra a fibra de sílica fundida antes do recobrimento e após aproximadamente 30 min de processo de revestimento com nanofibras de FSR, respectivamente (vazão em 0,2 mL h^{-1} e distância de 12 cm).



Figura 5.2: Microscopia eletrônica de varredura: (a) fibra de sílica fundida (vidro) sem recobrimento e (b) fibra de sílica fundida recoberta com nanofibras de FSR com 200 x de ampliação.

Os resultados das análises de MEV, também possibilitaram avaliar o diâmetro médio das fibras. Na condição de vazão em 0,2 mL h⁻¹ e distância de 12 cm, o diâmetro médio foi de 304 ± 46 nm. Neste diâmetro, as fibras de FSR obtidas se enquadram como nanofibras (menor que 1000 nm) de acordo com os autores ZHOU & GONG (2008).

Esse material provavelmente possui elevada área superficial devido ao seu diâmetro diminuto, permitindo assim que maiores quantidades de analitos sejam extraídas pela SPME. Em contrapartida, essa suposta elevada área superficial pode aumentar o tempo de dessorção dos analitos, justamente pelo maior número de sítios que estarão expostos para adsorção. A Figura 5.3 a) mostra uma ampliação das nanofibras de FSR e em b) a distribuição média dos diâmetros. Essa

distribuição mostrou uniformidade dos diâmetros médios, com perfil de distribuição normal, unimodal e sem presença de *outliers*.



Figura 5.3: Imagens obtidas por MEV 5.000 x de ampliação a) e b) distribuição dos diâmetros médios das nanofibras de FSR. Diâmetro médio 304 ± 46 nm.

5.1.2. Delineamento Experimental Fatorial 2²

Por meio do estudo do delineamento experimental fatorial 2² foi possível qualificar e quantificar os fatores estatisticamente significativos que influenciam no valor do diâmetro médio das nanofibras. Neste estudo as variáveis avaliadas foram vazão, distância e a interação entre ambas. A tensão elétrica e a concentração da solução foram fixadas, tendo em vista resultados promissores nos estudos de avaliação preliminares. Os resultados obtidos para o delineamento experimental são mostrados na Tabela 5.1.

Fabela 5.1. Delineamento experimental fatorial 2 ² para as variáveis vazão (mL h ⁻¹
e distância (cm) em duplicata com triplicada no ponto central e resposta diâmetro
nédio (nm) das nanofibras de FSR.

		Variáve	eis Reais	Diâmetro médio
Experimento	xperimento Corrida		Distância (cm)	± desvio padrão (nm)
1	2	0,20	7,0	490 ± 0,15
2	9	0,20	7,0	461 ± 0,20
3	4	0,50	7,0	520 ± 0,23
4	11	0,50	7,0	$490 \pm 0,19$
5	10	0,20	12,0	304 ± 0.07
6	3	0,20	12,0	$310 \pm 0,09$
7	1	0,50	12,0	$342 \pm 0,10$
8	7	0,50	12,0	320 ± 0.07
9	8	0,35	9,5	$399 \pm 0,10$
10	6	0,35	9,5	$410 \pm 0,12$
11	5	0,35	9,5	403 ± 0,11

As imagens de MEV para cada experimento realizado são mostradas nas Figuras 5.4 de a) a l). Na Figura 5.4 l) é mostrado um exemplo de análise de diâmetro médio utilizando-se o software Size Meter 1.1[©]. As imagens e tabelas contendo as medidas dos diâmetros para cada experimento são mostradas no Apêndice 1.







Figura 5.4: Micrografias das fibras de sílica fundida recobertas com nanofibras de FSR no estudo do delineamento experimental fatorial 2² (imagens de a) a k)) e medidas de diâmetro médio (Size Meter[®] 1.1; imagem I)). Ampliação das imagens em 5000 x.

Pode se observar que o processo foi altamente reprodutível devido à baixa variabilidade entre as replicatas. Os maiores diâmetros médios das nanofibras de FSR foram obtidos nas condições de menor distância (7,0 cm) e maior vazão (0,50 mL h⁻¹), com um diâmetro médio de 505 nm (média da duplicata nesta condição). Seguidos por 7,0 cm e 0,20 mL h⁻¹, com média de 476 nm, 9,50 cm e 0,35 mL h⁻¹, com média de 404 nm, 12,0 cm e 0,50 mL h⁻¹, média de 331 nm. Os menores diâmetros foram obtidos na condição de maior distância (12,0 cm) e menor vazão (0,20 mL h⁻¹), com média de 307 nm. Nas condições onde os diâmetros foram maiores, também houve a coalescência entre as fibras. Nas condições com menores diâmetros médios (experimentos 5 e 6), os desvios padrões e variâncias também foram menores. No experimento 5, obteve-se uma média de 0,3044 \pm 0,067, variância de 0,0045. No experimento 6 a média foi de 0,3097 \pm 0,0876 e variância de 0,0077, o que mostra a homogeneidade entre as fibras.

A normalidade dos dados foi verificada através da análise da probabilidade normal dos resíduos (Figura 5.5 a) e da diferença entre os valores observados e os valores preditos pela regressão (Figura 5.5 b). Foi observado que os pontos experimentais se distribuíram de forma normal em torno das curvas, indicando que a normalidade assumida foi satisfatória.



Figura 5.5: a) Probabilidade normal dos resíduos. b) Diferença entre os valores observados (resultados) e valores preditos pela regressão.

Na análise dos resíduos em função dos valores preditos (Figura 5.6 a) e em função do experimento (Figura 5.6 b), verificou-se que os resíduos se distribuem de forma aleatória em torno do zero, indicando uma distribuição normal dos mesmos e, por conseguinte, a igualdade de variâncias nos resultados. Não há presença de *outliers*, pois todos os valores estão dentro da faixa aceitável (-3 a +3)..



Figura 5.6: a) Gráfico dos resíduos em função dos valores preditos e b) em função do experimento: Os resíduos se distribuem de forma aleatória em torno do zero, indicando uma distribuição normal e igualdade de variâncias nos resultados.

A significância dos fatores foi confirmada pela análise de variância (ANOVA), apresentados na Tabela 5.2. Foi possível obervar que ambos os fatores, vazão e distância foram significativos para um modelo linear (p < 0,05). A distância foi o fator com maior influência sobre o resultado diâmetro médio das nanofibras. A interação entre as variáveis e a curvatura para o modelo não foram significativos (p > 0,05), bem como a curvatura não foi significativa (p > 0,05).

Fonte de Variação	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrados	F calculado	P valor
Modelo	60084,25	2	30042,12	174,14	< 0,0001
Vazão (mL h ⁻¹)	1431,12	1	1431,12	8,30	0,0236
Distância (cm)	58653,13	1	58653,3	339,98	< 0,0001
Curvatura	0,85	1	0,85	4,940E-003	0,9459
Residual	1207,63	7	172,52		
Falta de Ajuste	15,13	1	15,13	0,076	0,7919
Erro Puro	1192,50	6	198,75		
Total	61292,73	10			

Tabela 5.2. Analise de variância (ANOVA) para superfície de resposta do modelo linear para o diâmetro médio das nanofibras de FSR.

