

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

**Desenvolvimento de Metodologia Analítica para Análise de
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) em amostras de água
utilizando uma interface SPME/LC/DAD**

Fernanda Cristine Spoljaric Ferreira

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências – Área de Concentração:
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos
2006

Ao meu filho Felipe, por me ensinar que não é necessário ser perfeito para ser
amado.

Ao meu marido Frederico, por aprendermos juntos que o melhor da vida está
dentro dos nossos corações.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos por serem o que são e fazerem parte da
minha vida.

Agradecimentos

Ao Professor Fernando Mauro Lanças, pela orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho..

À Cristina A. Diagone, por ter confiado na minha capacidade profissional e por ser, durante todos estes anos, uma amiga generosa e leal.

À Sílvia de Souza Freitas e à Claudete Alves, pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas, amigos e funcionários do grupo de Cromatografia.

Ao Dr. José Carlos Rodriguez, pela interface.

Aos funcionários da biblioteca do IQSC, pela atenção dispensada durante todos estes anos.

Aos funcionários do Serviço de Pós Graduação do IQSC, pela presteza e boa vontade.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química de São Carlos pelo apoio institucional.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	v
Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	1
1.1 Micro Extração em Fase Sólida	1
1.1 Parâmetros de Extração	5
1.1.1 Fase Estacionária	6
1.1.2 Tempo de extração	7
1.1.3 Temperatura de extração	8
1.1.4 Efeito do pH e da força iônica em SPME	8
1.1.5 Agitação da amostra	9
1.1.6 Mecanismos de Extração	9
1.1.7 Acoplamento SPME-HPLC	11
1.1.8 Aplicações da técnica	13
1.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (PAHs)	15
1.3 Validação do Método Analítico	18
1.3.1 Seletividade	19
1.3.2 Linearidade e faixa de aplicação	19
1.3.3 Precisão	21
1.3.4 Exatidão	22
1.3.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)	23
2. Objetivos	24
3. Parte Experimental	25
3.1 Equipamentos/Materiais	25
3.2 Reagentes	26
3.3 Padrões	26
3.4 Condições cromatográficas	26
3.5 Procedimento analítico para o desenvolvimento e otimização das condições de extração por SPME (modo de dessorção “off line”)	27

3.5.1	Preparo das soluções	27
3.5.2	Procedimento para a dessorção “off line”	29
3.6	Procedimento para a validação do método analítico utilizando a interface SPME-LC	30
3.6.1	Avaliação do desempenho da interface SPME-LC	30
3.6.1.1	Procedimento para a dessorção “on line”	31
3.6.2	Linearidade da amostra	32
3.6.3	Linearidade do padrão	34
3.6.4	Exatidão e Precisão	35
4.	Resultados e Discussão	37
4.1	Otimização dos parâmetros de extração	37
4.1.1	Tempo de extração	37
4.1.2	Solvente de extração	52
4.1.3	Temperatura de extração	53
4.1.4	Força iônica do meio	62
4.1.5	Dados da recuperação obtida nas condições otimizadas de extração	69
4.1.6	Teste da interface com as fibras PA e CW/TRP	75
4.2	Validação do método analítico utilizando a fibra CW/TRP e a interface SPME-LC	76
4.2.1	Linearidade da amostra	76
4.2.2	Linearidade do padrão	78
4.2.3	Exatidão e Precisão	80
5.	Conclusões	84
6.	Referências	86

Lista de Figuras

Figura 1.1	Dispositivo para SPME comercializado pela Supelco.	2
Figura 1.2	Modos de extração com SPME; extração direta (a) e <i>headspace</i> (b) .	4
Figura 1.3	Estrutura e nome dos 16 PAHs considerados como poluentes prioritários pelo EPA.	16
Figura 3.1	Interface SPME-LC.	31
Figura 4.1	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Temperatura: 25 °C.	39
Figura 4.2	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra:PA. Temperatura: 25 °C.	40
Figura 4.3	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Temperatura: 25 °C.	42
Figura 4.4	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Temperatura: 25 °C.	43
Figura 4.5	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TPR. Temperatura: 25 °C.	44
Figura 4.6	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: CW/TPR. Temperatura: 25 °C.	45
Figura 4.7	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: C18 "lab	

	made". Temperatura: 25 °C.	47
Figura 4.8	Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: C18 "lab made". Temperatura: 25 °C.	47
Figura 4.9	Área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS/DVB. Temperatura: 25 °C.	50
Figura 4.10	Área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS/DVB. Temperatura: 25 °C.	50
Figura 4.11	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.	55
Figura 4.12	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.	55
Figura 4.13	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos.	57
Figura 4.14	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos.	58
Figura 4.15	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos.	59
Figura 4.16	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos.	60
Figura 4.17	Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno,	

- criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: C18 “lab made”. Tempo de extração: 40 minutos. 62
- Figura 4.18 Variação da área versus força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C. 64
- Figura 4.19 Variação da área versus força iônica do meio de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C. 64
- Figura 4.20 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C. 65
- Figura 4.21 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C. 66
- Figura 4.22 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C. 67
- Figura 4.23 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C. 67
- Figura 4.24 Curva da concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) versus a concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) para os compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. 77
- Figura 4.25 Gráfico ilustrando a variação da área versus a concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para os compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Fibras de SPME comercialmente disponíveis e suas 6

	características.	
Tabela 3.1	Preparo da solução padrão estoque.	27
Tabela 3.2	Preparo da solução padrão de trabalho 1,0 µg/mL.	28
Tabela 3.3	Preparo do padrão de calibração 4,0 µg/mL.	28
Tabela 3.4	Valores de concentração em µg/fibra.	29
Tabela 3.5	Parâmetros de otimização da extração.	29
Tabela 3.6	Preparo do padrão de calibração 20,0 µg/mL.	30
Tabela 3.7	Valores de concentração em µg/fibra.	32
Tabela 3.8	Preparo da solução padrão de trabalho 10,0 µg/mL.	32
Tabela 3.9	Preparo das soluções padrão de trabalho para linearidade da amostra.	33
Tabela 3.10	Valores de concentração em µg/fibra.	33
Tabela 3.11	Preparo da solução padrão de trabalho 50,0 µg/mL.	34
Tabela 3.12	Preparo das soluções padrão de trabalho para linearidade do padrão.	34
Tabela 3.13	Valores de concentração em µg/fibra para exatidão e precisão.	36
Tabela 4.1	Otimização do tempo de extração para a fibra de poliacrilato (PA). Temperatura: 25 °C.	38
Tabela 4.2	Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: (PA).	38
Tabela 4.3	Otimização do tempo de extração para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Temperatura: 25 °C.	42
Tabela 4.4	Otimização do tempo de extração para a fibra carbowax/templeted resin (CW/TRP). Temperatura: 25 °C.	44
Tabela 4.5	Otimização do tempo de extração para a fibra C18 "lab made". Temperatura: 25 °C.	46
Tabela 4.6	Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: C18 "lab made".	46
Tabela 4.7	Otimização do tempo de extração para a fibra de	

	polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Temperatura: 25 °C.	49
Tabela 4.8	Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: PDMS/DVB.	49
Tabela 4.9	Valores de área e desvio padrão relativo obtidos na limpeza da fibra de PDMS/DVB. Tempo de dessorção: 20 minutos.	51
Tabela 4.10	Valores de área e desvio padrão relativo obtidos na otimização do solvente de dessorção para a fibra de PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura: 25 °C.	52
Tabela 4.11	Otimização da temperatura de extração para a fibra de poliacrilato (PA). Tempo de extração: 30 minutos.	54
Tabela 4.12	Desvio padrão relativo relacionado à temperatura de extração. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.	54
Tabela 4.13	Otimização da temperatura de extração para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Tempo de extração: 20 minutos.	57
Tabela 4.14	Otimização da temperatura de extração para a fibra de carbowax/templeted resin (CW/TRP). Tempo de extração: 40 minutos.	59
Tabela 4.15	Otimização da temperatura de extração para a fibra C18 "lab made". Tempo de extração: 40 minutos.	61
Tabela 4.16	Desvio padrão relativo relacionado temperatura de extração. Fibra: C18 "lab made". Tempo de extração: 40 minutos.	61
Tabela 4.17	Otimização da força iônica do meio para a fibra de poliacrilato (PA). Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.	63
Tabela 4.18	Desvio padrão relativo relacionado a força iônica do meio. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.	63
Tabela 4.19	Otimização da força iônica do meio para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.	65

Tabela 4.20	Otimização da força iônica do meio para a fibra carbowax/templeted resin (CW/TRP). Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.	66
Tabela 4.21	Recuperação obtida com a fibra de poliacrilato (PA) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.	70
Tabela 4.22	Recuperação obtida com uma fibra nova de poliacrilato (PA) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.	71
Tabela 4.23	Recuperação obtida com a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.	71
Tabela 4.24	Recuperação obtida com a fibra carbowax/templeted resin (CW/TRP) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.	72
Tabela 4.25	Recuperação obtida com a fibra C18 “lab made” nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.	72
Tabela 4.26	Recuperação obtida com a fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.	73
Tabela 4.27	Recuperação obtida na etapa de limpeza da fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Tempo de dessorção: 20 minutos.	73
Tabela 4.28	Comparação entre as recuperações obtidas pelas fibras de SPME nas condições otimizadas.	74
Tabela 4.29	Dados de recuperação e desvio padrão relativo obtido com a interface SPME/LC utilizando a fibra de PA.	75
Tabela 4.30	Dados de recuperação e desvio padrão relativo obtido com a interface SPME/LC utilizando a fibra CW/TRP.	76
Tabela	Dados de concentração teórica (µg/fibra) versus	

4.31	concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$).	77
Tabela 4.32	Equação da reta e coeficiente de correlação (R) dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno obtidos no parâmetro linearidade da amostra.	78
Tabela 4.33	Dados de área versus concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$).	79
Tabela 4.34	Equação da reta e coeficiente de correlação (R) dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno obtidos no parâmetro linearidade do padrão.	80
Tabela 4.35	Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,0250 $\mu\text{g}/\text{fibra}$.	81
Tabela 4.36	Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,100 $\mu\text{g}/\text{fibra}$ (Precisão Dia 1)	82
Tabela 4.37	Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,100 $\mu\text{g}/\text{fibra}$ (Precisão Dia 2)	82
Tabela 4.38	Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,500 $\mu\text{g}/\text{fibra}$.	82
Tabela 4.39	Razão das médias do parâmetro precisão (Dia 1/Dia 2)	83

Resumo

Este trabalho descreve a otimização e validação de um método analítico para a análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) em água usando uma interface SPME/LC/DAD. Parâmetros como tipos de fibra, tempo de extração, temperatura e força iônica foram estudados no modo "off line" e a influência destes na eficiência de extração foi avaliada. Os melhores resultados foram obtidos com a fibra Carbowax/templated resin. Uma interface "lab made" foi utilizada para a etapa de validação e as curvas de calibração mostraram boa linearidade ($r > 0,99$) para a maioria dos compostos analisados, tanto na linearidade da amostra como na linearidade do padrão. Os dados de precisão obtidos na concentração de trabalho variaram de 1 a 3%, aproximadamente, e os valores de recuperação se mantiveram na faixa de 4 a 27%. Os PAHs foram determinados na faixa de 0,025 μg até 0,5 μg . Pode-se considerar os valores obtidos nos itens de precisão e linearidade satisfatórios para a análise dos PAHs, considerando-se os critérios internacionais estabelecidos para esta classe de compostos, mas o método não atende as especificações relacionadas a recuperação e faixa de concentração.

Abstract

This work describes the optimization and validation of an analytical method to determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in water using a SPME/LC/DAD interface. Parameters as fibers kind, sampling time, temperature and ionic strength were studied and their influence on the extraction efficiency were evaluated. The best results were obtained with the Carbowax/templated resin fiber. A "lab made" interface was used to validate the method and the calibration curves showed good linearity ($r > 0,99$) to almost all the compounds analyzed, considering both the sample linearity and the standard linearity. The data obtained for precision showed a variation from 1 to 3 % and the recovery values were bellow 27%. The PAHs analysis was performed for concentrations from 0,025 $\mu\text{g}/\text{fiber}$ to 0,5 $\mu\text{g}/\text{fiber}$. The method does not show good recoveries values but the data obtained for precision and linearity can be considered satisfactory according to international criteria established for theses compounds.

1. Introdução

1.1 Micro Extração em Fase Sólida

A Micro-Extração em Fase Sólida (SPME) começou a ser desenvolvida na década de 90, pelo pesquisador Janus Pawliszyn e colaboradores.¹ É uma técnica de pré-concentração baseada na partição do analito entre uma solução e a fase de recobrimento da fibra de extração. Basicamente, utiliza-se uma fibra de sílica fundida coberta com um polímero ou sólido adsorvente, que é exposta à amostra: os analitos serão absorvidos e/ou adsorvidos pela fibra, de acordo com o seu coeficiente de partição (K) entre a fase de recobrimento da fibra e a amostra.

A SPME foi desenvolvida inicialmente para a análise de compostos voláteis mas, atualmente, tem sido estendida para a análise de uma grande variedade de matrizes líquidas, sólidas e gasosas e para diversos analitos, de voláteis a não voláteis.^{1,2}

A SPME é uma técnica simples do ponto de vista instrumental, e o rápido desenvolvimento desta técnica resultou na fabricação de um dispositivo comercializado pela Supelco® (Figura 1.1).²

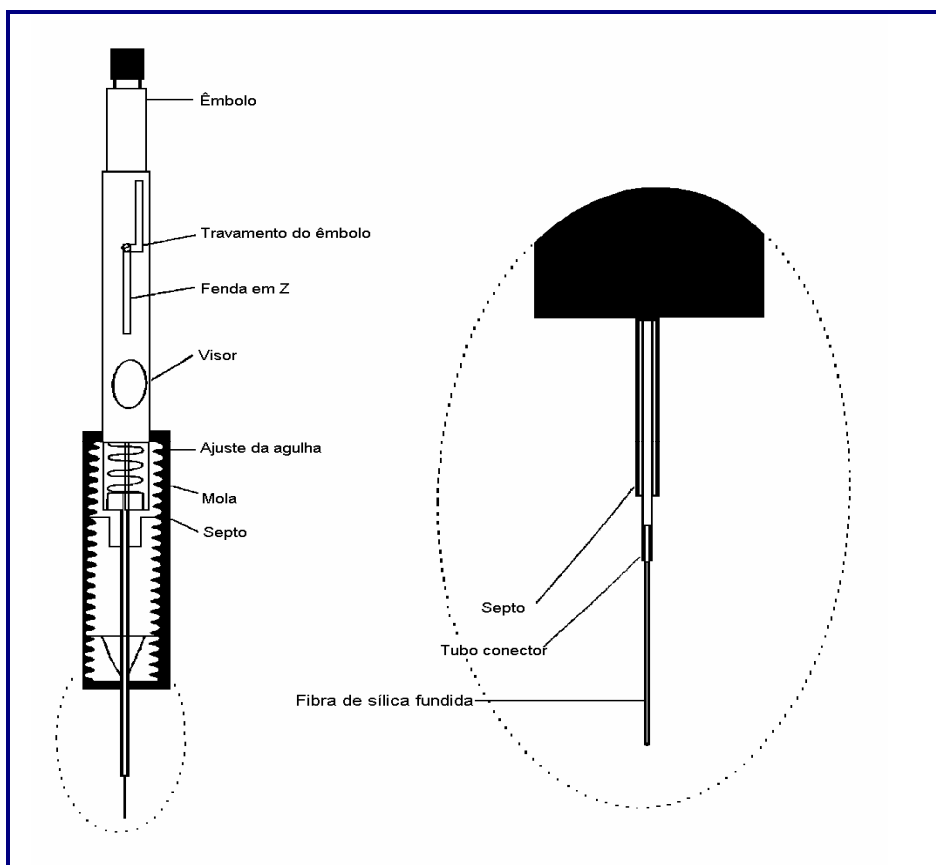


Figura 1.1. Dispositivo para SPME comercializado pela Supelco.²

A SPME baseia-se na sorção dos analitos em uma fibra de sílica fundida, revestida com um sorbente (usualmente referido como fase estacionária). A fibra é introduzida diretamente na amostra, ou no headspace, extraíndo e concentrando o analito de interesse. Posteriormente é transferida para o instrumento analítico, onde a dessorção, separação e quantificação dos analitos ocorrem.² Quando a técnica analítica utilizada é a cromatografia gasosa, a etapa de dessorção ocorre no injetor do equipamento, e quando se utiliza a cromatografia líquida a dessorção pode ser no modo “off line” ou no modo “on line”. No modo “off line” a dessorção é realizada em frascos contendo volumes conhecidos do solvente extrator e no modo “on line” utiliza-se uma

interface contendo uma cela de dessorção, de volume conhecido, possibilitando a injeção direta.

