Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Avaliação de Compostos Orgânicos Semi-Voláteis em Amostras de Águas Subterrâneas via CG/EM utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersivo - DLLME

Aluno: Raphael Fabbro Gomes

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientador: Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

São Paulo

2014

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Avaliação de Compostos Orgânicos Semi-Voláteis em Amostras de Águas Subterrâneas via CG/EM utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersivo - DLLME

Aluno: Raphael Fabbro Gomes

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientador: Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

São Paulo

2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que me foi concedido, agradeço aos meus pais pelo carinho, compreensão e todos os incentivos.

Ao Prof. Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos, por acreditar e apoiar a minha pesquisa desde o principio, pela troca de conhecimentos e todo incentivo desde o inicio até a conclusão do mestrado.

A Analytical Solutions Ltda por fornecer sua infra-estrutura para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Ao IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos diversos amigos que incentivaram, discutiram, ajudaram em diversas etapas durante a realização de toda a pesquisa, nos quais não irei citar nomes para evitar injustiças, pois foram muitos e todos são igualmente especiais para mim.

A todos, deixo aqui registro do meu muito obrigado.

“Felix qui potuit rerum cognoscere causas”

Virgilio

Avaliação de Compostos Orgânicos Semi-Voláteis em Amostras de Água Subterrâneas via CG/EM utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersivo - DLLME

Raphael Fabbro Gomes

Resumo

A contaminação das águas subterrâneas e recursos hídricos superficiais nas últimas décadas representam uma ameaça para a saúde pública. No Brasil, as águas subterrâneas desempenham importante papel no abastecimento público e privado, suprindo as mais variadas necessidades de água em diversas cidades e comunidades. Com a finalidade de garantir a qualidade da água consumida, o ser humano vem desenvolvendo desde a década de 70 diversas técnicas analíticas para monitorar a presença de contaminantes. No entanto, algumas dessas técnicas podem gerar resíduos piores ao meio ambiente do que as já existentes. Desta maneira a partir da década de 90, surge uma nova tendência na forma como conduzir as análises químicas, com o intuito de reduzir o impacto ambiental. No presente trabalho, foi explorada uma técnica de extração que atende tais objetivos, denominada como microextração líquido-líquido dispersivo – DLLME, desenvolvida por M.Rezaee e colaboradores. Onde foram validados os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, atingindo limites entre 0,04 a 1,56 μgL^{-1}, também foram analisadas amostras de águas subterrâneas coletadas aleatoriamente, em 4 postos de gasolina localizados na cidade de São Paulo.

Evaluation of Semi-Volatile Organic Compounds in Groundwater Samples by GC / MS using Liquid-Liquid Microextraction Dispersive - DLLME

Raphael Fabbro Gomes

Abstract

Contaminations of groundwater and surface water resources in recent decades represent a threat to public health. In Brazil, groundwater plays an important role in public and private provision, meeting the diverse needs of water in various cities and communities. In order to ensure the quality of water consumed, the human being has been developing since the 70`s analytical techniques to monitor the presence of contaminants. However, some of these techniques can generate worst waste to the environment than the existing ones. Thus from the 90's, a new trend in how to conduct chemical analysis, aiming to reduce the environmental impact arises. In the present study, we explored a technique for extraction that meets these goals, termed as dispersive liquid-liquid microextraction - DLLME, developed by M.Rezaee and collaborators. Where polycyclic aromatic hydrocarbons have been validated, reaching limits between 0.040 to 1.558 $\mu g L^{-1}$, also groundwater samples randomly collected from four gas stations located in the city of São Paulo analyzed.

Sumário

Página

1 Introdução 14
2 Objetivo 21
3 Revisão da Literatura 22
3.1 Técnicas de Extração 22
3.1.1 Extração liquido-liquido – LLE 22
3.1.2 Extração de fase sólida - SPE 25
3.1.3 Microextração de fase sólida - SPME 26
3.1.4 Microextração líquido-líquido Dispersivo - DLLME 30
3.2 Cromatografia 34
3.2.1 Cromatografia em fase gasosa (CG) 36
3.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas 40
3.3.1 Processo de Ionização 40
3.3.2 Razão Massa/Carga (m/z) 41
3.3.3 Analisador ou Filtro de Massas Quadrupolar 43
3.3.4 Detector 43
3.4 Validação de Método 44
4 Materiais e Métodos 52
5 Amostragem 54
6 Otimização do método de DLLME 55
7 Resultados e Discussão 67
7.1 Seletividade 67
7.2 Curvas de Calibração e faixa linear de trabalho 76
7.3 Faixa Linear de trabalho 85
7.4 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ). 94
7.5 Precisão e Exatidão 96
7.6 Resultados em Amostras Reais 97
8 Conclusão 99
9 Referências Bibliográficas 101

Lista de Tabelas

Página

Tabela 3-1: Lista cronológica dos eventos mais relevantes no desenvolvimento da cromatografia. 35
Tabela 4-1: Lista de Reagentes 53
Tabela 4-2: Lista de Padrões 53
Tabela 6-1: Recuperação dos Solventes em função da variação do pH, do solvente dispersor e do solvente extrator. 56
Tabela 6-2: Resultados da recuperação (%) do padrão em diferentes condições de extração. 59
Tabela 6-3: Grupos de monitoramento de íons e os “dwell time” 64
Tabela 7-1: Resultado do Cálculo do Teste F para o Naftaleno. 68
Tabela 7-2: Resultado do Cálculo do Teste F para o Acenaftileno 68
Tabela 7-3: Resultado do Cálculo do Teste F para o Acenafteno. 69
Tabela 7-4: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fluoreno 69
Tabela 7-5: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fenantreno. 70
Tabela 7-6: Resultado do Cálculo do Teste F para o Antraceno. 70
Tabela 7-7: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fluoranteno 71
Tabela 7-8: Resultado do Cálculo do Teste F para o Pireno 71
Tabela 7-9: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[a]antraceno: 72
Tabela 7-10: Resultado do Cálculo do Teste F para o Criseno 72
Tabela 7-11: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[b]fluoranteno 73
Tabela 7-12: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[k]fluoranteno 73
Tabela 7-13: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[a]pireno 74
Tabela 7-14: Resultado do Cálculo do Teste F para o Indeno[123-cd]pireno 74
Tabela 7-15: Resultado do Cálculo do Teste F para o Dibenzo[a,h]antraceno 75
Tabela 7-16: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[g,h,i]perileno 75
Tabela 7-17: Resultados do cálculo do Fator de Resposta Médio e Desvio Padrão Relativo. 85
Tabela 7-18: Resultados dos limites de Detecção e Quantificação. 95
Tabela 7-19: Comparação dos Limites de Quantificação com o Conama 420. 96

Tabela 7-20: Resultados dos Cálculos de Precisão e Exatidão e suas Avaliações. 97
Tabela 7-21: Resultados das amostras de água subterrânea. 98

Lista de Figuras

Página

Figura 1-1: Estruturas dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA). 16
Figura 1-2: Estrutura dos Compostos Fenólicos 17
Figura 1-3: Estruturas dos Ésteres de ftalato 18
Figura 3-1: Fluxograma da extração líquido-líquido.[16] 23
Figura 3-2: Todas as etapas do processo de extração por SPE. 28
Figura 3-3: Etapas do processo de extração por SPME. 29
Figura 3-4: Diagrama mostrando o crescimento do número de artigos publicados utilizando DLLME nos últimos 8 anos. (Fonte: Google Scholar acesso em 03/02/2014). 30
Figura 3-5: Etapas de extração da técnica de DLLME. 32
Figura 3-6: Diagrama de um cromatógrafo a gás: 1- Unidade de Gás; 2- Unidade de Amostragem; 3- Unidade da Coluna; 4- Unidade do Forno; 5- Unidade do Detector; 6- Processador de Dados. 39
Figura 3-7: Unidades fundamentais do espectrômetro de massas. 40
Figura 3-8: Mecanismos de reação e fragmentação ocorridos no espectrômetro de massas e o seu espectro de massas. 42
Figura 6-1: Programação de aquecimento do forno do cromatógrafo para analise dos SVOC 57
Figura 6-2: Programação de aquecimento do forno do cromatógrafo para analise do PAH 63
Figura 6-3: Cromatograma dos 16 PAH na concentração de 1000 $\mu g.L^{-1}$ 66
Figura 7-1: Curva de Calibração do Naftaleno 76
Figura 7-2: Curva de Calibração do Acenaftileno 77
Figura 7-3: Curva de Calibração do Acenafteno 77
Figura 7-4: Curva de Calibração do Fluoreno 78
Figura 7-5: Curva de Calibração do Fenantreno 78
Figura 7-6: Curva de Calibração do Antraceno 79
Figura 7-7: Curva de Calibração do Fluoranteno 79
Figura 7-8: Curva de Calibração do Pireno 80

Figura 7-9: Curva de Calibração do Benzo[a]antraceno.....80
Figura 7-10: Curva de Calibração do Criseno 81
Figura 7-11: Curva de Calibração do Benzo[b]fluoranteno.....81
Figura 7-12: Curva de Calibração do Benzo[k]fluoranteno 82
Figura 7-13: Curva de Calibração do Benzo[a]pireno.....82
Figura 7-14: Curva de Calibração do Indeno[123-cd]pireno 83
Figura 7-15: Curva de Calibração do Dibenzo[a,h]antraceno 83
Figura 7-16: Curva de Calibração do Benzo[b,h,i]perileno 84
Figura 7-17: Estudo da Faixa Linear para o Naftaleno 86
Figura 7-18: Estudo da Faixa Linear para o Acenaftileno.....87
Figura 7-19:Estudo da Faixa Linear para o Acenaftileno.....87
Figura 7-20: Estudo da Faixa Linear para o Acenafteno. 88
Figura 7-21: Estudo da Faixa Linear para o Fluoreno. 88
Figura 7-22: Estudo da Faixa Linear para o Fenantreno. 89
Figura 7-23: Estudo da Faixa Linear para o Antraceno. 89
Figura 7-24: Estudo da Faixa Linear para o Fluoranteno. 90
Figura 7-25: Estudo da Faixa Linear para o Pireno. 90
Figura 7-26: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[a]antraceno. 91
Figura 7-27: Estudo da Faixa Linear para o Criseno. 91
Figura 7-28: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[b]fluoranteno.....92
Figura 7-29: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[k]fluoranteno.....92
Figura 7-30: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[a]pireno. 93
Figura 7-31: Estudo da Faixa Linear para o Indeno[123-cd]pireno.....93
Figura 7-32: Estudo da Faixa Linear para o Dibenzo[a,h]antraceno.....94
Figura 7-33: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[g,h,i]perileno. 94

Lista de Abreviaturas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CG - Cromatografia a gás .

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente.

Da – daltons.

DC - corrente contínua.

DLLME - dispersive liquid-liquid microextraction (microextração líquido-líquido dispersivo).

EPA - Environmental Protection Agency (Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos).

HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

Kd - coeficiente de distribuição.

LD - Limite de Detecção

LLE - liquid-liquid extration (extração líquido-líquido).

LQ - Limite de Quantificação

MMA - Ministério do Meio Ambiente.

RF – radiofreqüência.

SEMA - Secretária Especial do Meio Ambiente.

SFC - cromatografia por fluído supercrítico.

SPE - solid-phase extraction (extração em fase sólida).

SPME - Solid Phase microextraction (microextração em fase sólida).

SVOC - semi-volatile organic compounds (compostos orgânicos semi-voláteis).

UE - União Européia.

VOC - volatile organic compounds (compostos orgânicos voláteis).

WHO/OMS - “World Health Organization” ou Organização Mundial da Saúde.

1 Introdução

A água é o elemento fundamental da vida. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo espectro das atividades humanas, onde se destacam, entre outros, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida aquática.

O homem no decorrer de sua civilização se estabeleceu em locais onde sempre existiu grande abundância de água. Mas com o aumento das populações e a exploração dos recursos naturais para seu próprio benefício, ele vem se comportando de uma forma voraz, criando formas perigosas de poluição não só para a vida aquática, mas também para sua própria vida. [1]

As águas subterrâneas são fundamentais para o desenvolvimento humano. No Brasil, elas desempenham importante papel no abastecimento público e privado, suprindo as mais variadas necessidades de água em diversas cidades e comunidades, bem como em sistemas autônomos residenciais, indústrias, serviços, irrigação agrícola e lazer. Menos reconhecido, mas igualmente importante, é seu papel ecológico, fundamental para manutenção da flora, fauna e fins estéticos ou paisagísticos em corpos d'água superficiais, pois a perenização da maior parte dos rios, lagos e pântanos é feita pela descarga de aqüíferos, através dos fluxos de base. Esse mesmo fluxo de base também é importante para auxiliar na diluição de esgotos e evitar o assoreamento dos rios pelo acúmulo de sedimentos e lixos nas cidades devido à sua perda de capacidade de arrasto. [2]

Com a finalidade de garantir a qualidade da água consumida, o ser humano vem desenvolvendo desde a década de 70 diversas técnicas analíticas para monitorar a presença de contaminantes. No entanto, algumas dessas técnicas podem gerar resíduos piores ao meio ambiente do que as já existentes.

Desta maneira a partir da década de 90, surge uma nova tendência na forma como conduzir as análises químicas, com o intuito de reduzir o impacto ambiental. Essa nova visão é denominada *Green Chemistry*, ou química verde,

química limpa, ou ainda, química auto-sustentável. O conceito da química verde, que inclui 12 princípios básicos, é definido como o projeto, o desenvolvimento e a aplicação dos produtos e processos químicos visando à redução, eliminação, ou ainda a utilização de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente. Iniciaram-se desta forma diversas pesquisas com o objetivo de desenvolver métodos ambientalmente seguros. [3]

Um dos principais alvos dos estudos envolvendo a química verde é o monitoramento da qualidade das águas, haja vista o papel fundamental desempenhado pela água, na manutenção de todos outros segmentos da natureza. Para que esse monitoramento (não apenas da água, mas também de outras matrizes, como solos e atmosfera) fosse realizado de forma eficaz, diversas agências de controle ambiental foram criadas. Dentre elas, destacam se a agência de proteção ambiental, EPA, do inglês - *Environmental Protection Agency* que, atualmente, é um dos principais órgãos de controle ambiental do mundo e, em âmbito nacional, o Ministério do Meio Ambiente (MMA), representado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).[3]

Segundo a Lei da Política Nacional do Meio Ambiente, Lei de nº 6938 de 31 de agosto de 1981, artigo 2 “A Política Nacional do Meio Ambiente tem por objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental que propicia à vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento sócio-econômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana”. Portanto, o monitoramento das águas se torna de vital interesse econômico e social do País.[4]

Segundo o artigo 7º da Lei nº. 6.938/1981, juntamente com a criação do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, e a Secretária Especial do Meio Ambiente – SEMA, estabeleceu dentre outras propostas, as normas, limites e critérios para o licenciamento de atividades efetivas ou potencialmente poluidoras, bem como determinou a realização de estudos das alternativas e das possíveis conseqüências ambientais de projetos públicos ou privados, requisitando aos órgãos federais, estaduais e municipais. [4]

A contaminação das águas subterrâneas e recursos hídricos superficiais nas últimas décadas representam uma ameaça para a saúde pública.

A partir de uma perspectiva analítica, os poluentes orgânicos na água podem ser classificados como compostos orgânicos voláteis VOC do inglês – “volatile organic compounds” e compostos orgânicos semi-voláteis SVOC do inglês – “semi-volatile organic compounds”. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA) listou inúmeros compostos orgânicos voláteis, tais como os BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), e semi-volateis, como os pesticidas organoclorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fenóis, nitrofenois, ésteres de ftalatos, cetonas, anilinas, nitrosaminas e cetonas como compostos regulamentados. [5]

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) apresentados na Figura 1-1 são um dos principais poluentes no ponto de vista ambiental, originados da combustão incompleta de matéria orgânica e combustíveis fósseis. Os HPA`s com 4 ou mais anéis aromáticos tendem a condensar em partículas e são mais carcinogênicos e mutagênicos que aqueles que possuem poucos anéis aromáticos. [6]

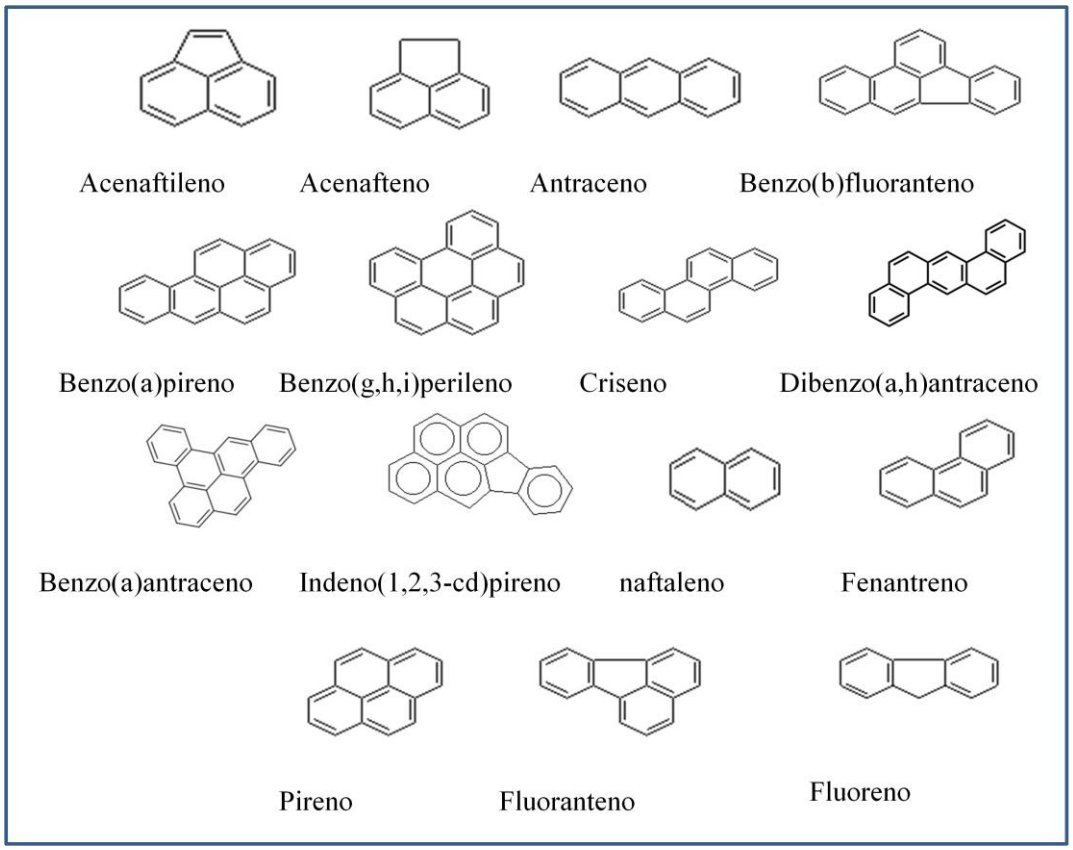

Figura 1-1: Estruturas dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA).

Os compostos fenólicos apresentados na Figura 1-2, são substâncias químicas que estão presentes em muitos processos industriais e, conseqüentemente, são liberados em muitos efluentes e águas residuais. Em razão da sua toxicidade e persistência no ambiente, uma variedade de fenóis foram incluídos em programas de monitoramentos, como a da proteção ambiental dos EUA (EPA) e da União Européia (UE). [7]

Fenóis também têm um efeito adverso sobre o gosto e o odor dá água potável mesmo em baixas concentrações. Sua toxicidade e sua influência sobre o gosto e o cheiro são as razões pelas quais estes compostos são atualmente analisados em água potável e de superfície. [8]

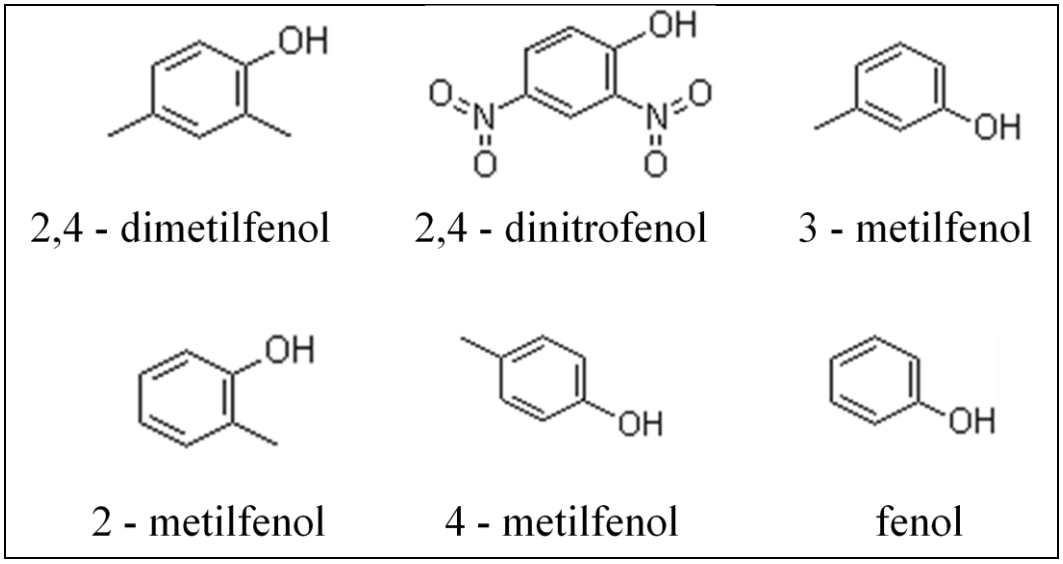

Figura 1-2: Estrutura dos Compostos Fenólicos

A legislação da União Européia (UE) em 1980, estabeleceu que a concentração máxima admissível de fenóis na água destinada ao consumo humano como sendo de 0,5 μgL^{-1} para o teor total e 0,1 μgL^{-1} para os compostos individuais. [9]

Os ésteres de ftalato demonstrados na Figura 1-3 têm uma grande variedade de aplicações industriais, agrícolas e domésticas, o mais importante é a sua utilização como plastificantes que melhoram a flexibilidade e funcionalidade

dos materiais poliméricos. Devido a estas propriedades, nos últimos anos, a produção de ésteres de ftalato e sua utilização têm aumentado significativamente, como conseqüência os ésteres de ftalato migram dos materiais para o meio ambiente, sendo encontrados na água, solos, ar, alimentos e no corpo humano. [10]

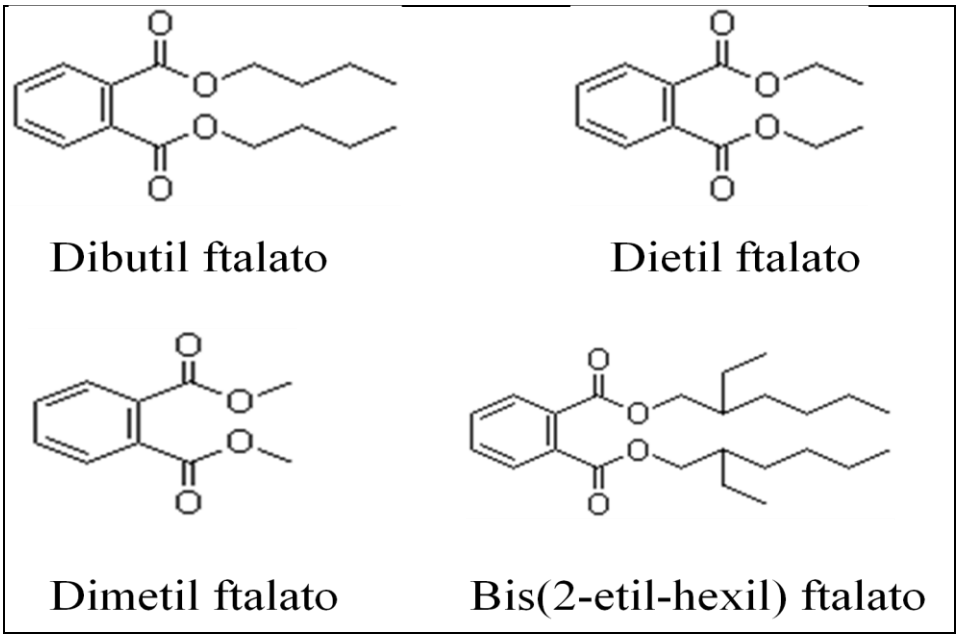

Figura 1-3: Estruturas dos Ésteres de ftalato

Os ftalatos mais utilizados são dimetil-, dietil-, di-n-butil-, butilbenzil-, bis(2-etilhexil)-, e di-n-octil ésteres de ftalato. O bis(2-etil-hexil) adipato entre outros plastificantes, têm sido incluídos nas listas de poluentes prioritários em vários países. Por exemplo, EPA estabeleceu uma concentração máxima admissível em água de 6 μgL^{-1} para o bis(2-etil-hexil) ftalato e 0,4 mgL^{-1} para o bis(2-etil-hexil) adipato, sendo este o mais utilizado e representa um quarto da produção total de plastificantes. [11]

Técnicas analíticas com grande sensibilidade tais como a Cromatografia a gás (CG) e a Cromatografia Líquida (Cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE) associadas aos diversos detectores inclusive a espectrometria de massas, têm contribuído constantemente para a análise de amostras ambientais na determinação de compostos em baixas concentrações. [12]

Apesar dos avanços tecnológicos substanciais no campo analítico, a maioria dos instrumentos ainda não pode lidar diretamente com as matrizes complexas das amostras. Portanto uma primeira etapa de preparação é fundamental antes da análise instrumental, sendo o seu principal objetivo de eliminar interferentes e concentrar os analitos de interesse e tornando-os mais compatível com o sistema de análise. [13]

A extração líquido-líquido LLE do inglês – “liquid-liquid extration” é baseada na transferência de um analito presente em amostra aquosa para um solvente imiscível com a fase aquosa, sendo amplamente utilizada na preparação de amostras. No entanto, existem algumas desvantagens, tais como a formação de emulsão, o uso de grande volume de amostra e de solvente orgânico tóxico e por conseqüência a geração de grandes quantidades de poluentes. Desta forma, a técnica de extração se torna muito cara, demorada e prejudicial ao meio ambiente. [13]

Outra abordagem na preparação de amostra mais popular é a extração em fase sólida SPE do inglês – “solid-phase extraction” que embora utilize menos solvente que a LLE, o uso pode ainda ser considerado significativo e normalmente é necessário um passo extra de concentração do extrato até alcançar um volume menor. [13]

Nas ultimas duas décadas, foi empregado um esforço substancial para adaptar e desenvolver métodos de extração com o objetivo de economizar tempo, trabalho e materiais. Desta forma a miniaturização tem sido a peça fundamental para alcançar esse objetivo. [13]

No presente trabalho, foi explorado uma técnica de extração que atende tais objetivos, desenvolvida por M.Rezaee e colaboradores [13], que é denominada com microextração líquido-líquido dispersivo DLLME do inglês – “dispersive liquid-liquid microextraction”.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e

documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. [14]

2 Objetivo

O objetivo do trabalho é determinar os compostos orgânicos semi-volateis SVOC, buscando aprimorar e validar o método de micro-extração líquido-líquido dispersivo DLLME em águas subterrâneas através da técnica de cromatografia á gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Os objetivos específicos para atingir este trabalho serão:

- Aprimorar a técnica de micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para a extração dos SVOC em águas subterrâneas;
- Realizar a validação da técnica de micro-extração líquido-líquido dispersiva (DLLME) para obtenção dos SVOC; e
- Analisar amostras de águas subterrâneas coletadas em postos de gasolina no estado de São Paulo;

3 Revisão da Literatura

Durante a segunda metade do século XX, foi observado um crescimento na demanda por técnicas de separação mais complexas, tais mudanças se deram principalmente devido a aceleração da industrialização. O surgimento das indústrias petroquímicas, de processamento de alimentos, a melhoria dos produtos farmacêuticos e as contaminações ambientais entre outros motivos, exigiram uma melhoria na metodologia analítica já existente. Como resultado destas demandas, a química analítica evoluiu de procedimentos muito simples em sua maioria qualitativos e semiquantitativos, para determinações instrumentais complexas. [15]

3.1 Técnicas de Extração

Uma das etapas fundamentais para análise química orgânica é o processo de extração, que com o passar do tempo, esse processo tem evoluído junto com as técnicas instrumentais. A seguir são demonstradas, algumas técnicas utilizadas ultimamente.