Os resultados do teste F de Fisher-Snedecor mostraram que o modelo foi significativo ($F_{calculado}$ (2;7;0,05)=174,14; $F_{tabelado}$ (2;7;0,05)=4,737), pois $F_{calculado}$ >> $F_{tabelado}$ e a relação $F_{calculado}/F_{tabelado}$ =36,76 e p_{valor} < 0,05 indicam que o modelo é válido no nível de significância de 95%. A falta de ajuste não foi significativa ($F_{calculado}$ (1;6;0,05)=0,076; $F_{tabelado}$ (1;6;0,05)=5,987) apresentando $F_{calculado}$ <= $F_{tabelado}$ e p > 0,05. Esses resultados indicam que o modelo linear foi válido para o ajuste do modelo proposto e a falta de ajuste não foi significativa. Além disso, o R^2_{pred} =0,949 está de acordo com o R^2_{adj} =0,974, confirmando esse resultado.

O modelo linear foi construído (equação 1) através da análise de regressão e descreve a relação entre as variáveis independentes significativas e a resposta.

Diâmetro(nm)=698,79 + 89,16*Vazão(mL h⁻¹) - 34,25*Distância(cm) (Equação 1)

O coeficiente positivo para a vazão e negativo para a distância estão de acordo com o previsto pela literatura (PAWLISZYN, 2012). Segundo o modelo, quanto maior a vazão e quanto menor a distância, maior o diâmetro médio das fibras. Para a obtenção de fibras com menor diâmetro, são necessários menores

vazões e maiores distâncias. Observou-se essa relação por meio dos gráficos de diâmetro médio em função de cada variável separadamente (Figura 5.7 a) e b)).



Figura 5.7. Diâmetro médio das nanofibras de FSR em função da: a) vazão e b) distância.

O diâmetro médio em função da vazão (Figura 5.7 a) varia linearmente, pois se observa um aumentou no diâmetro médio das nanofibras na medida em que se aumenta a vazão da solução. Isto está relacionado com a quantidade de solução que é ejetada durante o processo de eletrofiação sob uma tensão constante. Maior quantidade de solução injetada produz fibras com diâmetro maior, pois a tensão aplicada não é capaz de gerar um jato com fibras finas. A força necessária para quebrar a tensão superficial é, por conseguinte, maior. Vazões muito elevadas também podem produzir coalescência entre as fibras pelo fato da deposição acontecer ainda com quantidades expressivas de solvente (MEGELSKI *et al.,* 2002; BHARDWAJ & KUNDU, 2010)

O diâmetro médio em função da distância entre o capilar-coletor (Figura 5.7 b) também variou linearmente, porém diminuindo o diâmetro médio das nanofibras na medida em que se aumentou a distância. Quanto maior a distância, maior é o tempo de alongamento das fibras e completa evaporação do solvente, resultando em fibras menores. De forma contrária, a menores distâncias, as fibras não alongam efetivamente, resultando em diâmetros maiores. Nos experimentos utilizando-se a distância de 7,0 cm, pode-se observar a coalescência das fibras, devido a deposição das fibras com excesso de solvente. Não foi observado

nenhuma interação entre as variáveis com base no planejamento experimental (SILL & VON RECUM, 2008).

O mapa de contorno e a superfície de resposta para o diâmetro médio das nanofibras de FSR é mostrada na Figura 5.8 a) e b), respectivamente. Não há curvatura significativa, demonstrando que o modelo linear é válido. Os menores diâmetros foram obtidos na condição de menor vazão e maior distância. O processo foi reprodutível e homogêneo.



Figura 5.8. Mapa de contorno a) e superfície de resposta b) para os resultados experimentais do delineamento experimental fatorial 2². Resposta diâmetro médio (nm) em função da vazão (mL h⁻¹) e distância (cm).

5.1.3. Análises Térmicas

No processo de dessorção em SPME via temperatura, e também no empregado para cromatografia gasosa, os dispositivos são dispostos a altas temperaturas no injetor por um determinado tempo. Neste processo, por se tratarem de nanofibras poliméricas, há a preocupação com os danos estruturais que possam surgir pelo emprego dessa alta temperatura. As análises térmicas da FSR pura e do dispositivo recoberto com as nanofibras de FSR tratada com metanol, são mostradas na Figura 5.9.



Figura 5.9: Análises térmicas de TGA para a FSR pura (linha vermelha) e respectivas nanofibras (linha preta), e DSC das nanofibras de FSR depositadas sobre fibra de sílica fundida (linha azul).

5.1.3.1. Análise Termogravimétrica

Por meio da análise de TGA (Figura 5.9) foi possível observar duas regiões distintas de perda de massa para ambos os materiais. A primeira região, próximo de 100°C, pode ser atribuída à perda de água ou sol ventes no material. A segunda região que se estende de 250 a 350 °C foi associada à degradação com quebra de grupos de resíduos de aminoácidos laterais bem como a clivagem de ligações peptídicas (FREDDI *et al.,* 1999). O material eletrofiado manteve praticamente a mesma estabilidade térmica frente ao material de partida. Esse é um indicativo que dentro da faixa de 100 a 250°C o material poderá se r utilizado para ciclos de adsorção e dessorção térmica.

5.1.3.2. Análise por Calorimetria Diferencial de Varredura

Na análise de DSC (Figua 5.9) para as nanofibras de FSR depositadas sobre fibra de sílica fundida foram observados dois picos endotérmicos, correspondentes às temperaturas de perda de massa no TGA. O pico endotérmico próximo a 100 $^{\circ}$ C, correspondente a perda de água e entre as temp eraturas de 250 $^{\circ}$ C e 300 $^{\circ}$ C, indicando a decomposição da FSR. Picos de degradação nesta região são característicos de materiais derivados de seda com configuração β - folha (FREDDI *et al.,* 1999).

Fica evidente pelas análises de DSC e TGA, que uma faixa de temperatura que se estenda até por volta de 100 a 250°C pode ser utilizada no processo de dessorção em SPME, sem problemas com fusão ou perdas de material por degradação.

5.2. Tratamento Térmico dos Dispositivos para SPME Recobertos com Nanofibras de FSR

Os dispositivos recobertos com as nanofibras de FSR foram submetidos a tratamento térmico, simulando possíveis condições cromatográficas. No processo de dessorção de solventes com baixa massa molecular ou voláteis, geralmente se

se empregam temperaturas no injetor de 50 – 300 °C. Em virtude da FSR começar a degradar por volta de 250°C a 300°C, a temperatur a de 250°C foi proposta como máxima para este estudo. As imagens de MEV são mostradas na Figura 5.10 a) a d). Os resultados mostraram que, para uma hora de tratamento, em nenhuma das temperaturas testadas observou-se fusão das fibras ou perda de material. Poucos foram os danos estruturais observados quanto ao rompimento das fibras, conforme se pode perceber pelas setas na Figura 5.10.

Na condição mais drástica de 250°C, as fibras também ficaram expostas por 3 h e 4 h, sendo os resultados apresentados na Figura 5.11 a) e b), respectivamente.



Figura 5.10: Imagens obtidas por MEV das nanofibras de FSR sobre as fibras de sílica fundida após tratamento térmico por 1 h em a) 100°C; b) 150°C; c) 200°C e d) 250°C. As setas mostram os pontos de ruptura das nanofibras. 10.000 x de ampliação.



Figura 5.11: Imagens obtidas por MEV das nanofibras de FSR após tratamento térmico por a 250°C por 3 h a) e 4 h b). As setas mostram os pontos de ruptura das nanofibras. 5.000 x de ampliação.

Comparativamente com as condições de apenas 1 h de tratamento térmico, o material que ficou submetido a 3 e 4 h à 250°C, s ofreu maiores danos, porém pouco impactantes. As fibras que se romperam foram em pontos de fragilidade, em fibras mais finas, que podem estabilizar com o tempo. Isso mostra que o material pode suportar inúmeros ciclos de extração e dessorção, mesmo sob temperaturas de dessorção de até 250°C. Na Tabela 5.3 estão descritos os principais tipos de revestimentos para SPME, relacionados com as temperaturas máximas utilizadas, e também a faixa de temperatura recomendada para o processo de dessorção térmica.