O processo de extração envolve a partição dos analitos entre a matriz e a fase estacionária. No equilíbrio, a quantidade extraída é proporcional ao coeficiente de partição e a concentração do analito na amostra. O coeficiente de partição é determinado pela interação entre o analito/matriz e o analito/fase estacionária. A extração é considerada completa quando a concentração do analito atinge o equilíbrio de distribuição entre a fase estacionária e a matriz. Isto significa que não ocorre uma extração exaustiva. A condição de equilíbrio para um sistema de duas fases (aquosa e sólida) pode ser descrita pela seguinte equação: ³

$$N = \frac{K.V_s.V_{aq}C^0_{aq}}{K.V_s + V_{aq}} \quad (1)$$

onde N é a quantidade extraída pela fase estacionária, V_{aq} e V_s são os volumes da amostra e da fase estacionária, respectivamente; K é o coeficiente de partição entre as duas fases, e C^0_{aq} é a concentração dos analitos na amostra. A equação mostra que a quantidade extraída do analito depende do volume da fase estacionária e do coeficiente de partição. Existe uma relação linear entre a quantidade extraída e a concentração inicial dos analitos na fase aquosa. A extração exaustiva do analito pode ser obtida para quantidades pequenas de amostra, quando o coeficiente de partição é muito alto. ⁴

Em SPME podem ser utilizados dois modos de extração: a extração direta e a extração que utiliza a técnica de headspace (HS-SPME). Na extração direta a fibra é inserida diretamente na amostra. No modo headspace os analitos são volatilizados antes da sorção na fase estacionária: os analitos mais voláteis são extraídos mais rapidamente que os semi-voláteis, uma vez que a concentração na fase gasosa é maior, o que contribui para uma transferência de massa mais rápida. Este modo de extração possui a vantagem de proteger a fibra de interferentes não voláteis presentes na amostra. A Figura 1.2 apresenta os modos de extração utilizados em SPME. ²

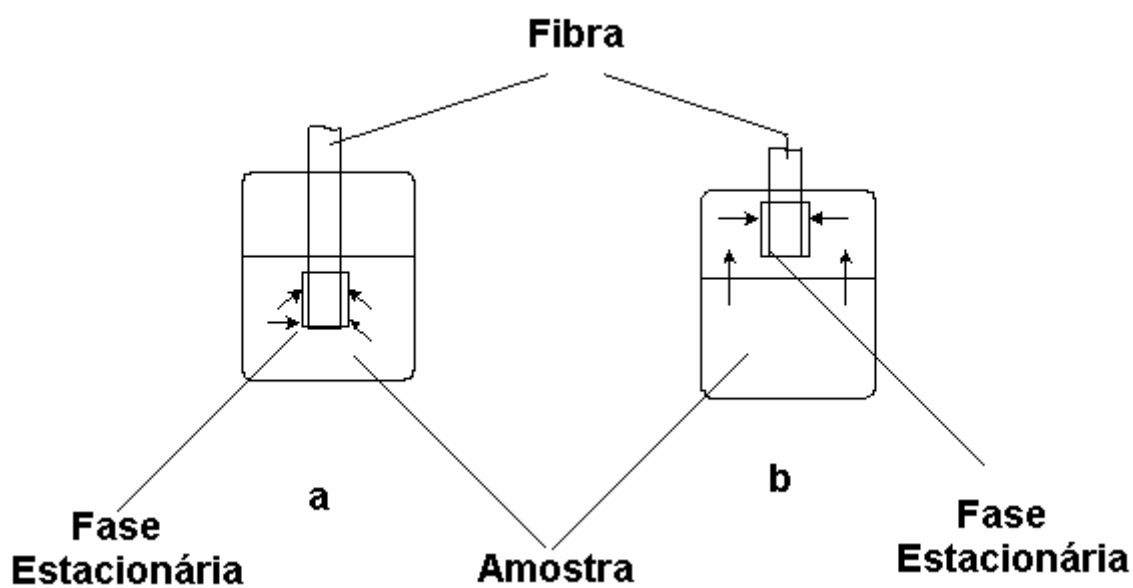


Figura 1.2. Modos de extração com SPME; extração direta (a) e *headspace* (b)

A Micro Extração em Fase Sólida é, frequentemente, considerada como uma outra forma da Extração em Fase Sólida (SPE) ou uma micro SPE. Mas existem diferenças significativas entre os métodos. A SPE é um método exaustivo de extração enquanto a SPME considera o equilíbrio de extração e a sorção seletiva dos analitos. Como um certo grau de seletividade é necessário em qualquer método de preparo de amostra, uma técnica de extração baseado no equilíbrio torna, em teoria, o processo mais simples e preciso, eliminando com mais facilidade possíveis interferentes.⁵

1.1 Parâmetros de Extração

A SPME baseia-se no equilíbrio entre o analito e a fase estacionária. A quantidade extraída do analito em uma amostra pode ser influenciada por diversos parâmetros como: o tipo de fase estacionária, temperatura, tempo de extração, força iônica da amostra, solvente orgânico, variação de pH e velocidade de agitação. É de fundamental importância a otimização destas variáveis para obter-se o máximo rendimento da técnica. A sorção dos analitos na fase estacionária depende das interações físicas e químicas entre o soluto e a fase estacionária.^{6,7}

1.1.1 Fase Estacionária

A SPME é uma técnica sensível, devido ao fator de concentração geralmente obtido pelas fibras, e seletiva devido aos diferentes materiais utilizados para revestir as mesmas. A eficiência do processo de extração depende da constante de partição, sendo este um parâmetro característico que descreve as propriedades das fases estacionárias e a seletividade para os analitos em relação aos outros componentes da amostra. O volume da fase estacionária determina a sensibilidade do método, enquanto sua espessura determina o tempo de extração. Assim, a eficiência da extração pode ser melhorada aumentando-se o volume da fase estacionária e, conseqüentemente a quantidade de analito extraída.⁷

As fibras de SPME comercialmente disponíveis consistem de um capilar de sílica fundida revestido com uma fase estacionária, geralmente um material polimérico. A Tabela 1.1 ilustra as características de algumas fibras para SPME comercialmente disponíveis. Fibras específicas para uma classe de compostos fornecem, como principal vantagem, uma maior seletividade de extração, minimizando a extração de interferentes.²

Tabela 1.1. Fibras de SPME comercialmente disponíveis e suas características.⁷

Fase estacionária	Espessura do filme (μm)	Uso recomendado	Polaridade
PDMS	100 ^a	GC/HPLC	apolar
	30 ^a	GC/HPLC	apolar
	7 ^b	GC/HPLC	apolar
PDMS/DVB	65 ^c	GC	polar
	60 ^c	HPLC	polar
PA	85 ^c	GC/HPLC	polar
CW/TPR	50 ^c	HPLC	polar

PDMS (polidimetilsiloxano); DVB (divinilbenzeno); PA (poliacrlato); CW (carbowax); TPR (resina de suporte SUPELCOGEL TPR-100)

a fase não ligada ao suporte de sílica

b fase ligada ao suporte de sílica

c fase parcialmente ligada ao suporte de sílica

1.1.2 Tempo de extração

A quantidade extraída de analito por SPME depende principalmente do coeficiente de partição do analito, da agitação da amostra e do tempo de extração. Por ser um processo de partição, a quantidade máxima extraída é obtida quando o equilíbrio for estabelecido entre o analito e a fase estacionária. O tempo de extração é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. Para compostos que possuem coeficiente de partição menor, o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio é longo. Neste caso, sugere-se que um tempo de extração menor do que o tempo de

equilíbrio deve ser selecionado. O tempo de exposição da fibra na amostra deve ser preciso para se obter dados reprodutíveis. ^{1,7}

1.1.3 Temperatura de extração

A influência da temperatura na partição do analito entre a fase estacionária e a amostra pode ser descrita em termos cinéticos e termodinâmicos. Teoricamente a quantidade extraída aumenta com a temperatura, devido a melhor transferência de massa; contudo, para um processo exotérmico o aumento de temperatura diminui o valor do coeficiente de partição entre a fibra/analito. Portanto, diminuindo-se a temperatura aumenta-se a quantidade de analito extraída. Existe assim um máximo de quantidade extraída que varia com a temperatura e com as características do sistema de extração (amostra/fibra). ⁷

1.1.4 Efeito do pH e da força iônica em SPME ^{7,8}

Uma das possibilidades para melhorar a extração de alguns analitos por SPME é a modificação da força iônica e do pH da amostra. O efeito da força iônica pode aumentar ou diminuir a quantidade extraída, dependendo do composto e da concentração do sal (NaCl). Em geral a força iônica reduz ou

aumenta a solubilidade do analito na matriz de acordo com a polaridade do mesmo.

O pH da amostra poderá influenciar o coeficiente de partição do analito quando se trata de compostos dissociáveis. Assumindo-se que somente a forma não dissociada do ácido ou da base pode ser extraída por SPME, valores de pH baixos aumentam a quantidade extraída de analitos ácidos e valores de pH altos aumentam a quantidade extraída de analitos básicos, observando-se os valores de pKa dos compostos. Para compostos de caráter ácido ou básico é imprescindível, portanto, o ajuste de pH da amostra para obter-se um melhor desempenho da extração.

1.1.5 Agitação da amostra

A agitação da amostra aumenta a difusão dos analitos na fibra (fase estacionária) e reduz o tempo de extração tanto para a extração direta quanto no headspace. Em HS-SPME, a agitação também facilita a transferência de massa entre o headspace e a amostra aquosa. Se a agitação da amostra fosse perfeita, todos os analitos presentes na matriz teriam acesso ao filme extrator e a extração seria rápida. Contudo, na prática, independente da velocidade de agitação, o fluido em contato com a superfície da fibra é estacionário, dificultando o acesso dos analitos à fibra e, conseqüentemente, afetando o tempo de extração.^{2,7}

1.1.6 Mecanismos de Extração

A difusão do analito da amostra para a fase estacionária inicia-se imediatamente após a exposição da fibra na amostra. O processo de extração pode ocorrer por dois mecanismos: absorção e/ou adsorção.⁹ Em ambos os casos o processo de extração se inicia pela adsorção do analito na superfície da fibra; se o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária for alto, ocorre a partição do analito entre as duas fases e a extração ocorre por absorção. Por outro lado, se o coeficiente de difusão for baixo, o analito permanece na superfície da fibra e a extração ocorre por adsorção.^{8,9}

A adsorção é um fenômeno em que as moléculas se ligam à superfície de um sólido. Essa ligação pode ser de dois tipos: adsorção física (fisiossorção), regida por interações de van der Waals ou adsorção química (quimiossorção), em que as moléculas se ligam à superfície por meio de ligações químicas, geralmente covalentes. Na adsorção existe um número limitado de sítios ativos na superfície, os quais limitam a quantidade de analito extraída devido a competição pelos sítios ativos.¹⁰

Quando ocorre a quimiossorção, a dessorção dos analitos é difícil e demorada, podendo até mesmo não ocorrer, inutilizando a fibra.

Os coeficientes de partição das moléculas orgânicas em PDMS são próximos aos observados para os solventes orgânicos; portanto, a extração dos analitos ocorre por absorção. Para a fibra de PA, os coeficientes de partição são menores, mas suficientemente elevados para que o mecanismo de extração predominante seja a absorção.

Entretanto, os coeficientes de partição das moléculas orgânicas em polímeros como o poli(vinilbenzeno) e o carboxen são baixos e essencialmente

todas as moléculas permanecem na superfície do filme, sendo que a extração ocorre por adsorção.

A absorção é um processo que está baseado na partição de um composto entre duas fases imiscíveis. O processo de partição é determinado pela permanência relativa do composto em cada fase, e no equilíbrio pode ser descrito pelo coeficiente de partição K :⁷

$$K = \frac{C^o}{C^a} \quad (2)$$

onde C_o é a concentração no equilíbrio do analito na fase orgânica (fase estacionária) e C_a é a concentração no equilíbrio do analito na fase aquosa. Quando a fase orgânica é um polímero líquido que recobre a fibra de SPME, o coeficiente de partição é, geralmente, expresso como K_{fw} .¹¹ A permanência de uma molécula em uma fase é determinada pelo potencial químico desta molécula na fase. Quando duas fases imiscíveis estão em contato, o composto de interesse é transferido entre as duas fases até estabelecer o equilíbrio, e os potenciais químicos do analito nas duas fases são iguais.^{7,8}

Em SPME, o coeficiente de partição é determinado pela atividade do analito na amostra aquosa, sendo que a presença de outras moléculas orgânicas em baixas concentrações na amostra não deve afetar a extração do analito de interesse. Exceções existem quando outros compostos orgânicos estão presentes na amostra em concentrações elevadas sendo considerados como co-solventes. A diferença fundamental entre adsorção e absorção é que em adsorção as moléculas ligam-se diretamente na superfície de um sólido, enquanto que na absorção ocorre a dissolução em um filme líquido.

1.1.7 Acoplamento SPME-HPLC

A maior parte das aplicações que utilizam SPME como técnica de extração foram realizadas em combinação com a cromatografia gasosa onde, depois da etapa de extração, os analitos são termicamente dessorvidos dentro do injetor do cromatógrafo. Entretanto a técnica SPME/GC é, geralmente, limitada à análise de compostos voláteis e termicamente estáveis. Um método típico para ultrapassar esta limitação é derivatizar os compostos de interesse (derivatização na amostra e/ou durante a extração).¹²

Mais recentemente, para aumentar a faixa de aplicação da técnica para compostos não voláteis e instáveis termicamente, a SPME tem sido acoplada a HPLC (High Performance Liquid Chromatography)¹³ e a CE (Capillary Electrophoresis)¹⁴.

A diferença entre a SPME-GC e a SPME-HPLC é a etapa de dessorção. Na análise por HPLC a dessorção é realizada em uma interface apropriada consistindo de um injetor de HPLC com uma cela de dessorção adaptada, instalada no lugar do loop da amostra. A dessorção é realizada colocando-se uma mistura de solventes apropriada na cela de dessorção (dessorção estática) ou passando-se a fase móvel através da cela de dessorção (dessorção dinâmica).¹⁵

Ao contrário da SPME-GC, a otimização das condições de dessorção é a etapa mais crítica em SPME-HPLC e, com o número limitado de fibras comercialmente disponíveis, é o fator determinante para o lento desenvolvimento da técnica. O número de aplicações de SPME-HPLC

relatados na literatura tem sido substancialmente menor que o número de aplicações SPME/GC, apesar do seu potencial. ¹²

Uma abordagem diferente para o acoplamento SPME-HPLC é a denominada SPME “in tube”, que usa um capilar aberto de sílica fundida como o dispositivo para extração no lugar da fibra de SPME convencional. ¹⁶

1.1.8 Aplicações da técnica

A SPME foi apresentada como uma técnica para determinar compostos voláteis em amostras ambientais, mas seu uso tem se estendido à análise de uma grande variedade de matrizes e compostos, embora a maior parte dos artigos publicados sobre a técnica tratem da sua aplicação na área ambiental e de alimentos. ^{17,18}

Ferrari et al ¹⁹ analisaram herbicidas do tipo s-triazinas e seus metabólitos em água utilizando uma fibra de PDMS para a extração. Foi obtida uma precisão média de 15% nos resultados obtidos e estes compostos foram determinados em um nível de concentração próximo de 0,1 µg/mL.

A SPME acoplada com HPLC foi aplicada com sucesso para determinar um grupo de aminas heterocíclicas em concentrações da ordem de ng/mL. Os vários parâmetros que afetam a absorção e dessorção foram otimizados para diferentes tipos de fibras.²⁰

Alpendurada e Gonçalves²¹ analisaram trinta e seis pesticidas incluídos em quatro grupos de pesticidas (organoclorados, organofosforados, piretróides e triazinas) em amostras de água, utilizando três tipos diferentes de fibras. Eles concluíram que o tipo de fibra exerce um papel essencial na seletividade da extração.

Barrio et al²² analisaram seis fungicidas organoclorados em vinho por SPME-HPLC. Eles estudaram e otimizaram todos os fatores passíveis de afetarem a exatidão e precisão do método. Os fungicidas foram detectados na faixa de 4 a 27 µg/L.

Um método SPME-HPLC foi desenvolvido para determinar micotoxinas em milho. As condições de extração e dessorção foram otimizadas e os limites de quantificação obtidos variaram de 7 a 29 ng/mL.²³

Sete pesticidas organofosforados (diazino, fenitrothion, fenitron, quinalfós, triazofós, fosalon e pirazofós) foram determinados em fruta e suco de fruta por SPME-GC. Os limites de detecção do método estão abaixo de 2µg/kg para todos os pesticidas. Os desvios padrão relativos não foram maiores do que 9%.²⁴

Pawliszyn et al²⁵ utilizaram SPME no modo convencional e no modo headspace para determinar as frações ligadas e livres de fenóis e

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água contaminada rica em matéria orgânica dissolvida.

Pizarro et al ²⁶ estudaram a presença de clorofenóis em vinho e avaliaram os efeitos de matriz na extração. Eles concluíram que a adição de padrão é a técnica adequada para a quantificação destes compostos.

SPME acoplada a HPLC foi aplicada para na análise de 12 compostos fenólicos considerados poluentes prioritários pela EPA (US Environmental Protection Agency). De acordo com o método, uma amostra pode ser analisada a cada 47 minutos. ²⁷

Chang et al ²⁸ aplicaram o acoplamento SPME-HPLC na análise de aminas aromáticas em água. De acordo com os resultados, o tipo da fibra e o procedimento de dessorção foram considerados os parâmetros mais importantes da extração.

Um número crescente de publicações tem sido dedicado a aplicação da SPME na área biomédica.²⁹ A SPME pode ser utilizada como uma técnica alternativa às técnicas tradicionais de preparo de amostra na análise de fármacos e metabólitos, mas a baixa recuperação da técnica aliada a interferentes encontrados em amostras biológicas são um fator limitante da técnica. Contudo, a sua sensibilidade a torna candidata como técnica de identificação na área toxicológica, clínica e bioquímica. ³⁰

1.2 Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (PAHs)

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (PAHs) são substâncias poluentes resultantes da emissão de uma grande variedade de fontes,

incluindo processos de combustão industrial, da queima da madeira, de combustíveis fósseis e de matéria orgânica em geral. Os PAHs estão presentes em amostras ambientais muito complexas, que contém muitas estruturas isoméricas.³¹

Os PAHs podem ser introduzidos nas águas dos rios, lagos e mares por diversas maneiras: através de águas de esgoto provenientes de indústrias, de materiais particulados transportados pelo vento e pela água das chuvas que arrastam estes compostos da terra para o meio aquático.³²

A água potável deve conter somente de 1-10 ng/L de cada PAH, sendo que o limite superior não deve ultrapassar 100 ng/L. Segundo o US EPA (Agência de Proteção do Meio Ambiente dos Estados Unidos), 16 PAHs são considerados como poluentes prioritários. A estrutura química e o nome destes compostos estão descritos na Figura 1.3.³³

A exposição ocupacional aos PAHs ocorre em várias indústrias envolvendo a produção de alumínio, ferro e aço. Nestas indústrias, os operários que trabalham nos fornos são expostos a estes compostos por inalação e através da pele.³⁴⁻³⁶

A exposição ocupacional aos PAHs tem sido associada com câncer em seres humanos. Vários PAHs com 5 anéis, incluindo o benzo(a)pireno, são classificados como compostos possivelmente carcinogênicos por agências internacionais de

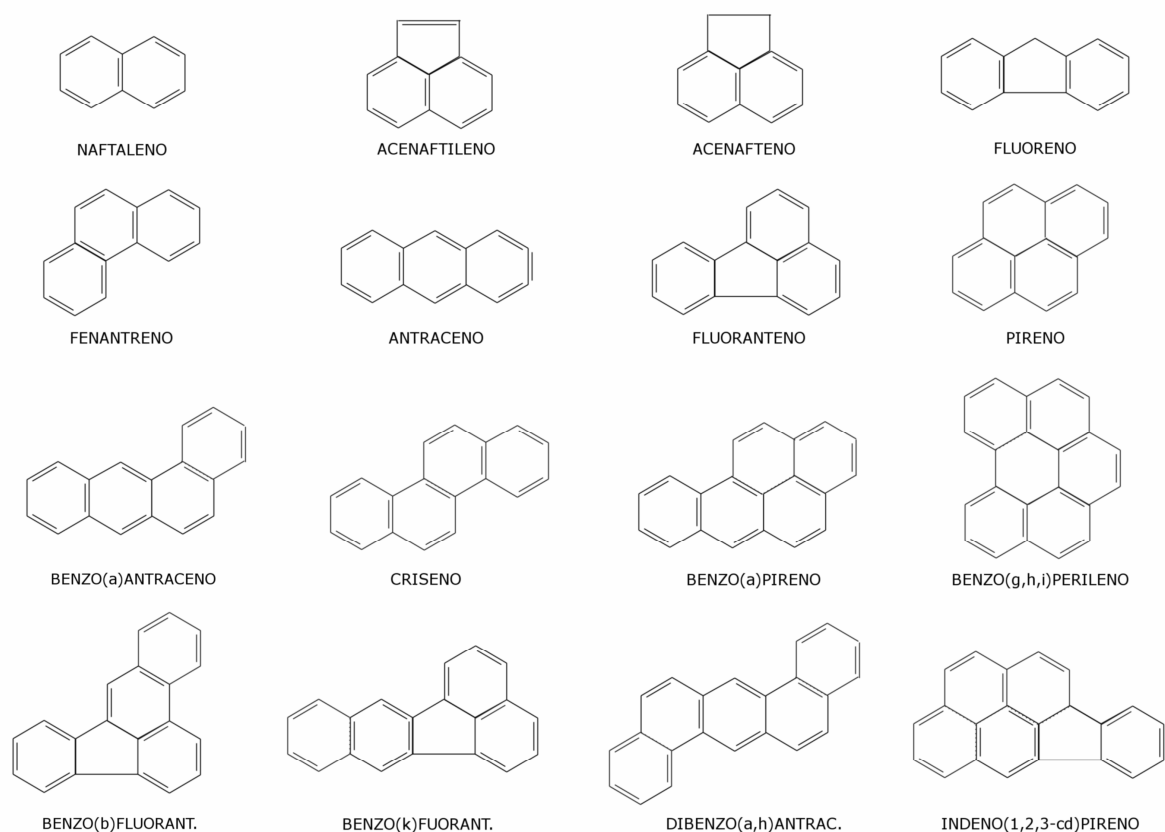


Figura 1.3. Estrutura e nome dos 16 PAHs considerados como poluentes prioritários pelo EPA.³³

pesquisa sobre o câncer.³⁷ Entretanto, os PAHs de 2 e 3 anéis são mais abundantes que os compostos de 5 anéis e também podem ser prejudiciais à saúde. O naftaleno, o mais simples e mais volátil dos PAHs, foi o causador de tumores respiratórios em estudos realizados em ratos.³⁷

Com base nas propriedades e massa molecular, duas classes de PAHs podem ser distinguidas: os PAHs de dois a três anéis e os PAHs de quatro a seis anéis. Os PAHs de baixa massa molecular têm uma toxicidade aguda significativa, enquanto os PAHs de maior massa molecular mostram um alto potencial carcinogênico e mutagênico.³⁸

A maior parte da informação sobre a toxicologia dos PAHs foi obtida a partir de experimentos com animais expostos a estes compostos sobre

condições controladas. Estudos relacionados aos efeitos em seres humanos são raros.³⁹ Por causa da natureza complexa das misturas, é difícil avaliar a contribuição de um PAH isolado para a carcinogênese total destas misturas.