3.1.1 Extração liquido-liquido – LLE

A extração líquido-líquido (LLE – liquid-liquid extraction) é uma técnica aplicada entre solventes imiscível, amplamente difundida nas indústrias e laboratórios. Consiste, basicamente, em utilizar um solvente para remover um ou mais analitos da amostra liquida, conforme se verifica na Figura 3-1. [16]

Pode-se descrever a distribuição entre dois solventes imiscíveis através do coeficiente de distribuição. O Coeficiente de distribuição é uma constante de equilíbrio que descreve a distribuição de uma substancia a ser analisada (A) entre dois solventes imiscíveis, por exemplo, uma solução aquosa e uma fase orgânica. [16]

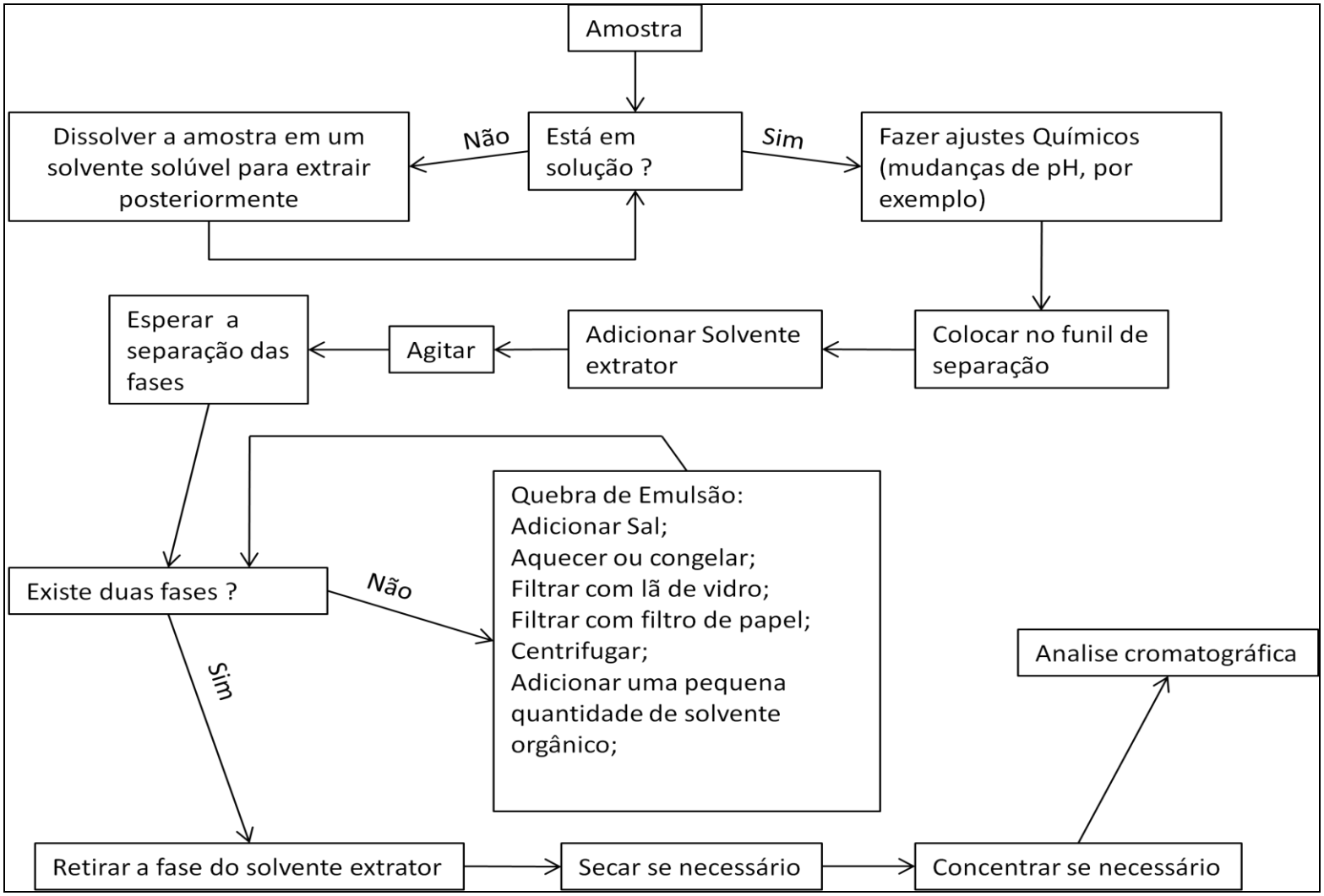

Figura 3-1: Fluxograma da extração líquido-líquido.[16]

Esse equilíbrio pode ser obtido por agitação de uma solução aquosa contendo o analito A com um solvente orgânico. Esse processo pode ser expresso com na equação 1:

$$A_{(aq)} \leftrightarrow A_{(org)} \quad (1)$$

Sendo, $A_{(Aq)}$ e $A_{(Org)}$ as fases aquosas e orgânicas respectivamente. A razão das atividades de A entre os dois solventes é uma constante e pode ser representada na equação 2:

$$K_d = \frac{(A_{org})}{(A_{aq})} \quad (2)$$

Sendo, K_d o coeficiente de distribuição, o valor numérico de K_d nos fornece valores constantes uteis, a uma dada temperatura. A expressão mais útil é a fração do analito extraído (E), geralmente expresso em porcentagem conforme demonstrado nas equações 3 e 4:

$$E(\%) = \frac{C_{A(org)}V_{A(aq)}}{(C_{A(org)}V_{A(org)}+C_{A(aq)}V_{A(aq)})} .100 \quad (3)$$

ou

$$E(\%) = \frac{K_d V}{(1+K_d V)} .100 \quad (4)$$

Sendo, $C_{A(org)}$ e $C_{A(aq)}$ são as concentrações do analito na fase orgânica e aquosa, $V_{A(org)}$ e $V_{A(aq)}$ são os volumes das fases orgânicas e aquosa, respectivamente e V é a razão entre ($V_{A(org)}$/ $V_{A(aq)}$).

Desta maneira, para se obter uma recuperação quantitativa (>99%) do analito em uma das fases, serão necessários duas ou três extrações com o solvente extrator isento de contaminantes, considerando o valor de K_d igual a 10.

A equação 5 é utilizada normalmente para determinar a quantidade de analito extraído após sucessivas extrações:

$$E = 1 - \left[\frac{1}{(1+K_d V)}\right]^n \quad (5)$$

Sendo, n o número de extrações. Portando, se a razão entre os volumes das duas fases for igual a 1 e o K_d for igual a 3, serão necessários 4 extrações para conseguir uma recuperação maior que 99%.

3.1.2 Extração de fase sólida - SPE

A extração por fase sólida, mais conhecida como SPE (Solid Phase Extration), consiste basicamente em condicionar uma fase estacionaria com um solvente orgânico e em seguida é eluído um liquido que contenha o composto alvo por uma fase estacionaria, podendo ser uma coluna ou mesmo um disco no intuito de reter este composto. [16]

Existem diversas tipos de fases estacionárias (sílica, alumina, florisil, carbono e resinas) cuja seleção depende da natureza dos analitos e as quais correspondem diferentes tipos de interação do analito-fase estacionária: [17]

a) Fase Reversa - envolve interações de analitos presentes em matrizes polares com uma fase estacionária apolar. Como exemplo tem-se as fases constituídas por cadeias C8 e C18 ligadas a grupos silanol de sílica. [17]

b) Fase Normal - envolve interações entre uma fase estacionária polar e analitos presentes em matrizes apolares. Por exemplo, as de fases polares são

as de sílica, alumina ou a sílica funcionalizada com grupos polares tais como, CN, NH_2 ou diol. [17]

c) Troca Iónica - envolve interações iónicas entre a fase estacionária (positiva ou negativa) e os solutos carregados. Uma diversidade de resinas aniônicas ou catiônicas podem ser usadas neste tipo de interações. [17]

d) Adsorção - envolve a interações entre analitos e materiais não modificados, ficando os compostos de interesse retidos no adsorvente, geralmente um material poroso. [17]

Ao mesmo tempo em que os analitos são retidos, interferentes podem se mostrar presentes, desta maneira são realizadas etapas de clean-up com misturas de solventes que removam os interferentes sem retirar o analito. Após essa etapa é realizada a remoção do analito com pequenas quantidades de solvente que tenha afinidade pelo analito. Na Figura 3-2 são apresentadas algumas ilustrações com todo o processo de SPE. [16]

Existem vários procedimentos de tratameno de amostra por SPE, que tanto variam no emprego de diferentes tipos de solventes, quanto no volume de amostra, como no volume de solvente para ativação e eluição dos analítos. [18]

A escolha do solvente é um passo importante na SPE, portanto deve ser considerada as informações a respeito do analito, dada a natureza da matriz e o conhecimento das impurezas a serem eliminadas. [19]

3.1.3 Microextração de fase sólida - SPME

A microextração de fase sólida ou SPME (Solid Phase microextraction) é um processo do qual um analito é adsorvido por uma fibra revestida de sílica, sendo esse o método de concentração. Em seguida o analito é dessorvido em um instrumento adequado para a separação e quantificação. [16]

A fase mais importante para esse sistema de extração em dois estágios é a adsorção do analito numa fibra adequadamente revestido de sílica ou fase estacionaria. A escolha do adsorvente é fundamental, oportunidade em que

deve ser escolhido um adsorvente com forte afinidade para os compostos orgânicos alvos, os analitos, de modo que a pré-concentração possa ocorrer a partir de qualquer amostra aquosa diluída ou a fase gasosa. O abrangência e a distinção dos meios disponíveis para a sorção é cada vez maior, porem sua exploração tem ocorrido com maior freqüência na técnica de SPE. [16]

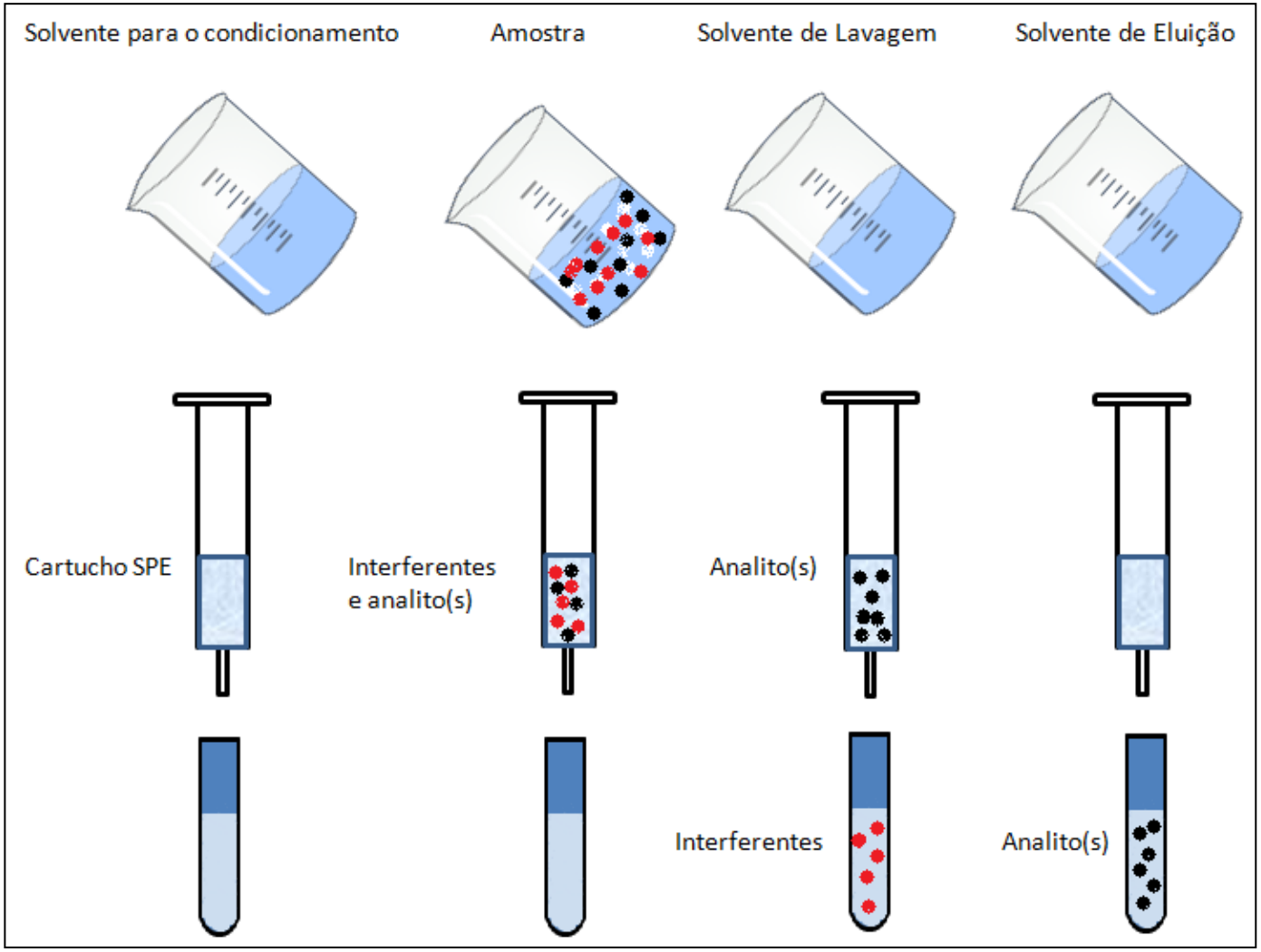

Figura 3-2: Todas as etapas do processo de extração por SPE.

A fase estacionária mais relatada na literatura para SPME é o poli(dimetilsiloxano), pois além de ser uma fase apolar utilizada para extrair inúmeros analitos apolares, apresenta grande estabilidade a altas temperaturas, apresentando geometria cilíndrica que permite melhor incorporação na superfície da seringa. [16]

O cartucho de SPME tem duas funções, fornecer proteção para a fibra durante o transporte e permitir a perfuração do septo de borracha do injetor do cromatógrafo á gás por meio de uma agulha, como demonstrado na Figura 3-3.

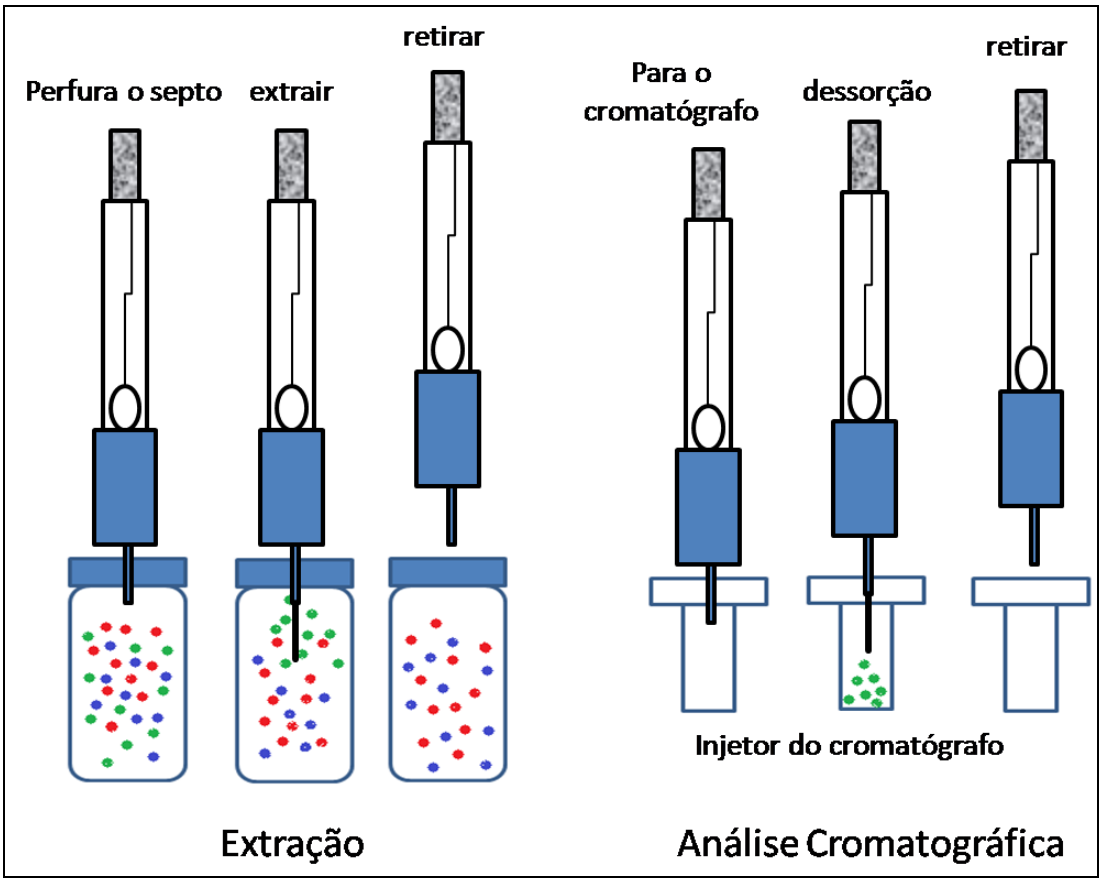

Figura 3-3: Etapas do processo de extração por SPME.

3.1.4 Microextração líquido-líquido Dispersivo - DLLME

A microextração líquido-líquido dispersivo ou DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) foi proposta em 2006 por M. Rezaee e colaboradores.[13a] Essa técnica de extração e pré-concentração de amostras atende aos requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração tendo alto potencial para aplicação direta em campo. [20]

Desde a primeira publicação em 2006, cada vez mais essa técnica tem sido difundida e aplicada em diversas áreas, chegando a 816 no ano de 2013, na Figura 3-4 pode-se observar o crescimento da técnica de DLLME na química analítica.

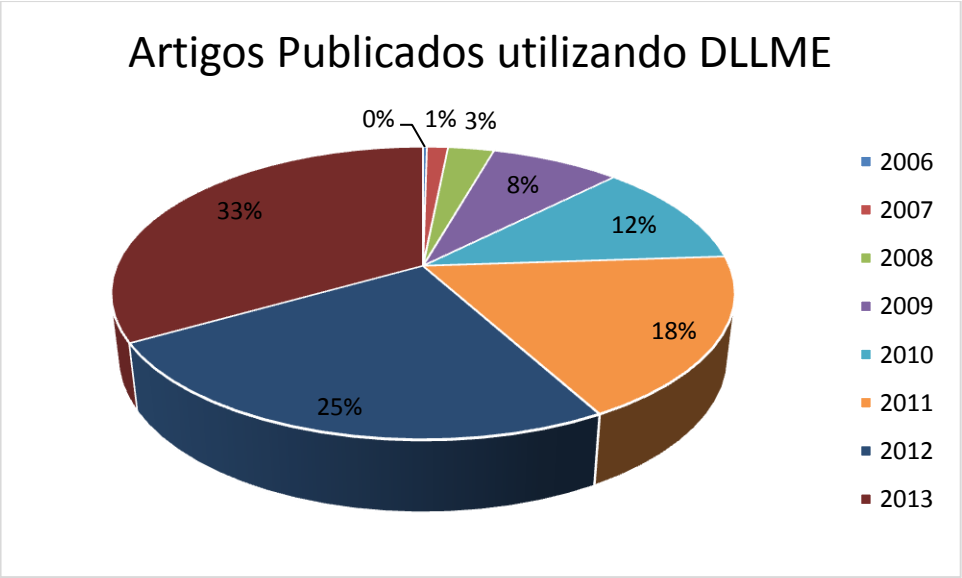

Figura 3-4: Diagrama mostrando o crescimento do número de artigos publicados utilizando DLLME nos últimos 8 anos. (Fonte: Google Scholar acesso em 03/02/2014).

Está técnica consiste em utilizar um solvente dispersor (fase orgânica) em uma amostra líquida (fase aquosa) que em seguida com um solvente extrator, imiscível na fase aquosa são removidos os compostos de interesse, baseando-se desta maneira em um sistema ternário de solventes. Pode-se observar na Figura

3-5, as etapas da técnica de DLLME como a dispersão do solvente, a centrifugação e a coleta da micro gota. [21]

A técnica DLLME é normalmente realizada em duas etapas. A primeira etapa consiste na injeção de uma mistura adequada dos solventes extrator e dispersor na amostra que encontra-se na fase aquosa, e que contém os analitos. Nesta etapa, o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas extraindo os analitos. Esta dispersão do solvente extrator é favorecida pelo solvente dispersor, que deve ser solúvel na amostra aquosa e na fase orgânica. Devido à grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo, sendo esta a principal vantagem deste método. A segunda etapa é a centrifugação da solução turva e a transferência da fase sedimentada para um frasco (microvial) que permitirá a determinação dos analitos.[21]

A DLLME baseia-se no processo de partição dos analitos entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa (onde encontra-se o analito) e a outra um fase orgânica (solvente orgânico) A solubilização dos analitos em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, os analitos são geralmente apolares, apresentando maior afinidade pela fase orgânica, composta por um solvente orgânico apolar, em comparação com a fase aquosa, que é, por sua vez, altamente polar. [21]

A fase orgânica ou extrato poderá conter a maior proporção do analito. Se esta quantidade for próxima a 100% pode ser considerada uma técnica de extração exaustiva e a exatidão do método, expressa em termos de recuperação, pode ser calculada através da equação 6.

$$R(\%) = \left[\frac{(C1-C2)}{C3}\right] .100 \qquad (6)$$

Sendo, C1 é a concentração do analito determinada na amostra fortificada, C2 é a concentração do analito na amostra não fortificada e o C3 é a concentração do analito adicionada na amostra fortificada.