Tipos de Revestimentos	Temperatura Max (℃)	Temperatura Recomendada (℃)
7 μm PDMS	340	200-340
30 µm PDMS	280	200-280
100 μm PDMS	280	200-280
85 <i>µ</i> m PA	300	200-280
95 µm Carboxen-PDMS	300	220-300
65 μm PDMS/DVB	250	220-265
FSR*(Neste estudo)	250	120-250

Tabela 5.3. Principais tipos de revestimentos para SPME: Temperatura máxima e faixa de temperatura recomendada para o processo de dessorção térmico.

*Fibras recobertas por fibroína da seda regenerada.

Fonte: PAL SYSTEM – PREP AND LOAD PLATFORM.

O dispositivo para SPME recoberto por FSR possui temperatura máxima equivalente aos demais tipos de recobrimento disponíveis comercialmente. Temperaturas acima das recomendadas podem provocar danos à forma estrutural das fibras. Essa deformação acaba diminuindo a eficiência de extração das nanofibras devido à diminuição da área superficial, porosidade ou grupamentos químicos, bem como prejudicando a reprodutibilidade entre as análises cromatográficas.

5.3. Análise por Espectroscopia na Região do Infravermelho – FTIR-ATR

A análise por espectroscopia na região do infravermelho foi utilizada para verificar possíveis mudanças de conformação logo após o processo de regeneração da FS, e também após a eletrofiação e tratamento com metanol.

As bandas características de absorção no infravermelho de proteínas podem ser representadas por amidas A, B e amidas I a VII. As bandas de absorção de amidas A e B são devidas principalmente pelo estiramento N-H em 3300 cm⁻¹ 3100 cm⁻¹, respectivamente (KONG & YU, 2007). As bandas de amida I e II são as duas bandas vibracionais mais intensas da estrutura das proteínas. A região espectral mais sensível aos componentes da estrutura secundária das proteínas é a banda de amida I (1700-1600 cm⁻¹), que é em grande parte devido vibrações de estiramento C=O das ligações peptídicas (-CONH-). A frequência da banda de amida I está correlacionada com a estrutura secundária das proteínas. Amida II tem banda de absorção em torno 1540-1520 cm⁻¹, e está relacionada com a deformação angular no plano N-H e estiramento C-H, mostrando sensibilidade menor às mudanças na conformação do que a amida I. Amida III ocorre no intervalo de 1220-1300 cm⁻¹, e resultam da combinação de estiramento N-C e a deformação C-H (ZHOU et al., 2011). Os deslocamentos destas bandas indicam as conformações da proteína: em torno de 1650 cm⁻¹ (bobina aleatória) e 1630 cm⁻¹ (β - folha) para a amida I, 1540 cm⁻¹ (bobina aleatória) e 1520 cm⁻¹ (β - folha) para amida II e 1230 cm⁻¹ (bobina aleatória) e 1270 cm⁻¹ (β - folha) para amida III (VASCONCELOS et al., 2008).

Os espectros de infravermelho estão apresentados na Figura 5.12 a) e b), e os valores das bandas características de absorção de amida I e II apresentadas na Tabela 5.4.



Figura 5.12: FTIR-ATR de a) FSR e b) nanofibras de FSR tratadas com metanol.

Tabela 5.4. Bandas características presentes nos espectros de FTIR-ATR da FSR e das fibras obtidas da FSR por eletrofiação e tratadas com metanol.

Amostras	Amida I (cm ⁻¹)	Amida II (cm ⁻¹)
FSR	1657,23	1520,04
FSR tratada	1621,54	1508,14

Pode-se observar que as bandas de absorção características de amidas I e II deslocam para regiões mais baixas nos espectros de FTIR-ATR das nanofibras que foram eletrofiadas e tratadas com metanol, em relação às fibras regeneradas. Esse fato pode ser atribuído à mudança de conformação das fibras de FSR, de bobina aleatória para β -folhas. Isso ocorre porque as macromoléculas de FSR podem reorganizar sua estrutura cristalina devido às mudanças nas ligações de hidrogênio causadas por contato físico com substâncias químicas, como metanol, etanol e glutaraldeído (YIN *et al.*, 2009). No processo de extração e purificação da FS, e por fim a regeneração da fibra (FSR), as cadeias mudam a conformação cristalina de β -folhas, mais estável e insolúvel, para de bobina aleatória, solúvel e com domínios amorfos. Para aumentar a estabilidade das nanofibras, o tratamento com metanol é imprescindível para que o polímero não volte a solubilizar, com domínios predominantes na conformação cristalina de β -folha.

5.4. Análises cromatográficas

5.4.1. Desenvolvimento analítico

O capítulo geral 467 *Residual Solvents (U.S. Pharmacopeia*) descreve a metodologia analítica para CG, na análise de solventes residuais em matériasprimas e produtos de origem farmacêutica. Este método é reconhecido e considerado validado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Porém, neste trabalho, a técnica de SPME foi adaptada para tal método, sendo necessárias as avaliações decorrentes das mudanças do procedimento e características da técnica de amostragem.

Nos ensaios cromatográficos preliminares, avaliou-se a capacidade da fibra recoberta por nanofibras de FSR em estar livre do solvente do preparo, ou de resíduos indesejáveis. Na Figura 5.13 é mostrado um cromatograma de uma solução "branco" (apenas água purificada) do dispositivo adsorvente, nas condições cromatográficas de análise. Não foram observados sinais de interferentes no cromatograma.

Na Figura 5.14 é representado um cromatograma de uma solução de AIS a 50 ppm obtido com a mesma fibra em um tempo total de extração de 30 min e dessorção de 5 min. O cromatograma do AIS mostrou um pico em torno de 3,5 minutos, atribuído ao analito AIS, e outro pico em torno de 25 minutos, atribuído ao diluente DMF. Os picos foram estreitos e simétricos, característicos de CG.



Figura 5.13: Cromatograma de uma injeção "branco", com o dispositivo para SPME recoberto com nanofibras de FSR na ausência de analitos.



Figura 5.14: Cromatograma de uma injeção com dispositivo SPME recoberto com nanofibras de FSR de uma solução contendo AIS a 50 ppm de concentração.

O AIS é um solvente comumente utilizado em rotas de síntese de fármacos. Por esse motivo, é um possível solvente residual (impureza) em matérias-primas ativas na área farmacêutica. Consequentemente, a extração e quantificação desse solvente é amplamente requisitada em controle de qualidade nesta área.

5.4.2. Tempo de Extração

Avaliou-se a capacidade de extração do analito AIS por meio do tempo de exposição da fibra ao *headspace*. O tempo de dessorção foi fixado em 10 min e o tempo de extração foi variado entre 5 e 30 minutos. Para todos os experimentos os parâmetros do sistema cromatográfico foram mantidos constantes. Os resultados das áreas dos picos em função do tempo são mostrados na Tabela 5.5. A Figura 5.15 (extração) mostra a área do pico em função do tempo para solução de 50 ppm de AIS.

Tabela 5.5. Área dos picos cromatográficos de AIS, média e desvio padrão em diferentes tempos de extração, mantendo o tempo de dessorção fixo em 10 minutos.