As técnicas mais utilizadas para a extração e concentração de PAHs de matrizes como a água são a extração Soxlet (SE), extração líquido líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). De modo geral estas técnicas são demoradas e exigem uma grande quantidade de solvente. Além disso a concentração dos PAHs em fase aquosa é considerada em níveis de ng/L ou abaixo.⁴⁰

Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para medir baixas concentrações de PAHs em água. A análise destes compostos pode ser realizada por cromatografia gasosa (GC)⁴¹, cromatografia líquida (HPLC)^{42,43} e eletroforese capilar (CE)⁴⁴.

A cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama oferece alguma sensibilidade e seletividade na análise de PAHs. Entretanto, a técnica não oferece sensibilidade devido a interferências na análise de matrizes ambientais complexas. A cromatografia líquida é ainda a técnica mais utilizada para determinar PAHs em matrizes ambientais. As vantagens da HPLC na separação de PAHs em misturas complexas já foram determinadas e reportadas.⁴⁰

A SPME tem sido proposta como uma técnica de extração e concentração de PAHs, devido a sua simplicidade, baixo consumo de solvente, seletividade e sensibilidade. Muitas das técnicas tradicionais de extração envolvem procedimentos com várias etapas que sempre apresentam o risco de perda do analito enquanto a SPME permite a extração e concentração do

analito em uma única etapa. As amostras aquosas podem ser estudadas diretamente inserindo a fibra na solução e a técnica pode ser utilizada diretamente em campo, minimizando perdas.⁴⁵

Os PAHs foram analisados por SPME-GC^{37,38,45,46,47} e por SPME-HPLC^{39,40,48,49}. Gándara et al.³⁹ e Chen⁴⁰ desenvolveram um método com dessorção “off line” e Jinno et al.⁴⁸ e Negrão e Alpendurada⁴⁹ utilizaram uma interface comercial (Supelco) para a dessorção.

Recentemente foi desenvolvida uma interface “lab made” SPME-HPLC⁵⁰, utilizada na análise de pesticidas em água. A interface apresentou bons resultados com relação à precisão e sensibilidade.

1.3 Validação do Método Analítico⁵¹⁻⁶⁷

A validação de um método analítico é um procedimento para avaliar se o método é seletivo, linear dentro da faixa de trabalho, exato, preciso e robusto. Os estudos de validação precisam ser representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostra sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de resíduos. De um modo geral, os parâmetros analíticos avaliados são: seletividade, linearidade do padrão e amostra, exatidão, precisão (repetibilidade e intermediária) e robustez. O item robustez geralmente envolve a estabilidade do padrão e amostra, e a análise das variações das condições estabelecidas no método (composição da fase móvel, temperatura, etc.).

1.3.1 Seletividade

A seletividade de um método avalia se o analito de interesse é identificado de forma inequívoca, na presença ou não de interferentes presentes na amostra. A seletividade garante que o pico cromatográfico seja exclusivamente do composto de interesse. A seletividade pode ser avaliada de várias maneiras:

- comparação da matriz isenta do analito de interesse com a amostra (fortificada ou não) e com o padrão do analito; a ausência de interferentes no mesmo tempo de retenção que o analito deve ser garantida;
- pureza do pico, avaliada através de um detector de arranjo de diodos ou por espectrometria de massas acoplada a uma técnica cromatográfica;

1.3.2 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de aplicação.

Uma relação matemática entre o sinal e a concentração, ou massa do analito deve ser determinada experimentalmente e pode ser representada por uma equação linear, chamada de curva analítica ou de calibração. A estimativa dos coeficientes angular e linear da equação linear (a e b) e o coeficiente de correlação (r) podem ser calculados a partir dos pontos experimentais, através

do método de regressão linear. O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade da curva obtida; quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais.

A faixa de aplicação de um método corresponde aos limites máximo e mínimo da curva analítica, e estes limites variam de acordo com a aplicação e órgão regulador. Para fármacos e medicamentos, a ANVISA recomenda uma faixa entre 80 a 120% do valor esperado, enquanto outros órgãos como a IUPAC recomendam de 50 a 150%. Para a quantificação de resíduos, é necessário incluir o limite de quantificação, com precisão e exatidão comprovadas, com uma concentração de trabalho que pode ser de 2 a 3 vezes ou de 20 a 50 vezes este valor, dependendo do objetivo da análise.

A faixa de linearidade deve abranger um mínimo de cinco pontos; o número de injeções para cada ponto varia de três a seis vezes.

A curva pode ser construída pelo método do padrão externo, padrão interno ou adição de padrão.

No método do padrão externo, gera-se uma curva analítica que relaciona à concentração de um padrão ao sinal analítico obtido na medida do padrão.

No método do padrão interno, adiciona-se na amostra e na solução padrão, um composto (padrão interno) de concentração fixa e conhecida, mas que não interfira na análise. A curva analítica obtida relaciona o sinal analítico obtido pelo padrão dividido pelo sinal analítico obtido pelo padrão interno versus o sinal analítico obtido pelo analito na amostra dividido pelo sinal analítico obtido pelo padrão interno adicionado à amostra.

No método de adição de padrão, adicionam-se a amostra várias concentrações da solução padrão. Gera-se uma curva analítica que relaciona a

massa adicionada ao sinal analítico obtido. A massa do analito na amostra é obtida pela extrapolação da curva obtida.

1.3.3 Precisão

A precisão é a avaliação da concordância dos resultados obtidos para ensaios diferentes, para uma mesma amostra. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (s) e pelo desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$RSD (\%) \quad \text{ou} \quad CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

onde:

\bar{x} = média aritmética do número de medidas

x_i = valor de cada medida

n = número de medidas

A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade é a concordância entre os resultados obtidos em medidas repetidas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições. A intermediária avalia o efeito de variações como dias diferentes (para um mesmo analista), analistas diferentes, equipamentos diferentes. A reprodutibilidade expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos no preparo de uma amostra em laboratórios diferentes.

Os critérios de precisão variam de acordo com o objetivo da análise. Para resíduos, a precisão no limite de quantificação é definida pela faixa de concentração onde este limite foi estabelecido. Faixas mais baixas de concentração aceitam maiores variações nos valores de precisão. Para fármacos, a ANVISA recomenda uma precisão de 15% para o limite de quantificação.

1.3.4 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor aceito como verdadeiro. Os critérios de aceitação para a exatidão estão associados também a faixa de concentração trabalhada. Estes limites podem ser estreitos em concentrações mais altas e mais flexíveis em concentrações mais baixas. A exatidão do método é medida através da recuperação (R). A recuperação é a fortificação da matriz isenta do analito de interesse (branco da matriz, placebo, etc) em níveis diferentes de concentração do analito, em pelo menos três níveis (por exemplo, 80, 100 e 120%). A recuperação é dada pela relação entre a concentração obtida após a etapa de extração e a concentração teórica:

$$R(\%) = \left(\frac{C_{obtida}}{C_{teórica}} \right) \times 100$$

onde:

C_{obtida} = concentração obtida do analito na amostra fortificada após a etapa de extração

$C_{teórica}$ = concentração do analito na solução padrão de fortificação

Para a análise de resíduos os intervalos aceitáveis para recuperação estão entre 70 a 120%, com precisão de 20%.

1.3.5 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não quantificada com um valor exato e preciso. O limite de detecção pode ser obtido pelo método visual, método sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva de calibração. No método visual, o LOD é determinado utilizando soluções padrão do analito de interesse até a visualização da menor concentração visível na qual seja possível distinguir entre sinal e ruído. No método sinal/ruído, o sinal das soluções contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de um branco; a relação sinal/ruído normalmente aceita é de 3:1.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sendo que os critérios de aceitação podem variar de acordo com o nível de concentração do limite de quantificação e com as necessidades do método.

O limite de quantificação também pode ser estabelecido pelos mesmos métodos utilizados para o LOD (método visual, método sinal/ruído e método baseado em parâmetros da curva de calibração). A relação sinal/ruído adotada para o LOQ é de 10:1.

2. Objetivos

Os objetivos desta tese são:

1. Otimizar as condições de extração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) por SPME, no modo "off line", e avaliar os parâmetros que interferem na eficiência da extração
2. Validar um método analítico utilizando as condições otimizadas de extração e uma interface "lab made"SPME/HPLC

3. Parte Experimental

3.1 Equipamentos/Materiais

- Cromatógrafo Líquido Shimadzu (Kioto, Japão) modelo 10A composto de:
 1. Bomba LC 10AT
 2. Amostrador automático
 3. Forno
 4. Detector UV modelo SPD-10AV
 5. Software: Shimadzu Class-VP
- Coluna Supelco (Pensilvânia, Estados Unidos) C18 5 μm 250 x 4,6 mm
- Balança analítica Mettler Toledo (Ohio, Estados Unidos) modelo AG 285
- Balança semi analítica Tecnal (São Paulo, Brasil) modelo TEB 1000
- Agitador magnético VWR Scientific Products (Pensilvânia, Estados Unidos) modelo 400
- Banho com aquecimento Quimis (São Paulo, Brasil)
- Holder para SPME Supelco modelo 57330-U
- Fibra para SPME Supelco com 10 cm de comprimento:
 1. PDMS (polidimetilsiloxano) 100 μm
 2. PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) 60 μm
 3. PA (poliacrilato) 85 μm

4. CW/TRP (carbowax/templated resin) 50 µm

- Fibra para SPME “lab made” com 10 cm de comprimento:
 1. C18 (octadecilsilano) 10 µm
- Interface “lab made” SPME-LC
- Sistema de filtração de água Milli-Q da Millipore (Massachusetts, Estados Unidos)

3.2 Reagentes

Água purificada

Acetonitrila grau HPLC Mallinckodt (Missouri, Estados Unidos)

Cloreto de sódio Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

3.3 Padrões

Os padrões de fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno com teor de 99,9% foram fornecidos pela Supelco.

3.4 Condições cromatográficas

Fluxo	1,0 mL/min
Comprimento de onda	254 nm
Fase móvel	Acetonitrila/Água 70/30
Tempo de corrida	35 minutos

Temperatura	25 °C
Volume de injeção SPME “off line”	20 µL
Volume de injeção SPME “on line”	50 µL

3.5 Procedimento analítico para o desenvolvimento e otimização das condições de extração por SPME (modo de dessorção “off line”)

3.5.1 Preparo das soluções

A Tabela 3.1 mostra o preparo das soluções padrão estoque dos compostos analisados.

Tabela 3.1 Preparo da solução padrão estoque.

Composto	Massa (mg)	Volume (mL)	Concentração (µg/mL)	Volume Solução (mL)	Volume Diluição (ml)	Concentração Final (µg/mL)
fluoreno	150	100	1.500	10	100	150
fenantreno	210	100	2.100	10	100	210
antraceno	120	100	1.200	10	100	120
fluoranteno	170	100	1.700	10	100	170
pireno	110	100	1.100	10	100	110
criseno	120	100	1.200	10	100	120
benzo(b)fluoranteno	130	100	1.300	10	100	130
benzo(a)pireno	110	100	1.100	10	100	110

Preparou-se uma solução padrão de trabalho a partir das soluções padrão estoque, pipetando-se os volumes especificados na Tabela 3.2, transferindo para um balão volumétrico de 100 mL, e completando-se o volume com acetonitrila.

Tabela 3.2 Preparo da solução padrão de trabalho 1,0 µg/mL.

Composto	Concentração (µg/ml)	Volume da solução (µL)	Volume de diluição (mL)	Concentração Final (µg/ml)
Fluoreno	150	670	100	1,0
Fenantreno	210	480	100	1,0
Antraceno	120	830	100	1,0
Fluoranteno	170	590	100	1,0
Pireno	110	910	100	1,0
Criseno	120	830	100	1,0
Benzo(b)fluoranteno	130	770	100	1,0
Benzo(a)pireno	110	910	100	1,0

A solução padrão de extração foi preparada a partir da solução padrão de trabalho de 1,0 µg/mL. Pipetou-se 1 mL desta solução em um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com água. Foi obtida uma solução contendo 0,2 µg/ml de fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno.

Foi preparado um padrão de calibração a partir das soluções padrão estoque, pipetando-se os volumes especificados na Tabela 3.3, transferindo para um balão volumétrico de 10 mL e completando o volume com acetonitrila.

Tabela 3.3. Preparo do padrão de calibração 4,0 µg/mL.

Composto	Concentração (µg/ml)	Volume da solução (µL)	Volume de diluição (mL)	Concentração Final (µg/ml)
Fluoreno	150	270	10	4,05

Fenantreno	210	190	10	3,99
Antraceno	120	340	10	4,08
Fluoranteno	170	240	10	4,08
Pireno	110	370	10	4,07
Criseno	120	340	10	4,08
Benzo(b)fluoranteno	130	310	10	4,03
Benzo(a)pireno	110	370	10	4,07

3.5.2 Procedimento para a dessorção “off line”

A solução padrão de extração foi transferida para um frasco de vidro de forma cônica de 5 mL, contendo uma barra de agitação magnético triangular. A fibra foi imersa nesta solução e a amostra foi agitada com velocidade de 1.200 rpm. A dessorção foi realizada expondo-se a fibra por 20 minutos em um frasco contendo 250 μ L da solução de dessorção. Em seguida foram injetados 20 μ L desta solução.

A Tabela 3.4 mostra os valores de concentração teórica em μ g/fibra e a concentração final teórica da solução injetada.

Tabela 3.4 Valores de concentração em μ g/fibra.

Concentração da solução (μ g/mL)	Volume (mL)	Concentração (μ g/fibra)	Volume de dessorção (μ L)	Concentração final (μ g/mL)
1,0	1,0	1,0	250	4,0

Os parâmetros otimizados para cada fibra estudada estão relacionados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros de otimização da extração.

Fibra	Tempo de extração	Solvente de Extração	Temperatura de extração	Força iônica do meio (%)
-------	-------------------	----------------------	-------------------------	--------------------------

	(minutos)	(Acetonitrila/H ₂ O)	(°C)	NaCl)
PA	5, 15, 30, 45, 60	60/40, 40/60	25, 35, 45, 60	0, 5, 10, 15
PDMS	20, 30, 40	-	25, 35, 45, 60	0, 5, 10, 15
CW/TRP	20, 30, 40	-	25, 35, 45	0, 5, 10
C18	20, 30, 40	-	35, 45, 60	-
PDMS/DVB	20, 30, 40	-	-	-

3.6 Procedimento para a validação do método analítico utilizando a interface SPME-LC

3.6.1 Avaliação do desempenho da interface SPME-LC

Foram utilizadas duas fibras (PA e CW/TRP) nas melhores condições determinadas no modo de extração “off line”. Determinou-se a recuperação e precisões obtidas com a interface. A fibra com melhor desempenho foi escolhida para se realizar a validação do método analítico.

Foi preparado um padrão de calibração a partir das soluções padrão estoque, pipetando-se os volumes especificados na Tabela 3.6, transferindo para um balão volumétrico de 10 mL e completando o volume com acetonitrila.

Tabela 3.6 Preparo do padrão de calibração 20,0 µg/mL.

Composto	Concentração (µg/ml)	Volume da solução (µL)	Volume de diluição (mL)	Concentração Final (µg/ml)
Fluoreno	1.500	135	10	20,25
Fenantreno	2.100	100	10	21,00
Antraceno	1.200	170	10	20,40
Fluoranteno	1.700	120	10	20,40
Pireno	1.100	190	10	20,90
Criseno	1.200	170	10	20,04

Benzo(b)fluoranteno	1.300	160	10	20,08
Benzo(a)pireno	1.100	190	10	20,90

3.6.1.1 Procedimento para a dessorção “on line”

A solução padrão de extração (3.5.1) foi transferida para um frasco de vidro de forma cônica de 5 mL, contendo uma barra de agitação magnético triangular. A fibra foi imersa nesta solução e a amostra foi agitada com velocidade de 1.200 rpm. A dessorção foi realizada expondo-se a fibra por 20 minutos na cela de dessorção da interface contendo 50 µL de ACN/H₂O 70/30, com a válvula na posição load. Em seguida a fibra foi retirada da cela e a válvula foi colocada na posição inject durante toda a corrida cromatográfica. A Figura 3.1 mostra a interface utilizada neste trabalho.