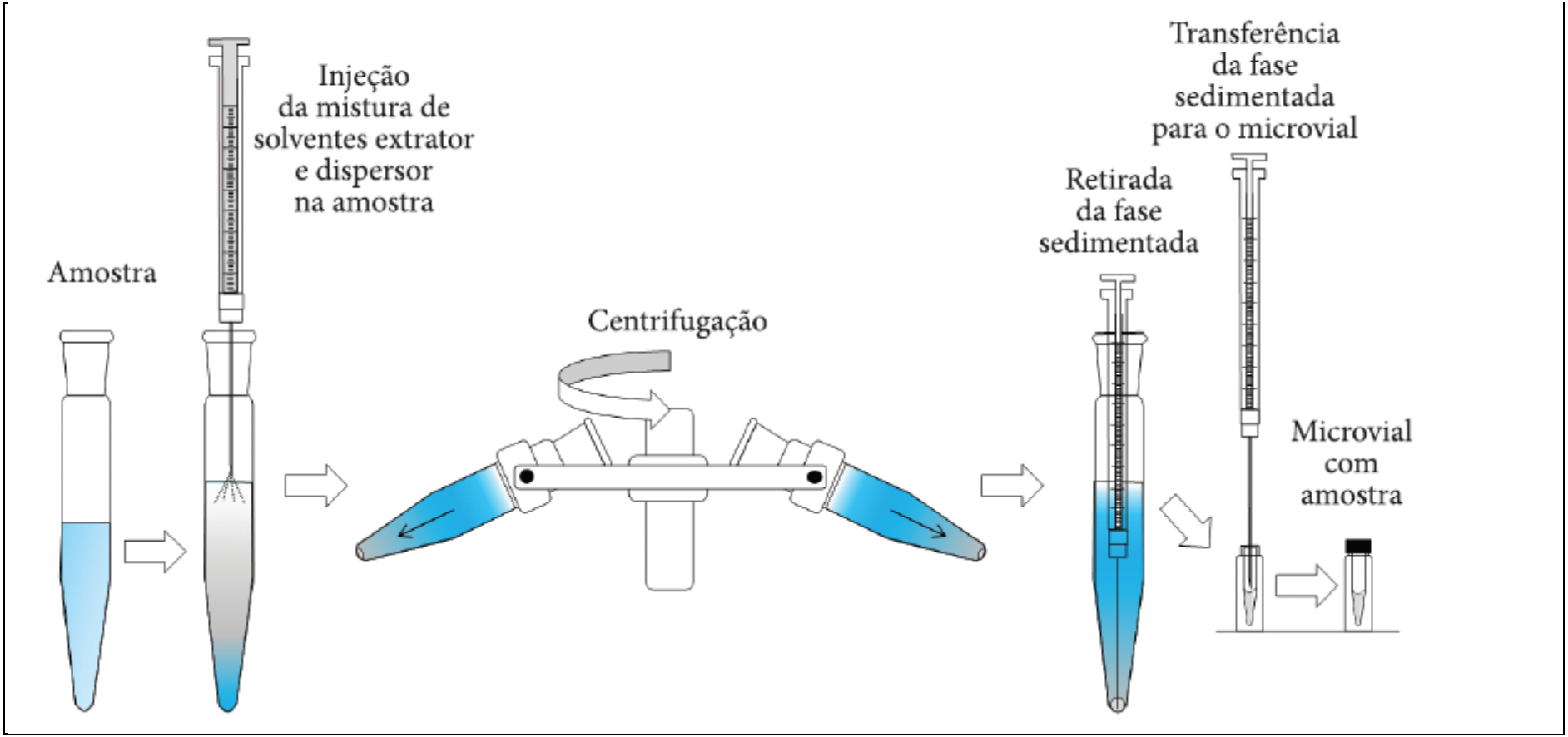

Figura 3-5: Etapas de extração da técnica de DLLME.

Se a transferência do analito entre a fase aquosa e a fase orgânica for parcial, a extração por DLLME será considerada uma técnica de equilíbrio. Neste caso, a recuperação (R) pode ser definida como a quantidade total de analito, em porcentagem, que é transferida para a fase extratora (ou orgânica) ao final da extração. A razão entre o volume da fase doadora (aquosa) e a fase aceptora (orgânica) também governa a recuperação do analito, de acordo com a equação 7.

$$R(\%) = \left[\frac{K_d V_{S(org)}}{(K_d V_{S(org)} + V_{S(d)}}\right].100 \qquad (7)$$

Sendo, K_d o coeficiente de distribuição, $V_{S(org)}$ é o volume da fase orgânica e $V_{S(d)}$ é o volume da fase doadora (ou aquosa). Portanto a extração em duas fases é favorecida para analitos hidrofóbicos, ou seja, com elevados coeficientes de partição entre 500 e 1000, ou maiores. [22]

Adicionalmente, a recuperação pode ser favorecida aumentando-se a razão entre as fases aceptora (orgânica) e doadora.[21] Outro parâmetro comumente utilizado para demonstrar a eficiência dos processos de micro extração em fase líquida, como no caso da DLLME, é o fator de enriquecimento E, que informa o grau de concentração do analito obtido na extração e pode ser calculado pela equação 8:

$$E = \frac{V_{S(d)} R}{100 \,. V_{S(org)}} \qquad (8)$$

Sendo, R a recuperação, $V_{S(d)}$ e $V_{S(org)}$ são os volumes do solvente dispersivo e do solvente extrator e como a razão entre os volumes são normalmente elevados, altos fatores de enriquecimento são obtidos.

3.2 **Cromatografia**

Existem muitas divergências de quanto ao surgimento da técnica de cromatografia. Contudo, ao invés de somente duplicar as diversas publicações do assunto, Tabela 3-1 apresenta uma lista cronológica dos eventos mais relevantes no desenvolvimento da cromatografia. Os diferentes tipos de cromatografia (liquido, gás, papel, em camada delgada, troca iônica, fluido supercrítico e eletroforese) apresentam muitas características em comum e todas elas devem ser consideradas no seu desenvolvimento. [23]

O termo cromatografia foi utilizado pela primeira vez pelo botânico russo Michael Tswett. Ele realizou a separação da clorofila e da xantofila, em uma coluna de vidro contendo carbonato de cálcio finamente dividido como fase estacionaria, fazendo passar um líquido no qual extratos das duas substâncias estavam diluídos. O termo cromatografia do grego (*kroma* = cor e *graphos* = escrita) ocorre em decorrência das espécies separadas por Tswett, apresentarem-se como bandas coloridas na coluna. [24]

A cromatografia é um método de separação física, onde os analítos a serem separados são distribuídos de forma seletiva entre duas fases, a fase estacionária e a fase móvel. Esta técnica é classificada conforme as fases móveis, assim descritos: cromatografia por fluído supercrítico (SFC), cromatografia a gás (GC), e cromatografia líquida (LC). Repetidos processos de sorção e dessorção ocorrem durante a passagem dos analítos através da fase estacionária, havendo a separação em decorrência das diferenças entre os coeficientes de distribuição de cada analito que constituí a amostra.[25] Compostos mais fortemente ligados a fase estacionária, tem a sua mobilidade diminuída durante o fluxo da fase móvel, desta forma, compostos fracamente ligados, tem sua mobilidade favorecida passando mais rapidamente pela fase estacionária. Assim acontece a separação dos compostos em bandas discretas, analisadas qualitativamente ou quantitativamente. [26]

Tabela 3-1: Lista cronológica dos eventos mais relevantes no desenvolvimento da cromatografia.

Ano da Publicação	Cientista	Comentários
1834	Runge, F.F.	Utilizou tecido e papel para realizar a separações de corantes e extratos de plantas;
1850	Runge, F.F.	Separou soluções salinas em papel
1868	Goppelsroeder, F.	Introduziu tiras de papel (Sistema capilar) Para analise de corantes, hidrocarbonetos, leite, cerveja, colóides, água potável e mineral, vegetal e pigmentos de origem animal.
1878	Shönbein, C.	Utilizou tiras de papel para analise de soluções;
1897 – 1903	Day, D.T.	Desenvolveu um fluxo ascendente em colunas, utilizando amostras de petróleo bruto;
1906 – 1907	Twsett, M.	Separou o pigmento clorofila utilizando carbonato de cálcio como fase estacionaria e éter de petróleo como fase móvel;
1931	Kuhn, R et al.	Introduziu a cromatografia sólido-líquido na separação de xantofilas em gema de ovo;
1940	Wilson, J.N.	Escreveu o primeiro trabalho teórico em cromatografia;
1941	Tiselius, A.	Desenvolveu a cromatografia líquida e a analise de eluição;
1941	Martin, A.J.P. e Synge, R.L.M.	Apresentou o primeiro modelo que poderia descrever a eficiência da coluna, recebendo o Prêmio Nobel em 1952;

Tabela 3-1: Lista cronológica dos eventos mais relevantes no desenvolvimento da cromatografia (continuação).

Ano da Publicação	Cientista	Comentários
1944	Consden, R. , Gordon,A.H. e Martin, A.J.P.	Desenvolveram a cromatografia em papel;
1946	Claesson, S.	Desenvolveu a cromatografia sólido-líquido;
1948	Tiselius, A.	Ganho o Premio Nobel em 1948, pelo desenvolvimento da analise de adsorção e eletroforese.
1949	Martin, A.J.P	Contribuíram para relação entre retenção e constante de equilíbrio termodinâmico
1951	Cremer, E.	Introduziu a cromatografia gás-sólido
1952	Phillips, C.S.G.	Contribuiu a cromatografia líquido-líquido;
1952	James, A.T. e Martin, A.J.P	Introduziram a cromatografia gás-líquido;
1955	Glueckauf, E.	Derivou a primeira equação abrangendo a relação do calor e tamanho das partículas;
1956	van Deemter, J.J., et al	Simplificaram o trabalho de Lapidus e Ammundson em função da distribuição de Gauss;
1957	Golay, M.	Relatou o desenvolvimento de colunas tubulares;
1965	Giddings, J. C.	Revisou e aplicou as primeiras teorias de cromatografia;

3.2.1 Cromatografia em fase gasosa (CG)

A primeira publicação sobre cromatografia a gás (CG) é a de determinação de ácidos graxos, que consistia em procedimento de titulação em conjunto de uma microbureta como detector. [24]

Após sua introdução por James e Martin, a técnica de cromatografia a gás se desenvolveu rapidamente, passando de simples pesquisa a instrumento altamente sofisticado, chegando a movimentar milhões de dólares em apenas 4 anos, como um dos primeiros instrumentos analíticos a ser associado a um computador para controlar a análise, o dados e seus resultados. [24]

O instrumento tem evoluído ao longo dos anos, embora maior parte dos dispositivos e técnicas tenham sido introduzidas nos três primeiros simpósios internacionais realizados em 1956, 1958 e 1960, patrocinados pelas indústrias do petróleo. [24]

O maior interesse da indústria do petróleo no desenvolvimento dessa técnica é a facilidade da separação de uma mistura contendo grande número de hidrocarbonetos em relação aos métodos convencionais utilizados na época. [24]

Mesmo sendo uma técnica em constante evolução a disposição de seus componentes ainda são as mesmas desde o seu surgimento e estão representados pelo diagrama na Figura 3-6, sendo:

1. Gás de arraste (fase móvel) – Um gás inerte e barato, que tem como função carregar a molécula do analíto desde onde foi injetada, passando pela coluna chegando até o detector, com um fluxo controlado. Esse gás é usualmente escolhido de acordo com o detector a ser utilizado. [27]

2. Sistema de Injeção – Idealmente deveria propiciar uma introdução instantânea da amostra, o que não é possível em termos práticos, uma forma de contornar é injetar a amostra de modo a obter uma banda tão estreita quanto possível. A escolha da temperatura do injetor, volume da amostra e tipo de injeção depende do estado físico em que ela se encontra. [27]

3. Coluna (fase estacionária) – É o coração do sistema, onde efetivamente acontece a separação dos analitos. O ponto de partida para a escolha de uma coluna é a afinidade entre compostos similares, quanto mais semelhantes forem a fase estacionária e os compostos a serem separados, mais eficiente será a separação, o diâmetro da coluna também exerce influência sobre o processo de separação, e por fim o comprimento da coluna é determinante, sendo quanto maior mais efetiva a separação. As colunas podem ser empacotadas, sendo produzidas em tubos de metal ou vidro, também podem ser capilares tendo até centenas de metros. [27]

4. Forno – Responsável pelo ajuste da temperatura da coluna, tem papel determinante na separação dos compostos, para a grande maioria das amostras, quanto menor a temperatura da coluna, mais efetiva é a separação e quanto mais alta a temperatura menor é o tempo de analise. O ideal é conseguir uma temperatura intermediária, não tão alta que não possa existir uma boa separação, nem tão baixa que o tempo de analise seja demasiadamente grande.[27]

5. Detector – Sua função principal é detectar a presença de um analito e medir a sua quantidade. Espera-se de um detector que ele gere a maior quantidade de sinal elétrico possível a uma dada concentração (sensibilidade), que tenha um baixo ruído (permitindo que sejam detectadas com segurança as menores quantidades possíveis do analito), que possua boa resposta aos componentes analisados (podendo ser universais quando respondem com um bom sinal elétrico a todos os tipos de compostos como exemplo o detector de condutividade térmica, ou seletiva quando respondem somente a determinadas classes de compostos como o detector de ionização de chama), e que tenha ampla faixa de linearidade (a resposta obedeça a uma boa relação de proporcionalidade com a concentração do analito). Também é desejável que um detector seja barato, simples, tenha fácil disponibilidade e seja robusto. No mercado existem mais de 50 tipos de detectores disponíveis sendo mais utilizados o detector de condutividade térmica e o detector de ionização de chama.[27]

6. Registrador – Tem como função o registro do sinal obtido pelo detector em função do tempo permitindo que seja conhecido, o tempo decorrido entre a entrada de um analito no sistema e a sua saída (tempo de retenção), altura do pico cromatográfico, e também a área do pico. Desta forma é possível realizar uma análise qualitativa e/ou quantitativa dos analitos. A partir da década de 80 com o uso de interfaces de conversão analógico-digitais, o computador passou a ser utilizado como registrador, sendo este também responsável por todo o controle de funções do cromatógrafo. [27]

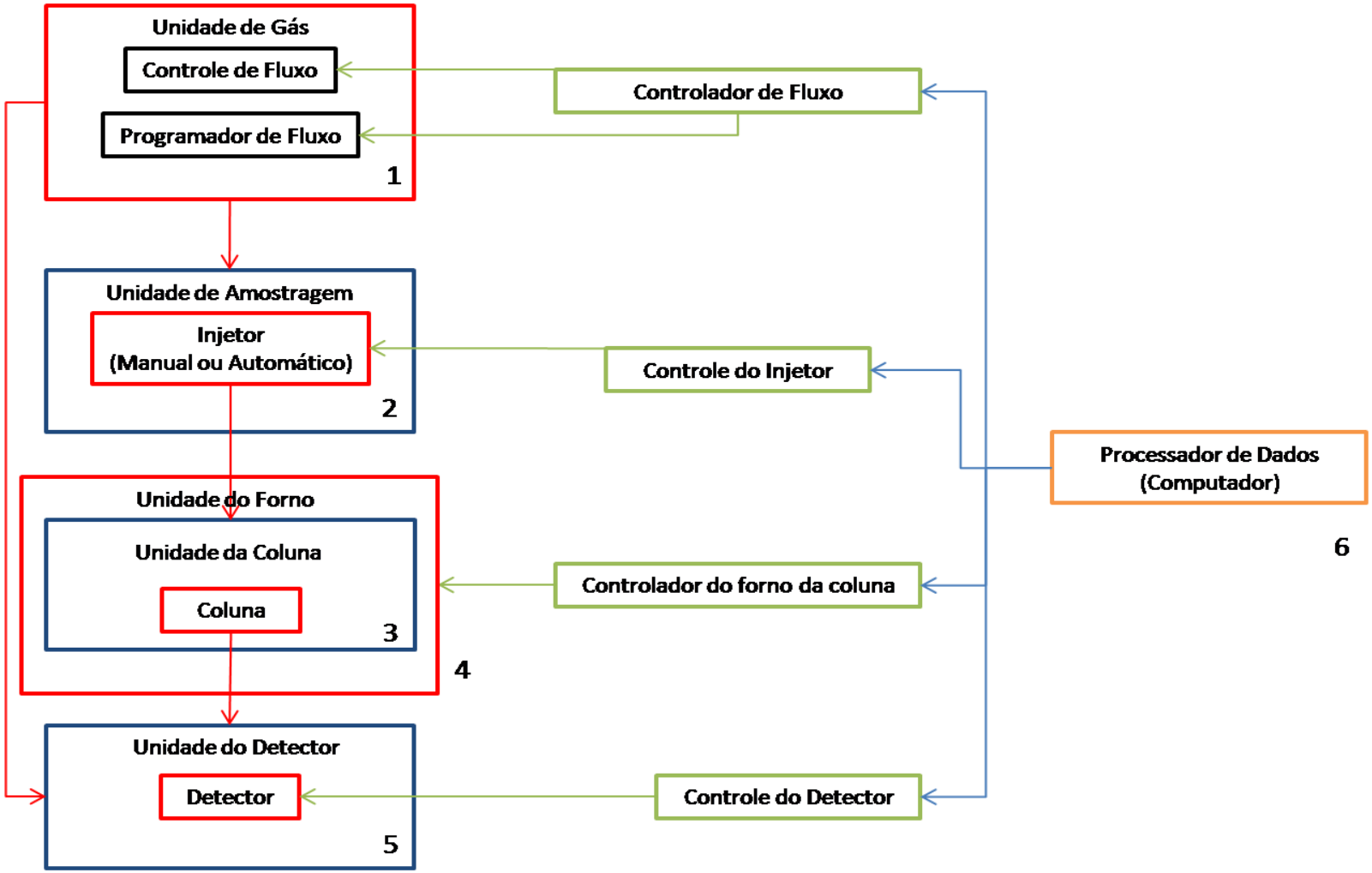

Figura 3-6: Diagrama de um cromatógrafo a gás: 1- Unidade de Gás; 2- Unidade de Amostragem; 3- Unidade da Coluna; 4- Unidade do Forno; 5- Unidade do Detector; 6- Processador de Dados.

3.3 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

O detector de massas acoplado a cromatografia á gás, é constituído de versão simplificada de um espectrômetro de massas adaptado para detecção de picos cromatográficos. Suas primeiras duas versões mais populares surgiram no início da década de 80 produzidas pela Finnigan e pela Hewlett Packard. Essa técnica é bastante seletiva e permite a realização de analises tanto quantitativa, quanto qualitativa. [27]

Um espectrômetro de massas é constituído de unidades fundamentais como: uma fonte de ionização, um analisador ou filtro de massas e um detector, como apresentado na Figura 3-7:

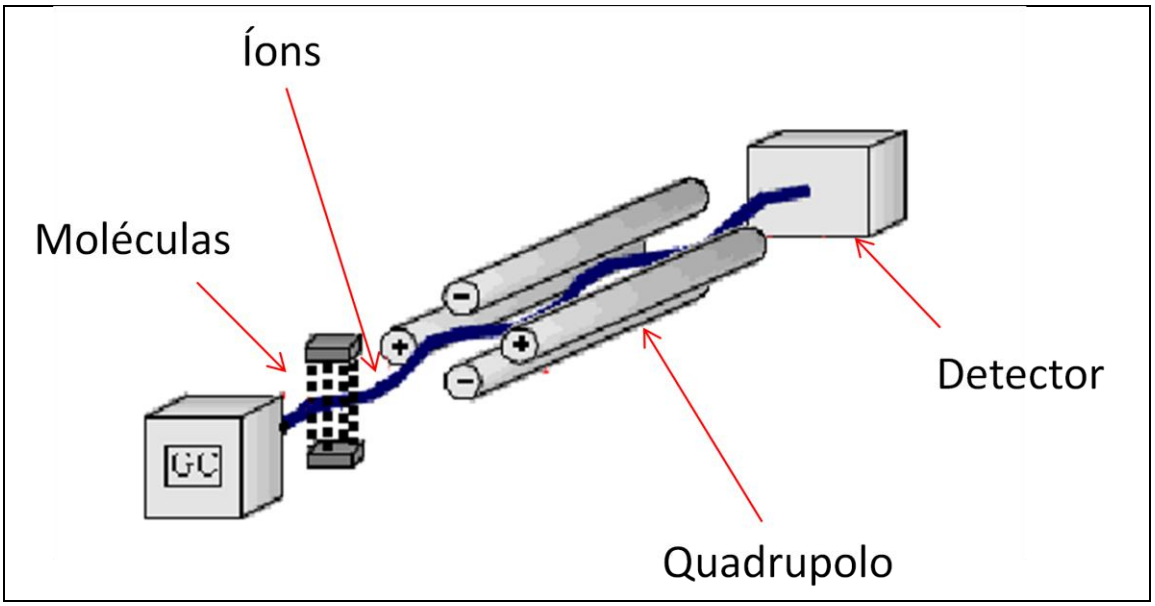

Figura 3-7: Unidades fundamentais do espectrômetro de massas.

3.3.1 Processo de Ionização

Quando um elétron é acelerado através de um campo elétrico, ele ganha energia cinética, dessa maneira quando chega à energia de 70 eV (elétrons volts), esse elétron pode interagir com moléculas carregadas ou neutras (M), provocando a ejeção de um elétron presente na molécula conforme a equação 9. [28]

$$e^- + M \quad \rightarrow M^{*+} + 2e^- \qquad (9)$$

Desta maneira, dois elétrons são eliminados na reação deixando uma espécie carregada positivamente ($M^{\circ+}$), chamada de íon molecular. Quando aplicamos 70 eV , em alto vácuo, algumas moléculas adquiram tanta energia extra que elas se separam “fragmentam” formando íons de menor massa, como demonstrado na equação 10. [28]

$$p(e^-) + p(M) \quad \rightarrow q(M^{*+}) + 2e^- + r(A^+) + s(B^+) \qquad (10)$$

Esses fragmentos são característicos de cada substância, semelhantes a uma impressão digital, assim denominado espectro de massas, e podem ser comparados e identificados através de bibliotecas de espectros de massas. [28]

3.3.2 Razão Massa/Carga (m/z)

O mecanismo de ionização, a fragmentação e o espectro de massas são apresentados na Figura 3-8.

A massa de um elétron é muito pequena em comparação a massa total de uma molécula, conseqüentemente a massa molecular relativa de uma molécula é quase a mesma que a do seu derivado molecular iônico. Portando se considerarmos a massa de uma carga positiva sendo o equivalente a um, a razão massa-carga será o valor da massa molecular. [28]

A separação dos íons se dá com base na razão massa-carga das espécies iônicas. A razão massa-carga é algumas vezes referida somente pelo termo conveniente de “massa”. As massas atômicas são em geral expressas daltons (Da). [26]

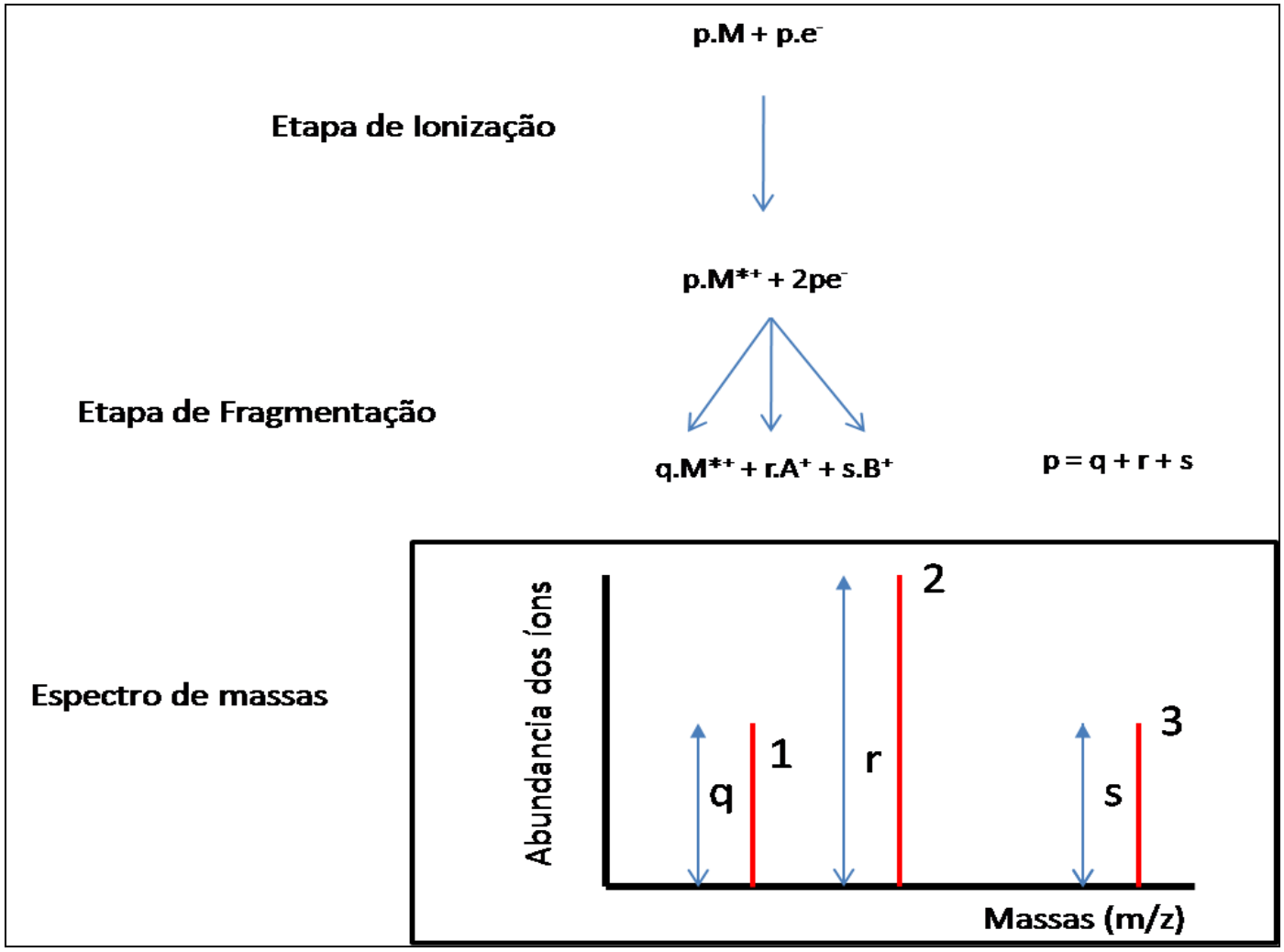

Figura 3-8: Mecanismos de reação e fragmentação ocorridos no espectrômetro de massas e o seu espectro de massas.

3.3.3 Analisador ou Filtro de Massas Quadrupolar

O analisador de massas “Filtro de massa quadrupolar” é constituído por quatro varetas cilíndricas orientados numa disposição quadrada. E, quando aplicado um potencial de radiofreqüência (RF) e corrente contínua (DC) a estas varetas, os íons com m/z especifico podem atingir o detector sem perturbação, sendo os outros íons com m/z indesejados, absorvidos pelas varetas, durante a sua trajetória. [29]

Com o baixo custo e uma taxa de digitalização rápida esse analisador de massas é o mais utilizado em CG/EM. [29]

Outro analisador de massas é o “íon-trap” no qual os íons são confinados por campos elétricos e magnéticos. Desta maneira, os íons com m/z especifico orbitam dentro do analisador até a remoção quando atingem o detector, sendo os outros íons com m/z indesejados, absorvidos pelas paredes do “Ion Trap” durante a sua trajetória orbital. [30]

3.3.4 Detector

Um dos detectores mais comuns nos espectrômetros de massas é a eletromultiplicadora, cujo principio diz que quando uma partícula que viaja em alta velocidade, provoca a ejeção de outras partículas secundárias quando atingem uma superfície metálica.