Tempo	Áre	rea do pico (u.a.) Média Desvio		Desvio Padrão	
(mim)	1	2	3	(u.a.)	(DESVIPAD) (u.a.)
5	4034,2	4355,1	6099,4	4829,6	1111,4
10	6389,2	5423,1	6333,5	6048,6	542,4
15	7765,1	7576,0	8060,5	7800,5	244,2
20	7787,0	9800,9	11233,9	9607,3	1731,6
25	9022,0	10823,2	8123,8	9323,0	1374,6
30	9903,5	9983,3	8002,7	9296,5	1121,2



Figura 5.15: Perfil de extração e dessorção para uma solução de 50 ppm de AIS extraída de nanofibras de FSR.

Os resultados mostraram que o tempo de equilíbrio para a extração em *headspace,* foi de cerca de 20 min. Após esse tempo, nenhuma melhora significativa na recuperação do analito foi observada. Fica evidente a saturação da fibra pelo analito depois de 20 minutos de contato. Uma leve queda na capacidade de extração foi observada após esse tempo, possivelmente devido à competição com a água, nos sítios adsorventes da fibra.

5.4.3. Tempo de Dessorção

Para se avaliar a quantidade de analito dessorvida em relação ao tempo de exposição da fibra no injetor do CG foi utilizada a condição de tempo de extração fixa de 20 minutos e tempo de dessorção variando de 5 – 30 minutos. Também para estes experimentos, os parâmetros do sistema cromatográfico foram mantidos constantes. Os resultados das áreas dos picos em função do tempo de dessorção são mostrados na Tabela 5.6. A Figura 5.15 (dessorção) mostra a curva da área do pico em função do tempo de dessorção.

Tempo	Cempo Área do pico (u.a.) Méd		Média	Desvio Padrão	
(mim)	1	2	3	(u.a.)	(DESVIPAD) (u.a.)
5	6004,3	7120,6	9120,6	7415,2	1578,9
10	9600,4	10189,2	8876,7	9555,4	657,4
15	9029,1	7098,8	9567,5	8565,1	1298,1
20	6102,0	9199,0	9136,0	8145,7	1770,2
25	9673,0	8009,9	9654,5	9112,5	954,9
30	10500,0	8187,8	10099,5	9595,8	1235,7

Tabela 5.6. Área dos picos cromatográficos de AIS, média e desvio padrão em diferentes tempos de dessorção mantendo o tempo de extração fixo em 20 minutos.

Apesar do desvio padrão relativamente alto (em algumas medidas superior a 20%) pode-se perceber que a extração já se completa a partir de 10 minutos de permanência do dispositivo no injetor em modo *splitless*. Entretanto, esses erros são aceitáveis, uma vez que trata-se de testes feitos em condições ainda não otimizadas.

As melhores respostas para dessorção do analito foram obtidas em 10 e 30 minutos. Altos tempos de dessorção podem acarretar problemas na análise, como por exemplo, perda do material devido ao escape de analito pelo septo do injetor, ou injeção antecipada. Sendo assim, o tempo de 10 minutos foi considerado como melhor relação tempo/extração estudado para a etapa de dessorção. Isso se deve a temperatura elevada do injetor (140 °C), bem acim a da temperatura de ebulição do AIS (82,3°C). Nesta temperatura, o analito tem a capacidade de romper as interações físicas com o suporte nanofibrílico (dessorção), para posterior injeção no CG.

Através dos estudos de extração e dessorção em diferentes condições de tempo pode-se concluir que as melhores condições encontradas foram de 20 minutos para extração e 10 minutos para dessorção.

5.5. Validação do Método Analítico

5.5.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada para o analito AIS na faixa de concentração de 10 a 500 ppm. A obtenção da curva analítica a partir de diluições seriadas das soluções concentradas permitiu determinar o coeficiente de correlação linear (R) da reta. O
resultado foi satisfatório para o estudo que apresentou R de 0,9963. As áreas dos picos cromatográficos são mostrados na Tabela 5.7 e o ajuste da curva analítica na Figura 5.16.

Concentração AIS (ppm)	Área (u.a.)	R	R²
10	1076,9		
50	9205,9		
100	180049,0	0,9963	0,9927
250	456678,0		
500	1105014,2		

Tabela 5.7. Área dos picos cromatográficos de AIS para diferentes concentrações para o estudo de Linearidade.





Os critérios de aceitação para a linearidade foram satisfatórios, demonstrando que no intervalo estudado, o método é linear, e por conseguinte, que a área dos picos são diretamente proporcionais a concentração de AIS presente na amostra. Mesmo para a concentração de 10 ppm, o método foi linear e quantificável. A especificação para solventes residuais, segundo *U.S. Pharmacopeia*, para AIS é de 5000 ppm, bem acima da faixa utilizada para este

estudo. Esta faixa foi escolhida, pois em análises preliminares de solventes residuais em matérias-primas, as concentrações de AIS foram relativamente baixas, sendo necessário avaliar-se a lineraridade para concentrações próximas àquelas que serão observadas.

5.5.2. Especificidade

Para avaliar a especificidade do método, foram analisadas uma solução padrão, contendo Metanol (250 ppm), AIS (50 ppm) e Acetato de Etila (250 ppm). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram os mesmos utilizados no estudo de otimização da extração e dessorção, isto é, 20 minutos de extração e 10 minutos de dessorção da amostra. Os analitos foram analisados frente a solução branco do diluente.



A Figura 5.17 mostra o cromatograma para o estudo de especificidade.



As condições cromatográficas utilizadas proporcionaram que todos os analitos mostrassem tempos de retenção distintos, com alta resolução entre os mesmos. Além disso, a área do pico do álcool isopropílico não foi intensamente diminuída pela presença dos outros dois analitos, se comparada com os resultados das análises de amostras que continham apenas este analito, apesar de sua concentração ser 5 vezes menor. Pode-se concluir que, para estes analitos, o método é específico. Mesmo em uma matriz mais complexa e na presença de outras espécies, o analito AIS teve área de 8428 (u.a) equivalente ao estudo de otimização dos parâmetros cromatográficos, quando apresentou área de até 9607 (u.a), colaborando assim com a reprodutibilidade do método.

6. CONCLUSÃO

Por meio deste trabalho foi possível extrair a fibroína da seda a partir de casulos do bicho-da-seda, purificá-la e regenerá-la, para posterior emprego no processo de eletrofiação.

A técnica de eletrofiação se mostrou eficaz no preparo do revestimento adsorvente para SPME com nanofibras de FSR. Durante a avaliação preliminar, foi possível se obter fibras com diferentes morfologias e diâmetros médios. Por meio do estudo de delineamento experimental fatorial 2² foi determinado as melhores condições de processo com sendo 12,0 cm de distância, vazão de 0,20 mL h⁻¹ e tensão de 20 kV. Nestas condições, as nanofibras de FSR apresentaram diâmetro médio de 307 nm, boa uniformidade entre as fibras, ausência de coalescência e poucos *beads*.

O material obtido apresentou provável área superficial elevada, devido ao seu diâmetro nanométrico e formação de emaranhados, que envolveram a fibra de sílica fundida. O dispositivo adsorvente mostrou boa resistência térmica à temperaturas elevadas, mantendo sua morfologia até 4 horas a 250°C. Mesmo nesta condição, os danos não foram substanciais, mostrando que o dispositivo não deve perder as características morfológicas durante análises em CG.