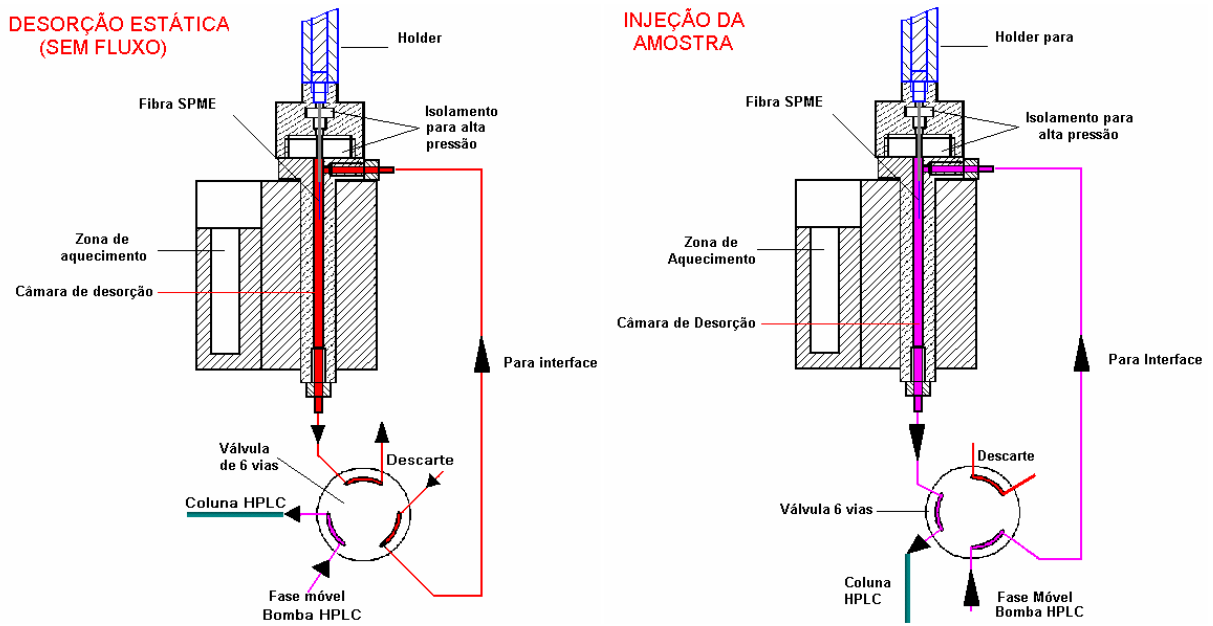


Figura 3.1. Interface SPME-LC. ⁵⁰

A Tabela 3.7 mostra os valores de concentração em $\mu\text{g}/\text{fibra}$ e a concentração final teórica da solução injetada.

Tabela 3.7. Valores de concentração em $\mu\text{g}/\text{fibra}$.

Concentração da solução ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	Volume de desorção (μL)	Concentração final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1,0	1,0	1,0	50	20,0

3.6.2 Linearidade da amostra

Foi preparada uma solução padrão de 10 µg/mL a partir das soluções padrão estoque, pipetando-se os volumes especificados na Tabela 3.8 em um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com acetonitrila.

A partir da solução padrão de 10,0 µg/mL preparou-se uma solução de 1,0 µg/mL pipetando-se 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila.

Tabela 3.8 Preparo da solução padrão de trabalho 10,0 µg/mL.

Composto	Concentração (µg/ml)	Volume da solução (µL)	Volume de diluição (mL)	Concentração Final (µg/ml)
Fluoreno	150	670	10	10,0
Fenantreno	210	480	10	10,1
Antraceno	120	830	10	10,0
Fluoranteno	170	590	10	10,0
Pireno	110	910	10	10,0
Criseno	120	830	10	10,0
Benzo(b)fluoranteno	130	770	10	10,0
Benzo(a)pireno	110	910	10	10,0

As Tabelas 3.9 e 3.10 mostram o preparo das soluções padrão utilizadas para se verificar a linearidade da amostra e os valores em de concentração em µg/fibra. Os volumes finais foram completados com água.

Procedeu-se conforme descrito no item 3.6.1.1. As análises foram realizadas em duplicata. Foi traçada a curva “Concentração Obtida versus Concentração Teórica” expressa em µg/fibra. Obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação para cada composto analisado. Foi determinado como critério de aceitação um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,98.

Tabela 3.9 Preparo das soluções padrão de trabalho para linearidade da amostra.

Solução (µg/ml)	Volume (µl)	Volume (ml)	Concentração (µg/mL)
1,0	250	10	0,025
1,0	500	10	0,050
1,0	1.000	10	0,100
10,0	250	10	0,250
10,0	500	10	0,500

Tabela 3.10 Valores de concentração em µg/fibra.

Conc. (µg/mL)	Volume (mL)	Volume diluição (ml)	Conc. (µg/mL)	Conc. (µg/fibra)	Volume Dessorção (µL)	Conc. Final (µg/mL)
0,025	1,0	5	0,005	0,025	50	0,5
0,050	1,0	5	0,010	0,050	50	1,0
0,100	1,0	5	0,020	0,100	50	2,0
0,250	1,0	5	0,050	0,250	50	5,0
0,500	1,0	5	0,100	0,500	50	10,0

3.6.3 Linearidade do padrão

A linearidade do padrão foi avaliada na faixa de 0,5 a 10,0 µg/mL. Foi preparada uma solução padrão de 50 µg/mL a partir das soluções padrão estoque, pipetando-se os volumes especificados na Tabela 3.11 em um balão volumétrico de 10 mL.

Tabela 3.11 Preparo da solução padrão de trabalho 50,0 µg/mL.

Composto	Concentração	Volume da	Volume de	Concentração
----------	--------------	-----------	-----------	--------------

	($\mu\text{g/ml}$)	solução (μL)	diluição (mL)	Final ($\mu\text{g/ml}$)
Fluoreno	1.500	335	10	50,2
Fenantreno	2.100	240	10	50,4
Antraceno	1.200	420	10	50,4
Fluoranteno	1.700	295	10	50,1
Pireno	1.100	460	10	50,6
Criseno	1.200	420	10	50,4
Benzo(b)fluoranteno	1.300	390	10	50,7
Benzo(a)pireno	1.100	460	10	50,6

A Tabela 3.12 mostra o preparo das soluções padrão utilizadas para se verificar a linearidade do padrão.

Tabela 3.12 Preparo das soluções padrão de trabalho para linearidade do padrão.

Solução ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (mL)	Volume diluição (ml)	Concentração Final ($\mu\text{g/mL}$)
50,0	2	10	10,0
50,0	1	10	5,0
10,0	2	10	2,0
10,0	1	10	1,0
1,0	5	10	0,5

As análises foram realizadas em duplicata. Foi traçada uma curva do tipo Área versus Concentração, expressa em $\mu\text{g/mL}$. Obteve-se a equação da reta e o coeficiente para cada composto analisado. Foi determinado como critério de aceitação um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,98.

3.6.4 Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada em 3 níveis de concentração: 0,025, 0,1 e 0,5 $\mu\text{g/fibra}$. As soluções foram preparadas a partir das soluções padrões de 0,025,

0,1 e 0,5 µg/mL. A Tabela 3.13 mostra o preparo das soluções utilizadas para verificar a exatidão do método. Foi avaliada também a precisão intra dia e intermediária, na concentração de 0,1 µg/fibra. As soluções para o item precisão foram preparadas conforme as soluções preparadas para o item exatidão. Foi preparado um padrão de calibração de 2,0 µg/mL pipetando-se 1 mL da solução padrão de trabalho de 20 µg/mL em um balão de 10 mL. Completou-se o volume com acetonitrila. As análises foram realizadas em duplicata e procedeu-se conforme item 3.6.1.1.

Para a exatidão foram calculados os percentuais de recuperação médios, o desvio padrão e o desvio padrão relativo. Foi determinado como critério de aceitação uma faixa de recuperação de 70 a 120%.

No item precisão foi calculado o desvio padrão relativo. Foram determinados como critérios de aceitação um desvio padrão relativo maior ou igual a 10% e a razão de médias inter dias (Dia 1/Dia 2) entre 0,95 e 1,05.

Tabela 3.13 Valores de concentração em µg/fibra para exatidão e precisão.

Conc. (µg/mL)	Volume (mL)	Volume diluição (ml)	Conc. (µg/mL)	Conc. (µg/fibra)	Volume Dessorção (µL)	Conc. Final (µg/mL)
0,025	1,0	5	0,005	0,025	50	0,5
0,100	1,0	5	0,020	0,100	50	2,0
0,500	1,0	5	0,100	0,500	50	10,0

4. Resultados e Discussão

4.1 Otimização dos parâmetros de extração

Vários parâmetros experimentais foram avaliados durante o desenvolvimento do método de análise de PAHs em água, objetivando aumentar a velocidade, sensibilidade e seletividade. Os estudos foram conduzidos para se determinar quais dos parâmetros envolvidos na extração

(tempo de extração, temperatura, força iônica do meio) são determinantes na extração de PAHs de amostras aquosas.

4.1.1 Tempo de extração

Para assegurar a eficiência do processo de extração, uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um método empregando SPME é determinar o tempo necessário para o processo de extração alcançar o equilíbrio entre a fibra e a amostra. A quantidade de analito extraída pela fibra depende não somente da polaridade e espessura da fase estacionária, mas também, do tempo de extração e da concentração do analito na amostra.

O tempo de extração foi avaliado através dos valores de área obtidos para cada composto em função do tempo. As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram os valores de área obtido para a fibra de poliacrilato e o desvio padrão relativo encontrado. As Figuras 4.1 e 4.2 mostram o perfil de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Pode-se observar que para o fluoreno, fenantreno e antraceno, o tempo de extração correspondente a adsorção máxima ocorreu em 30 minutos enquanto que para o fluoranteno, pireno e criseno o melhor tempo de extração foi de 45 minutos. Para os compostos benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno o equilíbrio não foi atingido. Este resultado é coerente considerando-se a difusão dos analitos no revestimento polimérico (transferência de massa).^{5,7} Os PAHs de menor massa molecular (2-3 anéis), como o fluoreno, fenantreno e antraceno, alcançaram o equilíbrio entre as duas fases mais rapidamente que compostos de maior massa

molecular (4 anéis) como o fluoranteno, pireno e criseno. Os compostos de 5 anéis (benzo(a)pireno e benzo(b)fluoranteno) não atingiram o equilíbrio de adsorção até 60 minutos de extração. Fixou-se o tempo de 30 minutos como o tempo ideal para a extração dos PAHs com a fibra de poliacrilato.

Tabela 4.1 Otimização do tempo de extração para a fibra de poliacrilato (PA). Temperatura: 25 °C.

	5 minutos	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
composto	Área média	Área média	Área média	Área média	Área média
fluoreno	18470	43044	46621	43274	36207
fenantreno	48432	138710	162316	148866	123346
antraceno	98710	290584	363329	354535	292236
fluoranteno	11871	41267	55156	55775	46982
pireno	9832	34673	46465	47364	40249
criseno	31904	131750	205883	235047	209579
benzo(b)fluoranteno	16467	73711	128532	163936	164174
benzo(a)pireno	15090	70755	127579	160798	172536

Tabela 4.2 Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: (PA)

	5 minutos	15 minutos	30 minutos	45 minutos	60 minutos
composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	7,02	8,60	3,17	4,52	2,77
fenantreno	18,29	10,20	7,26	4,80	9,72
antraceno	19,54	9,97	0,20	6,82	12,40
fluoranteno	35,75	3,19	6,79	24,22	24,24

pireno	38,15	4,46	5,21	24,06	23,61
criseno	56,12	11,19	2,70	46,10	13,61
benzo(b)fluoranteno	67,12	24,84	0,80	60,06	0,71
benzo(a)pireno	71,50	26,58	4,26	56,80	1,98

a = desvio padrão relativo

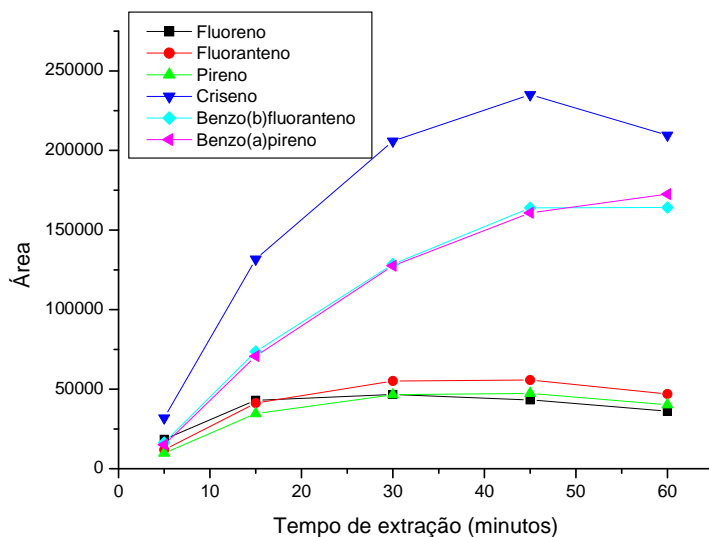


Figura 4.1 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Temperatura: 25 °C.

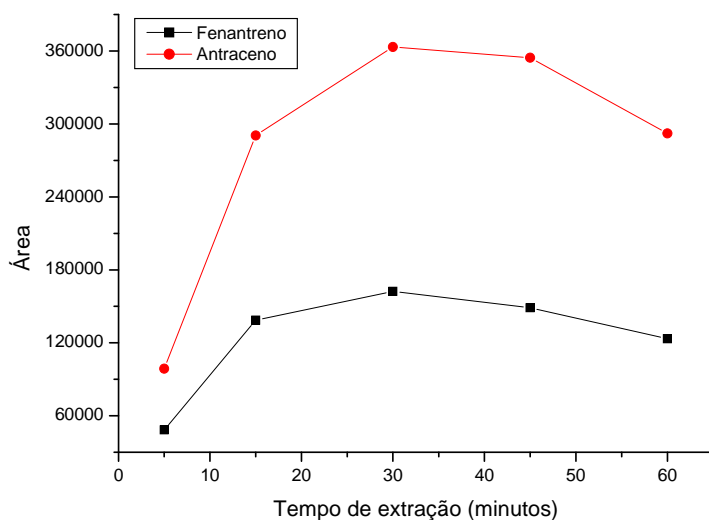


Figura 4.2 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra:PA. Temperatura: 25 °C.

Observando-se os valores de área obtidos para o tempo de 30 minutos, conclui-se que os menores valores de área foram obtidos para o fluoreno (2 anéis), fluoranteno (4 anéis) e pireno (4 anéis) enquanto que os maiores valores de área foram obtidos para o antraceno (3 anéis), fenantreno (3 anéis) e criseno (4 anéis), embora os compostos benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno, com 5 anéis, tenham sido melhor extraídos do que alguns dos compostos de menor massa molecular. A princípio, poderia se esperar uma relação linear entre a quantidade absorvida e a massa molecular destes compostos, já que a fibra de poliácrlato é uma fibra com características polares e, teoricamente, compostos de menor massa molecular adsorveriam mais.⁵ Porém existem algumas variáveis a serem consideradas neste sistema. Primeiro, ele trata do coeficiente de partição entre vários compostos que estão sendo extraídos ao mesmo tempo; segundo, a amostra contém 20% (v/v) de um solvente orgânico, ou seja, a competição pelos sítios ativos e a solvatação do meio solvente orgânico/água é diferente de um sistema de equilíbrio único, em meio 100% aquoso; e terceiro, existe a possibilidade da diferenciação isomérica por parte da fibra.

Os valores de desvio padrão determinados para o tempo de extração igual a 30 minutos estão abaixo de 10%, o que condiz com valores encontrados na literatura.⁶⁸

A Tabela 4.3 mostra os valores de área obtidos na otimização do tempo de extração da fibra de polidimetilsiloxano. As Figuras 4.3 e 4.4 mostram o perfil de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Para todos os compostos analisados, o melhor tempo de extração foi 40 minutos. A

quantidade extraída em função do tempo não foi linear para nenhum dos compostos analisados; e uma provável explicação para este fato seria algum erro sistemático ocorrido durante a análise. Fixou-se o tempo de 20 minutos como o tempo de extração ideal para os PAHs.

Com exceção do fenantreno e antraceno, todos os demais compostos mostraram baixos valores de área; isto não quer dizer necessariamente que eles tenham sido pouco absorvidos, mas justamente o contrário. A fibra de polidimetilsiloxano é apolar, e o solvente de dessorção, embora composto de 60% de solvente orgânico (acetonitrila), pode não ter sido capaz de dessorver adequadamente os compostos mais apolares, de 4 e 5 anéis. Isto explicaria também os baixos valores de área encontrados, quando comparados com os valores de área obtidos com a fibra de poliacrilato. Os compostos retidos pela fibra de poliacrilato, por terem um caráter mais apolar, podem ter tido um coeficiente de distribuição mais alto entre a fibra e o solvente de dessorção, quando comparado com a fibra de polidimetilsiloxano.

Tabela 4.3 Otimização do tempo de extração para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Temperatura: 25 °C.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
Composto	Área	Área	Área
fluoreno	38089	29557	44113
fenantreno	141641	100883	174940
antraceno	623945	476668	736690
fluoranteno	39482	33197	53458
pireno	33396	27913	44949
criseno	14804	9557	17939
benzo(b)fluoranteno	20964	16626	28852
benzo(a)pireno	19767	16733	27832

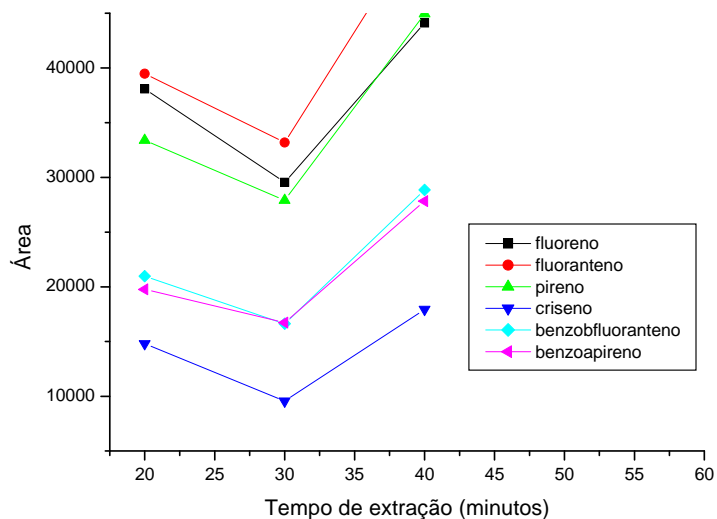


Figura 4.3 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Temperatura: 25 °C.

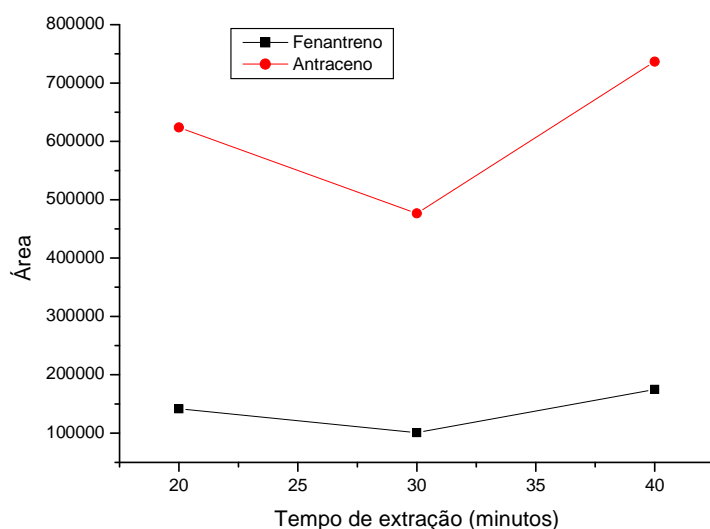


Figura 4.4 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Temperatura: 25 °C.

A Tabela 4.4 mostra os valores de área obtidos durante a otimização do tempo de extração com a fibra carbowax/templated resin. As Figuras 4.5 e 4.6

mostram o perfil de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno.

Pode-se observar que nenhum dos compostos analisados atingiu o equilíbrio entre a fibra e o meio de extração em 40 minutos de extração. Deve-se considerar aqui a espessura da fibra CW/TRP, de 50 μm , já que a quantidade de analito extraída e o tempo de extração variam em função da espessura da fibra. Os valores de área obtidos, quando comparados com a fibra de poliacrilato, parecem comprovar este fato. A fibra de poliacrilato, polar e com espessura de 85 μm , extraiu uma quantidade maior dos PAHs do que a fibra CW/TRP, com exceção do fenantreno.