Partindo desse principio, íons selecionados pelo quadrupolo ou íon-trap são direcionados para um primeiro prato (dínodo) que quando atingem seu objetivo ejetam os elétrons que são acelerados a um determinado potencial elétrico de modo atingir um segundo dínodo. [28]

Se considerarmos que cada íon que entre em colisão no primeiro dínodo provoque a liberação de 10 elétrons, e que ao atingir o segundo dínodo cada elétron gere mais 10 elétrons para o terceiro dínodo. Podemos concluir que a cada íon que chega ao primeiro dínodo o sinal é amplificado em 100 vezes no segundo dinodo. Normalmente uma eletromultiplicadora comercial trabalha em media com 11 dínodos, podendo chegar uma amplificação de sinal de até 10^6 em ordens de grandeza. [28]

Esse fluxo de elétrons fornece uma corrente elétrica que pode ser aumentada com o uso de amplificadores operacionais simples, fornecendo dessa maneira um sistema de detecção de íons sensível. [28]

3.4 **Validação de Método**

Na última década a validação de método tornou-se um dos instrumentos mais importantes no meio analítico, pois além de garantir a confiabilidade dos resultados, estabelece padrões e referências a serem seguidas posteriormente.

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, vem sendo cada vez mais reconhecida e exigida, posto que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. [14]

Existem várias agências, instituições e organizações que foram criadas com a finalidade de estabelecer métodos ou protocolos para a validação de método. Internacionalmente é reconhecida a Eurachem que é uma rede de organizações na Europa, com o objetivo de estabelecer um sistema de rastreabilidade internacional das medições químicas e promover boas práticas da qualidade, além de criar um fórum de discussão para o desenvolvimento e considerações na questão técnica e política.[31] Tem-se a ISO (International Organization for Standardization) que é uma organização não-governamental que faz uma ligação entre o setor público e privado, estabelecendo normas para 162 países sendo seu escritório central em Genebra, Suíça.[32] Outra organização é a WHO/OMS “World Health Organization” ou Organização Mundial da Saúde que é a autoridade de coordenação da saúde dentro das Nações Unidas sendo responsável pela saúde mundial, organizando pesquisas, estabelecendo normas e padrões, articulando opções políticas baseadas em evidências e fornecendo apoio técnico aos países.[33]

No Brasil é reconhecida a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que tem a finalidade de promover a proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de

produtos e serviços, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados.[34] Outra instituição nacional é o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) que possui entre outras finalidades a de executar as políticas nacionais de metrologia e da qualidade, verificar a observância das normas técnicas e legais, manter e conservar os padrões das unidades de medida, assim como implantar e manter a cadeia de rastreabilidade dos padrões das unidades de medida no País e planejar e executar as atividades de acreditação de laboratórios de calibração e de ensaios. [35]

Observa-se que cada agência apresenta sua definição para a validação de método como demonstrado a seguir:

• “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” – (ANVISA). [36]

• “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” – (EURACHEN). [37]

• “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” – (INMETRO). [38]

• “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” – (OMS). [33]

Estudos de validação de métodos são realizados em diversas etapas, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados analíticos. Estas etapas podem variar, dependendo da agência regulamentadora de cada país, sendo entre as mais importantes: seletividade, linearidade, faixa de trabalho ou faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão. [38]

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. [36]

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. [14]

Pode-se obter a linearidade por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta ou curva analítica que relaciona as duas variáveis é descrita na equação 11.

$$y = a + bx \qquad (11)$$

Sendo, (*y) a* resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.), (*x) e a* concentração, (a) é a interseção com o eixo y, quando *x for igual a zero*, (coeficiente linear) e (*b)* a inclinação da curva analítica ou a sensibilidade (coeficiente angular).

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b).

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório. [35]

Além dos coeficientes de regressão (a) e (b), também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação R^2. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de um, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.[14] A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

Quando se esta trabalhando com cromatografia a gás com detector de espectrometria de massas é geralmente utilizado um padrão interno para auxiliar na correção das respostas de cada injeção. Pode-se utilizar desta forma o fator de resposta como critério de avaliação de uma curva de calibração.

O fator de resposta é calculado a partir da equação 12:

$$FR= \frac{A_a . C_{pi}}{A_{pi} . C_a} \qquad (12)$$

Sendo, (A_a) a área do pico (ou altura) do analíto ou “surrogate”; (A_{pi}) a área do pico (ou altura) do padrão interno; (C_a) a massa ou concentração da substância a analisar ou “surrogate” e (C_{pi}) a massa ou concentração do padrão interno

Para métodos de CG/EM podem ser utilizados a soma de dois íons (m/z) para cada analito alvo e para cada padrão interno.

A linearidade da calibração pode ser avaliada através do fator de resposta médio que é calculado pela equação 13:

$$FRM = \frac{S_{fr}}{\overline{FR}} . 100 \qquad (13)$$

Sendo, (S_{fr}) o desvio padrão de todos os fatores de resposta e ($\overline{FR}$) a média de todos os fatores de resposta;

Segundo os critérios de avaliação da EPA o FRM ou DRM (Desvio Padrão Relativo) não deve ser superior a 20 %. [39]

Além da curva analítica citada anteriormente se faz necessário ter uma faixa de trabalho que deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de

concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação e no limite superior depende do sistema de resposta do equipamento de medição. [38]

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. [36]

O limite de detecção (LD) pode ser expresso pela equação 14:

$$\mathrm{LD} = 3{,}3 \,.\, \frac{s}{\mathrm{Ca}} \qquad (14)$$

Sendo (s) a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e (Ca) é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica

Limite de Quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. [36]

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, porém utilizando a relação 10:1, dessa maneira a relação entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (Ca), representado pela equação 15:

$$\mathrm{LQ} = 10 \,.\, \frac{s}{\mathrm{Ca}} \qquad (15)$$

O melhor caminho para resolver o cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. [14]

Após a realização do estudo do LD e do LQ, o processo analítico é avaliado com o estudo de recuperação.

A recuperação é geralmente determinada pelo estudo de materiais de referência relevantes ou por estudos de adição de padrão. [37]

Em relação aos valores de referência apropriados é importante o estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. [38]

A Recuperação (R) em % pode ser definida pela equação 16:

$$R = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}}.100 \qquad (16)$$

Finalmente após a realização de todos os estudos citados anteriormente é necessário determinar, se o processo analítico possui precisão e exatidão.

A precisão pode ser definida como a concordância de uma série de medidas da mesma grandeza. [40]

Podendo ser avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, na validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s), seguindo a equação 17.

$$s = \sqrt{\frac{\sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n-1}} \qquad (17)$$

Sendo, $\bar{x}$ a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média (ICM), que é uma faixa de valores no qual existe uma

determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável, calculada pela equação 18:

$$ICM = \bar{x} \pm t_{n-1}\frac{s}{\sqrt{n}} \quad (18)$$

Sendo t_{n-1} o valor crítico da distribuição de “t-student” com (n – 1) graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança. Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) expresso em %, calculados pela equação 19:

$$RSD\ ou\ CV = \frac{S}{\bar{x}}.100 \quad (19)$$

Sendo s o desvio médio de uma determinada população e $\bar{x}$ é á média aritmética da determinada população.

É comum que métodos que quantificam compostos em macro quantidades requeiram um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. [14]

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. [14]

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão. [14]

Os materiais de referência certificados (CRM) são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração

de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (“National Institute of Standards and Technology” - USA), LGC (“Laboratory of the Government Chemist” - UK), FAPAS (“Food Analysis Performance Assessment Scheme” - UK). [14]

A comparação de métodos consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. [14]

4 Materiais

Os reagentes, materiais, padrões e equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho estão listados a seguir:

Equipamentos e Materiais:

- Cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas – CG-EM, marca Agilent, CG - modelo 7890 e EM – modelo 5975.
- Coluna cromatográfica - DB-5ms – 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm
- Centrifuga
- Tubos de ensaio com tampa de 15 mL.
- Microseringas volumetrias de 10, 50, 150, 500 e 1000 µL
- Vial de 2 mL para CG
- Insert de 200 µL

No presente trabalho foram utilizados vários solventes, reagentes e padrões que estão listados das tabelas Tabela 4-1 e Tabela 4-2.

Tabela 4-1: Lista de Reagentes

Reagentes	Pureza	Marca
Cloreto de Sódio	Grau Analítico	Synth
Diclorometano	Grau HPLC	Tédia
Hexano	Grau HPLC	Tédia
Acetonitrila	Grau HPLC	J T Baker
Metanol	Grau HPLC	Tédia
Isooctano	Grau Analítico	Synth
Acetona	Grau Analítico	Tédia
Ácido Sulfúrico	Grau Analítico	Tédia
Hidróxido de Sódio	Grau Analítico	Synth

Tabela 4-2: Lista de Padrões

Padrões	Concentração (mgL^{-1})	Marca	Número de catalogo	Lote
CLP Semivolateis Calibration Mix	1000	Supelco	506508	LB24011
Method 8270D-PAH mix	2000	AccuStandard	M-8270-13-ASL	211091007
Internal Standard Mix	4000	AccuStandard	Z-014J	213041388
Method 8270 Surrogate Standard	4000	AccuStandard	M-8270-SS	B7080269

5 Amostragem

No presente trabalho foram utilizadas amostras de rotina de um laboratório de analise ambiental, o local de amostragem e o cliente não podem ser revelados devido a termos de confidencialidade que o laboratório tem com os seus clientes.

Foram utilizadas 4 amostras de água subterrânea coletadas em postos de gasolina, seguindo o procedimento ABNT NBR 15847:2010 onde estão estabelecidos métodos para a purga de poços de monitoramento utilizados para a investigação ambiental. Esta Norma apresenta os métodos de Purga por Volume Determinado, Purga Baixa Vazão, Purga Mínima e Amostragem Passiva, e as amostras são foram armazenadas em câmera fria a uma temperatura abaixo de 7°C, até o momento de sua extração. [41]

6 Resultados e Discussão

6.1 Otimização do método de DLLME

Antes de realizar o estudo de validação foi necessário adaptar a técnica de extração para a determinação dos SVOC com a realidade do laboratório. Dessa forma em um tubo de ensaio foi adicionado 5 mL de água-ultrapura e em todos os tubos de ensaio foram adicionados 5 µL da solução padrão de SVOC com a concentração de 5 mgL^{-1}.

Para os testes a variação do pH foi considerada, sendo realizados testes em pH neutro, ácido e básico, para isso foi adicionado 1 mL separadamente das soluções de ácido sulfúrico a 0,05 $molL^{-1}$ e hidróxido de sódio a 0,1 $molL^{-1}$ nos tubos de ensaio.

Em seguida foram adicionados 500 µL do solvente dispersivo, no caso foram utilizados os solventes: metanol, acetona e acetonitrila.

Após a homogeneização da mistura foi adicionada com auxílio de uma seringa 100 µL de solvente extrator, para essa otimização foram utilizados os solventes: diclorometano e isooctano.

Os compostos presentes na solução padrão de compostos orgânicos semi-voláteis são: 1,4 – diclorobenzeno, 1,3 – diclorobenzeno, fenol, nitrobenzeno, isoforena, 1,2,4 – triclorobenzeno, naftaleno, hexacloro-1,3-butadieno, 2-cloronaftaleno, 2-nitroanilina, dimetilftalato, acenaftileno, acenafteno, dibenzofurano, dietilftalato, fluoreno, 4-clorodifenil éter, 4-bromodifenil éter, hexaclorobenzeno, fenantreno, antraceno, azobenzeno, carbazol, dibutilftalato, fluoranteno, pireno, benzil-butilftalato, criseno, benzo[a]antraceno, bis(2-etilhexil)ftalato, di-n-octilftalato, benzo[b]fluranteno, benzo[k]fluranteno, benzo[a]pireno, benzo[ghi]perileno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno.

Através dessas avaliações, foram observados os seguintes volumes de extratos apresentados na tabela 6-1:

Tabela 6-1: Recuperação dos Solventes em função da variação do pH, do solvente dispersor e do solvente extrator.

Volume recuperado aproximado (µL)									
	Metanol			Acetona			Acetonitrila		
	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH =7	pH >7	pH <7	pH =7	pH >7
Diclorometano	15	50	10	36	45	30	40	30	47,5
Isooctano	45	57,5	70	68	50	80	70	70	90

Os extratos foram injetados no CG/EM seguindo as seguintes configurações:

Cromatógrafo a gás:

- ✓ Tipo de Injeção: Splitless
- ✓ Volume de injeção: 2 µL
- ✓ Fluxo do Gás: 0,87 $mLmin^{-1}$
- ✓ Temperatura do Injetor: 290 °C

Seguindo a seguinte programação do forno do cromatógrafo:

Manter 50°C por 0,57 minutos, iniciar o aquecimento do forno com uma taxa de 52,24°C por minuto até 130°C e mantendo essa temperatura por 2,87 minutos; iniciar novo aquecimento com uma taxa de 17,41°C por minuto até 180°C e mantendo essa temperatura por 2,87 minutos, novamente aquecer com uma taxa de 17,41°C por minuto até 240°C e mantendo essa temperatura por 2,87 minutos, aquecer novamente com uma taxa de 20,89 °C por minuto até 320° C e mantendo essa temperatura por 2,30 minutos. A Figura 6-1 a seguir demonstra como deve ficar a programação do forno.

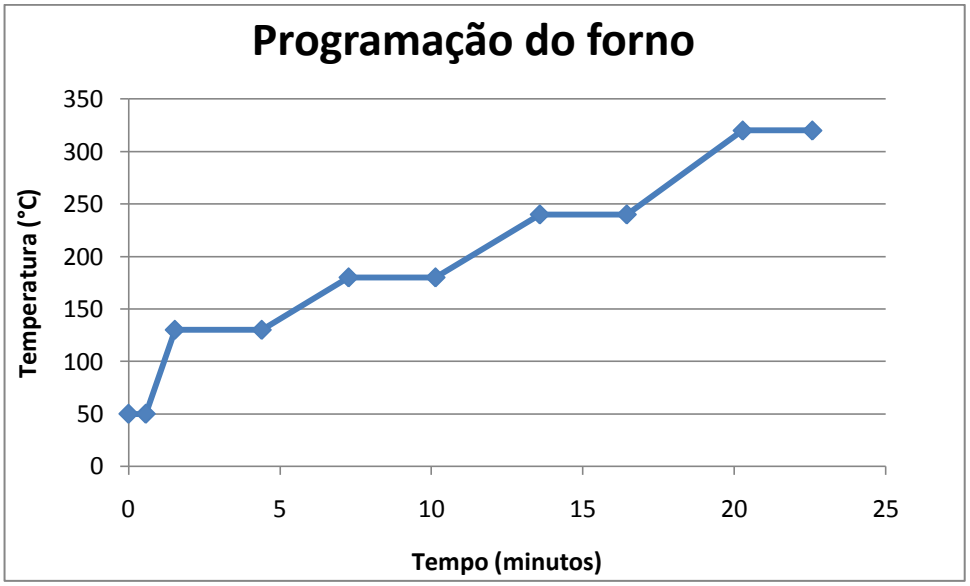

Figura 6-1: Programação de aquecimento do forno do cromatógrafo para analise dos SVOC

Espectrômetro de Massas:

- ✓ Temperatura da linha de transferência: 320 °C
- ✓ Modo de leitura: Scan (Varredura) – 45 a 500 Da.

Dessa maneira foram obtidos os seguintes resultados de recuperação que são apresentados na Tabela 6-2, onde pode ser observado que a melhor recuperação da solução mãe foi à combinação metanol-isooctano, mesmo não sendo a melhor recuperação do extrato.

Observou-se também que a extração deve ser realizada em meio ácido, pois a maioria dos compostos estudados apresentam características ácidas em suas estruturas e desta maneira quando realizamos a extração em meio ácido a moléculas passam do estado do estado ionizado para o estado fundamental, possibilitando uma melhor extração dos analítos.

Pode-se observar também pelos resultados obtidos que a técnica de DLLME apresenta variações nas recuperações entre as diferentes classes químicas, portanto para ter um melhor desempenho no estudo de validação a separação entre as classes químicas se faz necessário.

Portanto o estudo de validação no presente trabalho foi centralizado aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), que apresentaram uma recuperação média de 99% entre as demais classes nas mesmas condições.

Tabela 6-2: Resultados da recuperação (%) do padrão em diferentes condições de extração.

Solvente Dispersante	Metanol						Acetona						Acetonitrila					
Solvente Extrator	Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano		
Variação de pH	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7
1,4 – diclorobenzeno	0	0	0	0	9	8	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	12	18
1,3 – diclorobenzeno	0	0	0	0	8	27	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	6	17
fenol	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	32
nitrobenzeno	0	0	0	0	6	62	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	10	4
isoforena	0	10	0	0	8	1	0	0	0	0	3	2	0	9	0	0	0	3
1,2,4 -triclorobenzeno	0	21	2	0	18	68	0	0	2	0	50	60	0	40	11	0	23	30
naftaleno	0	34	1	0	30	78	0	0	1	0	54	56	0	48	9	0	23	29
hexacloro-1,3-butadieno	0	44	3	0	47	102	0	0	3	0	81	89	0	71	17	0	32	42
2-cloronaftaleno	0	23	3	0	8	46	0	30	3	0	68	55	0	54	5	0	31	24
2-nitroanilina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0
dimetilftalato	0	5	4	0	0	26	0	58	4	0	8	21	0	40	8	0	0	5
acenaftileno	0	17	3	0	24	70	0	59	3	0	80	45	0	53	8	0	29	25
acenafteno	0	30	6	0	50	122	0	55	6	0	150	88	0	80	17	0	63	59
dibenzofurano	0	15	4	0	16	82	0	56	4	0	67	52	0	66	13	0	38	36
dietilftalato	0	8	3	0	16	21	0	145	3	0	24	12	0	68	11	0	6	35

Tabela 6-2: Resultados da recuperação (%) do padrão em diferentes condições de extração (continuação).

Solvente Dispersante	Metanol						Acetona						Acetonitrila					
Solvente Extrator	Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano		
Variação de pH	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH=7	pH>7	pH<7	pH=7	pH>7
fluoreno	0	23	5	0	26	127	0	82	5	0	122	85	0	66	18	0	51	80
4-clorodifenil éter	0	19	4	0	15	93	0	89	4	0	77	70	0	60	13	0	39	62
4-bromodifenil éter	0	44	3	0	47	102	0	0	3	0	81	89	0	71	17	0	32	42
hexaclorobenzeno	0	33	5	0	53	137	0	152	5	0	152	105	0	76	21	0	64	86
fenantreno	0	16	5	0	14	121	0	121	5	0	106	77	0	93	18	0	42	71
antraceno	0	0	3	0	0	94	0	63	3	0	34	54	0	56	16	0	19	52
azobenzeno	0	5	2	0	0	59	0	49	2	0	37	34	0	45	9	0	15	43
carbazol	0	0	5	0	0	77	0	34	5	0	70	68	0	73	4	0	0	11
dibutilftalato	0	5	2	0	16	65	0	78	2	0	75	49	0	40	10	0	27	51
fluoranteno	0	7	4	0	15	128	0	176	4	0	133	81	0	85	18	0	45	50
pireno	0	8	4	0	17	133	0	170	4	0	129	91	0	73	20	0	49	58
benzil-butilftalato	0	0	2	0	6	49	0	82	2	0	31	33	0	42	13	0	3	34
criseno	0	0	2	0	0	78	0	102	2	0	35	42	0	32	13	0	9	25
benzo[a]antraceno	0	0	2	0	0	94	0	136	2	0	39	60	0	44	14	0	9	31

Tabela 6-2: Resultados da recuperação (%) do padrão em diferentes condições de extração (continuação)

Solvente Dispersante	Metanol						Acetona						Acetonitrila					
Solvente Extrator	Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano			Diclorometano			Isooctano		
Variação de pH	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7	pH< 7	pH= 7	pH> 7
bis(2-etilhexil)ftalato	0	21	6	0	16	103	0	95	6	0	95	78	0	128	38	0	27	62
di-n-octilftalato	0	10	3	0	3	76	0	46	3	0	30	46	0	49	17	0	10	38
benzo[b]fluranteno	0	0	2	0	0	120	0	100	3	0	68	63	0	40	17	0	12	30
benzo[k]fluranteno	0	0	0	0	0	178	0	93	0	0	31	0	0	53	27	0	15	0
benzo[a]pireno	0	0	0	0	0	60	0	42	0	0	32	24	0	27	7	0	8	11
benzo[ghi]perileno	0	0	0	0	0	63	0	25	0	0	39	20	0	23	5	0	5	9
dibenzo[a,h]antraceno	0	0	0	0	0	73	0	45	0	0	36	26	0	19	10	0	0	8
indeno[1,2,3-cd]pireno	0	0	0	0	0	78	0	43	0	0	53	30	0	27	8	0	5	11

Para o estudo de validação dos HPA foram seguidas as seguintes condições:

Extração:

O preparo das amostras seguiu o seguinte procedimento:

Foram adicionados 5 mL de água ultra-pura em um tubo de ensaio, em seguida foi adicionado 1 g de NaCl, 5 µL da solução padrão de surrogate na concentração de 10 mgL^{-1}.

Em seguida foram adicionados concentrações variadas do padrão de HPA nas concentrações de 10, 50, 100, 1000, 2000, 5000 e 8000 μgL^{-1}.

Após a homogeneização, foi adicionado com auxilio de uma microseringa 500 µL de Metanol e agitado levemente.

Com auxilio de uma microseringa adicionar 100 µL de Isooctano no meio da amostra, provocando o processo de dispersão das microgotas do isooctano.

Levar a centrifugação a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos, após esse período remover cerca de 50 µL do extrato sobrenadante com auxilio de uma microseringa e transferir para um “insert” e adicionar 5 µL da solução do padrão interno a 10 mgL^{-1} e levar para injeção no cromatógrafo a gás.

Cromatógrafo a gás:

- ✓ Tipo de Injeção: Splitless
- ✓ Volume de injeção: 2 µL
- ✓ Fluxo do Gás: 1,0 $mL.min^{-1}$
- ✓ Temperatura do Injetor: 290 °C

Seguindo a seguinte rampa cromatográfica:

Manter 50°C por 1,2 minutos, iniciar o aquecimento do forno com uma taxa de 67°C por minuto até 130°C a partir dessa temperatura alterar a

taxa de aquecimento para 28°C por minuto até 320°C e mantendo essa temperatura por 2,7 minutos. A Figura 6-2 demonstra a programação do forno.

Figura 6-2: Programação de aquecimento do forno do cromatógrafo para analise do PAH

Espectrômetro de Massas:

- ✓ Temperatura da linha de transferência: 320 °C
- ✓ Modo de leitura: SIM (Selective Ion Monitoring).

No modo SIM o espectrômetro de massas é uma das ferramentas que transforma essa técnica mais seletiva. Entretanto, para se obter um pico cromatográfico de alta resolução, é necessário criar grupos de leituras de íons e cada íon deve ter o seu valor de “dwell time” na intenção de que cada grupo tenha 3,33 ciclos de leituras de íons por segundos, portanto para o presente trabalho foram criados 9 grupos que são apresentados na Tabela 6-3.

Tabela 6-3: Grupos de monitoramento de íons e os "dwell time"

Composto	Íons primário / (*Dwell time*)	Íons secundário / (*Dwell time*)	Íons terciários / (*Dwell Time*)
Grupo 1			
D8-Naftaleno	136 (70)	68 (30)	
Naftaleno	128 (70)	129 (30)	127 (20)
Grupo 2			
2-Fluorbifenil (*surrogate*)	172 (100)	173 (50)	
Grupo 3			
Acenaftileno	152 (70)	151 (20)	153 (20)
D10-Acenafteno	164 (70)	162 (20)	120 (20)
Acenafteno	154 (70)	153 (20)	152 (20)
Grupo 4			
Fluoreno	166 (100)	165 (50)	167 (50)
Grupo 5			
D10-Fenantreno	188 (70)	94 (30)	80 (20)
Fenantreno	178 (70)	179 (30)	176 (30)
Antraceno	178 (70)	176 (30)	179 (30)
Grupo 6			
Fluoranteno	202 (70)	101 (20)	203 (30)
Pireno	202 (70)	200 (20)	203 (30)
D14-Terfenil (*surrogate*)	244 (70)	122 (30)	212 (20)

Tabela 6-3: Grupos de monitoramento de íons e os dwell time (continuação).

Composto	Íons primário / (*Dwell time*)	Íons secundário / (*Dwell time*)	Íons terciários / (*Dwell Time*)
Grupo 7			
Benzo(a)antraceno	228 (70)	229 (30)	226 (20)
D12-Criseno	240 (70)	120 (30)	236 (20)
Criseno	228 (70)	226 (20)	229 (30)
Grupo 8			
Benzo(b)fluoranteno	252 (70)	253 (20)	125 (30)
Benzo(k)fluoranteno	252 (70)	253 (20)	125 (30)
Benzo(a)pireno	252 (70)	253 (20)	125 (30)
D12-Perileno	264 (70)	260 (30)	265 (20)
Grupo 9			
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276 (70)	138 (30)	227 (20)
Dibenzo(a,h)antraceno	278 (70)	139 (30)	279 (20)
Benzo(g,h,i)perileno	276 (70)	138 (30)	277 (20)

A partir dessas condições foi obtido o seguinte cromatograma apresentado na Figura 6-3.