As nanofibras de FSR mostraram boa capacidade em extrair o solvente AIS, que pode ser um solvente residual de diversas rotas de síntese, e eventualmente necessário quantificar em analise de fármacos, produtos químicos e outros. Garantiu a repetibilidade nas medidas cromatográficas, com tempo de até 30 minutos no injetor a 140 °C. A otimização das medidas cromatográficas mostraram também que, para uma solução de 50 ppm de AIS, o tempo de equilíbrio para a extração máxima em *headspace* foi de cerca de 20 min. Para o tempo de dessorção, após 10 minutos todo material havia dessorvido por completo.

O método foi desenvolvido e avaliado quanto à linearidade e especificidade. Nestes estudos foi possível observar que na faixa de concentração de 10 a 500 ppm de AIS o método foi linear, com R de 0,9927. Também foi seletivo, apresentando satisfatória resolução entre os picos de metanol, AIS e acetato de etila.

As fibras adsorventes para SPME mostraram vantagens se comparadas a outros recobrimentos e métodos para recobrimento de fibras. Estas vantagens estão associadas ao preparo do dispositivo ser rápido, menos custoso, pois utiliza um polímero natural de fácil obtenção, reprodutível e que podem ser seletivos a compostos com determinada volatilidade, como os álcoois.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; GREINER, A.; WENDORFF, J. H. Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 38, n. 6, p. 963-991, june 2013.
- AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer.* v. 49, n. 26, p. 5603 5621, Dec. 2008.
- ALTMAN, G. H.; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, R. L.; CHEN, J.
 S.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, D.L. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, v. 24, p. 401 416, 2003.
- BABEL, A.; LI, D.; XIA, Y. N.; JENEKHE, S. A. Electrospun nanofibers of blends of conjugated polymers: morphology, optical properties and field-effect transistors. *Macromolecules.* v. 38, n. 11, p. 4705–4771, 2005.
- BADAWI, M. A.; EL-KHORDAGUI, L. K. A quality by design approach to optimization of emulsions for electrospinning using factorial and Doptimal designs. European Journal of Pharmaceutical Sciences. In press, 2014.
- BAGHERI, H.; ROOSTAIE, A. Electrospun modified silica-polyamide nanocomposite as a novel fiber coating. *Journal of Chromatography A*, v.1324, p. 11 – 20, January, 2014.
- BAJI, A.; MAI, Y.,; WONG, S.; ABTAHI, M.; CHEN, P.; Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*, v. 70, p. 703–718, 2010.
- BAUER, A. J.; ZENG, T.; LIU, J.; UTHAISAR, C.; LI, B. The Enhanced Encapsulation Capacity of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane-based Copolymers for the Fabrication of Electrospun Core/Shell Fibers. Macromolecular Rapid Communications. in press, 2014.

- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 325 – 347, 2010.
- BOYS, C. V. On the production, properties, and some suggested uses of the finest threads. *Proceedings of the Physical Society of London*, v. 9, p. 8-19, 1887.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
 Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Anexo da Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2003.
- CESTARI, M.; MULLER, V.; RODRIGUES, J. H.; NAKAMURA, C. V.; RUBIRA, A.
 F.; MUNIZ, E. C. Preparing silk fibroin nanofibers through electrospinning, further heparin immobilisation towards haemocompatibility improvement. *Biomacromolecules*, v. 15, n. 5, p. 1762 1762, 2014.
- CHIGOME, S.; DARKOA, G.;, TORTO, N. Electrospun nanofibers as sorbent material for solid phase extraction. *Analyst*, v. 136, p. 2879-2889, 2011.
- CUI, W.; LI, X.; ZHOU, S.; WENG, J. Investigation on process parameters of electrospinning system through orthogonal experimental design. *Journal* of Applied Polymer Science, v. 103, p. 3105–3112, 2007.
- DIETZ, C.; SANZ, J.; CAMARA, C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Review article Journal of Chromatography A*, v. 1103, Issue 2, p. 183-192, Jan 2006.
- DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, v. 35, p. 151-160, 1995.
- DUARTE, A. P.; CAMPOS, E. A.; SCHNEIDER, R.; CAMPOS, S. D.; COTTICA, S.
 M.; FAVRETO, W. A. J. ZnO-coated glass fibers for the analysis of trihalomethanes by headspace-solid phase microextraction-gas chromatography. *Talanta.* v. 83, n. 2, p. 549–552, dec. 2010.

- ELMARCO® NANO FOR LIFE. Disponível em: http://www.elmarco.com/electrospinning/key-features-of-nanofibers/. Acesso em 02/02/2013.
- FENG, J.; QIU, H.; LIU, X.; JIANG, S. The development of solid-phase microextraction fibers with metal wires as supporting substrates. *Trac Trends in Analytical Chemistry*. v. 46, p. 44–58, may. 2013.
- Formhals, A. **Process and apparatus for preparing artificial threads**, US Pat. PI 1,975,504, Oct. 2, 1934.
- FREDDI, G.; PESINA, G.; TSUKADA, M. Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori) in N-methyl morpholine N-oxide. International Journal of Biological Macromolecules. v.24, p.251-263, 1999.
- GATFORD, J. Diagram showing fibre formation by electrospinning. A diagram of the electrospinning process showing the onset of instability. The New Zealand Institute for Plant and Food Research Ltd. 2008. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning#mediaviewer/File:Electrospinning Diagram.jpg. Acesso em 05/06/2014.
- GILBERT, WILLIAM. **De Magnete**. Translated by Mottelay, P. F. New York. Dover Publications Inc, 1958, 1893. p. 319–320
- GIVENS, S. R.; GARDNER, K. H.; RABOLT, J. F.; CHASE, D. B. High-Temperature Electrospinning of Polyethylene Microfibers from Solution. *Macromolecules.* v. 40, n. 3, p. 608–610, 2007.
- GUERRINI, L. M.; BRANCIFORTI, M. C.; BRETAS, R. E. S.; Oliveira, M. P. Eletrofiação do Poli(álcool vinílico) Via Solução Aquosa, Polímeros: Ciência e Tecnologia, v. 16, n. 4, p. 286 – 293, 2006.
- HA, S. W.; GRACZ, H. S.; TONELLI, A. E.; HUDSON, S. M. Structural study of irregular amino acid sequences in the heavy chain of Bombyx mori silk fibroin. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 5, p. 2563 – 2569, 2005.
- HA, Sung-Won. Structural study of *Bombyx Mori* silk fibroin during processing for regeneration. Raleigh, North Carolina, USA: Fiber and

Polymer Science Program, College of Textiles, North Carolina State University, 2004. Thesis (PhD).

- HU, J.; ZENG, F.; WEI, J.; CHEN, Y.; CHEN, Y. Novel controlled drug delivery system for multiple drugs based on electrospun nanofibers containing nanomicelles. *J Biomater Sci Polym.* v. 25, n. 3, p. 257-268, 2014.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008-Revisão 1. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, 2003.
- JIANG, R.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *Trac Trends in Analytical Chemistry.* v. 39, p. 245–253, oct. 2012.
- KIM, S. H.; KIM, S.; NAIR, S.; MOORE, E. Reactive Electrospinning of Cross-Linked Poly (2-hydroxyethyl methacrylate) Nanofibers and Elastic Properties of Individual Hydrogel Nanofibers in Aqueous Solutions. Macromolecules. v. 38, n. 9, p. 3719–3723, 2005.
- KLIMOV, E.; RAMAN, V.; VENKATESH, R.; HECKMANN, W.; STARK, R.
 Designing Nanofibers via Electrospinning from Aqueous Colloidal Dispersions: Effect of Cross-Linking and Template Polymer. *Macromolecules.* v. 43, n. 14, p. 6152–6155, 2010.
- KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, v. 39, n. 8, p. 549 – 559, 2007.
- LANÇAS, F. M.; Extração em Fase Sólida (SPE), São Carlos, SP: RIMA, 2004.
- MATTHEWS, J. A.; WNEK, G. E.;, SIMPSON, D. G.; BOWLIN, G. L. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, v. 3, p. 232-238, 2002.
- MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules*, v. 35, n. 22, p. 8456 a 8466, 2002.