O tempo de não equilíbrio de 40 minutos foi considerado o tempo de extração ideal dos PAHs na extração com a fibra carbowax/templeted resin.

Tabela 4.4 Otimização do tempo de extração para a fibra carbowax/templeted resin (CW/TRP). Temperatura: 25 °C.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
Composto	Área	Área	Área
fluoreno	38733	64477	70753
fenantreno	163065	277300	319063
antraceno	702481	914580	1043214
fluoranteno	42810	81825	99116
pireno	34456	65850	80494
criseno	24484	19208	64030
benzo(b)fluoranteno	28839	28439	70075
benzo(a)pireno	7000	21090	41055

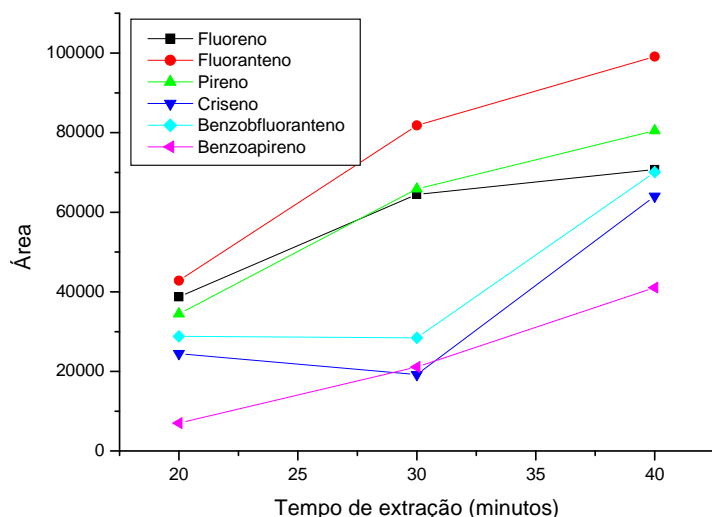


Figura 4.5 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TPR. Temperatura: 25 °C.

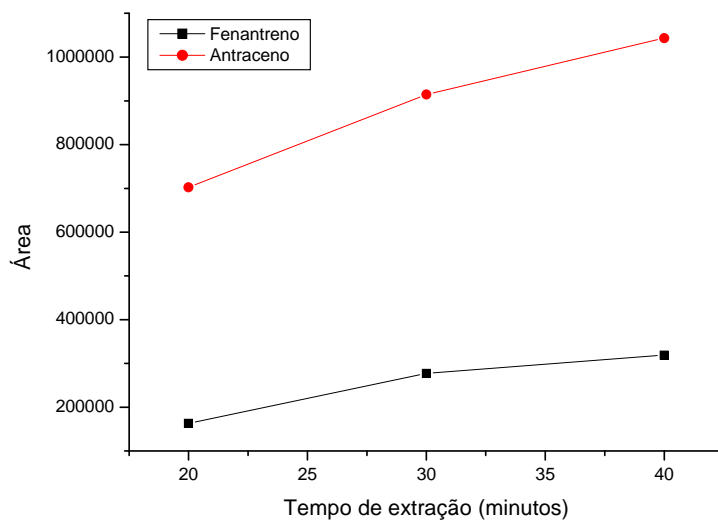


Figura 4.6 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: CW/TPR. Temperatura: 25 °C.

As Tabelas 4.5 e 4.6 mostram os valores de área e desvio padrão relativo obtidos durante a otimização do tempo de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno,

benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno utilizando-se a fibra C18 “lab made”. As Figuras 4.7 e 4.8 mostram os perfis de extração destes compostos.

Pode-se verificar que para o fluoreno, antraceno, fluoranteno e pireno, o tempo de extração não alterou significativamente a quantidade extraída destes compostos. Os compostos que tiveram uma alteração significativa foram os hidrocarbonetos de maior massa molecular, que não atingiram o equilíbrio em 40 minutos de extração. Este fato é coerente ao se pensar na capacidade de difusão destes analitos em uma fibra com 10 μm de espessura. A espessura da fibra também pode explicar os baixos valores de área encontrados para os PAHs, quando comparados aos valores de área encontrados na otimização do tempo de extração com a fibra de polidimetilsiloxano.

Porém, ao se relacionar os valores de área à estrutura da fibra e à estrutura dos compostos, obtém-se uma relação coerente: como a fibra C18 tem características apolares, os compostos de maior massa molecular, como o benzo(b)fluoranteno e o benzo(a)pireno (5 anéis), foram melhores adsorvidos e desorvidos no sistema estudado, ao contrário de compostos de menor massa molecular, como o fluoreno e o antraceno (2 e 3 anéis).

Tabela 4.5 Otimização do tempo de extração para a fibra C18 “lab made”. Temperatura: 25 °C.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
Composto	Área Média	Área Média	Área Média
fluoreno	14192	12295	12816
fenantreno	16049	15120	15956
antraceno	372655	321276	353663
fluoranteno	6544	5190	6531
pireno	6081	4182	5197
criseno	47598	51451	63979
benzo(b)fluoranteno	53738	50824	73344
benzo(a)pireno	52620	49294	70840

Tabela 4.6 Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: C18 “lab made”.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	6,93	5,54	4,25
fenantreno	28,55	6,79	9,08
antraceno	3,59	4,15	0,80
fluoranteno	34,00	6,89	4,89
pireno	25,30	34,31	13,14
criseno	18,13	14,67	18,25
benzo(b)fluoranteno	24,03	13,30	9,07
benzo(a)pireno	22,07	4,25	8,86

a = desvio padrão relativo

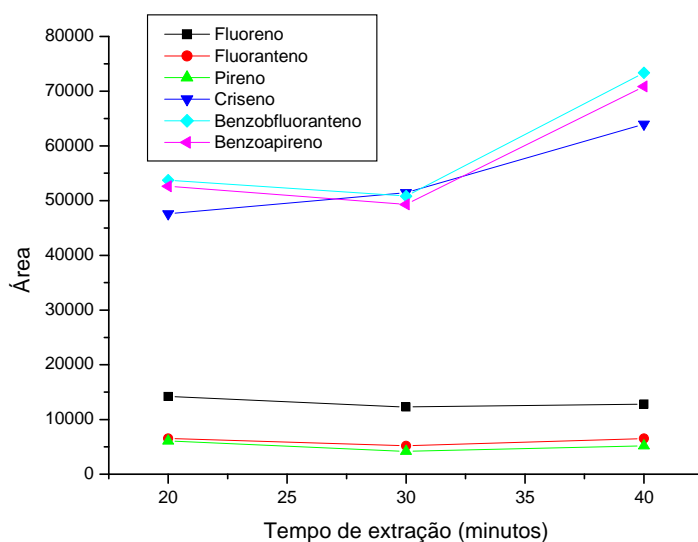


Figura 4.7 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: C18 “lab made”. Temperatura: 25 °C.

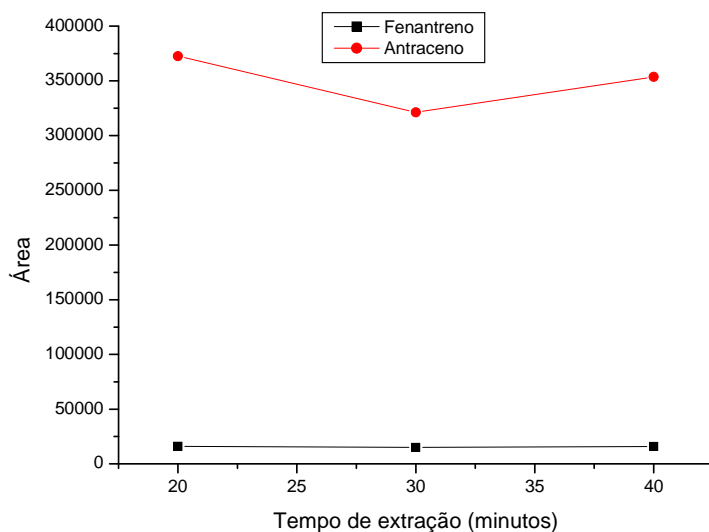


Figura 4.8 Variação da área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: C18 “lab made”. Temperatura: 25 °C.

As Tabelas 4.7 e 4.8 mostram os valores de área e desvio padrão relativo obtidos na otimização do tempo de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pierno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno utilizando-se a fibra PDMS/DVB. As Figuras 4.9 e 4.10 mostram os perfis de extração destes compostos.

A fibra PDMS/DVB possui características mistas: um adsorvente sólido polar (DVB) e um filme polimérico apolar (PDMS). Pode-se observar um decréscimo na quantidade extraída dos compostos de maior massa molecular com o aumento do tempo de extração, enquanto que os demais compostos atingiram o equilíbrio em 30 minutos. Neste caso pode ocorrer uma saturação do filme polimérico pelas moléculas do solvente orgânico, ou pelos demais compostos, o que impede a maior absorção dos compostos de 4-5 anéis.

Pode-se observar que, pelos valores de área e pelos valores de desvio padrão obtidos (maiores, quando comparados com os valores obtidos com

outras fibras), a fibra de PDMS/DVB extrai de modo mais uniforme os compostos analisados mas ao mesmo tempo, por possuir um sistema misto de extração, faz com que outras variáveis interfiram no coeficiente de distribuição dos analitos, já que o equilíbrio aqui tem que ser considerado entre três fases, e não em duas.

Tabela 4.7 Otimização do tempo de extração para a fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Temperatura: 25 °C.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
Composto	Área média	Área média	Área média
fluoreno	29799	34713	30074
fenantreno	110778	134728	122684
antraceno	546621	606892	552608
fluoranteno	36093	46238	43155
pireno	28757	36564	33961
criseno	195196	156388	140368
benzo(b)fluoranteno	94739	132845	122224
benzo(a)pireno	89645	123298	114114

Tabela 4.8 Desvio padrão relativo relacionado ao tempo de extração. Fibra: PDMS/DVB.

	20 minutos	30 minutos	40 minutos
composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	24,02	5,06	23,28
fenantreno	25,79	6,40	14,67
antraceno	21,81	8,50	8,02
fluoranteno	29,61	7,85	10,42
pireno	31,59	6,98	11,76

criseno	9,14	7,46	6,32
benzo(b)fluoranteno	39,24	9,12	13,57
benzo(a)pireno	37,39	8,10	12,79

a = desvio padrão relativo

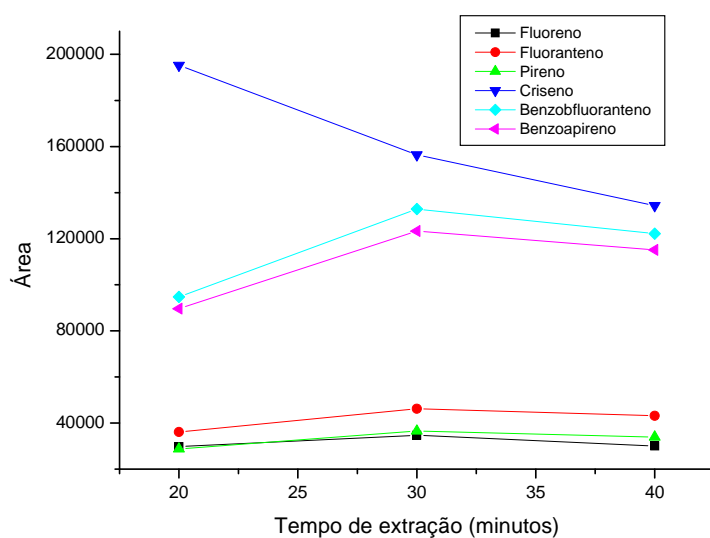


Figura 4.9 Área versus tempo de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS/DVB. Temperatura: 25 °C.

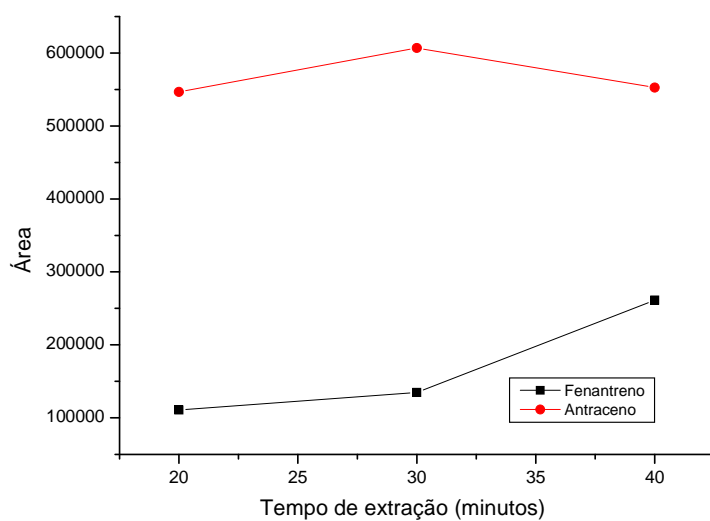


Figura 4.10 Área versus tempo de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS/DVB. Temperatura: 25 °C.

A Tabela 4.9 mostra os valores de área obtidos durante a limpeza da fibra de PDMS/DVB, os quais parecem evidenciar o fato da fibra, por ter características mistas, favorecer o “carry-over” dos analitos.

Tabela 4.9 Valores de área e desvio padrão relativo obtidos na limpeza da fibra de PDMS/DVB. Tempo de desorção: 20 minutos.

composto	Área média (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	não detectado	-
fenantreno	10158	1,84
antraceno	261326	14,37
fluoranteno	4632	9,69
pireno	4672	7,48
criseno	30213	14,37
benzo(b)fluoranteno	32838	17,88
benzo(a)pireno	32366	18,78

4.1.2 Solvente de extração

A Tabela 4.10 mostra os resultados obtidos na otimização do solvente de dessorção, utilizando-se a fibra de PA. Pode se observar que a diminuição da proporção do solvente orgânico favoreceu a dessorção do antraceno, e que os valores altos de desvio padrão relativo, bem como o fato da razão das médias entre o Dia 1 e Dia 2 estar fora do critério de aceitação de 0,97 a 1,03 para todos os compostos demonstram que a vida útil da fibra interfere diretamente na precisão do método.

Tabela 4.10 Valores de área e desvio padrão relativo obtidos na otimização do solvente de dessorção para a fibra de PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura: 25 °C.

	Acetonitrila/H ₂ O 60/40 Dia 1		Acetonitrila/H ₂ O 60/40 Dia 2		Razão das Médias ^a	Acetonitrila/H ₂ O 40/60	
Composto	Área média	DPR ^b	Área Média	DPR ^b		Área Média	DPR ^b

fluoreno	42080	9,08	43170	8,61	0,97	42457	0,56
fenantreno	166018	22,26	191328	10,99	0,87	881653	3,09
antraceno	564173	15,47	641549	12,20	0,88	278743	8,57
fluoranteno	54210	20,34	62877	18,19	0,86	31329	21,64
pireno	46547	22,29	53370	18,57	0,87	25476	16,48
criseno	215521	25,49	245382	33,48	0,87	77537	34,70
benzo(b)fluoranteno	159760	7,57	197438	42,08	0,81	41416	42,91
benzo(a)pireno	143905	14,08	195758	42,84	0,73	39452	14,06

a = Dia 1/Dia 2

b = desvio padrão relativo

4.1.3 Temperatura de extração

O coeficiente de distribuição do analito entre a amostra e a fibra diminui com o aumento da temperatura, considerando-se o processo de adsorção como exotérmico e que este processo seja o mecanismo predominante na interação analito/fibra. Entretanto, um aumento na temperatura aumenta a difusão do analito, facilitando a transferência de massa e, ao mesmo tempo, aumentando a solubilidade deste na amostra. ⁶⁹

As Tabelas 4.11 e 4.12 mostram os valores de área e o desvio padrão relativo obtidos na otimização da temperatura de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno, utilizando-se a fibra de poliacrilato. As Figuras 4.11 e 4.12 mostram os perfis de extração destes compostos em função do aumento de temperatura.

Pode-se observar um decréscimo na quantidade extraída destes analitos com o aumento da temperatura. Isto pode ser explicado pelo fato do tempo de extração, de 30 minutos, ser o tempo de equilíbrio de distribuição do analito entre a fibra/amostra; com o sistema em equilíbrio, fatores termodinâmicos influenciaram este decréscimo, ou seja, o mecanismo de adsorção foi

desfavorecido. Os valores de área para os compostos de maior massa molecular, como o benzo(b)fluoranteno e o benzo(a)pireno, comprovam que a cinética da distribuição não foi favorecida com o aumento da temperatura.

Tabela 4.11 Otimização da temperatura de extração para a fibra de poliacrilato (PA). Tempo de extração: 30 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C	60 °C
Composto	Área Média	Área Média	Área Média	Área Média
fluoreno	46621	11207	11467	10891
fenantreno	162316	25175	32411	22904
antraceno	363329	359338	392189	361376
fluoranteno	55156	7158	10076	8028
pireno	46465	5819	8479	6251
criseno	205883	44265	49635	43739
benzo(b)fluoranteno	128532	37097	42230	30974
benzo(a)pireno	127579	32068	38026	31726

Tabela 4.12 Desvio padrão relativo relacionado à temperatura de extração. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C	60 °C
Composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	3,17	1,10	0,89	2,39
fenantreno	7,26	21,55	13,82	8,74
antraceno	0,20	7,92	3,43	5,07
fluoranteno	6,79	26,97	10,77	18,62
pireno	5,21	29,37	9,36	17,75
criseno	2,70	13,87	21,73	22,93
benzo(b)fluoranteno	0,80	17,19	4,83	24,14
benzo(a)pireno	4,26	4,66	18,23	26,07

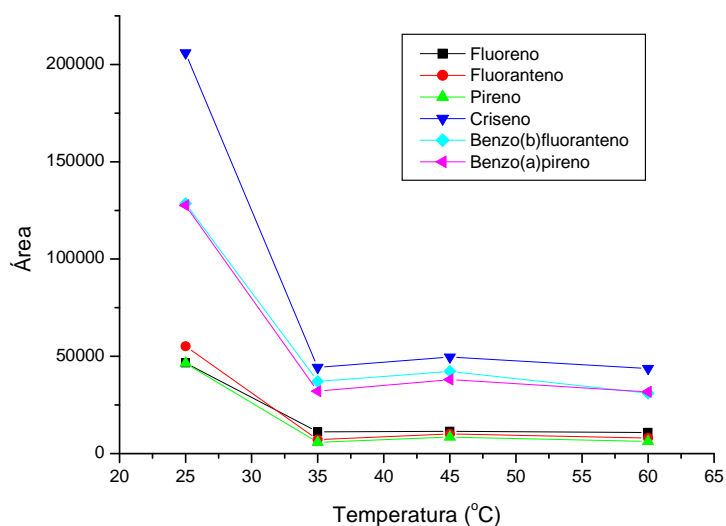


Figura 4.11 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.