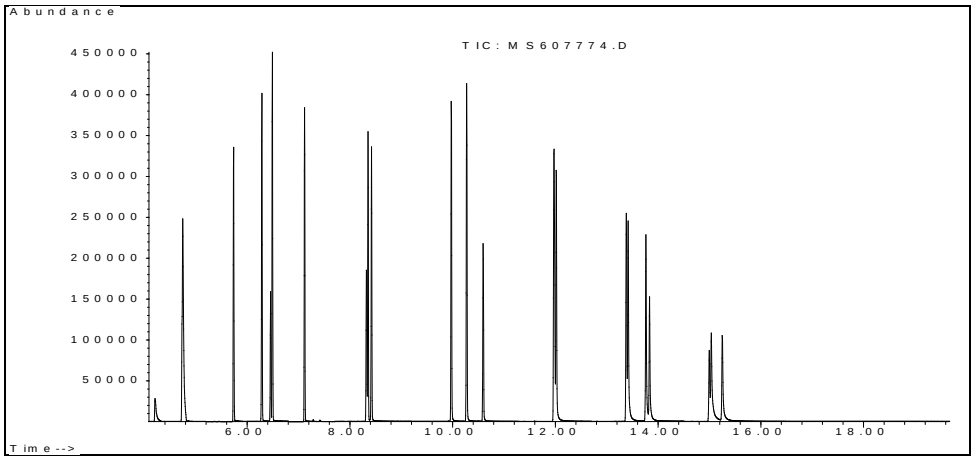

Figura 6-3: Cromatograma dos 16 PAH na concentração de 1000 µg.L^{-1}

7 Resultados e Discussão

7.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e se não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. [14]

Uma das maneiras de realizar o estudo de seletividade é através do cálculo da distribuição de Fisher, que mede a razão entre duas variâncias independentes.

Portanto, foi aplicado o cálculo do teste F para cada analito, sendo as variâncias as seguintes: amostras isentas de contaminação “brancos” e amostras contendo os analitos na concentração de 10 µg, obtendo assim os resultados apresentados nas tabelas de 7-1 a 7-16. Onde é apresentado a média dos resultados, a variância, o numero de leituras, o grau de liberdade utilizado e os valores do teste F calculado.

Tabela 7-1: Resultado do Cálculo do Teste F para o Naftaleno.

Teste-F: duas amostras para variâncias	*Menor Ponto (10 µg)*	*Branco (µg)*
Média	49,86	5,12
Variância	4,26	1,28
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	3,32	
P(F<=f) uni-caudal	0,04	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-2: Resultado do Cálculo do Teste F para o Acenaftileno

Teste-F: duas amostras para variâncias	**Menor Ponto (10 µg)**	**Branco (µg)**
Média	9,42	0,23
Variância	1,92	$2{,}63 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	729,72	
P(F<=f) uni-caudal	$8{,}56 \times 10^{-12}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-3: Resultado do Cálculo do Teste F para o Acenafteno.

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	9,79	0,26
Variância	1,02	$3,32 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	307,59	
P(F<=f) uni-caudal	$4,12 \times 10^{-10}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-4: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fluoreno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	10,35	0,31
Variância	4,07	$3,79 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	1074,87	
P(F<=f) uni-caudal	$1,50 \times 10^{-12}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-5: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fenantreno.

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	11,19	0,15
Variância	2,94	$1,30 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	2252,97	
P(F<=f) uni-caudal	$5,40 \times 10^{-14}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-6: Resultado do Cálculo do Teste F para o Antraceno.

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	11,17	0,10
Variância	7,09	$2,58 \times 10^{-04}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	27477,71	
P(F<=f) uni-caudal	$7,01 \times 10^{-19}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-7: Resultado do Cálculo do Teste F para o Fluoranteno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	10,54	0,25
Variância	5,19	$1,75 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	2960,35	
P(F<=f) uni-caudal	$1,58 \times 10^{-14}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-8: Resultado do Cálculo do Teste F para o Pireno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	10,64	0,10
Variância	5,26	$1,97 \times 10^{-04}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	26654,21	
P(F<=f) uni-caudal	$8,03 \times 10^{-19}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-9: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[a]antraceno:

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	11,29	0,44
Variância	3,93	$4,80 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	818,51	
P(F<=f) uni-caudal	$5,11 \times 10^{-12}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-10: Resultado do Cálculo do Teste F para o Criseno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	9,47	0,36
Variância	4,07	$6,21 \times 10^{-03}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	654,92	
P(F<=f) uni-caudal	$1,39 \times 10^{-11}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-11: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[b]fluoranteno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	14,79	0,70
Variância	30,60	$6,70 \times 10^{-02}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	456,74	
P(F<=f) uni-caudal	$7,01 \times 10^{-11}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-12: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[k]fluoranteno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	11,35	0,48
Variância	3,28	$3,62 \times 10^{-02}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	90,77	
P(F<=f) uni-caudal	$9,44 \times 10^{-08}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-13: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[a]pireno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	10,97	0,78
Variância	4,44	$4,97 \times 10^{-02}$
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	89,34	
P(F<=f) uni-caudal	$1,01 \times 10^{-07}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-14: Resultado do Cálculo do Teste F para o Indeno[123-cd]pireno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	25,03	3,54
Variância	85,66	1,34
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	63,70	
P(F<=f) uni-caudal	$4,49 \times 10^{-07}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-15: Resultado do Cálculo do Teste F para o Dibenzo[a,h]antraceno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	26,41	6,35
Variância	321,88	5,82
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	55,35	
P(F<=f) uni-caudal	$8,31x10^{-07}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Tabela 7-16: Resultado do Cálculo do Teste F para o Benzo[g,h,i]perileno

Teste-F: duas amostras para variâncias	Menor Ponto (10 µg)	Branco (µg)
Média	21,71	1,76
Variância	48,25	0,46
Observações*	10	10
gl**	9	9
F	103,84	
P(F<=f) uni-caudal	$5,21x10^{-08}$	
F crítico uni-caudal	3,18	

* - representa o numero de leituras

** - grau de liberdade utilizado para calcular o teste F

Segundo distribuição de Fisher se o valor do teste F calculado for maior que o F critico, consideramos à hipótese nula, caso contrario a hipótese é verdadeira. Desta maneira, todos os resultados calculados anteriormente

ficaram acima do valor do F critico, desta forma consideramos que o método em questão é seletivo para os 16 compostos orgânicos semi-voláteis.

No entanto, podemos observar que o F calculado para o naftaleno está bem próximo ao F critico, isso ocorreu devido à natureza do solvente utilizado, pois o isooctano apresenta contaminação natural de naftaleno e como não foi utilizado um solvente de alto grau de qualidade essa contaminação se tornou evidente, mas mesmo assim foi possível realizar a validação desse composto.

7.2 **Curvas de Calibração e faixa linear de trabalho**

A verificação da linearidade é um artifício que permite que seja observado o quanto é verdadeira a proporcionalidade da relação entre o sinal e a concentração do analito presente na amostra. [42]

As figuras de 7-1 a 7-16 apresentam as curvas de calibração dos 16 compostos orgânicos semi-voláteis:

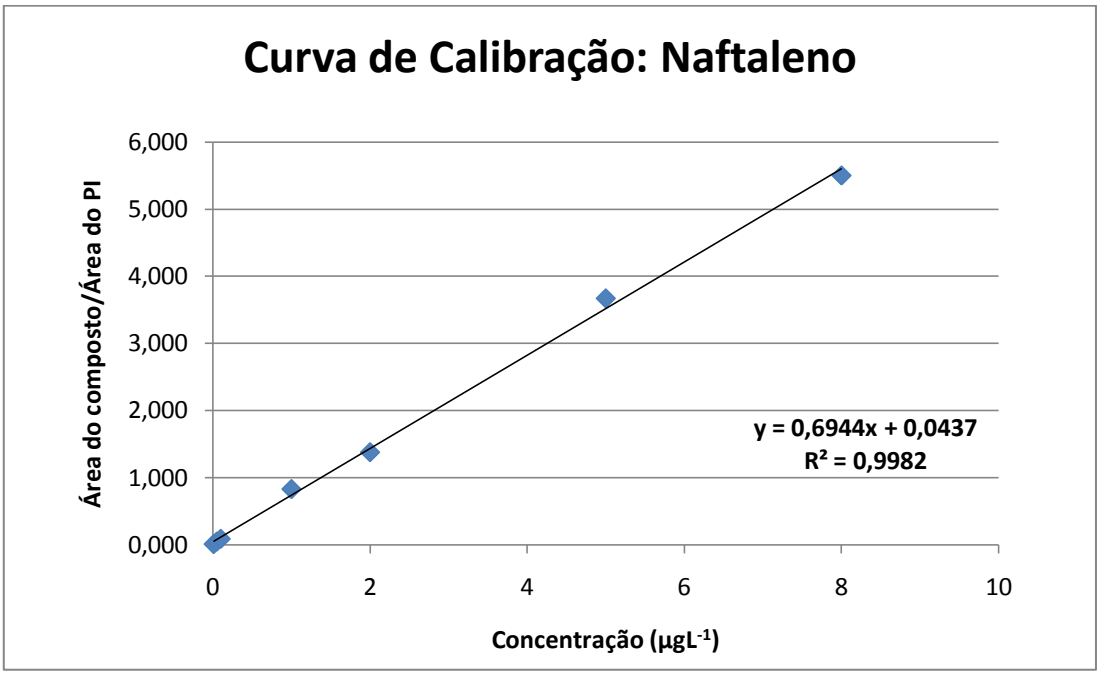

Figura 7-1: Curva de Calibração do Naftaleno

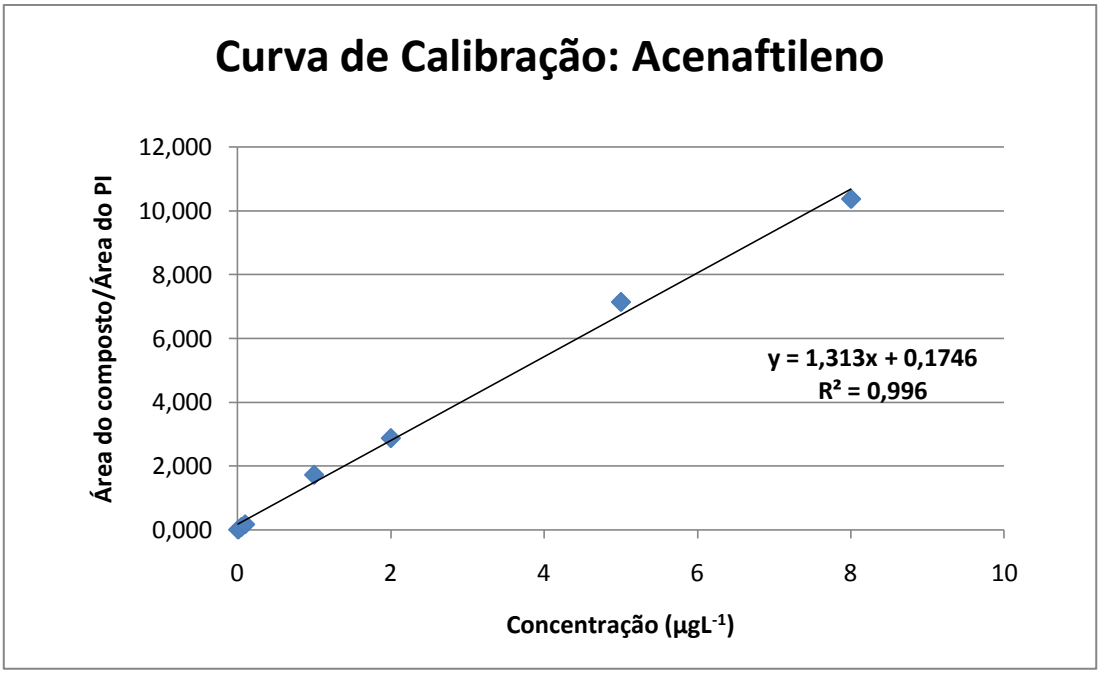

Figura 7-2: Curva de Calibração do Acenaftileno

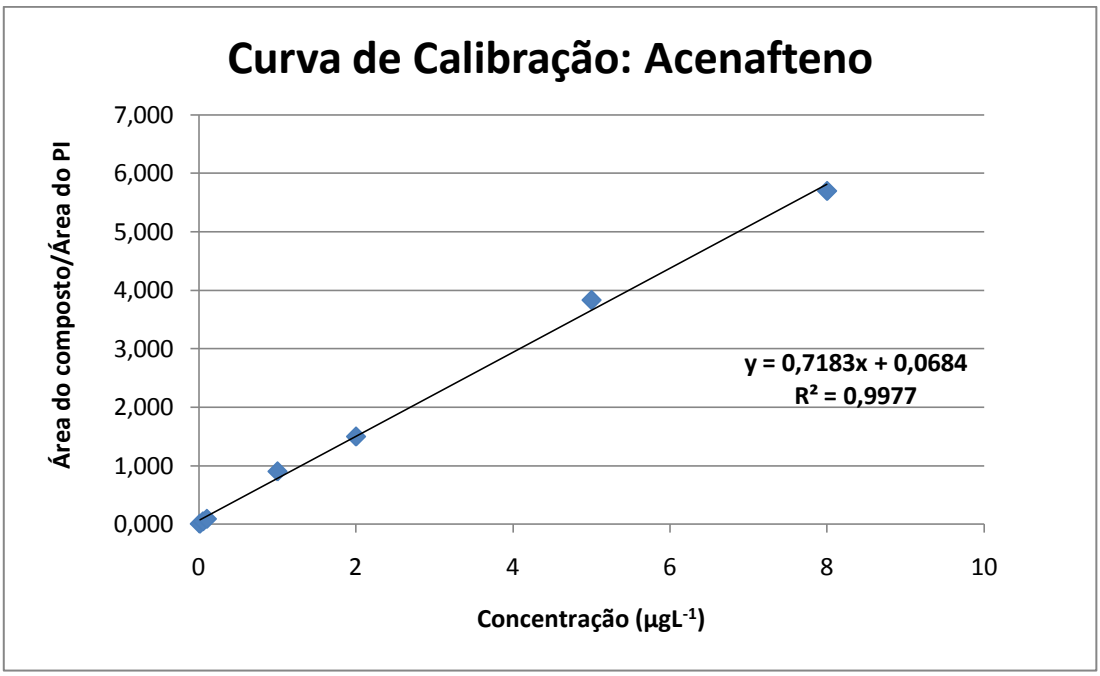

Figura 7-3: Curva de Calibração do Acenafteno

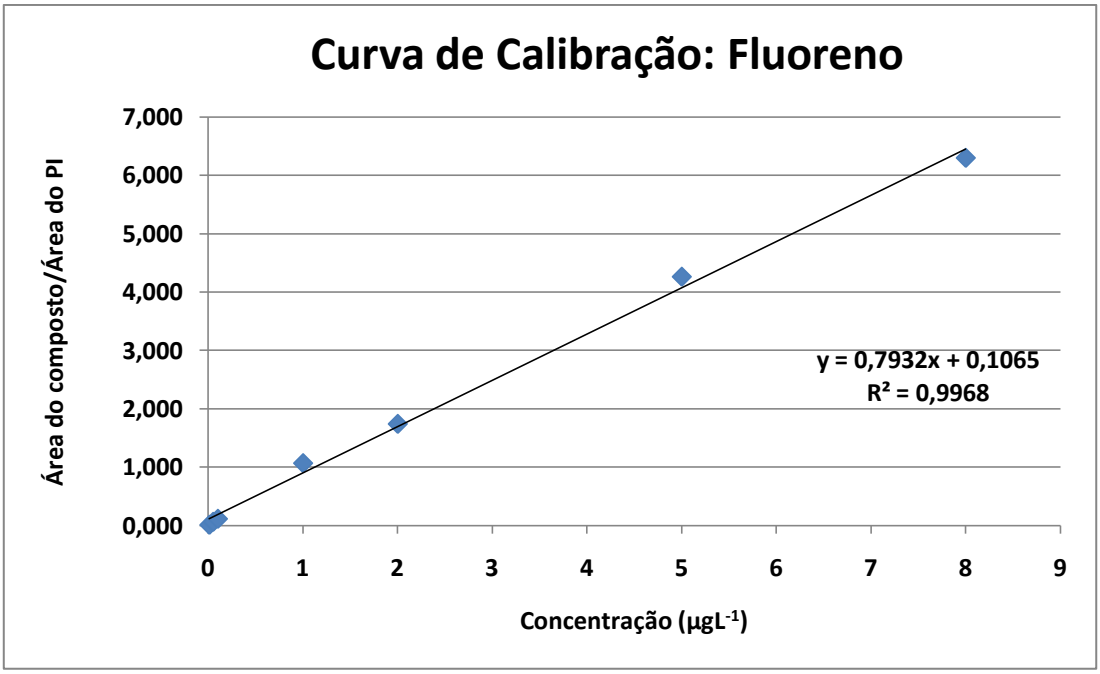

Figura 7-4: Curva de Calibração do Fluoreno

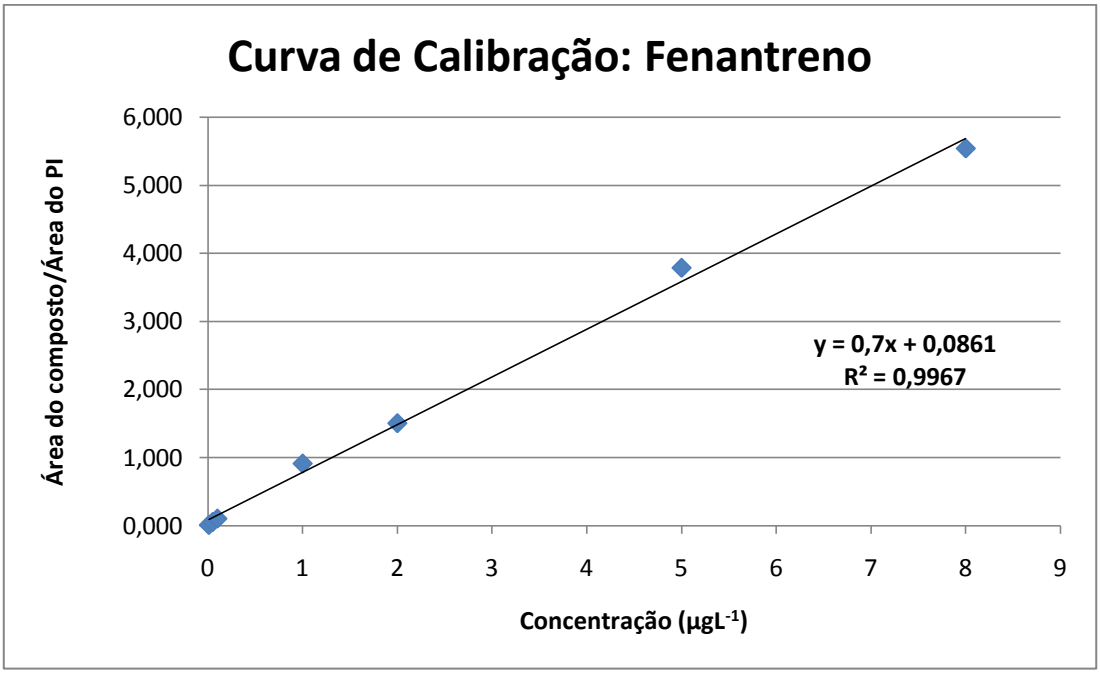

Figura 7-5: Curva de Calibração do Fenantreno

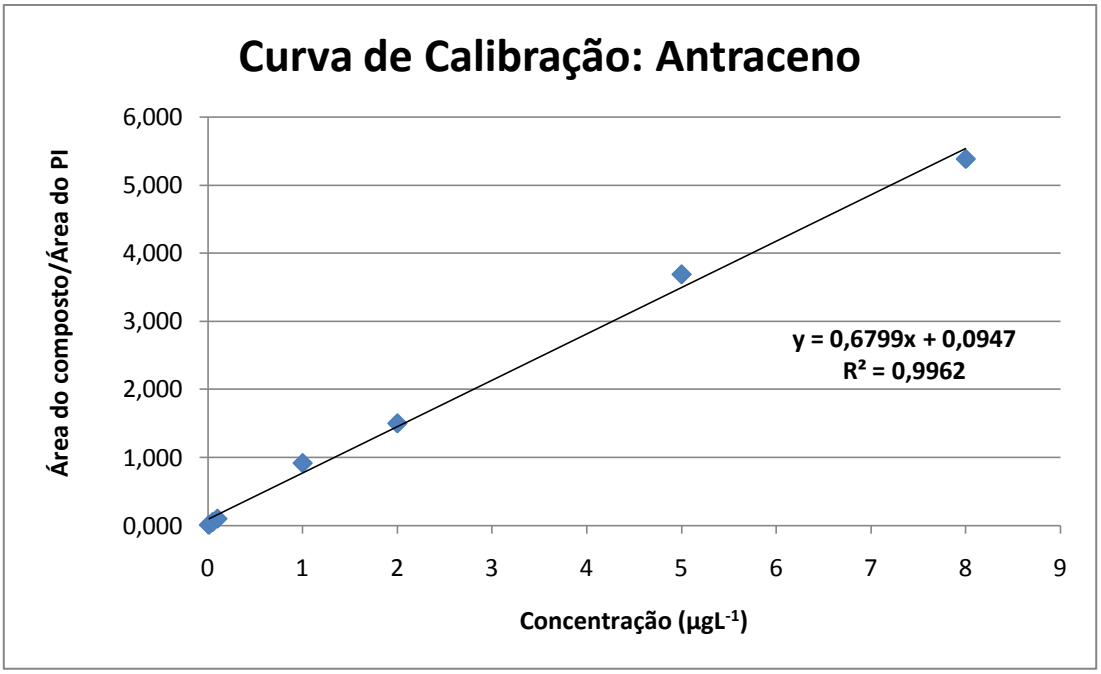

Figura 7-6: Curva de Calibração do Antraceno

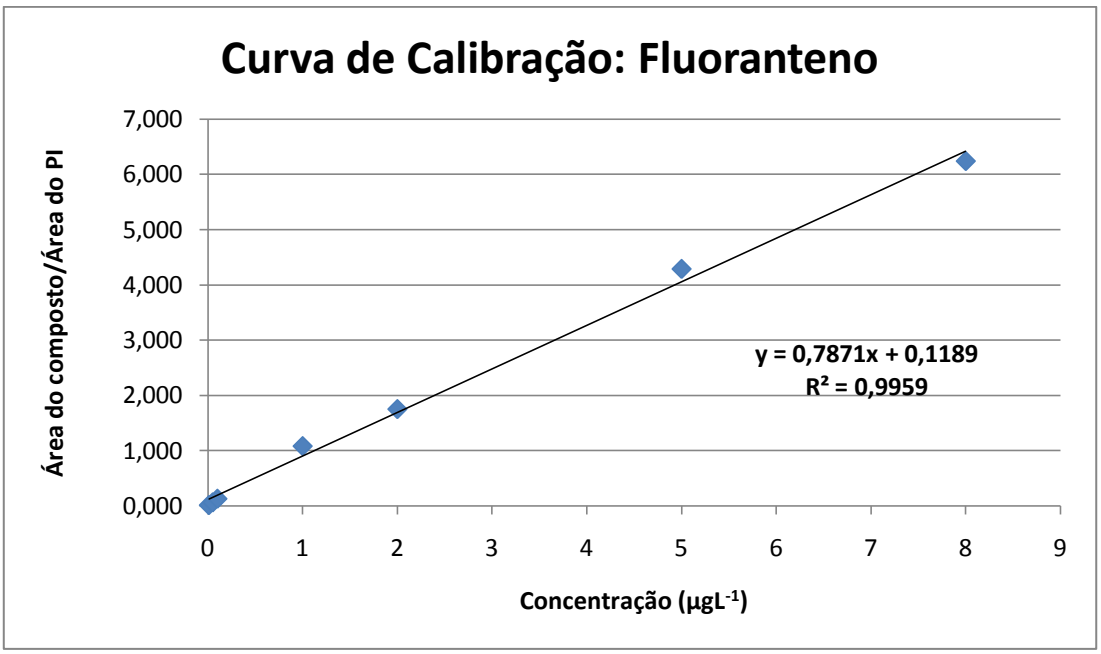

Figura 7-7: Curva de Calibração do Fluoranteno

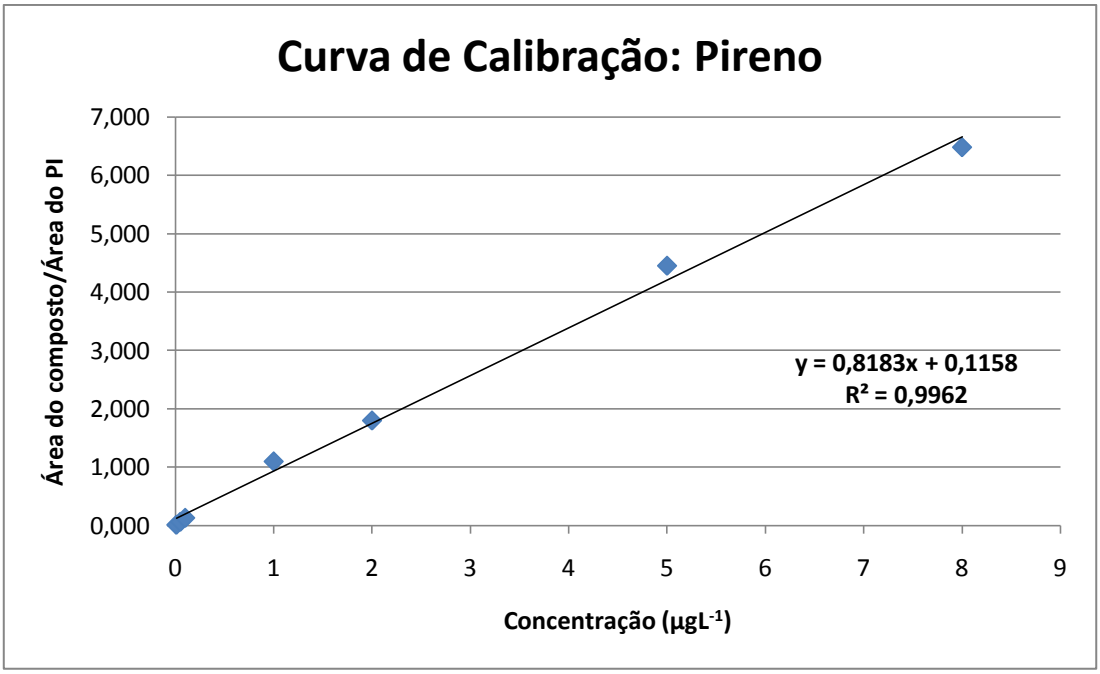

Figura 7-8: Curva de Calibração do Pireno

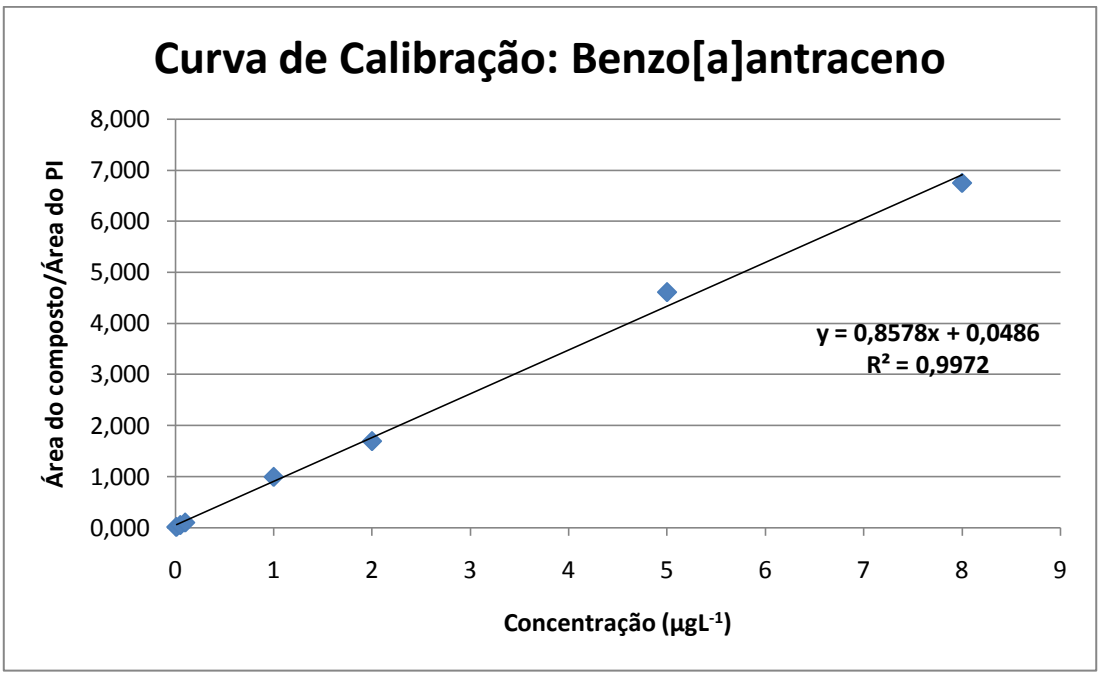

Figura 7-9: Curva de Calibração do Benzo[a]antraceno

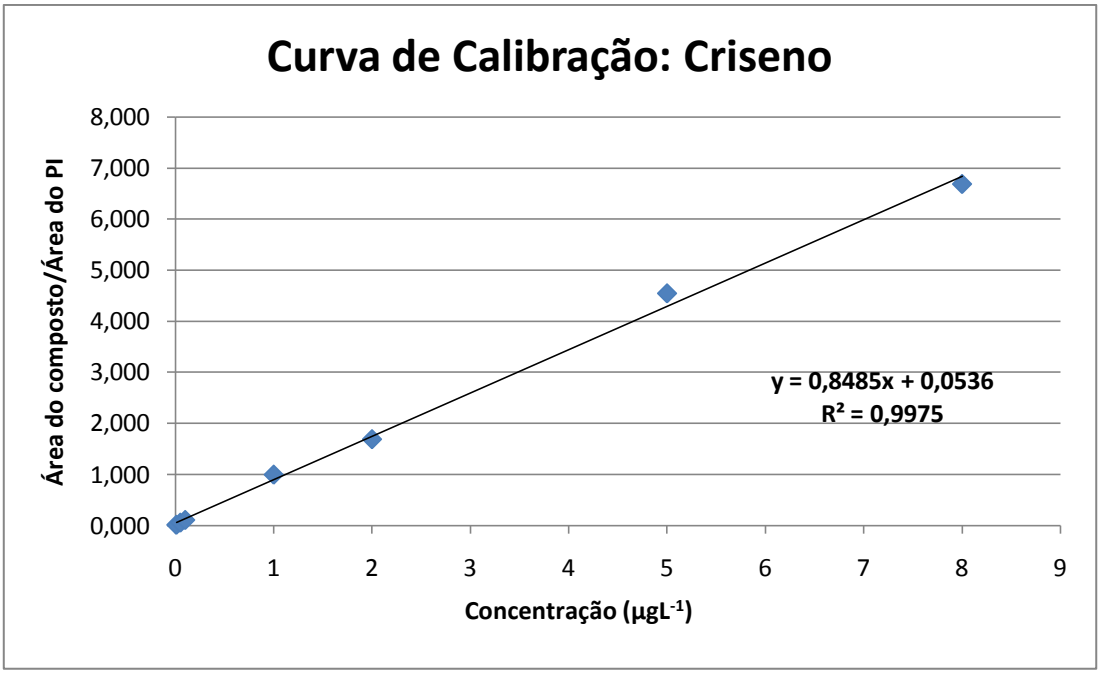

Figura 7-10: Curva de Calibração do Criseno

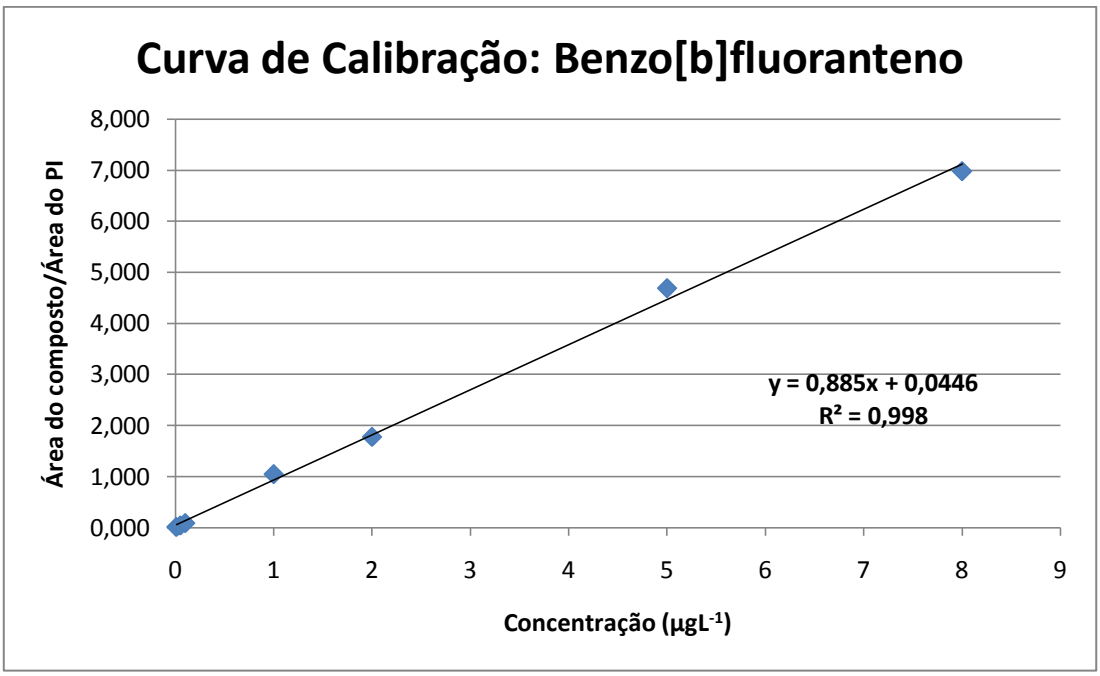

Figura 7-11: Curva de Calibração do Benzo[b]fluoranteno

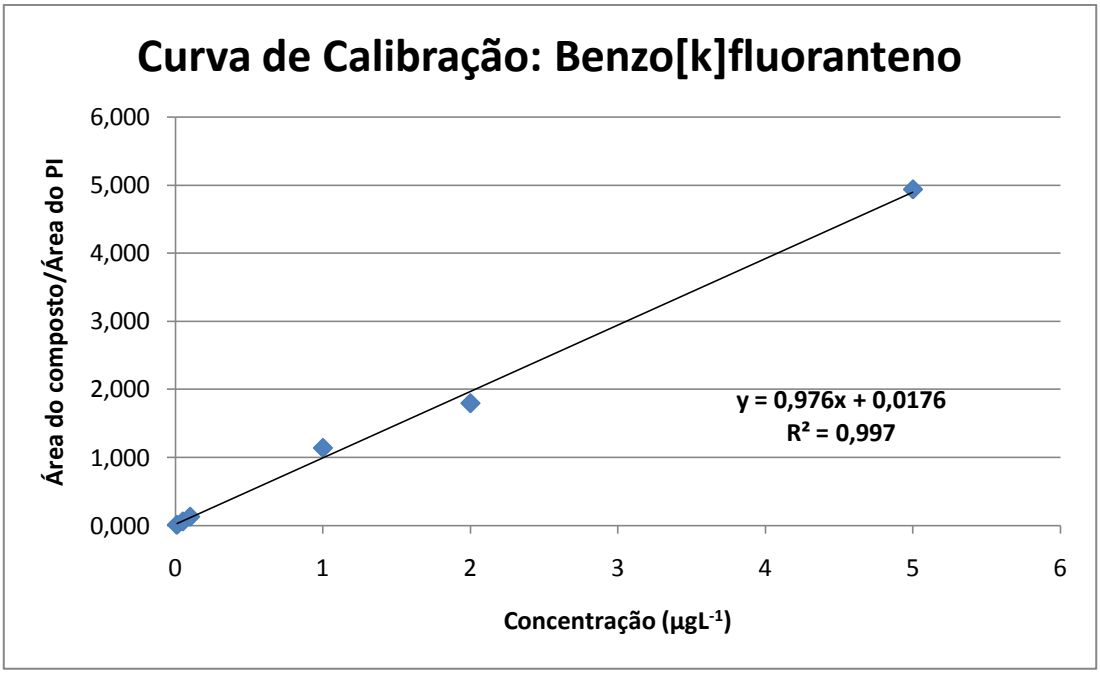

Figura 7-12: Curva de Calibração do Benzo[k]fluoranteno

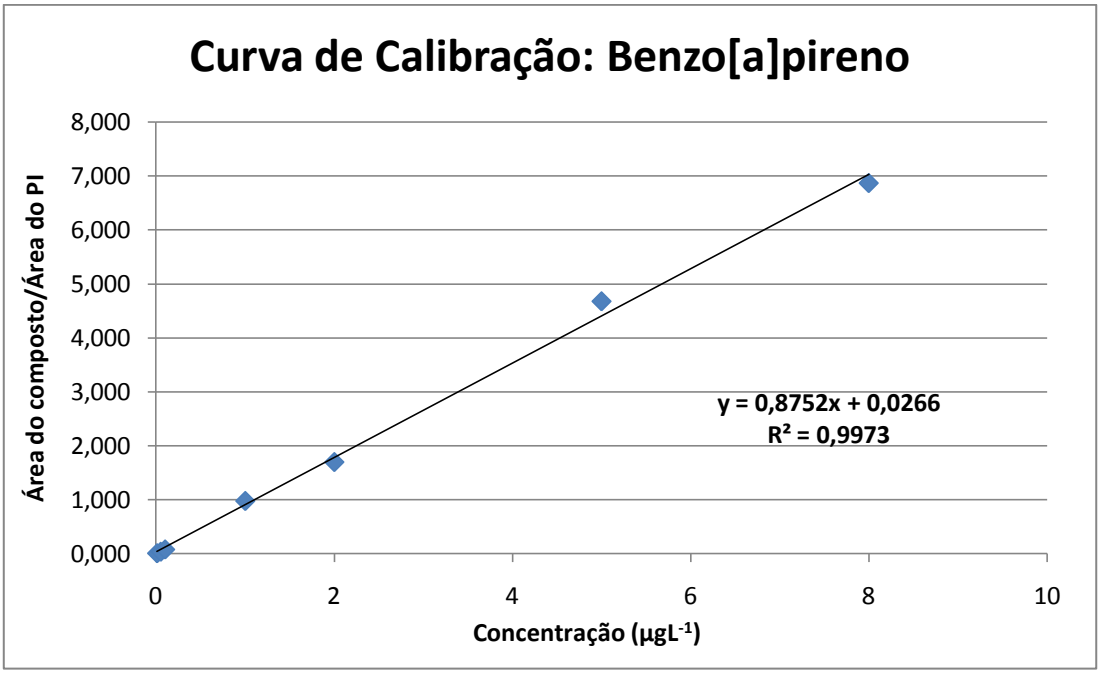

Figura 7-13: Curva de Calibração do Benzo[a]pireno

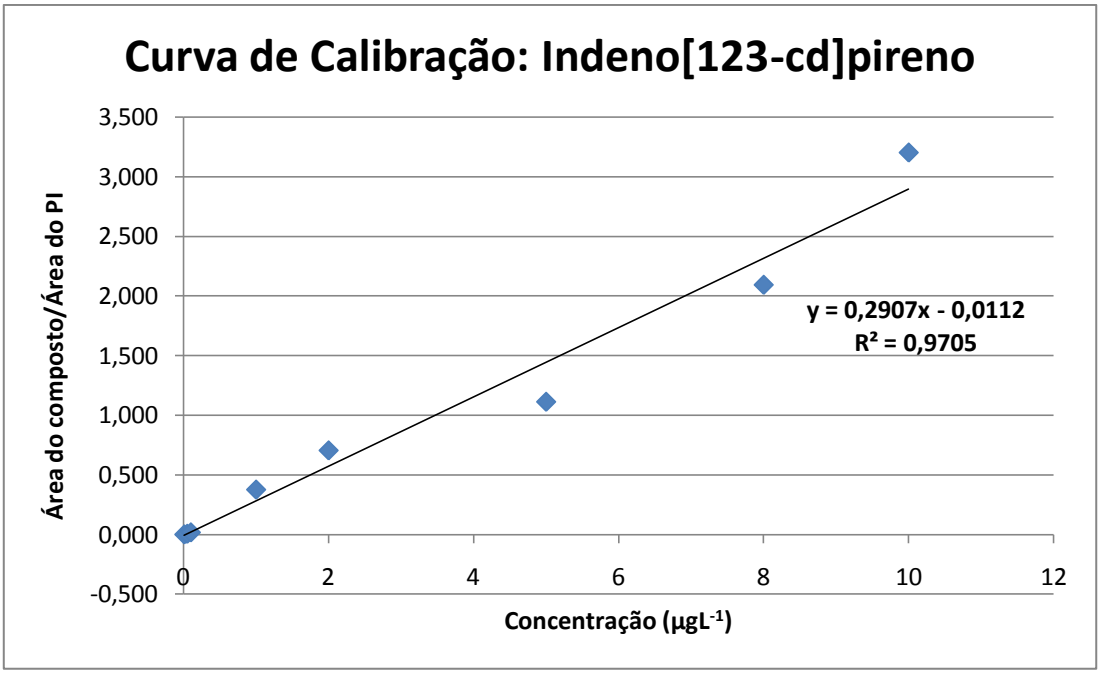

Figura 7-14: Curva de Calibração do Indeno[123-cd]pireno

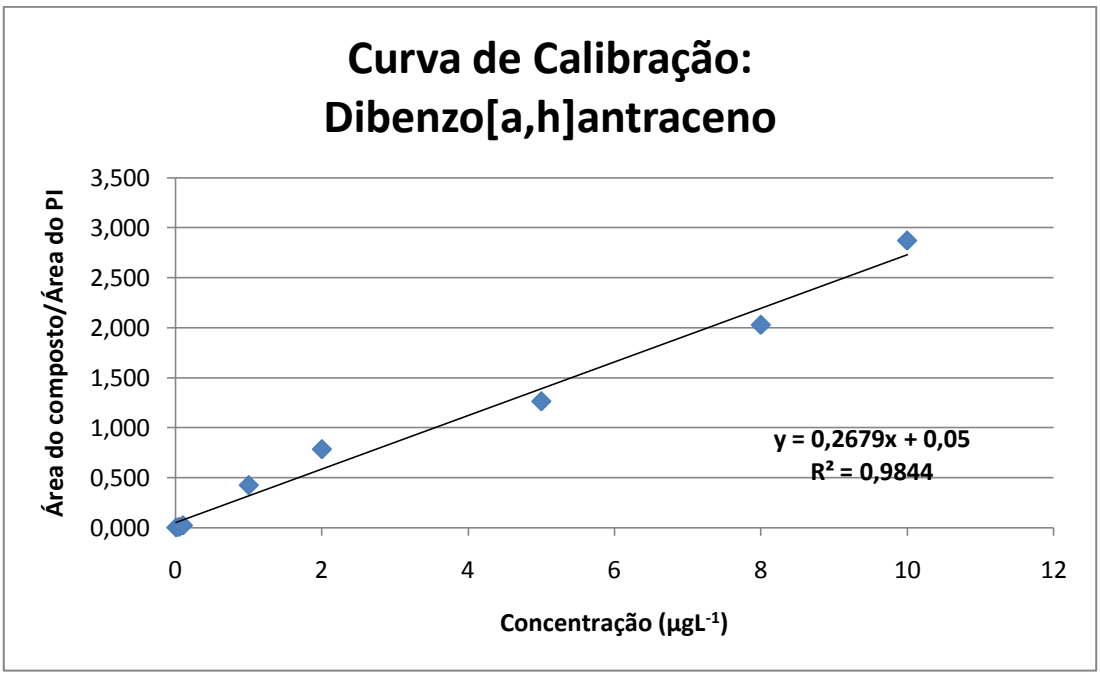

Figura 7-15: Curva de Calibração do Dibenzo[a,h]antraceno

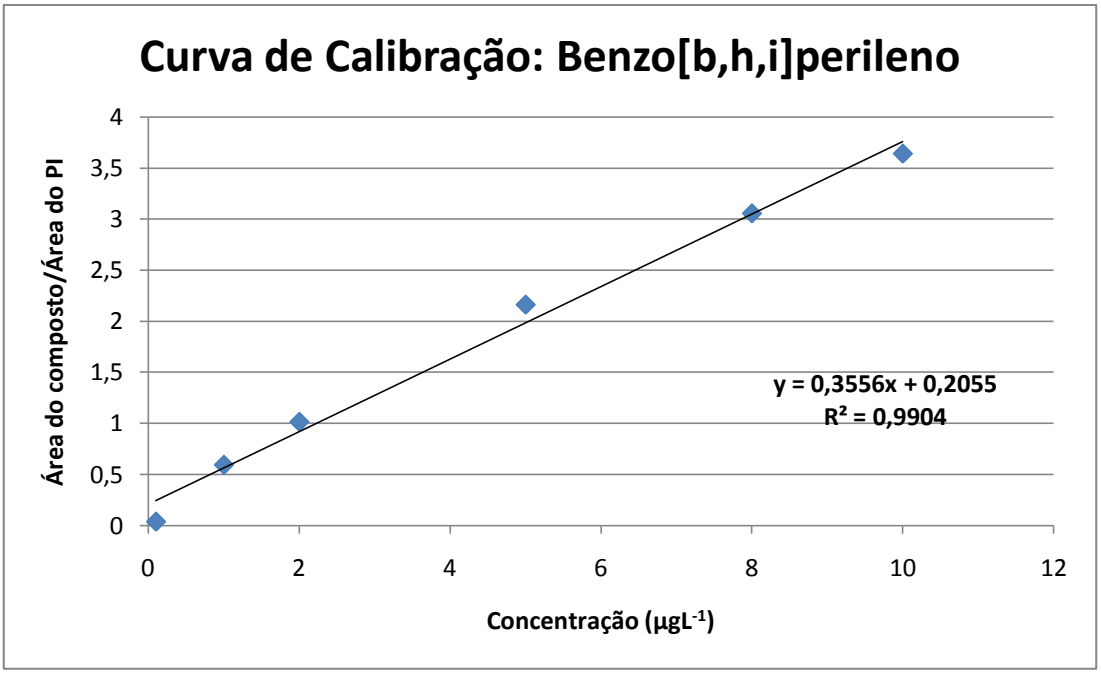

Figura 7-16: Curva de Calibração do Benzo[b,h,i]perileno

Para avaliar as curvas de calibração foi calculado o fator de resposta médio e o desvio padrão relativo para cada analito. Os resultados são apresentados na tabela 7-17. Pode-se observar que todos os analitos apresentaram um coeficiente de regressão acima de 0,90 estando dentro do limite estipulado pelo INMETRO estipula, porém quando avalia-se o desvio padrão relativo do fator de resposta médio os analitos, Indeno[123-cd]pireno e Dibenzo[a.h]antraceno apresentaram valores acima de 20 % como estipulados pela EPA.

Ainda segundo o EPA para a analise de HPA o fator de resposta médio deve sempre estar próximo a 1 e não foram observados esses valores para os compostos Indeno[123-cd]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g.h.i]perileno.

Uma das explicações para esses três analitos ficarem fora dos critérios de aceitação é a presença de sítios ativos no sistema cromatográfico que adsorvem compostos com massas moleculares mais elevadas.

Tabela 7-17: Resultados do cálculo do Fator de Resposta Médio e Desvio Padrão Relativo.

Compostos	Fator de Resposta Médio	Desvio Padrão Relativo (%)
Naftaleno	0,812	13
Acenaftileno	1,649	15
Acenafteno	0,873	15
Fluoreno	1,018	18
Fenantreno	0,898	18
Antraceno	0,862	16
Fluoranteno	1,039	19
Pireno	1,076	19
Benzoa[a]ntraceno	0,963	12
Criseno	0,958	10
Benzo[b]fluoranteno	0,841	17
Benzo[k]fluoranteno	1,043	15
Benzo[a]pireno	0,795	19
Indeno[123-cd]pireno	0,248	38
Dibenzo[a,h]antraceno	0,264	40
Benzo[g,h,i]perileno	0,444	20

7.3 Faixa Linear de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho

Para o presente trabalho foram realizadas extrações em diversas concentrações partindo de 10 μgL^{-1} até 20.000 μgL^{-1}. Onde podemos observar que a faixa linear de trabalho fica limitada entre 10 μgL^{-1} a 5000 μgL^{-1}, devido a uma particularidade do método de DLLME que consiste na saturação do solvente extrator.

Tais resultados são apresentados nas figuras 7-17 a 7-33.

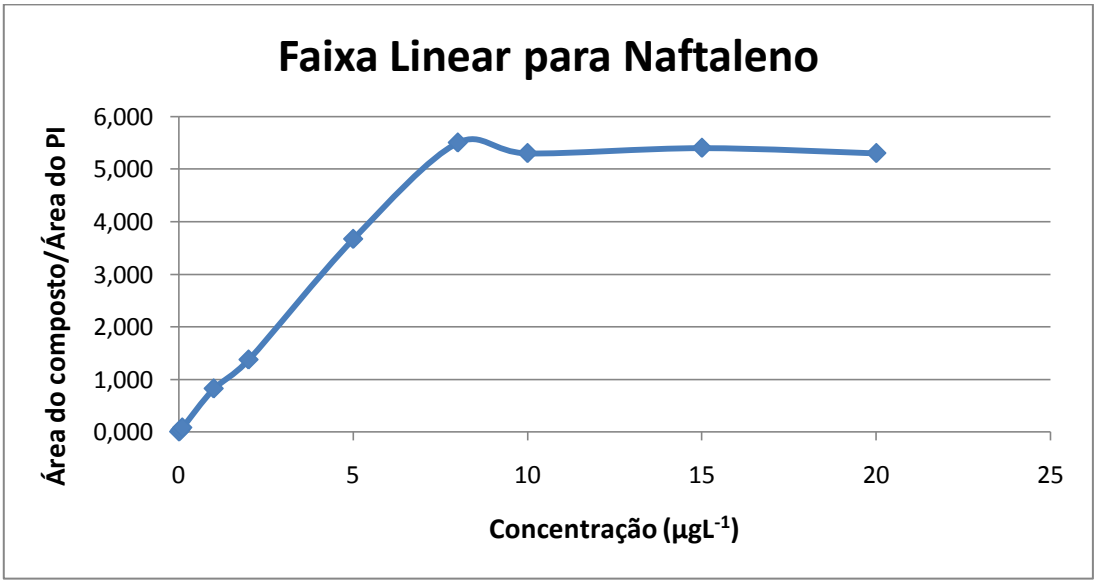

Figura 7-17: Estudo da Faixa Linear para o Naftaleno

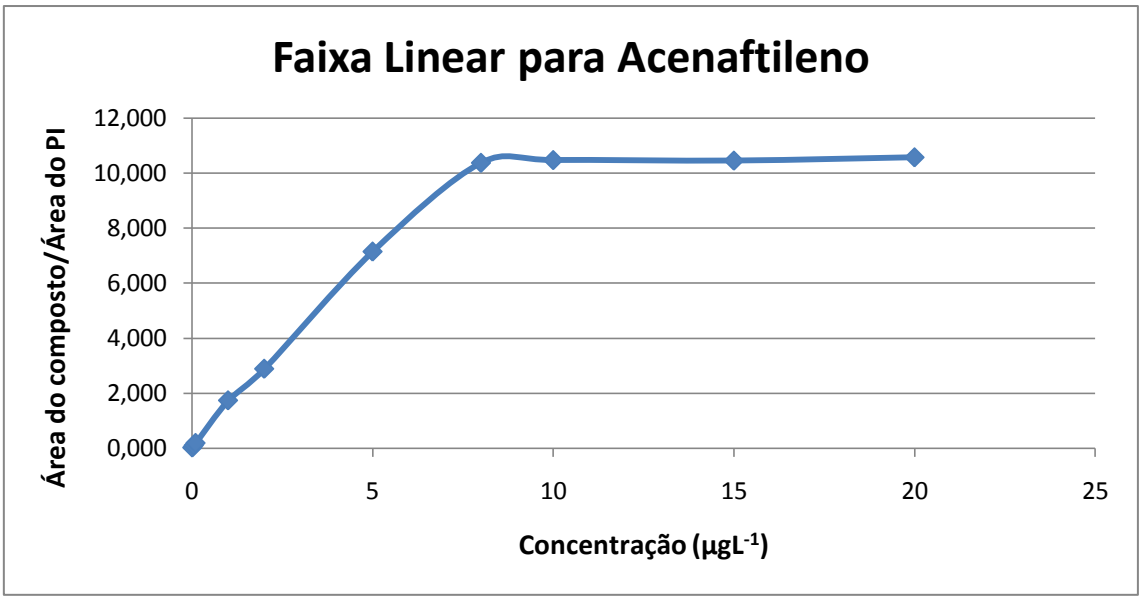

Figura 7-18: Estudo da Faixa Linear para o Acenaftileno.