- MIYAGUCHI, Y.; HU, J. Physicochemical Properties of Silk Fibroin after Solubilization Using Calcium Chloride with or without Ethanol. *Food Science and Technology Research*, v. 11, n. 1, p. 37 – 42, 2005.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Ed. Unicamp: Campinas, 2001.
- OLESIK, S. V.; ZEWE, J. W.; NEWSOME, T. E. Electrospun Nanofiber-Based
 Solid-Phase Microextraction Media. Analytical Techniques for Scientists. v.
 3, p. 533–540, 2012.
- ORRIACH-FERNÁNDEZ, F J.; MEDINA-CASTILLO, A .L.; DÍAZ-GÓMEZ, J. E.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. F.;, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. A sensing microfibre mat produced by electrospinning for the turn-on luminescence determination of Hg²⁺ in water samples. Sensors and Actuators B: Chemical. v. 195, p. 8-14,may 2014.
- PAL SYSTEM PREP AND LOAD PLATFORM. Disponível em: http://www.palsystem.com/index.php?id=261. Acesso em 01/02/2014.
- PARK, JUN-SEO. Electrospinning and its applications. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, v. 1, n. 4, p. 1 5, 2010.
- PAWLISZYN, J. Handbook of Solid Phase Microextraction. 1 Ed., USA. Elsevier, 2012. p. 100 120.
- PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. 1 Ed., New York, USA. Wiley - VCH, 1997.
- RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W. E.; LIM, T.C.; MA. Z. An introduction to electrospinning and nanofibers. 1 Ed., New Jersey. World Scientific. p. 15, 2005.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM,I.C.S.F.; MELO, L.F.C.
 Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

- SANTOS, C.; SILVA, C. J.; BÜTTEL, Z.; GUIMARÃES, R.; PEREIRA, S. B.; TAMAGNINI, P.; ZILLE, A. Preparation and characterization of polysaccharides/PVA blend nanofibrous membranes by electrospinning method. Carbohydrate Polymers. v. 99, n. 2, p. 584–592, Jan. 2014.
- SARLAK N.; NEJADA, M. A. F.; SHAKHESI, S.; SHABANI, K. Effects of electrospinning parameters on titanium dioxide nanofibers diameter and morphology: An investigation by Box–Wilson central composite design (CCD). Chemical Engineering Journal. v. 210, p. 410–416, nov. 2012.
- SCHAMBECK SFD GMBH[®]. Disponível em: <u>http://www.schambeck-</u> <u>sfd.com/en/hplc-gpc-products/gc-autosampler.php</u>. Acesso em 05/01/2014.
- SHANG, S.; ZHU, L. ;FAN, J. Intermolecular interactions between natural polysaccharides and silk fibroin protein. *Carbohydrate Polymers*, v. 93 p. 561 – 573, 2013.
- SHEN, Z.; THOMPSON, B. E.; MCHUGH, M. A. Electrospinning in Near-CriticalCO₂. Macromolecules. v. 39, n. 25, p. 8553–8555, 2006.
- SHIN, C.; CHASE, G. G.; RENEKER, D. H. Recycled expanded polystyrene nanofibers applied in filter media. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. v. 262, n. 1–, p. 211–215, 2005.
- SHIREY R. E. 4 SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. Handbook of Solid Phase Microextraction, 1 Ed., USA. Elsevier, 2012. P. 99 133.
- SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* v. 29, n. 13, p. 1989–2006, may 2008.
- SIZE METER 1.1[®]. Software desenvolvido por: Luiz Henrique Castelan Carlson sob orientação do professor Ariovaldo Bolzan. Laboratório de Controle de Processos. UFSC.
- SON, Y, J.; KIM, W. J.; YOO, H. S. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Arch Pharm Res.* v. 37, n. 1, p. 69-78, Jan. 2014.

- TAYLOR, G. Disintegration of water droplets in an electric field. *Proceeding of Royal Society A*, v. 280, n. 1382, p. 383-397, july, 1964.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. Química Nova, v. 4, n. 23, p. 523 – 530, 2000.
- VALLUZZI, R.; GIDO, S. P.; MULLER, W.; KAPLAN, D. L. Orientation of silk III at the air-water interface. International Journal of Biological Macromolecules, v. 24, n. (2-3), p. 237 – 242, 1999.
- VASCONCELOS, A.; FREDDI, G.; CAVACO-PAULO, A. Biodegradable
 Materials Based on Silk Fibroin and Keratin, *Biomacromolecules*, v. 9, n.
 4, p. 1299 1305, 2008.
- VEPARI, C.; KAPLAN, D. L. Silk as a biomaterial. Progress in Polymer Science, v. 32, n. 8-9 p. 991 1007, 2007.
- WANG, C.; YAN, K.; LIN, Y.; HSIEH, P. C. H. Biodegradable Core/Shell Fibers by Coaxial Electrospinning: Processing, Fiber Characterization, and Its Application in Sustained Drug Release. *Macromolecules*, v. 43, n. 15, p. 6389–6397, 2010.
- WANG, S.; ZHANG, Y.; WANG, H.; DONG, Z. Preparation, characterization and biocompatibility of electrospinning heparin-modified silk fibroin nanofibers, International Journal of Biological Macromolecules, v. 48, n. 2, p. 345 – 353, march, 2011.
- XIA, X.; WANG, X.; ZHOU, H.; NIU, X.; XUE, L.; ZHANG, X.; WEI, Q. The effects of electrospinning parameters on coaxial Sn/C nanofibers: Morphology and lithium storage performance. *Electrochimica Acta*, v. 121, n. 1, p. 345-351, march 2014.
- XIANG, Q.; MA, Y.; YU, D.; JIN, M.; WILLIAMS, G. R. Electrospinning using a Teflon-coated spinneret. Applied Surface Science. v. 284, n. 1, p. 889–893, nov. 2013.
- YANG, G.; WANG, J.; LI, L.; DING, S.; ZHOU, S. Electrospun Micelles/Drug-Loaded Nanofibers for Time-Programmed Multi-Agent Release. Macromol Biosci. in press, mar. 2014.

- YANILMAZ, M.; LU, Y.; DIRICAN, M.; FU, K.; ZHANG, X. Nanoparticle-onnanofiber hybrid membrane separators for lithium-ion batteries via combining electrospraying and electrospinning techniques. *Journal of Membrane Science Volume*, v. 456, p. 57 – 65, april, 2014.
- YIN, G. B.; ZHANG, Y. Z.; BAO, W. W.; WU, J. L.; SHI, D. B.; DONG, Z. H.; FU, W. G.; Study on the properties of the electrospun silk fibroin/gelatin blend nanofibers for scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 111, n. 3, p. 1471 1477, 2009.
- ZEWE, J. W.; STEACH, J. K.; OLESIK, S. V. Electrospun Fibers for Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 12, June, 2010.
- ZHANG, X.; REAGAN, M. R.; KAPLAN, D. L.; Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 61, n. 12, p. 988 – 1006, October 2009.
- ZHANG, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation, Analytical Chemistry, v. 66, n. 17, p. 844 853, September, 1994.
- ZHAO, C. H.; ASAKURA, T.; **Structure of silk studied with NMR**. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 39, n. 4, p. 301 – 352, 2001.
- ZHOU, C. Z.; CONFALONIERI, F.; MEDINA, N.; ZIVANOVIC, Y.; ESNAULT, C.; YANG, T.; JACQUETL, M.; JANIN, J.; DUGUETL, M.; PERASSO, R.; LI, Z.
 G. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 12, p. 2413 – 2419, may, 2000.
- ZHOU, F. L.; GONG, R. H. Manufacturing Technologies of Polymeric Nanofibres and Nanofibre Yarns. *Polymer International,* v. 57, p. 837–845, 2008.
- ZHOU, J.; CAO, C.; MA, X.; LIN, J. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules, v. 47, n. 4, p. 514 – 519, 2010.