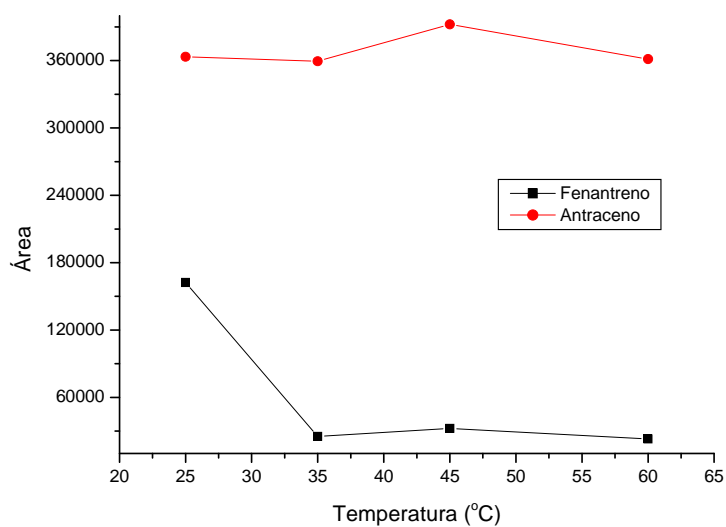


Figura 4.12 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos.

A Tabela 4.13 mostra os valores de área na otimização da temperatura de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno utilizando-se a fibra PDMS. As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os perfis de extração destes compostos variando-se a temperatura.

Pode-se observar que as quantidades extraídas dos compostos criseno e benzo(a)pireno aumentaram significativamente com o aumento de temperatura. Para o benzo(b)fluoranteno houve um máximo a 45 °C, enquanto para os outros compostos o aumento da temperatura não exerceu um efeito negativo.

O tempo de extração de 20 minutos não foi suficiente para que o equilíbrio fosse alcançado pelo analito entre a fibra e a amostra. Os dados demonstram que os efeitos obtidos pelo aumento da temperatura favoreceram a cinética da reação para os compostos de maior massa molecular, aumentando a difusão destes no recobrimento polimérico. O efeito do aumento da temperatura sobre os outros compostos não foi significativo por que a interação destes analitos com a fibra de PDMS deve ser dominada pelo mecanismo de partição. O ligeiro decréscimo pode ser atribuído ao aumento da solubilidade destes analitos apolares no meio aquoso.

Tabela 4.13 Otimização da temperatura de extração para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Tempo de extração: 20 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C	60 °C
Composto	Área	Área	Área	Área
fluoreno	38089	31841	28001	15205
fenantreno	141641	128905	122592	64743
antraceno	623945	664765	629393	504809
fluoranteno	39482	38775	44574	30805
pireno	33396	32353	37858	26163
criseno	14804	18600	53819	134870
benzo(b)fluoranteno	20964	31602	90410	36273
benzo(a)pireno	19767	28039	79969	127529

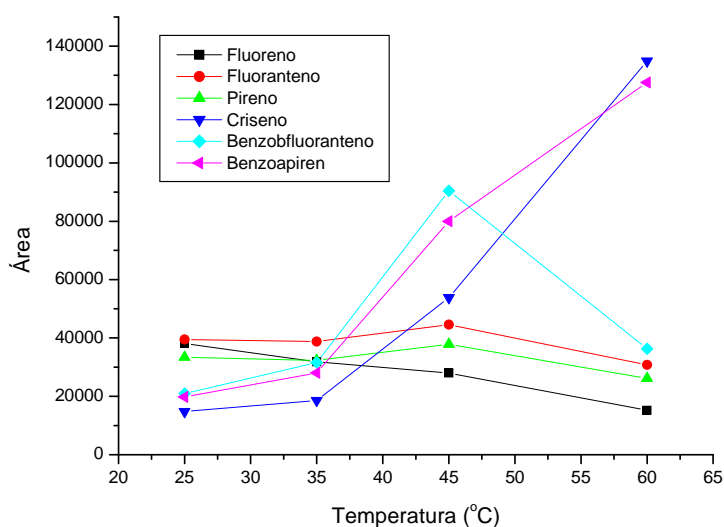


Figura 4.13 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos.

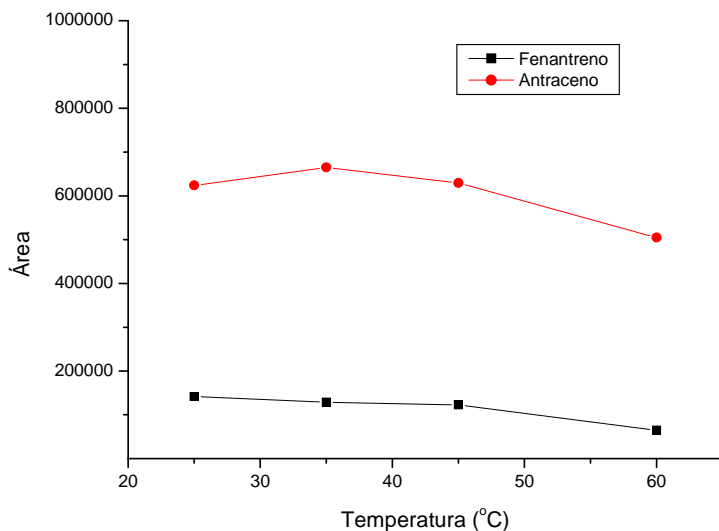


Figura 4.14 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos.

A Tabela 4.14 mostra os valores de área obtidos na otimização da temperatura de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno utilizando-se a fibra CW/TRP. As Figuras 4.14 e 4.15 mostram os perfis de extração destes compostos em função do aumento de temperatura.

Pode-se observar que o aumento da temperatura não produziu aumento significativo na eficiência de extração dos hidrocarbonetos pela fibra CW/TRP, ocorrendo apenas um pequeno decréscimo nas quantidades extraídas. O tempo de extração de 40 minutos foi o tempo de equilíbrio atingido para a maioria dos analitos na otimização do tempo de extração. Este decréscimo na adsorção com o aumento da temperatura é devido ao decréscimo no coeficiente de distribuição. Como a adsorção é, geralmente, um processo exotérmico, e o equilíbrio já tinha sido atingido, ou estava próximo de ser

atingido, a quantidade de analito extraída diminuiu com o aumento da temperatura.⁶⁸

Tabela 4.14 Otimização da temperatura de extração para a fibra de carbowax/templeted resin (CW/TRP). Tempo de extração: 40 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C
Composto	Área	Área	Área
fluoreno	70753	50060	43724
fenantreno	319063	273623	229145
antraceno	1043214	1006952	859746
fluoranteno	99116	95150	72264
pireno	80494	79737	59204
criseno	64030	55872	63994
benzo(b)fluoranteno	70075	97868	90709
benzo(a)pireno	41055	83392	77416

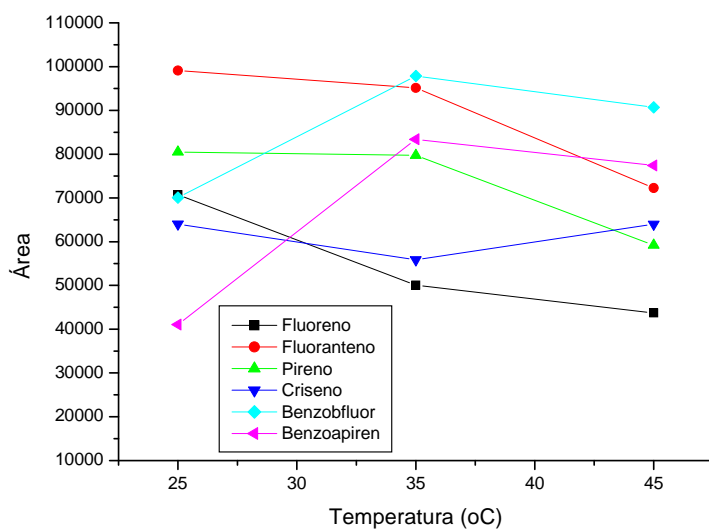


Figura 4.15 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos.

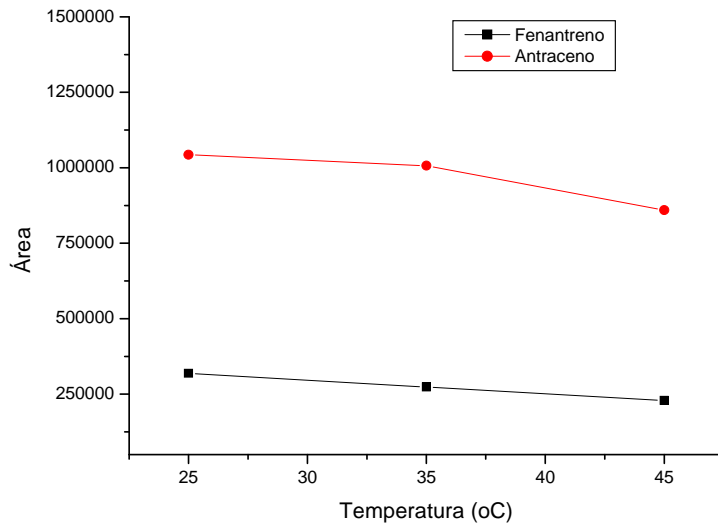


Figura 4.16 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos.

As Tabelas 4.15 e 4.16 mostram os valores de área e de desvio padrão obtidos na otimização da temperatura de extração dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno utilizando-se a fibra C18 “lab made”. A Figura 4.17 mostra os perfis de extração destes compostos em função do aumento de temperatura.

Os valores de área não foram alterados significativamente com o aumento da temperatura, com exceção dos compostos criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Estes compostos tiveram um decréscimo significativo na quantidade extraída pela fibra “lab made”. Isto se deve, provavelmente, ao fato do sistema estar em equilíbrio e do aumento da temperatura ter aumentado a solubilidade destes compostos na amostra.

Tabela 4.15 Otimização da temperatura de extração para a fibra C18 “lab made”. Tempo de extração: 40 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C	60 °C
Composto	Área Média	Área Média	Área Média	Área Média
fluoreno	12816	13953	13822	15344
fenantreno	15956	11371	12481	5376
antraceno	353663	334910	336432	277581
fluoranteno	6531	5449	4885	1298
pireno	5197	3849	4879	2783
criseno	63979	29365	39993	13627
benzo(b)fluoranteno	73344	39580	47220	17334
benzo(a)pireno	70840	36460	45383	16814

Tabela 4.16 Desvio padrão relativo relacionado temperatura de extração. Fibra: C18 “lab made”. Tempo de extração: 40 minutos.

	25 °C	35 °C	45 °C	60 °C
composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	4,25	15,85	15,26	12,60
fenantreno	9,08	20,22	11,54	9,50
antraceno	0,80	17,73	9,85	13,26
fluoranteno	4,89	28,59	24,45	7,79
pireno	13,14	17,84	12,81	78,35
criseno	18,25	54,23	19,28	12,84
benzo(b)fluoranteno	9,07	27,86	20,01	13,95
benzo(a)pireno	8,86	32,27	16,78	17,54

a = desvio padrão relativo

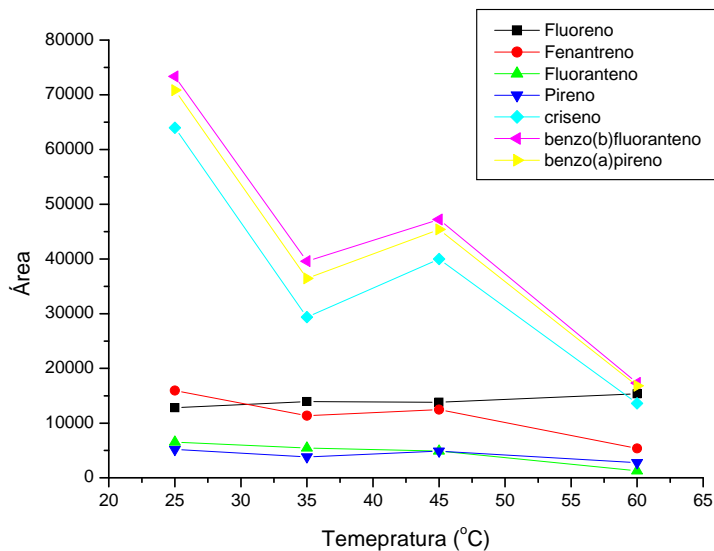


Figura 4.17 Variação da área versus temperatura de extração para os compostos fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: C18 “lab made”. Tempo de extração: 40 minutos.

4.1.4 Força iônica do meio

O aumento da força iônica do meio ou seja, a adição de uma determinada quantidade de sal na amostra pode diminuir a solvatação das moléculas do analito, devido a dois fatores; a) a solvatação preferencial das moléculas do sal pela água; e b) polaridade do analito.

A diminuição da solubilidade do analito na amostra pode aumentar a quantidade do analito extraída pela fibra de SPME. Neste processo ocorre o aumento na constante de partição K entre a fase de recobrimento/analito.^{5,7}

As Tabelas 4.17 e 4.18 mostram os valores de área e o desvio padrão encontrados na otimização da força iônica do meio para a fibra de poliacrilato. As Figuras 4.18 e 4.19 mostram os perfis de extração relacionados ao aumento da força iônica.

A Tabela 4.19 mostra os valores de área encontrados na otimização da força iônica do meio para a fibra de polidimetilsiloxano. As Figuras 4.20 e 4.21 mostram os perfis de extração relacionados ao aumento da força iônica.

A Tabela 4.20 mostra os valores de área encontrados na otimização da força iônica do meio para a fibra de carbowax/templeted. As Figuras 4.22 e 4.23 mostram os perfis de extração relacionados ao aumento da força iônica.

Tabela 4.17 Otimização da força iônica do meio para a fibra de poliacrilato (PA). Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl
Composto	Área Média	Área Média	Área Média	Área Média
fluoreno	46621	15044	13247	18890
fenantreno	162316	51844	55801	44906
antraceno	363329	421612	453821	499455
fluoranteno	55156	14226	17775	19814
pireno	46465	11603	14389	5548
criseno	205883	65810	90913	75118
benzo(b)fluoranteno	128532	47330	66752	57195
benzo(a)pireno	127579	47835	67220	53054

Tabela 4.18 Desvio padrão relativo relacionado a força iônica do meio. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl
Composto	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)	DPR ^a (%)
fluoreno	3,17	20,81	11,60	32,39
fenantreno	7,26	18,42	11,66	30,10
antraceno	0,20	6,71	2,76	10,72
fluoranteno	6,79	17,39	8,93	34,23
pireno	5,21	14,70	7,58	95,33
criseno	2,70	11,83	3,92	31,32
benzo(b)fluoranteno	0,80	7,62	5,19	32,80
benzo(a)pireno	4,26	6,76	10,04	23,86

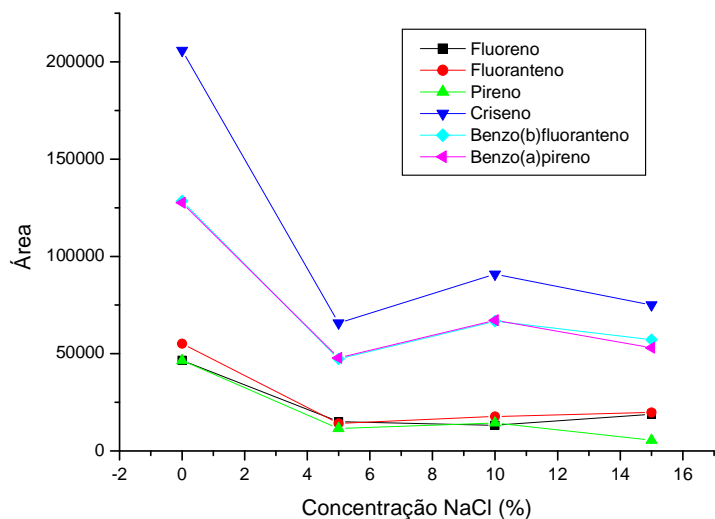


Figura 4.18 Variação da área versus força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

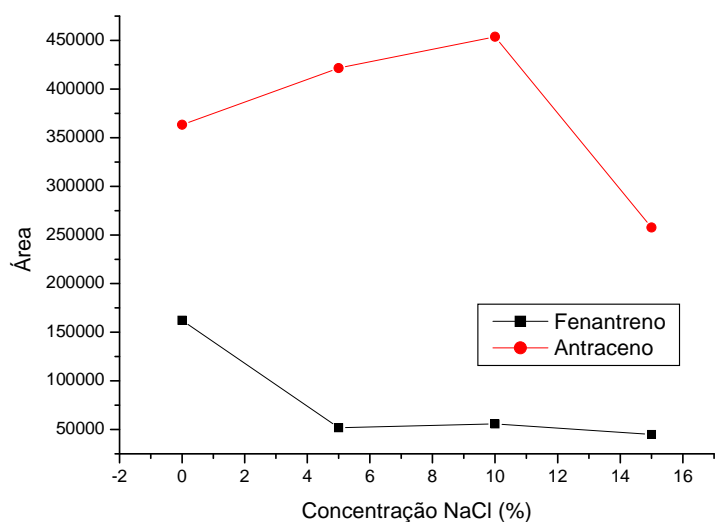


Figura 4.19 Variação da área versus força iônica do meio de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PA. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

Tabela 4.19 Otimização da força iônica do meio para a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.

	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl
Composto	Área	Área	Área	Área
fluoreno	28001	35829	38023	33834
fenantreno	122592	141961	136967	104347
antraceno	629393	667672	610643	490027
fluoranteno	44574	42829	38084	28130
pireno	37858	35505	31210	22980
criseno	53819	37994	34566	24513
benzo(b)fluoranteno	90410	52594	44582	27958
benzo(a)pireno	79969	28039	40323	25136

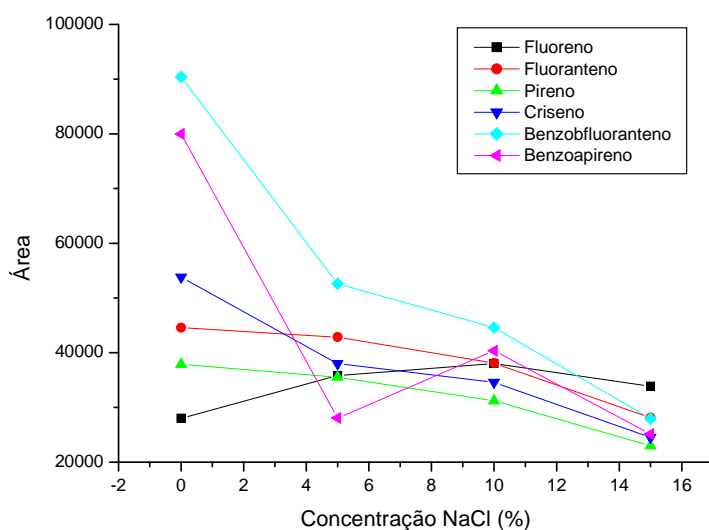


Figura 4.20 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.