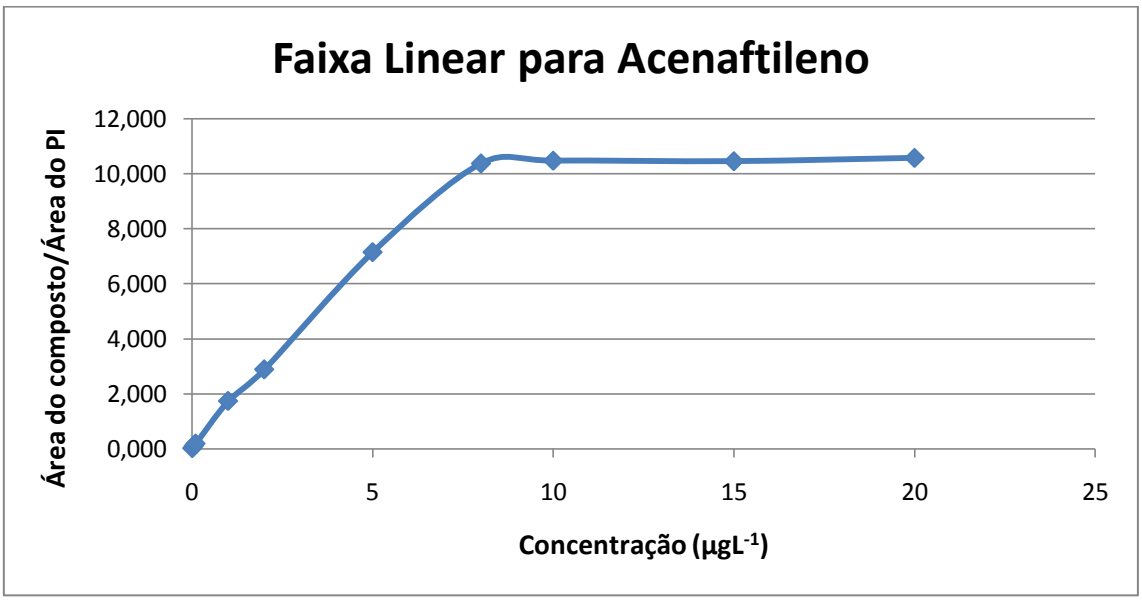

Figura 7-19:Estudo da Faixa Linear para o Acenaftileno.

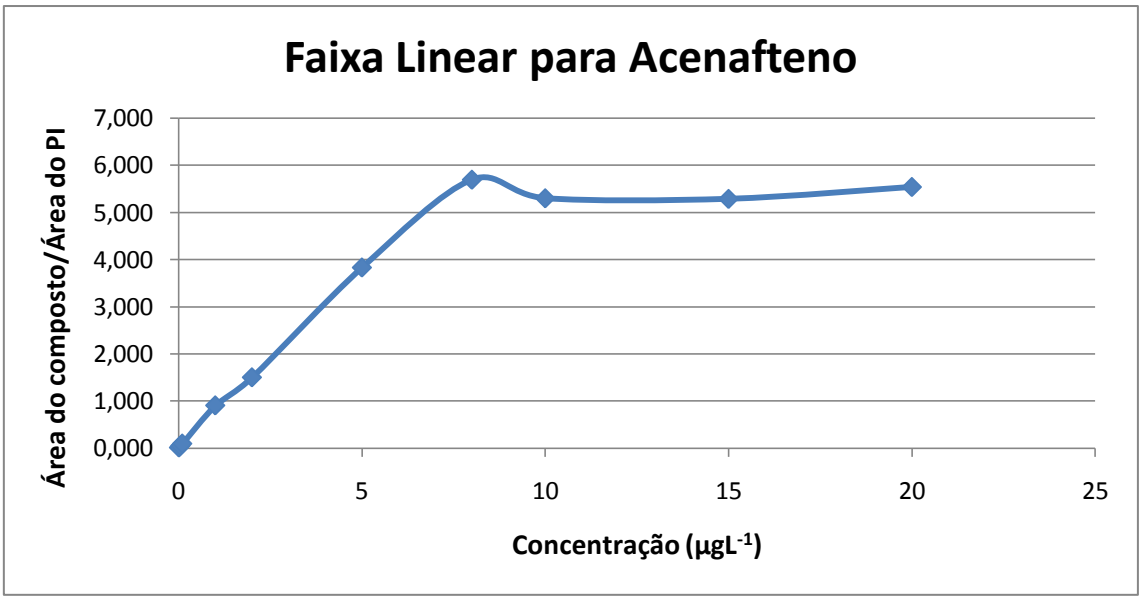

Figura 7-20: Estudo da Faixa Linear para o Acenafteno.

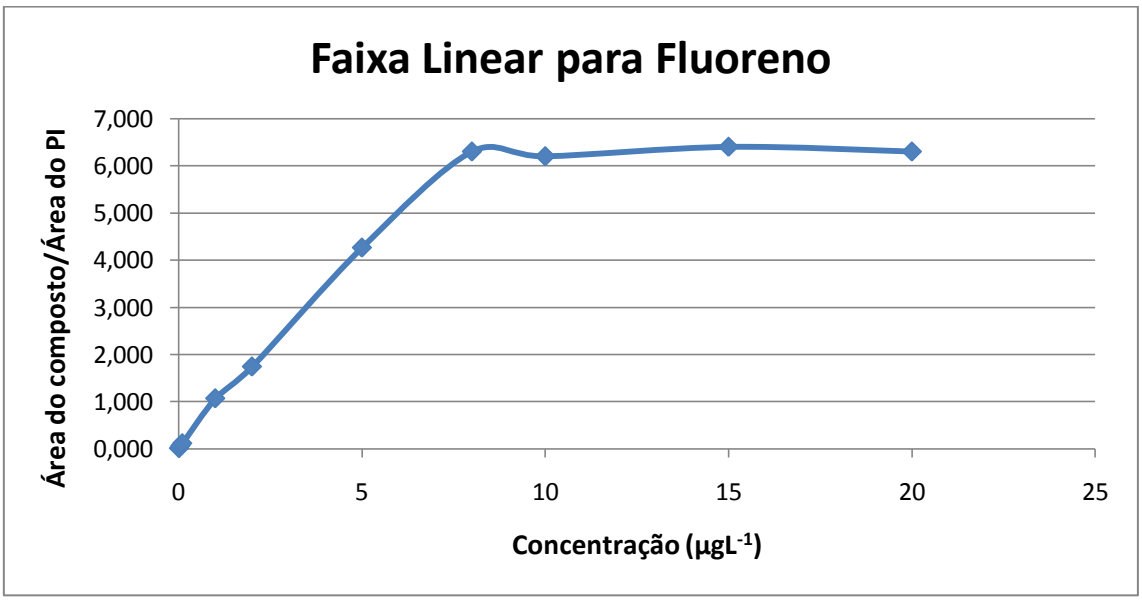

Figura 7-21: Estudo da Faixa Linear para o Fluoreno.

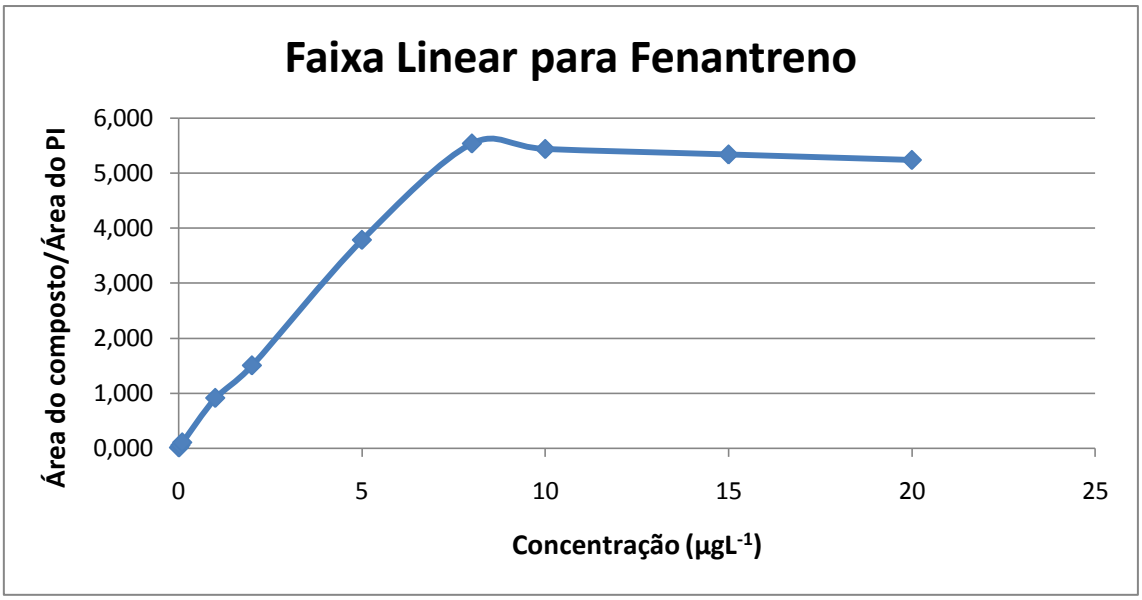

Figura 7-22: Estudo da Faixa Linear para o Fenantreno.

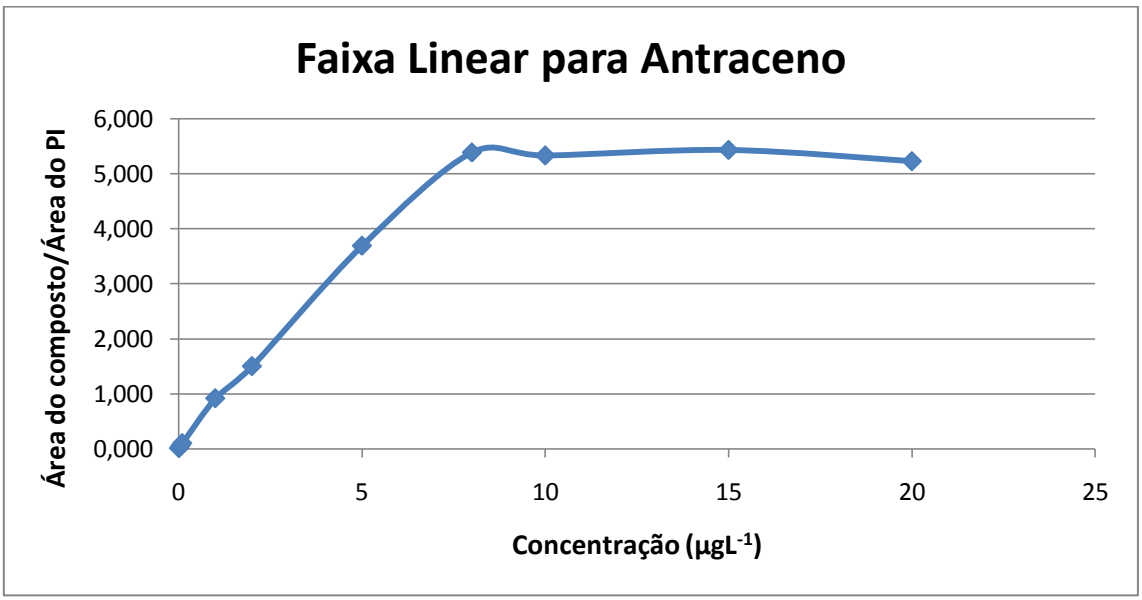

Figura 7-23: Estudo da Faixa Linear para o Antraceno.

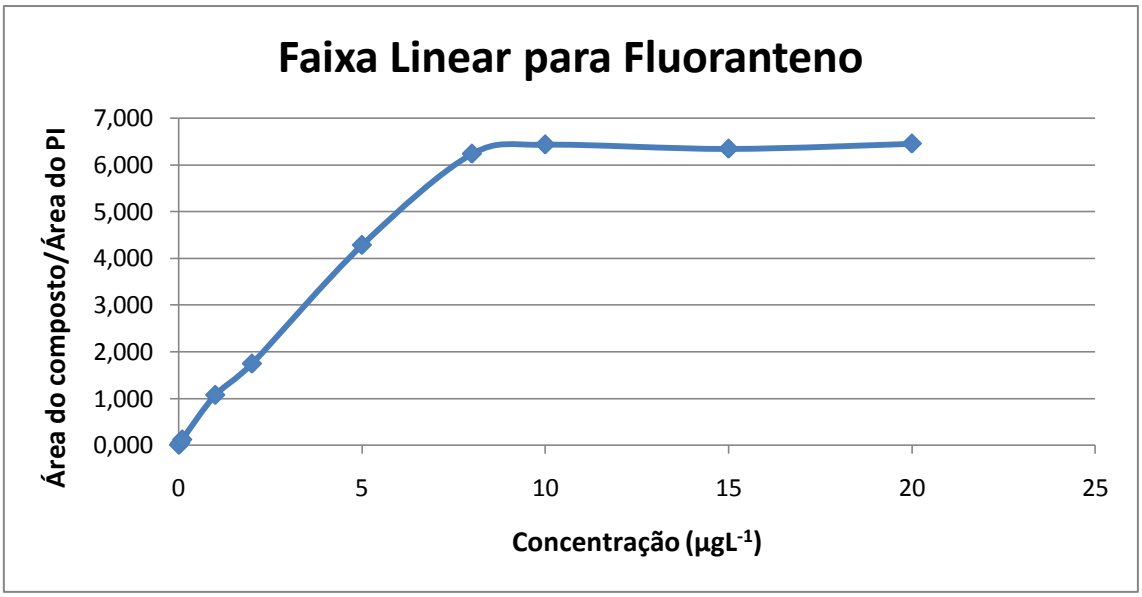

Figura 7-24: Estudo da Faixa Linear para o Fluoranteno.

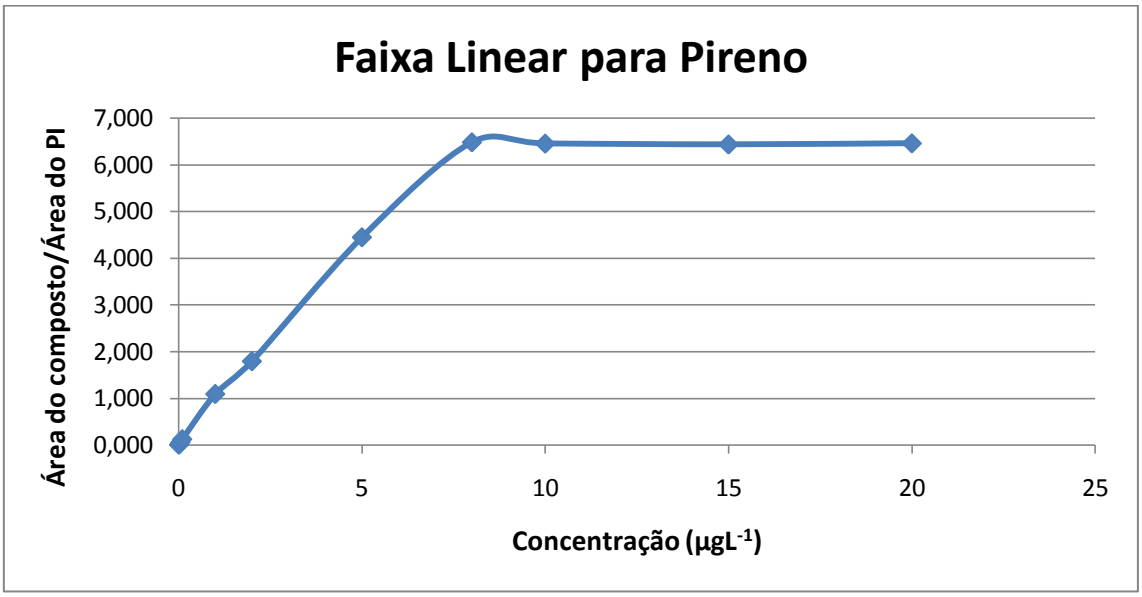

Figura 7-25: Estudo da Faixa Linear para o Pireno.

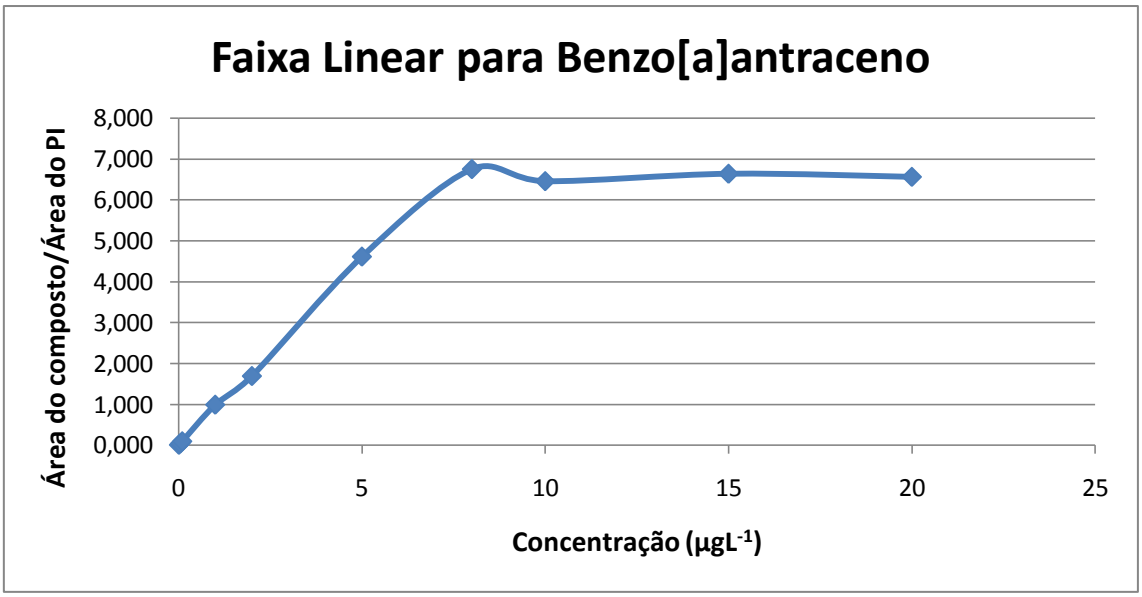

Figura 7-26: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[a]antraceno.

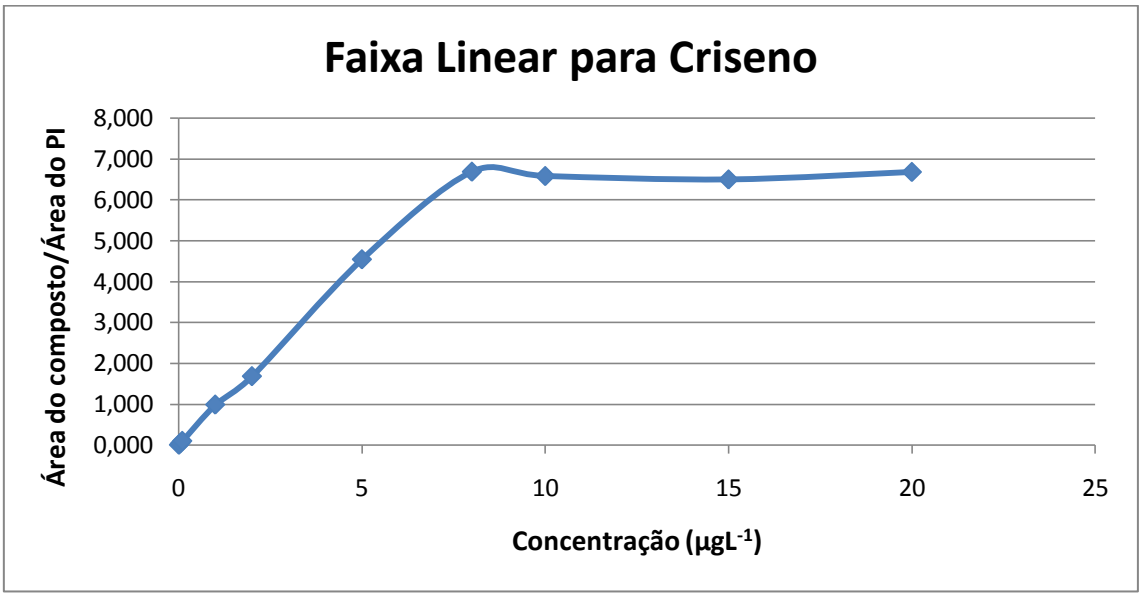

Figura 7-27: Estudo da Faixa Linear para o Criseno.

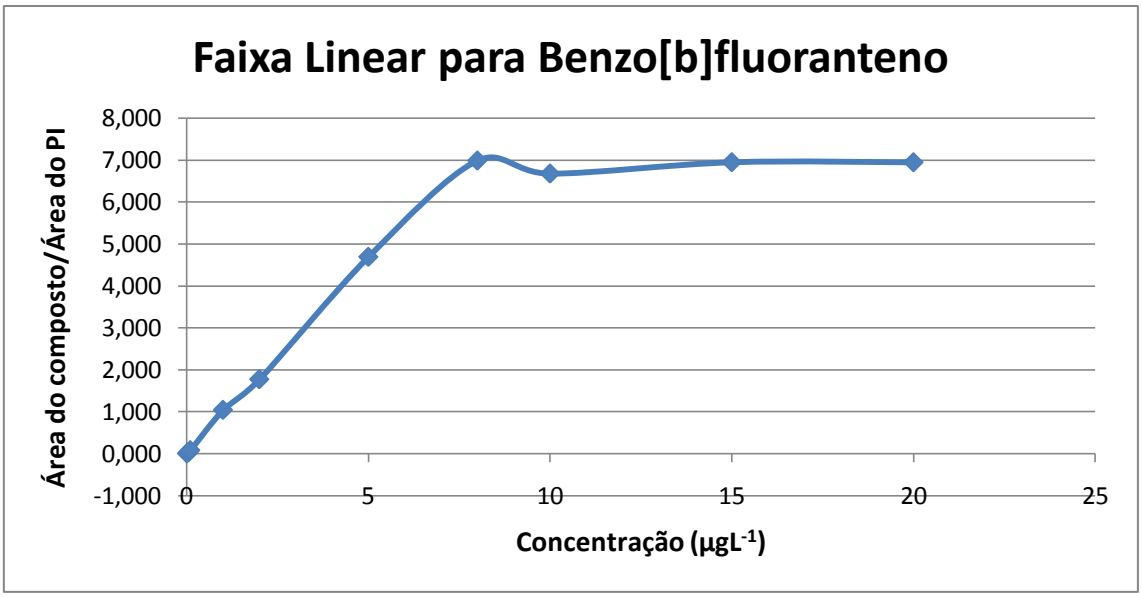

Figura 7-28: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[b]fluoranteno.

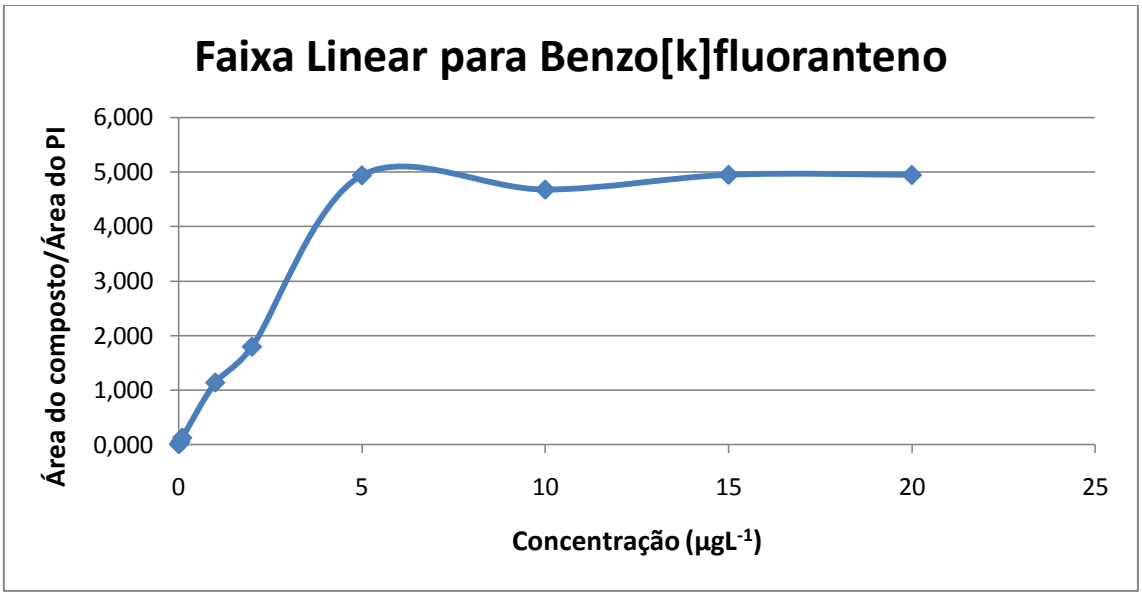

Figura 7-29: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[k]fluoranteno.