ZHOU, W.; HE, J.; DU, S.; CUI, S.; GAO, W. Electrospun Silk Fibroin/Cellulose Acetate Blend Nanofibres: Structure and Properties, Iranian Polymer Journal, v. 20, n. 5, p. 389 – 397, 2011.

8. APÊNDICE

APÊNDICE 1: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio da análise de MEV e Tabelas com medidas: Delineamento experimental fatorial 2².



Figura 8.1: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 1).

Tabela 8.1: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas:
Delineamento experimental fatorial 2 ² na condição de vazão de 0,20 mL h ⁻¹ e 7,0
cm de distância (experimento 1).

N٥	Diâmetro (µm)										
1	0,5629	11	0,4872	21	0,4707	31	0,4359	41	0,4485	51	0,4389
2	0,6079	12	0,5947	22	0,4134	32	0,5057	42	0,6286	52	0,3440
3	0,6239	13	0,3284	23	0,7342	33	0,509	43	0,4818	53	0,4728
4	0,1813	14	0,4899	24	0,6552	34	0,8047	44	0,4411	54	0,5286
5	0,1538	15	0,2774	25	0,5057	35	0,5624	45	0,3284	55	0,3213
6	0,156	16	0,7041	26	0,5451	36	0,3333	46	0,6492	56	0,2924
7	0,6051	17	0,5135	27	0,6975	37	0,4979	47	0,4013	57	0,3671
8	0,3846	18	0,6154	28	0,3906	38	0,4244	48	0,3906	58	0,7546
9	0,6260	19	0,3626	29	0,3812	39	0,6537	49	0,8771	59	0,6923
10	0,4544	20	0,4142	30	0,4623	40	0,4790	50	0,5109	60	0,4205

Média: 0,4899 Desvio Padrão: 0,1518 Variância: 0,0231



Figura 8.2: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 2).

Tabela 8.2: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 2).

N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,3861	11	0,8316	21	0,3117	31	0,5043	41	0,5175	51	0,2558
2	0,3128	12	1,0183	22	0,5195	32	0,3861	42	0,2797	52	0,3377
3	0,3533	13	0,2352	23	0,4446	33	0,4188	43	0,5123	53	0,3306
4	0,4683	14	0,2797	24	0,3692	34	0,9106	44	0,2649	54	0,2597
5	0,4675	15	0,2464	25	0,4156	35	0,7032	45	0,3128	55	0,3861
6	0,2338	16	0,2610	26	0,2610	36	0,613	46	0,3896	56	0,5738
7	0,5116	17	0,245	27	0,3896	37	0,5522	47	0,4284	57	0,4775
8	0,6658	18	0,2219	28	0,4284	38	0,6114	48	0,4438	58	0,7013
9	1,0519	19	0,3160	29	0,3608	39	0,8520	49	0,4299	59	0,6130
10	0,9365	20	0,2558	30	0,4901	40	0,2464	50	0,5143	60	0,5355

Média: 0,4609 Desvio Padrão: 0,2034 Variância: 0,0414



Figura 8.3: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 3).

Tabela 8.3: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 3).

N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)								
1	1,1889	11	0,6579	21	0,3956	31	0,7022	41	0,4528	51	0,5576
2	1,0789	12	0,6239	22	0,5367	32	0,4380	42	0,3768	52	0,4663
3	1,2380	13	0,4656	23	0,5007	33	0,5966	43	0,4744	53	0,3370
4	1,0427	14	0,5296	24	0,5263	34	0,5062	44	0,519	54	0,3531
5	0,7331	15	0,4744	25	0,5322	35	0,4284	45	0,5795	55	0,2055
6	0,7771	16	0,4831	26	0,3956	36	0,6104	46	0,2592	56	0,2264
7	0,6500	17	0,4251	27	0,4965	37	0,3768	47	0,3947	57	0,1664
8	0,9089	18	0,6600	28	0,4663	38	0,2645	48	0,4603	58	0,1417
9	0,9568	19	0,5263	29	0,3579	39	0,4243	49	0,4596	59	0,1085
10	0,4852	20	0,5007	30	0,3832	40	0,4111	50	0,4596	60	0,4284

Média: 0,5197 Desvio Padrão: 0,2313 Variância: 0,0535



Figura 8.4: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 4).

Tabela 8.4: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 7,0 cm de distância (experimento 4).

N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,5559	11	0,4196	21	0,3835	31	0,2797	41	0,4446	51	0,6622
2	1,0441	12	0,6158	22	0,3861	32	0,4164	42	0,3485	52	0,7013
3	0,8069	13	0,2078	23	0,5175	33	0,3646	43	0,5253	53	0,8603
4	0,7132	14	0,4284	24	0,5116	34	0,2869	44	0,4416	54	0,9777
5	0,6288	15	0,2142	25	0,3387	35	0,4164	45	0,4683	55	0,2234
6	0,5837	16	0,2674	26	0,2649	36	0,3965	46	0,697	56	0,3494
7	0,3636	17	0,3377	27	0,3377	37	0,5116	47	0,7319	57	0,2674
8	0,3719	18	0,3029	28	0,2810	38	0,6277	48	0,8835	58	0,4423
9	0,8328	19	0,6041	29	0,4041	39	0,4196	49	0,3896	59	0,426
10	0,6415	20	0,7853	30	0,3533	40	0,3213	50	0,5348	60	0,4996
	Média: 0,4	903	Desvio Pa	Idrãc): 0,1975 V	ariâı	ncia: 0,039				



Figura 8.5: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 5).

Tabela 8.5: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 5).

N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,3931	11	0,2352	21	0,3416	31	0,3636	41	0,2649	51	0,1873
2	0,2597	12	0,2857	22	0,3285	32	0,3896	42	0,2939	52	0,2674
3	0,3973	13	0,2857	23	0,3029	33	0,3636	43	0,2904	53	0,3533
4	0,2869	14	0,261	24	0,2939	34	0,3128	44	0,3255	54	0,3533
5	0,2857	15	0,3117	25	0,2674	35	0,2649	45	0,2904	55	0,2597
6	0,2352	16	0,3255	26	0,3029	36	0,3636	46	0,2904	56	0,2323
7	0,2869	17	0,3128	27	0,2597	37	0,316	47	0,2761	57	0,2712
8	0,2674	18	0,2961	28	0,2904	38	0,3377	48	0,2961	58	0,2869
9	0,2219	19	0,3973	29	0,5259	39	0,2857	49	0,1978	59	0,2649
10	0,1818	20	0,4704	30	0,5043	40	0,3416	50	0,1978	60	0,3117
	Média: 0,3	3044	Desvio Pa	drão	: 0,067 V	ariâı	ncia: 0,004	5			



Figura 8.6: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 6).

Tabela 8.6: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,20 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 6).