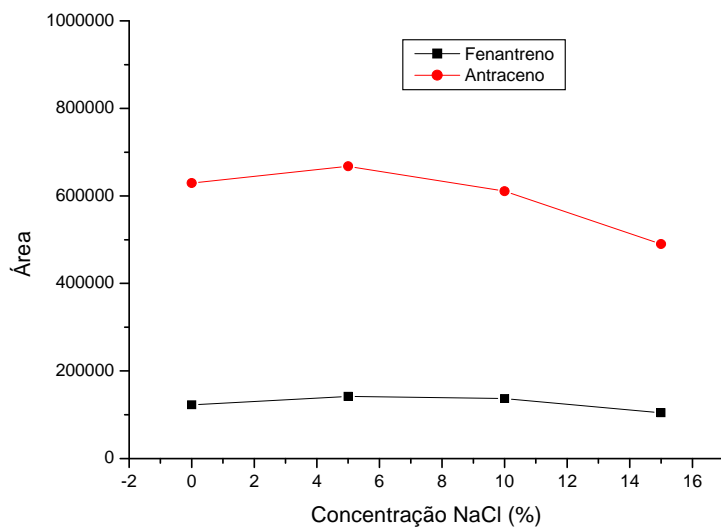


Figura 4.21 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fenantreno e antraceno. Fibra: PDMS. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.

Tabela 4.20 Otimização da força iônica do meio para a fibra carbowax/templated resin (CW/TRP). Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.

	0% NaCl	5% NaCl	10% NaCl
Composto	Área	Área	Área
fluoreno	70753	58694	55630
fenantreno	319063	234335	202683
antraceno	1043214	782224	583950
fluoranteno	99116	60202	48483
pireno	80494	49129	38824
criseno	64030	31339	25867
benzo(b)fluoranteno	70075	44374	24087
benzo(a)pireno	41055	41261	21970

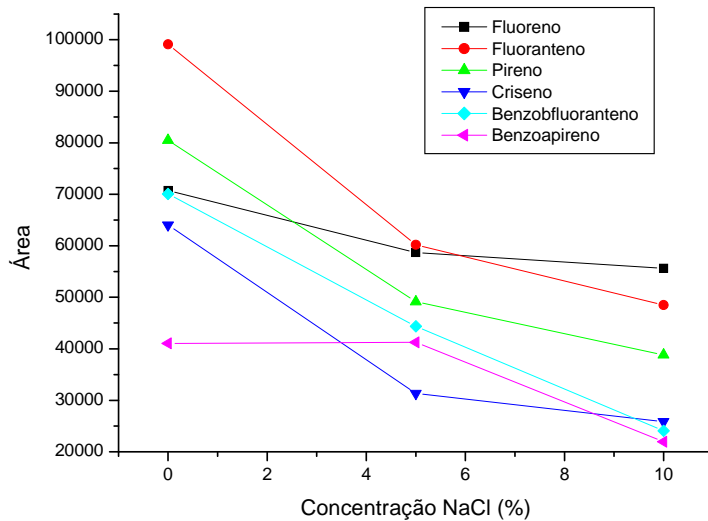


Figura 4.22 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.

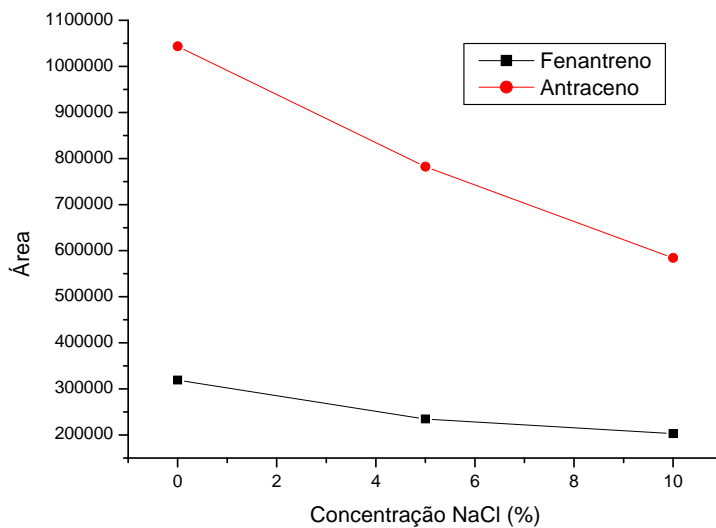


Figura 4.23 Variação da área versus a força iônica do meio de extração para os compostos fluoreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno. Fibra: CW/TRP. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.

Os valores de área tiveram um decréscimo significativo com o aumento da força iônica, principalmente para os hidrocarbonetos de maior massa molecular. Huang et al ⁶⁸ analisaram o efeito do aumento da força iônica na extração de s-triazinas e concluíram que a quantidade extraída das aminas aumentou com o aumento da concentração salina. Já Cardenes et al ¹⁵ analisaram o mesmo efeito em aminas heterocíclicas e observaram que o aumento da força iônica teve um efeito negativo na extração das aminas. Segundo Millan et al ²², existe uma concordância de que a adição de um sal na amostra exerce um efeito positivo na eficiência de extração da maior parte das amostras; entretanto algumas discrepâncias foram encontradas e não existe nenhuma relação direta entre a eficiência de extração e a adição de sal.

Lee et al ⁷⁰ também observaram um decréscimo na massa extraída na análise de PAHs por SPME/GC utilizando fibras com revestimento octadecilsilano, quando 5% de cloreto de sódio foi adicionado a amostra. Eles observaram que o efeito foi mais significativo para os hidrocarbonetos com maior número de anéis. Segundo os autores, somente 20% dos hidrocarbonetos foram extraídos da solução saturada de cloreto de sódio quando comparado com uma solução sem sal adicionado. Eles atribuíram o fato a deposição do sal na superfície da fibra, diminuindo o número de sítios ativos disponíveis para a adsorção.

4.1.5 Dados da recuperação obtida nas condições otimizadas de extração

A Tabela 4.21 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) encontrados nas condições otimizadas de extração “off line” para a fibra de poliacrilato. Os valores de recuperação variaram de 9,73% a 21,49%.

A Tabela 4.22 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) encontrados nas condições otimizadas de extração “off line” para uma fibra de poliacrilato **nova**. Os valores de recuperação variaram de 30,45% a 70,36%.

A Tabela 4.23 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) determinados nas condições otimizadas de extração “off line” para a fibra de polidimetilsiloxano. Os valores de recuperação variaram de 9,08% a 24,94%.

A Tabela 4.24 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) determinados nas condições otimizadas de extração “off line” para a fibra de carbowax/templeted resin. Os valores de recuperação variaram de 5,45% a 41,33%.

A Tabela 4.25 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) determinados nas condições otimizadas de extração “off line” para a fibra C18 “lab made”. Os valores de recuperação variaram de 2,11% a 14,01%.

A Tabela 4.26 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) encontrados nas condições otimizadas de extração “off line” para a fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno. Os valores de recuperação variaram de 1,11% a 24,04%.

A Tabela 4.27 mostra os valores de concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) e recuperação (%) determinados na limpeza da fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno. Os valores de recuperação variaram de 1,58% a 10,35%.

Tabela 4.21 Recuperação obtida com a fibra de poliacrilato (PA) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

Composto	Concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	Concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	Recuperação (%)
fluoreno	0,3895	0,0973	1,0	9,73
fenantreno	0,5359	0,1340	1,0	13,40
antraceno	0,5751	0,1438	1,0	14,38
fluoranteno	0,7531	0,1883	1,0	18,83
pireno	0,7542	0,1885	1,0	18,85
criseno	0,8595	0,2149	1,0	21,49
benzo(b)fluoranteno	0,6997	0,1749	1,0	17,49
benzo(a)pireno	0,6771	0,1693	1,0	16,93

Tabela 4.22 Recuperação obtida com uma fibra nova de poliacrilato (PA) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	1,2179	0,3045	1,0	30,45
fenantreno	1,7427	0,4357	1,0	43,57
antraceno	1,8128	0,4532	1,0	45,32
fluoranteno	2,3088	0,5772	1,0	57,72
pireno	2,3367	0,5842	1,0	58,42
criseno	2,8145	0,7036	1,0	70,36
benzo(b)fluoranteno	2,3385	0,5846	1,0	58,46
benzo(a)pireno	1,8289	0,4572	1,0	45,72

Tabela 4.23 Recuperação obtida com a fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 20 minutos. Temperatura 45 °C.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	0,2339	0,0585	1,0	5,08
fenantreno	0,4046	0,1011	1,0	10,11
antraceno	0,9975	0,2494	1,0	24,94
fluoranteno	0,6086	0,1521	1,0	15,21
pireno	0,6145	0,1536	1,0	15,36
criseno	0,4922	0,1230	1,0	5,62
benzo(b)fluoranteno	0,4244	0,1061	1,0	12,30
benzo(a)pireno	0,2247	0,0562	1,0	10,61

Tabela 4.24 Recuperação obtida com a fibra carbowax/templated resin (CW/TRP) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	0,5912	0,1478	1,0	14,78
fenantreno	1,0535	0,2634	1,0	26,34
antraceno	1,6533	0,4133	1,0	41,33
fluoranteno	1,3533	0,3383	1,0	33,83
pireno	1,3066	0,3266	1,0	32,66
criseno	0,2673	0,0668	1,0	6,68
benzo(b)fluoranteno	0,3815	0,0954	1,0	9,54
benzo(a)pireno	0,2179	0,0545	1,0	5,45

Tabela 4.25 Recuperação obtida com a fibra C18 “lab made” nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 40 minutos. Temperatura 25 °C.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	0,1039	0,0259	1,0	2,59
fenantreno	0,0527	0,0260	1,0	2,60
antraceno	0,5605	0,1401	1,0	14,01
fluoranteno	0,0892	0,0223	1,0	2,23
pireno	0,0843	0,0211	1,0	2,11
criseno	0,2671	0,0668	1,0	6,68
benzo(b)fluoranteno	0,3993	0,0998	1,0	9,98
benzo(a)pireno	0,3760	0,0940	1,0	9,40

Tabela 4.26 Recuperação obtida com a fibra polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) nas condições otimizadas de extração. Tempo de extração: 30 minutos. Temperatura 25 °C.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	0,2900	0,0725	1,0	7,25
fenantreno	0,0445	0,0111	1,0	1,11
antraceno	0,9618	0,2404	1,0	24,04
fluoranteno	0,6313	0,1578	1,0	15,78
pireno	0,5935	0,1484	1,0	14,84
criseno	0,6529	0,1632	1,0	16,32
benzo(b)fluoranteno	0,7232	0,1808	1,0	18,08
benzo(a)pireno	0,6543	0,1636	1,0	16,36

Tabela 4.27 Recuperação obtida na etapa de limpeza da fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Tempo de dessorção: 20 minutos.

Composto	Concentração obtida (µg/mL)	Concentração obtida (µg/fibra)	Concentração teórica (µg/fibra)	Recuperação (%)
fluoreno	-	-	-	-
fenantreno	-	-	-	-
antraceno	0,4141	0,1035	1,0	10,35
fluoranteno	0,0632	0,0158	1,0	1,58
pireno	0,0758	0,0189	1,0	1,89
criseno	0,1261	0,0315	1,0	3,15
benzo(b)fluoranteno	0,1788	0,0447	1,0	4,47
benzo(a)pireno	0,1718	0,0429	1,0	4,29

A Tabela 4.28 mostra uma comparação entre as recuperações obtidas por todas as fibras estudadas, nas condições otimizadas. O melhor desempenho foi obtido pelas fibras de caráter mais polar, o que não deixa de ser surpreendente em se tratando da análise de PAHs. Uma explicação provável seria a etapa de dessorção da análise por HPLC; possivelmente os hidrocarbonetos ficam fortemente retidos pelos recobrimentos mais apolares, o

que dificulta a sua posterior dessorção. Chen e Pawliszyn ¹³ verificaram a mesma dificuldade de dessorção dos PAHs de uma fibra de PDMS utilizando a técnica SPME/GC.

Os dados de recuperação também não encontram respaldo na literatura, para este tipo de composto. Chen ⁴⁰, na extração e dessorção “off line” de PAHs utilizando uma fibra de PDMS determinou percentuais de recuperação variando de 88,7% a 98%, com desvios padrão relativos de 2,3 a 4,8%. A massa teórica de ativo/fibra foi de 2,40 µg. Alpendurada ⁴⁹, utilizando uma interface comercial SPME/HPLC encontrou percentuais de recuperação de 73 a 104%, com desvios padrão relativos de 4,6 a 29,4%. A massa teórica de ativo/fibra foi de 100 µg.

Uma explicação para a diferença nos percentuais de recuperação encontrados pode ser o nível de concentração avaliado. Mas a técnica de extração tem como variáveis dependentes a espessura da fibra, e o coeficiente de distribuição entre analito/fibra e analito/amostra; e os cálculos referentes a estas taxas de recuperação não são suficientemente claros nos artigos citados. Portanto, devido a estes fatores, conclui-se que os dados experimentais obtidos até agora indicam que a extração de PAHs por SPME/HPLC possui taxas de recuperação abaixo de 70%.

Tabela 4.28 Comparação entre as recuperações obtidas pelas fibras de SPME nas condições otimizadas.

	PA	PA nova	PDMS	CW/TRP	PDMS/DVB	C18
fluoreno	9,73	30,45	5,10	14,78	7,25	2,59
fenantreno	13,40	43,57	10,11	26,34	1,11	2,60
antraceno	14,38	45,32	24,94	41,33	26,04	14,01

fluoranteno	18,83	57,72	15,21	33,83	15,78	2,23
pireno	18,85	58,42	15,36	32,66	14,84	2,11
criseno	21,49	70,36	5,62	6,68	16,32	6,68
benzo(b)fluoranteno	17,49	58,46	12,30	9,54	18,08	9,98
benzo(a)pireno	16,93	45,72	10,61	5,45	16,36	9,40

4.1.6 Teste da interface com as fibras PA e CW/TRP

As Tabelas 4.29 e 4.30 mostram os valores de concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$), desvio padrão relativo (%) e recuperação (%) encontrados na análise dos PAHs utilizando a interface “lab made” SPME/HPLC com as fibras de poliacrilato e carbowax/templated resin. Os dados de recuperação não se alteraram com a utilização da interface, mas os valores de precisão ficaram abaixo de 10%, o que atende aos critérios internacionais para a análise de resíduos nesta faixa de concentração. Apesar da fibra de poliacrilato apresentar melhores resultados com relação aos percentuais de recuperação, preferiu-se validar o método com a fibra carbowax/templated resin, por esta ser mais estável perante a presença de solventes orgânicos.

Tabela 4.29 Dados de recuperação e desvio padrão relativo obtido com a interface SPME/LC utilizando a fibra de PA.

	Área média	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	$C_{\text{teórica}}$ ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	DPR(%) ^a	R (%) ^b
fluoreno	478542	1,6562	0,0828	1,0	5,53	8,28
fenantreno	1824967	2,2758	0,1138	1,0	5,26	11,38
antraceno	3935001	3,4418	0,1721	1,0	5,09	17,21

fluoranteno	563382	2,8312	0,1416	1,0	2,39	14,16
pireno	467417	2,5315	0,1266	1,0	0,92	12,66
criseno	2171564	3,0111	0,1506	1,0	5,95	15,06
benzo(b)fluoranteno	1482870	2,6888	0,1344	1,0	4,89	13,44
benzo(a)pireno	1242006	2,6778	0,1339	1,0	8,35	13,39

a = desvio padrão relativo

b = recuperação

Tabela 4.30 Dados de recuperação e desvio padrão relativo obtido com a interface SPME/LC utilizando a fibra CW/TRP.

	Área média	C _{obtida} (µg/mL)	C _{obtida} (µg/fibra)	C _{teórica} (µg/fibra)	DPR(%) ^a	R (%) ^b
fluoreno	183985	0,6368	0,0318	1,0	0,52	3,18
fenantreno	663621	0,8276	0,0414	1,0	4,52	4,14
antraceno	1675411	1,4654	0,0733	1,0	2,01	7,33
fluoranteno	324764	1,6320	0,0816	1,0	2,79	8,16
pireno	255708	1,3849	0,0692	1,0	4,94	6,92
criseno	1491315	2,0679	0,1034	1,0	8,80	10,34
benzo(b)fluoranteno	1332277	2,3321	0,1166	1,0	13,52	11,66
benzo(a)pireno	1174803	2,3834	0,1192	1,0	13,46	11,92

4.2 Validação do método analítico utilizando a fibra CW/TRP e a interface SPME-LC

Neste item estão descritos os parâmetros estudados na validação do método analítico: linearidade da amostra, linearidade do padrão, exatidão e precisão.

4.2.1 Linearidade da amostra

A linearidade da amostra foi analisada na faixa de 0,025 $\mu\text{g}/\text{fibra}$ a 0,500 $\mu\text{g}/\text{fibra}$, utilizando cinco níveis de concentração e analisando cada nível de concentração em duplicata. A Tabela 4.31 indica os valores obtidos para cada nível de concentração. A Figura 4.24 mostra a curva analítica da concentração obtida versus a concentração teórica dos compostos analisados. A Tabela 4.32 mostra as equações da reta e os coeficientes de correlação determinados.

Todos os critérios de aceitação para a linearidade da amostra foram atingidos; obtiveram-se coeficientes de correlação iguais a 0,999 para todos os compostos analisados.

Tabela 4.31 Dados de concentração teórica ($\mu\text{g}/\text{fibra}$) versus concentração obtida ($\mu\text{g}/\text{fibra}$).

	0,025 $\mu\text{g}/\text{fibra}$	0,050 $\mu\text{g}/\text{fibra}$	0,100 $\mu\text{g}/\text{fibra}$	0,250 $\mu\text{g}/\text{fibra}$	0,500 $\mu\text{g}/\text{fibra}$
composto	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)	C_{obtida} ($\mu\text{g}/\text{fibra}$)
fluoreno	0,0013	0,0024	0,0043	0,0107	0,0208
fenantreno	0,0027	0,0047	0,0084	0,0184	0,0349
antraceno	0,0025	0,0064	0,0090	0,0216	0,0414
fluoranteno	0,0032	0,0067	0,0122	0,0297	0,0587
pireno	0,0034	0,0066	0,0126	0,0303	0,0601
criseno	0,0048	0,0096	0,0188	0,0469	0,0949
benzo(b)fluoranteno	0,0047	0,0095	0,0190	0,0491	0,1013
benzo(a)pireno	0,0043	0,0090	0,0178	0,0458	0,0952

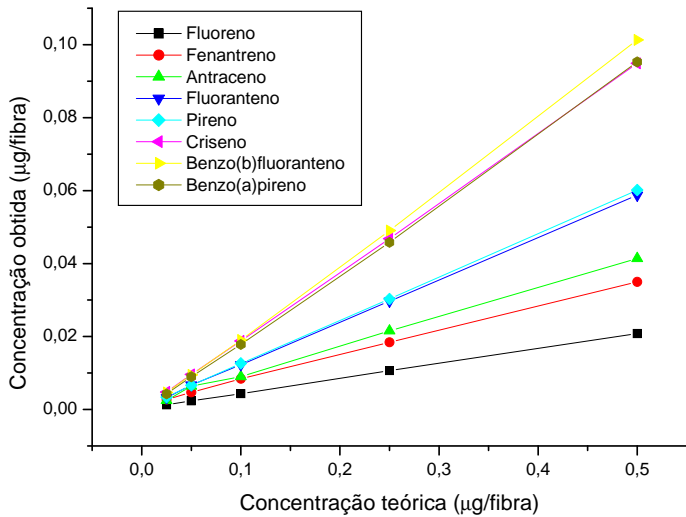


Figura 4.24 Curva da concentração obtida (µg/fibra) versus a concentração teórica (µg/fibra) para os compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno.