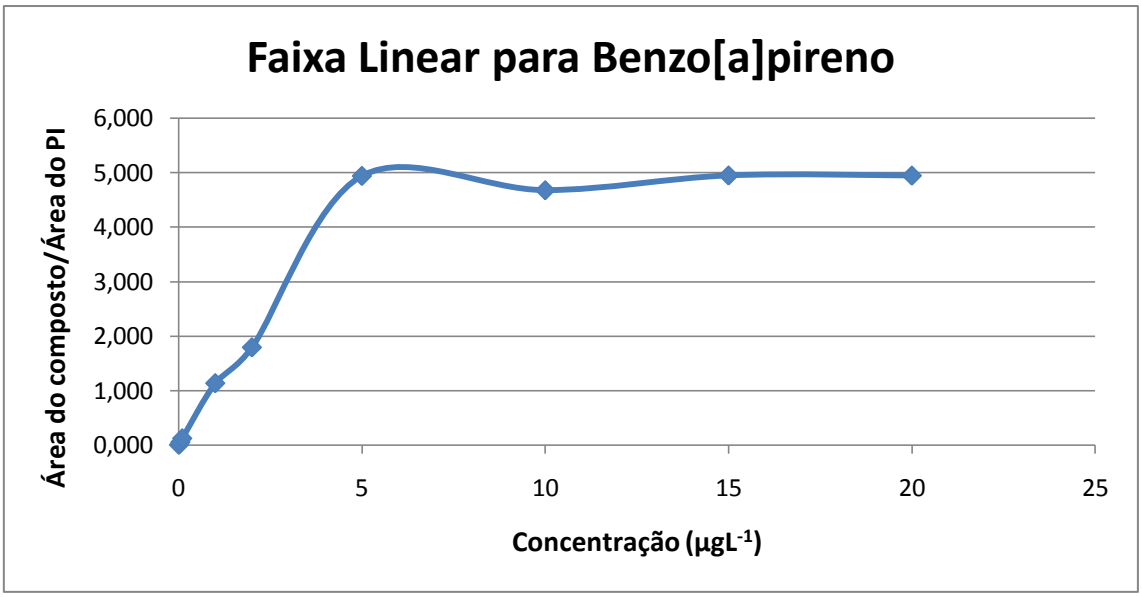

Figura 7-30: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[a]pireno.

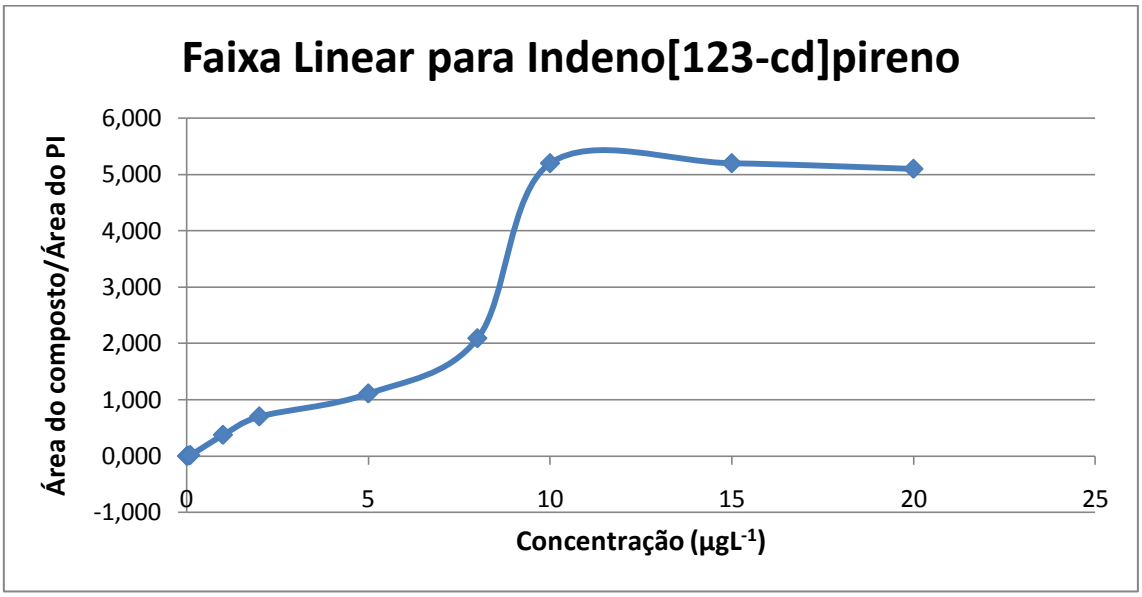

Figura 7-31: Estudo da Faixa Linear para o Indeno[123-cd]pireno.

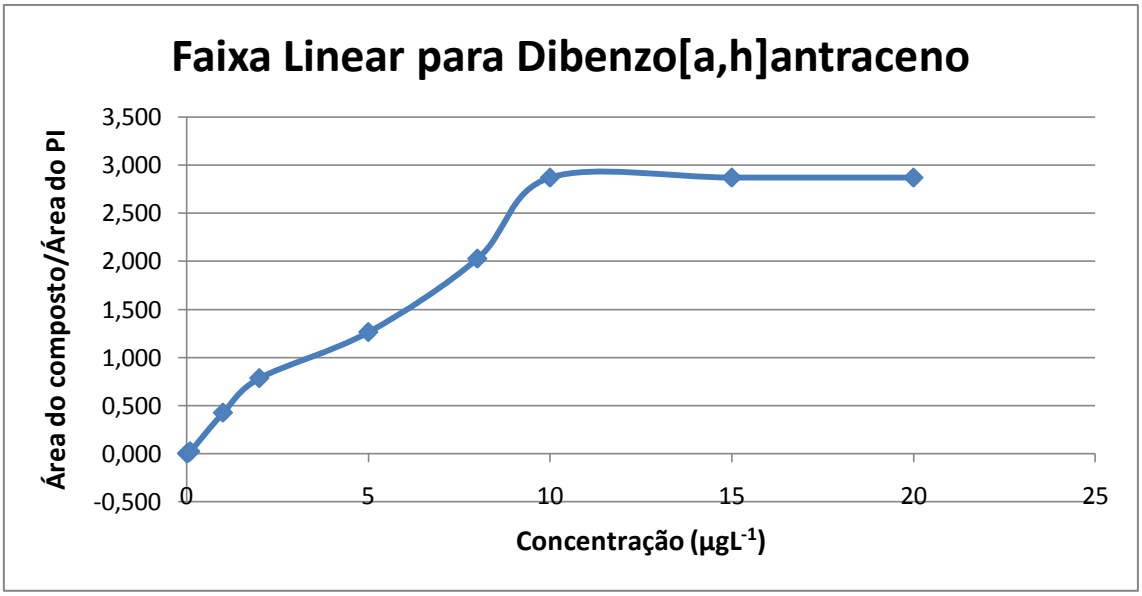

Figura 7-32: Estudo da Faixa Linear para o Dibenzo[a,h]antraceno.

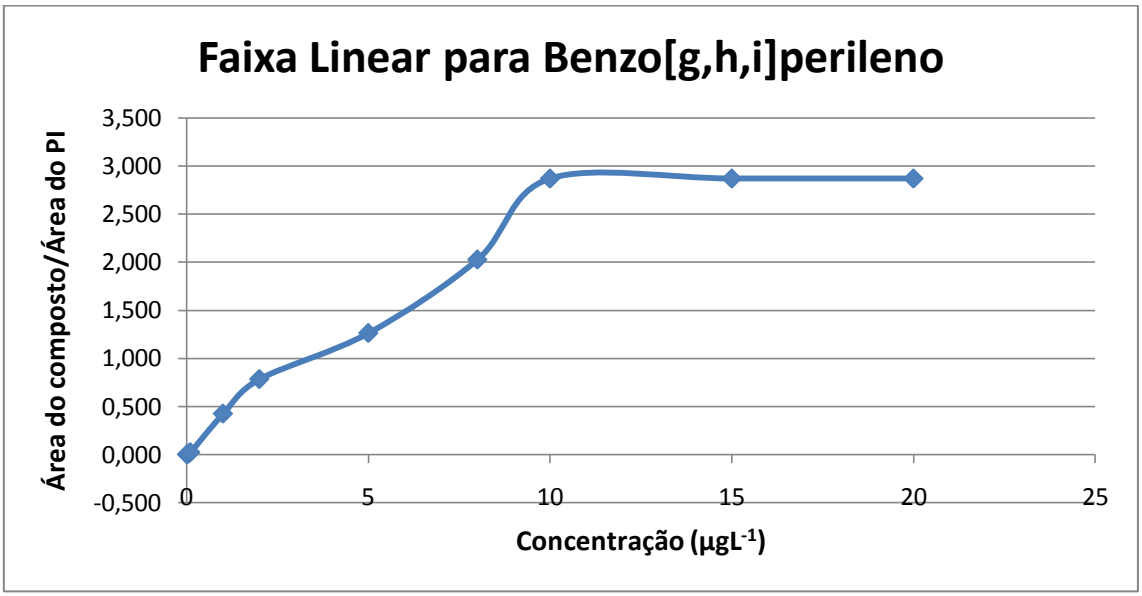

Figura 7-33: Estudo da Faixa Linear para o Benzo[g,h,i]perileno.

7.4 Limites de Detecção (LD) e Limites de Quantificação (LQ).

Após a obtenção das curvas de calibração e do estudo da faixa linear de trabalho, o próximo passo a ser tomado é a determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada analito.

Dessa forma, obtiveram-se os seguintes valores de LD e LQ apresentados na **Tabela 7-18** a seguir, onde foi observado também os LDM (limite de detecção do método) e LQM (limite de quantificação do método), que consiste na inclusão do valor do volume final do extrato e o volume total da amostra nos valores de LD e LQ que foram calculados em massa absoluta.

Tabela 7-18: Resultados dos limites de Detecção e Quantificação.

Compostos	LD (µg)	LQ (µg)	LDM ($\mu g.L^{-1}$)	LQM ($\mu g.L^{-1}$)
Naftaleno	8	22	0,076	0,224
Acenaftileno	1	4	0,013	0,040
Acenafteno	2	5	0,017	0,053
Fluoreno	3	10	0,033	0,101
Fenantreno	4	12	0,041	0,124
Antraceno	6	19	0,062	0,189
Fluoranteno	4	11	0,037	0,112
Pireno	4	12	0,040	0,122
Benzoa[a]antraceno	3	9	0,028	0,085
Criseno	2	6	0,019	0,059
Benzo[b]fluoranteno	3	10	0,032	0,096
Benzo[k]fluoranteno	3	9	0,029	0,088
Benzo[a]pireno	4	13	0,042	0,126
Indeno[123-cd]pireno	28	85	0,282	0,854
Dibenzo[a,h]antraceno	51	156	0,514	1,558
Benzo[g,h,i]perileno	22	66	0,216	0,656

A partir dos resultados obtidos de LDM e LQM é possível observar que a metodologia consegue realizar leituras inferiores aos limites de investigação estipulados pelo CONAMA 420 que são apresentados na tabela 7-19, com exceção dos analitos Indeno[123-cd]pireno e Dibenzo[a.h]antraceno que apresentaram valores de Limites de Quantificação superiores. [43]

Tabela 7-19: Comparação dos Limites de Quantificação com o Conama 420.

Compostos	LQM (µg.L^{-1})	Limites Conama 420 (µg.L^{-1})
Naftaleno	0,224	140,00
Acenaftileno	0,040	
Acenafteno	0,053	
Fluoreno	0,101	
Fenantreno	0,124	140,00
Antraceno	0,189	
Fluoranteno	0,112	
Pireno	0,122	
Benzo[a]antraceno	0,085	1,75
Criseno	0,059	
Benzo[b]fluoranteno	0,096	
Benzo[k]fluoranteno	0,088	
Benzo[a]pireno	0,126	0,70
Indeno[123-cd]pireno	0,854	0,17
Dibenzo[a,h]antraceno	1,558	0,18
Benzo[g,h,i]perileno	0,656	

7.5 **Precisão e Exatidão**

Para realizar o estudo de precisão e a exatidão foram realizadas diversas leituras de amostras contaminadas com o menor concentrações da curva de calibração (10 µg.L^{-1}), obtendo os seguintes resultados apresentados na **Tabela 7-20**.

Tabela 7-20: Resultados dos Cálculos de Precisão e Exatidão e suas Avaliações.

Compostos	Precisão (%)	Exatidão (%)	Avaliação	
Naftaleno	4	2	preciso	exato
Acenaftileno	5	1	preciso	exato
Acenafteno	4	3	preciso	exato
Fluoreno	8	4	preciso	exato
Fenantreno	8	12	preciso	exato
Antraceno	12	11	preciso	exato
Fluoranteno	8	8	preciso	exato
Pireno	9	8	preciso	exato
Benzo[a]antraceno	6	14	preciso	exato
Criseno	4	3	preciso	exato
Benzo[b]fluoranteno	7	15	preciso	exato
Benzo[k]fluoranteno	8	3	preciso	exato
Benzo[a]pireno	10	7	preciso	exato
Indeno[123-cd]pireno	13	98	preciso	inexato
Dibenzo[a,h]antraceno	25	65	impreciso	inexato
Benzo[g,h,i]perileno	12	88	preciso	inexato

A critério de avaliação da validação da técnica de DLLME considera-se que a maioria dos analitos foram precisos e exatos, no entanto, Indeno[123-cd]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[g,h,i]perileno apresentaram valores acima do critério de aceitação recomendado pelo INMETRO, desta maneira o método é impreciso e inexato para estes analitos.

7.6 Resultados em Amostras Reais

Todas as extrações foram realizadas por um laboratório ambiental terceirizado, seguindo o método de DLLME validado no presente trabalho. A

Tabela 7-21 apresenta os resultados naftaleno, fluoreno e fenantreno, os demais compostos ficaram abaixo dos limites de quantificação para os dois métodos.

Tabela 7-21: Resultados das amostras de água subterrânea.

	Amostra 1	**Amostra 2**	**Amostra 3**	**Amostra 4**
Compostos	Resultado ($\mu g.L^{-1}$)	Resultado ($\mu g.L^{-1}$)	Resultado ($\mu g.L^{-1}$)	Resultado ($\mu g.L^{-1}$)
Naftaleno	7,770	2,37	21,400	35,230
Acenaftileno	< 0,040	< 0,040	< 0,040	< 0,040
Acenafteno	< 0,053	< 0,053	< 0,053	< 0,053
Fluoreno	< 0,101	< 0,101	< 0,101	< 0,101
Fenantreno	2,170	0,620	2,050	1,180
Antraceno	< 0,189	< 0,189	< 0,189	< 0,189
Fluoranteno	2,760	0,460	2,490	1,190
Pireno	< 0,122	< 0,122	< 0,122	< 0,122
Benzo[a]antraceno	< 0,085	< 0,085	< 0,085	< 0,085
Criseno	< 0,059	< 0,059	< 0,059	< 0,059
Benzo[b]fluoranteno	< 0,096	< 0,096	< 0,096	< 0,096
Benzo[k]fluoranteno	< 0,088	< 0,088	< 0,088	< 0,088
Benzo[a]pireno	< 0,126	< 0,126	< 0,126	< 0,126
Indeno[123-cd]pireno	< 0,854	< 0,854	< 0,854	< 0,854
Dibenzo[a,h]antraceno	< 1,558	< 1,558	< 1,558	< 1,558
Benzo[g,h,i]perileno	< 0,656	< 0,656	< 0,656	< 0,656

Ao avaliar os resultados com os valores orientadores descritos na legislação CONAMA 420, foi possível identificar que nenhum dos compostos avaliados ultrapassou os limites estabelecidos, o que demonstra que as áreas avaliadas estão em conformidade com os parâmetros analisados.

8 Conclusão

A técnica de DLLME apresentou algumas limitações quanto a analise da varredura dos compostos orgânicos semi-voláteis estipulado pela EPA, posto que existem diversas classes químicas que apresentam diferentes coeficientes de distribuição.

Desta maneira, pode-se concluir que cada classe química apresenta seu solvente dispersor e extrator próprio, assim como a quantidade de solvente utilizado.

Em relação ao processo de validação dos HPA, pode-se observar que foram atingidos limites de detecção e quantificação entre 0,04 μgL^{-1} a 1,58 μgL^{-1} que atendem à legislação CONAMA 420, com exceção aos compostos indeno[123-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]perileno que apresentaram uma grande imprecisão, devido a presença de sítios ativos no sistema do cromatografo a gas que mesmo realizando todas as manutenções e instruções passada pelo fabricante e pela EPA, não foi possível remove-los.

No que diz respeito ao naftaleno, seu limite também foi superior aos demais compostos, pois o isooctano apresenta uma contaminação natural de naftaleno, que nos testes preliminares não foi possível identificar, a qualidade do reagente utilizado foi colocada em questão devido à falta de um reagente de melhor qualidade no mercado.

Vale ressaltar que a economia de tempo apresentada nesta técnica foi relevante, oportunidade em que considera-se ser possível aumentar em 5 vezes a quantidade de amostras extraídas, em comparação ao mesmo tempo que são extraídas pela técnica de líquido-líquido.

Sendo uma técnica extremamente rápida e econômica, ainda existe dificuldades em coletar a gota do extrato final. Desta forma a automação da técnica de DLLME deve ser o próximo passo para uma maior divulgação dessa técnica.

Após a avaliação dos resultados obtidos e a comparação com a legislação vigente, concluí-se que os postos de gasolina amostrados estão atendendo os requisitos e padrões de qualidade ambiental

Através dos resultados apresentados no presente trabalho pode-se observar que a técnica de DLLME tem um grande potencial para se tornar uma das peças fundamentais na redução da quantidade de solvente utilizado nos laboratórios, cumprindo os preceitos da química verde.

9 Referências Bibliográficas

[1] TRIPATHI, A.K.; PANDEY, S.N.. Water Pollution. **APH Publishing**, cap. 1 p.4, 2009.

[2] HIRATA, R.; ZOBBI, J.; OLIVEIRA, F. Águas subterrâneas: reserva estratégica ou emergencial. In: Bicudo, C.; Tundisi, J; Scheuenstuhl, M. (Org.). ***Águas do Brasil: análises estratégicas*.** 1. ed. São Paulo: Instituto de Botânica, v.1, p. 144-164, 2010.

[3] RODRIGUES,G., HENRIQUE, L., HESPANHOL, M.C., Alternativas Verdes Para O Preparo De Amostra E Determinação De Poluentes Fenólicos Em Água, **Quim. Nova**. v. 33, n.6, p. 1370 – 1378, 2010

[4] **Brasil. Lei 6938 de 31 de agosto de 1981; Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências**; Diário oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, v.160 n 93, 2 nov, Artigos 2 e 7, 1981.

[5] GUO, X.; MITRA, S. On-Line Membrane Extraction Liquid Chromatography For Monitoring Semi-Volatile Organics In Aqueous Matrices. **Journal Of Chromatography A**, Usa, n. 904 , p.189-196, 08 set. 2000.

[6] LIEN, G.; CHEN, C; WU, C. Analysis Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Or Electrospray Ionization With Tropylium Post-Column Derivatization. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, Taiwan, n. 21, p.3694-3700, 13 set. 2007.

[7] CASTILLO, M.; PUIG, D.; BARCELÓ, D.. Determination Of Priority Phenolic Compounds In Water And Industrial Effluents By Polymeric Liquid-Solid Extraction Cartridges Using Automated Sample Preparation With Extraction Columns And Liquid Chromatography Use Of Liquid-Solid Extraction Cartridges For Stabilization Of Phenols. **Journal Of Chromatography A**, Barcelona., n. 778 , p.301-311, 1997

[8] GALCERAN, M. T.; JÁUREGUI, O. Determination Of Phenols In Seawater By Liquid Chromatography With Electrochemical Detection After Enrichment By Using Solid-Phase Extraction Cartridges And Disks. **Analytica Chimica Acta**, Barcelona, n. 304, p.75-84, 1995.

[9] Official Journal Of The European Communities, **Directive: 80/778/EEC**. Ue, , p.11-29, 15 jul. 1980. Anais Eletrônicos, < http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1980L0778:19950101:EN:PDF>. Acesso em : 04 jun. 2011

[10] CASTILLO, M.; BARCELÓ, D.. Characterisation Of Organic Pollutants In Textile Wastewaters And Landfill Leachate By Using Toxicity-Based Fractionation Methods Followed By Liquid And Gas Chromatography Coupled To Mass Spectrometric Detection. **Analytica Chimica Acta**, Barcelona, n. 426 , p.253-264, 12 jan. 2001

[11] PEÑALVER, A. et al. Determination Of Phthalate Esters In Water Samples By Solid-Phasemicroextraction And Gas Chromatography With Mass Spectrometric Detection. **Journal Of Chromatography A**, Tarragona, Spain, n. 872, p.191-201, 2000.

[12] PÉREZ-RUIZ, T.; MARTÍNEZ-LOZANO, C.; TOMÁS, V.; MARTÍN, J.; High –Performance Liquid Chromatographic Assay Of Phosphate And Organophosphorus Pesticides Using A Post–Column Photochemical Reaction And Fluorimetric Detection. ***Anal. Chim. Acta,*** v.540, p.383-391, 2005.

[13] REZAEE,M.; YAMINI,Y; FARAJI,M; Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Iran, v. 1116, p. 1 – 9, 2006

[14] RIBANI, M. et al. Validação Em Métodos Cromatográficos E Eletroforéticos. **Quimica Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p.771-778, 07 jun. 2004

[15] LANÇAS, F. M. The Hole Of The Separation Sciences In The 21 thcentury. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 183-197, 2003.

[16] MOLDOVEANU, S.C., DAVID, V.; **Sample Preparation in Chromatography**, 1 ed, Journal of Chromatography Library, Elsevier, 2002

[17] ALVES, A.C.H. **DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUAS POR MICROEXTRACÇÃO EM FASE LÍQUIDA ASSOCIADA Á CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA**, Dissertação – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2010.

[18] FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 79f. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, SP, 2004.

[19] LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE**) / Fernando M. Lanças – São Carlos: RiMa, 96 p, 2004.

[20] SARAFRAZ-YAZDI, A., AMIRI, A.**. TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.29(1), p.1–14. 2009

[21] MARTINS, M. L., PRIMEL, E. G., CALDAS, S. S., PRESTES, O. D., ADAIME, M. B., & ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): Fundamentos E Aplicações. **Scientia Chromatographica**, v.4(1), p.29–45, 2012.

[22] PEDERSEN-BJERGAARD,S.; RASMUSSEN, K. Liquid-Phase Microextraction With Porous Hollow Fibers, A Miniaturized And Highly Flexible Format For Liquid-Liquid Extraction. **Journal of chromatography. A,** Norway, v. 1184, p. 132-142, 2008

[23] SCOKT,R. P.W.; **GAS CHROMATOGRAPHY**, 1 ed, LIBRARY4SCIENCE, 2003.

[24] LOUGH, W. J.; WAINER, I W. **High performance liquid chromatography:** fundamental principles and practice. London: Blackie, 275p, 1996.

[25] NIESSEN, W. M. A.; GREEF, J. VAN DER. **Liquid chromatography: mass spectrometry**. New York: Marcel Dekker, 479p, 1992.

[26] SKOOG, D. A. HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental.** 8 ed**.,** Cengage Learning,, 2005.

[27] LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Acta, 240p. 1993.

[28] HEBERT,C.G., JOHNSTONE, R.A.W.; **Mass Spectrometry Basic**, 1 ed.;CRS PRESS, 2002

[29] GROB, R.L.; BARRY, E.F.; **Modern Practice Ofgas Chromatography**, 4 ed.,EUA, Wiley, 2004

[30] BUSTILLOS,O, SASSINE, A, MARCH, R. **A Espectrometria De Massa Quadrupolar**, Scortecci, São Paulo, Brasil, 2001

[31] Focus for Analytical Chemistry in Europe, EURACHEM, **Anais eletrônicos**, Disponível em: <http://www.eurachem.org/index.php/euintro>. Acesso em: 04 jun. 2011.

[32] Internatonal Organization for Standardization. ISO, **Anais Eletrônicos** Disponível em: <http://www.iso.org/iso/about.htm>. Acesso em: 04 jun. 2011.

[33] World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde, WHO/OMS. **Anais Eletrônicos** Disponível em: <http://www.who.int/about/en/>. Acesso em: 04 jun. 2011.

[34] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Anais Eletrônicos**, Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>. Acesso em: 04 jun. 2011.

[35] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. INMETRO, **Anais Eletrônicos**, Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/index.asp>. Acesso em: 04 jun. 2011

[36] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, Brasil, Disponivel em:< http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 03 jun. 2011.

[37] Focus for Analytical Chemistry in Europe, EURACHEN, **CITAC / EURACHEM GUIDE: Guide to Quality in Analytical Chemistry.** Inglaterra, (Citac/Eurachem Guide), 2002.

[38] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos:** DOQ-CGCRE-008. Rev. 02. Junho/2007. Rio de Janeiro: INMETRO, 24p, 2010.

[39] US Environmental Protection Agency, **DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS**, Method 8000C, revisão 3, Março, 2003, Washington, EUA, EPA, 2011

[40] VOGEL, A. I. et al. **Análise Química Quantitatia.** 5. ed. Londres: Ltc - Livros Técnicos e Científicos Editora S.a., 107 p. 1992.

[41] Associação Brasileira de Normas Tecnicas. **Amostragem de água subterrânea em poços demonitoramento — Métodos de purga**. Rio de Janeiro : ABNT, (NBR 15847), 2010.

[42] ARRUDA, F.R. **Determinação De Benzidina Nos Rios Que Recebem A Carga De Efluentes Das Industrias Têxteis Da Cidade De São Carlos**, Dissertação - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS, São Carlos-SP, 2008.

[43] Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.**. Brasilia, Brasil. (Conama 420), 2009.