N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)								
1	0,2895	11	0,3722	21	0,2426	31	0,3684	41	0,1842	51	0,2233
2	0,3000	12	0,2483	22	0,2497	32	0,3201	42	0,2248	52	0,3158
3	0,3169	13	0,3947	23	0,2426	33	0,5425	43	0,308	53	0,3768
4	0,3158	14	0,5055	24	0,3069	34	0,2834	44	0,2907	54	0,5062
5	0,3694	15	0,4111	25	0,4895	35	0,2055	45	0,2632	55	0,2834
6	0,3169	16	0,3069	26	0,3000	36	0,2426	46	0,2592	56	0,2122
7	0,2942	17	0,3000	27	0,4685	37	0,2632	47	0,2055	57	0,2354
8	0,3080	18	0,2605	28	0,2895	38	0,2592	48	0,3000	58	0,3212
9	0,2632	19	0,3000	29	0,5937	39	0,2426	49	0,2055	59	0,2797
10	0,4026	20	0,2797	30	0,3722	40	0,2105	50	0,2426	60	0,2942

Média: 0,3097 Desvio Padrão: 0,0876 Variância: 0,0077



Figura 8.7: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 7).

Tabela 8.7: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 7).

N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,3242	11	0,3378	21	0,3526	31	0,3526	41	0,2544	51	0,3049
2	0,3242	12	0,4003	22	0,3873	32	0,3526	42	0,3580	52	0,2887
3	0,2691	13	0,2963	23	0,2887	33	0,3378	43	0,3222	53	0,2293
4	0,3764	14	0,3797	24	0,2887	34	0,3038	44	0,4121	54	0,2532
5	0,2963	15	0,3443	25	0,2952	35	0,2334	45	0,4304	55	0,2887
6	0,309	16	0,3222	26	0,2738	36	0,2887	46	0,3930	56	0,3131
7	0,3090	17	0,4654	27	0,2952	37	0,6582	47	0,3049	57	0,4668
8	0,2952	18	0,3598	28	0,3080	38	0,6684	48	0,3553	58	0,2178
9	0,2796	19	0,4654	29	0,3553	39	0,7394	49	0,3038	59	0,2785
10	0,4191	20	0,283	30	0,2785	40	0,2544	50	0,3038	60	0,2606

Média: 0,3418 Desvio Padrão: 0,0986 Variância: 0,0097



Figura 8.8: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 8).

Tabela 8.8: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,50 mL h⁻¹ e 12,0 cm de distância (experimento 8).

N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,3494	11	0,3896	21	0,3306	31	0,2338	41	0,2078	51	0,2610
2	0,426	12	0,3494	22	0,4032	32	0,2094	42	0,261	52	0,4416
3	0,3692	13	0,3128	23	0,2857	33	0,2078	43	0,2571	53	0,3719
4	0,4196	14	0,2904	24	0,2904	34	0,245	44	0,2571	54	0,3533
5	0,3213	15	0,2869	25	0,3956	35	0,2234	45	0,2597	55	0,5504
6	0,3485	16	0,4228	26	0,2810	36	0,2857	46	0,3138	56	0,3965
7	0,3782	17	0,3533	27	0,3377	37	0,3861	47	0,4438	57	0,3746
8	0,3636	18	0,4416	28	0,2395	38	0,3416	48	0,2395	58	0,2597
9	0,2904	19	0,2571	29	0,2395	39	0,3117	49	0,3835	59	0,2204
10	0,3692	20	0,2904	30	0,2395	40	0,3128	50	0,2961	60	0,2029

Média: 0,3197 Desvio Padrão: 0,0745 Variância: 0,0056



Figura 8.9: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 9).

Tabela 8.9: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 9).

N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)
1	0,5280	11	0,3906	21	0,4111	31	0,3440	41	0,5192	51	0,4879
2	0,3333	12	0,3450	22	0,3343	32	0,4054	42	0,4932	52	0,6975
3	0,4103	13	0,4623	23	0,2726	33	0,3846	43	0,5135	53	0,4872
4	0,2726	14	0,4644	24	0,2322	34	0,5676	44	0,4103	54	0,4587
5	0,2924	15	0,4359	25	0,359	35	0,3562	45	0,4478	55	0,4872
6	0,4351	16	0,3098	26	0,2821	36	0,3626	46	0,5451	56	0,2832
7	0,3488	17	0,2538	27	0,2832	37	0,4367	47	0,4899	57	0,2003
8	0,3698	18	0,4054	28	0,2206	38	0,4367	48	0,4382	58	0,3284
9	0,4142	19	0,3906	29	0,2774	39	0,5647	49	0,4925	59	0,3671
10	0,3130	20	0,4879	30	0,3626	40	0,4054	50	0,4536	60	0,3855

Média: 0,3991 Desvio Padrão: 0,0972 Variância: 0,0094



Figura 8.10: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 10).

Tabela 8.10: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 10).

N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)
1	0,5298	11	0,4416	21	0,3485	31	0,2395	41	0,2571	51	0,6234
2	0,5808	12	0,4164	22	0,3692	32	0,2961	42	0,2219	52	0,2961
3	0,7749	13	0,5934	23	0,3494	33	0,2338	43	0,4675	53	0,4032
4	0,5923	14	0,4164	24	0,3746	34	0,2797	44	0,5860	54	0,3746
5	0,3636	15	0,4942	25	0,4041	35	0,3128	45	0,7277	55	0,1515
6	0,3905	16	0,4544	26	0,4831	36	0,3673	46	0,5298	56	0,2450
7	0,5461	17	0,4625	27	0,4299	37	0,3896	47	0,4423	57	0,2761
8	0,5455	18	0,3896	28	0,2610	38	0,4299	48	0,4416	58	0,3138
9	0,4683	19	0,3255	29	0,3117	39	0,3965	49	0,5201	59	0,3636
10	0,4962	20	0,3533	30	0,3128	40	0,2961	50	0,5221	60	0,2961

Média: 0,4097 Desvio Padrão: 0,125 Variância: 0,0156



Figura 8.11: Medidas de diâmetro médio das nanofibras de FSR eletrofiadas por meio de MEV. Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 11).

Tabela 8.11: Medidas de diâmetro médio (μ m) das nanofibras de FSR eletrofiadas: Delineamento experimental fatorial 2² na condição de vazão de 0,35 mL h⁻¹ e 9,5 cm de distância (experimento 11).

N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N⁰	Diâmetro (µm)	N٥	Diâmetro (µm)
1	0,5007	11	0,3722	21	0,2895	31	0,3255	41	0,3431	51	0,4243
2	0,6316	12	0,3212	22	0,4737	32	0,3912	42	0,3982	52	0,2122
3	0,7086	13	0,337	23	0,3768	33	0,217	43	0,4316	53	0,2483
4	0,2834	14	0,5476	24	0,6075	34	0,4119	44	0,4161	54	0,4744
5	0,3656	15	0,519	25	0,4744	35	0,2426	45	0,5425	55	0,3740
6	0,3421	16	0,3370	26	0,3579	36	0,3169	46	0,5184	56	0,3768
7	0,2354	17	0,3795	27	0,6888	37	0,3722	47	0,4603	57	0,4916
8	0,2747	18	0,4411	28	0,3912	38	0,2632	48	0,4528	58	0,4356
9	0,2834	19	0,4744	29	0,5028	39	0,2846	49	0,4380	59	0,3722
10	0,4603	20	0,4284	30	0,5693	40	0,3080	50	0,2483	60	0,4340

Média: 0,4033 Desvio Padrão: 0,1125 Variância: 0,0126