Tabela 4.32 Equação da reta e coeficiente de correlação (R) dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno obtidos no parâmetro linearidade da amostra.

	Equação da reta	R (coeficiente de correlação)
fluoreno	$y = 0,04113x + 0,00030$	0,99996
fenantreno	$y = 0,06751x + 0,00137$	0,99981
antraceno	$y = 0,08038x + 0,00192$	0,99900
fluoranteno	$y = 0,1163x + 0,000610$	0,99995
pireno	$y = 0,11909x + 0,00059$	0,99998
criseno	$y = 0,18949x - 0,00006$	0,99997
benzo(b)fluoranteno	$y = 0,20367x + 0,00095$	0,99988
benzo(pireno)	$y = 0,19146x - 0,00098$	0,99983

4.2.2 Linearidade do padrão

A linearidade da amostra foi analisada na faixa de 0,5 µg/mL a 10,0 µg/mL, utilizando cinco níveis de concentração e analisando cada nível de concentração em duplicata. A Tabela 4.33 indica os valores obtidos para cada nível de concentração. A Figura 4.25 mostra a curva analítica da concentração obtida versus a concentração teórica dos compostos analisados. A Tabela 4.34 mostra as equações da reta e os coeficientes de correlação determinados.

Todos os critérios de aceitação para a linearidade do padrão foram atingidos; obtiveram-se coeficientes de correlação iguais ou maiores que 0,98 para todos os compostos analisados.

Tabela 4.33 Dados de área versus concentração (µg/mL).

	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	2,0 µg/mL	5,0 µg/mL	10,0 µg/mL
composto	Área média	Área média	Área média	Área média	Área média
fluoreno	140671	281341	577465	1444708	2889416
fenantreno	358442	716884	1440679	4009478	8018957
antraceno	753098	1506196	2944184	5716517	11433035
fluoranteno	95177	190353	392128	994969	1989939
pireno	87544	175087	356411	923211	1846422
criseno	336855	673709	1360662	3605934	7211868
benzo(b)fluoranteno	260907	521814	1055354	2856379	5712759
benzo(a)pireno	206705	413361	853528	2464563	4929127

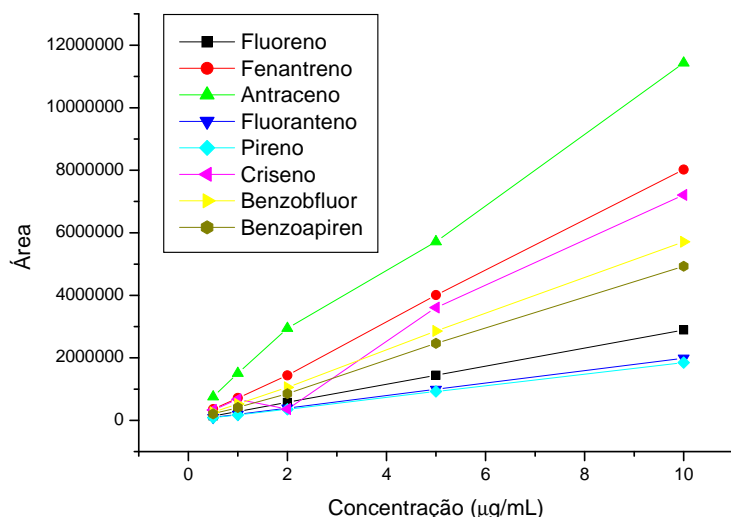


Figura 4.25 Gráfico ilustrando a variação da área versus a concentração (µg/mL) para os compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno.

Tabela 4.34 Equação da reta e coeficiente de correlação (R) dos compostos fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno obtidos no parâmetro linearidade do padrão.

	Equação da reta	R (coeficiente de correlação)
fluoreno	$y = 289481x - 4362$	1,00000
fenantreno	$y = 812297x - 96613$	0,99985
antraceno	$y = 1099970x + 400735$	0,99872
fluoranteno	$y = 199756x - 6585$	1,00000
pireno	$y = 185661x - 9211$	0,99998
criseno	$y = 754246x - 352904$	0,98827
benzo(b)fluoranteno	$y = 577116x - 53886$	0,99992
benzo(a)pireno	$y = 502085x - 84260$	0,99976

4.2.3 Exatidão e Precisão

A exatidão foi avaliada em três níveis de fortificação: 0,025, 0,100 e 0,500 $\mu\text{g}/\text{fibra}$, cada nível de concentração sendo analisado em duplicata. As Tabelas 4.35, 4.36 e 4.38 mostram os dados obtidos para o parâmetro exatidão. Para o nível de concentração de 0,025 $\mu\text{g}/\text{fibra}$, os valores de recuperação variaram de 6,34 a 28,44%, com desvios padrões relativos de 13,13 a 26,42 %. Estes valores de desvio padrão são aceitáveis se considerarmos este nível de concentração como o limite de quantificação dos compostos analisados ou próximo dele. Para o nível de concentração de 0,100 $\mu\text{g}/\text{fibra}$, os valores de recuperação variaram de 4,55 a 19,60%, com desvios padrões relativos de 0,50 a 4,63 %. No nível de concentração de 0,500 $\mu\text{g}/\text{fibra}$, os valores de recuperação variaram de 4,10 a 19,76%, com desvios padrões relativos de 0,31 a 2,60 %.

Estes valores indicam que a massa de analito influi diretamente na quantidade extraída pela técnica; porém baixos valores de massa apresentam desvios maiores. De acordo com as condições desenvolvidas no método, a SPME teria atingido os critérios internacionais para determinação de PAHs em água se o método fosse capaz de determinar uma concentração da ordem de 0,0005 $\mu\text{g}/\text{fibra}$ ou 0,5 ng/fibra .

Os valores de repetibilidade estão indicados na Tabela 4.36 e os dados de precisão intermediária estão indicados na Tabela 4.37. A Tabela 4.39 indica os valores de razão das médias entre o Dia 1 e o Dia 2.

Obteve-se coeficientes de variação menores que 5% na concentração de trabalho (0,1 µg/fibra). A razão das médias ficou entre 0,96 e 1,03. Os critérios de aceitação para o item precisão foram todos atingidos. Pode-se considerar o método preciso e linear dentro da faixa de concentração estudada.

Tabela 4.35 Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,0250 µg/fibra.

0,0250 µg/fibra						
	Área média	C _{obtida} (µg/mL)	C _{obtida} (µg/fibra)	C _{teórica} (µg/fibra)	DPR(%) ^a	R (%) ^b
fluoreno	9151	0,0317	0,0016	0,0250	17,49	6,34
fenantreno	42395	0,0589	0,0029	0,0250	15,01	11,77
antraceno	102473	0,0696	0,0035	0,0250	19,85	13,92
fluoranteno	15602	0,0796	0,0040	0,0250	14,01	15,92
pireno	15026	0,0843	0,0042	0,0250	13,13	16,86
criseno	92506	0,1360	0,0068	0,0250	19,34	27,19
benzo(b)fluoranteno	75036	0,1422	0,0071	0,0250	24,33	28,44
benzo(a)pireno	58962	0,1382	0,0069	0,0250	26,42	27,63

Tabela 4.36 Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,100 µg/fibra (Precisão Dia 1)

0,100 µg/fibra (Dia 1)

	Área média	C _{obtida} (µg/mL)	C _{obtida} (µg/fibra)	C _{teórica} (µg/fibra)	DPR(%) ^a	R (%) ^b
fluoreno	26298	0,0911	0,0046	0,1000	0,90	4,55
fenantreno	116746	0,1621	0,0081	0,1000	1,07	8,10
antraceno	281661	0,1913	0,0096	0,1000	0,50	9,57
fluoranteno	48677	0,2482	0,0124	0,1000	1,53	12,41
pireno	46084	0,2586	0,0129	0,1000	1,42	12,93
criseno	263329	0,3871	0,0194	0,1000	2,85	19,35
benzo(b)fluoranteno	206814	0,3919	0,0196	0,1000	4,63	19,60
benzo(a)pireno	158251	0,3708	0,0185	0,1000	3,81	18,54

Tabela 4.37 Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,100 µg/fibra (Precisão Dia 2)

0,100 µg/fibra (Dia 2)						
	Área média	C _{obtida} (µg/mL)	C _{obtida} (µg/fibra)	C _{teórica} (µg/fibra)	DPR(%) ^a	R (%) ^b
fluoreno	25474	0,0882	0,0044	0,1000	0,73	4,41
fenantreno	114818	0,1594	0,0080	0,1000	0,14	7,97
antraceno	275971	0,1875	0,0094	0,1000	0,23	9,37
fluoranteno	47427	0,2419	0,0121	0,1000	0,07	12,09
pireno	44958	0,2523	0,0126	0,1000	0,18	12,61
criseno	263799	0,3878	0,0194	0,1000	0,21	19,39
benzo(b)fluoranteno	210554	0,3990	0,0200	0,1000	0,46	19,95
benzo(a)pireno	165333	0,3874	0,0194	0,1000	1,23	19,37

Tabela 4.38 Dados de recuperação e desvio padrão relativo para o nível de concentração 0,500 µg/fibra.

0,500 µg/fibra						
	Área	C _{obtida}	C _{obtida}	C _{teórica}	DPR(%)	R

	média	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/fibra}$)	($\mu\text{g/fibra}$)	^a	(%) ^b
fluoreno	118510	0,4104	0,0205	0,5000	2,14	4,10
fenantreno	498051	0,6914	0,0346	0,5000	2,04	6,91
antraceno	124085 2	0,8429	0,0421	0,5000	1,90	8,43
fluoranteno	227644	1,1611	0,0581	0,5000	1,65	11,6 1
pireno	209652	1,1765	0,0588	0,5000	1,56	11,7 6
criseno	127834 5	1,8790	0,0940	0,5000	2,57	18,7 9
benzo(b)fluoranteno	104447 7	1,9794	0,0990	0,5000	2,69	19,7 9
benzo(a)pireno	813275	1,9057	0,0953	0,5000	0,31	19,0 6

Tabela 4.39 Razão das médias do parâmetro precisão (Dia 1/Dia 2)

	Razão das médias (Dia 1/Dia 2)
fluoreno	1,03
fenantreno	1,02
antraceno	1,02
fluoranteno	1,03
pireno	1,02
criseno	0,99
benzo(b)fluoranteno	0,98
benzo(a)pireno	0,96

5. Conclusões

A Micro Extração em Fase Sólida (SPME) demonstrou ser uma técnica simples e precisa na análise de PAHs em água. O método validado é preciso e linear, mas não é exato e sensível, de acordo com normas e guias internacionais, que estabelecem uma faixa de recuperação de 70 a 120 % para a análise de resíduos e uma concentração máxima de 100 ng/L para os PAHs.

A extração dos PAHs em amostras de água foi afetada pelo tempo de extração, tipo de fibra, temperatura de extração e força iônica do meio. De modo geral, um maior tempo de extração favoreceu a sorção dos PAHs, enquanto que um aumento na temperatura e na força iônica do meio dificultaram a extração destes compostos. As condições otimizadas para a extração dos PAHs foram: fibra Carbowax/templated resin de 50 μm , 40 minutos, 25 $^{\circ}\text{C}$, sem adição de sal.

O método não pode ser proposto para uma análise quantitativa de rotina devido aos baixos valores de recuperação obtidos, mas a técnica pode ser uma

ferramenta poderosa na identificação destes compostos, desde que estudos de seletividade sejam desenvolvidos.

A SPME, como técnica de rotina, apesar da sua simplicidade, apresenta algumas desvantagens: a extração de 40 minutos é demorada, e só seria viável se o laboratório disposto a utilizá-la tivesse uma grande quantidade de fibras disponíveis. Além disso, o tempo de vida útil da fibra influi diretamente nos resultados obtidos, o que não acontece com técnicas como a Extração Líquido Líquido (ELL) ou com a Extração em Fase Sólida (SPE).

O acoplamento da técnica com a cromatografia líquida é viável, mas sem dúvida alguma a maior aplicação da SPME ainda está na sua proposição original: uma técnica de campo simples para identificação de compostos voláteis, analisados por cromatografia gasosa.

6. Referências

1. PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction theory and practice**. Wiley, Ontário, 1997.
2. ALPENDURADA, M.F. Solid phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 889, p. 3-14, 2000.
3. LOUCH, D.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused sílica fibers. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1187-1199, 1992.
4. ZHANG, Z.; YANG, M.J.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 844^a-851^a, 1994.
5. LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 153-193, 2000.
6. PEÑALVER, A.E.; POCURULL, E.; MARCÉ, B.R.M. Trends in solid phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 557-568, 1999.
7. PAWLISZYN, J. **Applications of solid phase microextraction**. Royal Society of Chemistry, RSC Chromatograph Series, Cambridge, 1999, 655 páginas.

8. PAWLISZYN, J. Theory of solid phase microextraction. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 270-277, 2000.
9. GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers. **Analyst**, v. 124, p. 643-649, 1999.
10. ATKINS, P.W.; **Physical Chemistry**. Oxford University, Oxford, 6ª edição, p. 857, 1998.
11. LIAO, J.L.; ZENG, C.M.; HJERTEN, S.; PAWLISZYN, J. Solid phase micro extraction of biopolymers, exemplified with adsorption of basic proteins onto a fiber coated with polyacrylic acid. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 8, p. 1-4, 1996.
12. ZAMBONIM, C.G.; Coupling solid phase microextraction to liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p. 73-80, 2003.
13. CHEN, J.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2530-2533, 1995.
14. WHANG, C.W.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis. **Analytical Communications**, v. 35, p. 353-356, 1998.
15. CÁRDENES, L.; AYALA, J.H.; AFONSO, A.M.; GONZÁLEZ, V. Solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 87-93, 2004.
16. EISERT, R.; PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 2530-2533, 2004.
17. DUGAY, J.; MIÈGE, C.; HENNION, M.C. Effect of the various parameters governing solid phase microextraction for the trace determination of pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 27-42, 1998.
18. KATAOKA, H.; LORD, H.L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000
19. FERRARI, R.; NILSSON, T.; ARENA, R.; ARLATI, P.; BARTOLUCCI, C.; BASLA, R.; CIONI, F.; DEL CARLO, G.; DELLAVEDOVA, P.; FATTORE, E.; FUNGI, M.; GROTE, C.; GUIDOTTI, M.; MORGILLO, S.; MULLER, L.; VOLANTE, M. Inter laboratory validation of solid phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/L level in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 371-376, 1998.

20. KRUTZ, L.J.; SENSEMAN, S.A.; SCIUMBATO, A.S. Solid phase micro extraction for herbicide determination in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 999, p. 103-121, 2003.
21. GONÇALVES, C.; ALPENDURADA, M.F. Comparison of three different poly (dimethylsiloxane) – divinylbenzene fibers for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 19-26, 2002.
22. MILLAN, S.; SAMPEDRO, M.C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M.A.; RODRIGUEZ, E.; BARRIO, R.J. coupling solid phase microextraction and high performance liquid chromatography of halogenated fungicides in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 135-142, 2003.
23. ARESTA, A.; CIOFFI, N.; PALMISANO, F.; ZAMBONIM, C.G.; Simultaneous determination of ochratoxin A and cyclopiazonic, mycophenolic and tenuazonic acids in cornflakes by solid phase microextraction coupled to High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5232-5237, 2003.
24. SIMPLICIO, A.L.; BOAS, L.V.; Validation of a solid phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. **Journal of Chromatography A**, v. 833, p. 35-4, 1999.
25. PAWLISZYN, J.; KOPINKE, F.D.; PORSCHMANN, J. Solid phase microextraction for determining the binding state of organic pollutants in contaminated water rich in humic organic matter. **Journal of Chromatography A**, v. 816, p. 59-167, 1998.
26. URUÑUELA-MARTINEZ, A.; GONZÁLEZ-SAÍZ, J.M.; PIZARRO, C. Multiple solid phase microextraction in a non equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols in urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 31-38, 2005.
27. PEÑALVER, A.E.; POCURULL, E.; BORRULL, F.; MARCÉ, B.R.M. Solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 79-87, 2002.
28. CHANG, W.Y.; SUNG, Y.H.; HUANG, S.D.; Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 495, p. 109-122, 2003.
29. ULRICH, S. Solid phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 167-196, 2000.
30. THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid phase microextraction for the analysis of biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 49-82, 2000.

31. WISE, S.A.; SANDER, L.C.; MAY, E.W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 642, p. 329-349, 1993.
32. BJOWTH, A. **Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**. Marcel Dekker, Nova York, v1, 727 páginas, 1983.
33. SARGENTI, S.R.; MCNAIR, H.M. Comparison of solid phase extraction and supercritical fluid extraction for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking water. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 10, p. 125-131, 1998.
34. BJORESTH, A.; BECHER, G. **PAH in Work Atmospheres: Occurrence and Determination**. CRC Press, Boca raton, Flórida, 1986.
35. BOFFETA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Câncer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes Control**, v. 8, p.a 444-472, 1997.
36. MAKELA, L.P.; PYY, L.; HAKALA, E.; KAKKO, K.; LAPINLAMPI, T.; LISKO, A.; VAHAKANGAS, K. Ambient and biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons at a coaking plant. **Science of the Total Environment**, v. 199, p. 151-158, 1997.
37. WARDYANATHA, S.; ZHENG, Y.; RAPPAPORT, S.M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine of coke oven workers by headspace solid phase microextraction and gás chromatography-mass spectrometry. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, p. 165-174, 2003.
38. DOONG, R.; CHANG, S.; SUN, Y. Solid phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 879, p. 177-188, 2000.
39. GARCIA-FALCON, M.S.; LAMAELA-PUEZ, M.; GANDARA, J. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 52, p. 6897-6903, 2004.
40. CHEN, H.W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid phase microextraction and liquid chromatography. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 1383-1388, 2004.
41. SANTOS, F.J.; GALCERAN, M.T. The application of gás chromatography to environmental analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, p. 672-685, 2002.
42. MAO, C.; TUCKER, A.A. High performance liquid chromatography separation of polycyclic aromatic hydrocarbons using pyridinium chloride as a

selective fluorescence quencher to aid detection. **Journal of Chromatography A**, v.966, p. 53-61, 2002.

43. SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBRON, M.D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 364, p. -11, 1998.

44. NGUYEN, A.L.; LUONG, J.H.T. Separation and Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by solid phase microextraction/cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v.69, p. 1726-1731, 1997.

45. KING, A.J.; READMAN, J.W.; ZHOU, J.L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p. 259-267, 2004.

46. PASCHKE, A.; POPP, P.; SCHURMANN, G. Solubility and partitioning studies with polycyclic aromatic hydrocarbons using an optimized SPME procedure. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 363, p. 426-428, 1999.

47. LIU, Y.; HAGEMAM, K. YANG, Y.; HAWTHORNE, S.; LEE, M.L.; Solid phase microextraction of PAHs from aqueous samples using fibers coated with HPLC chemically bonded sílica stationary phases. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 5001-5005, 1997.

48. JINNO, K.; MURAMATSU, T.; SAITO, Y.; KISO, Y.; MAGDIC, S.; PAWLISZYN, J. Analysis of pesticides in environmental water samples by solid phase micro extraction high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 137-144, 1996.

49. NEGRÃO, MR.; ALPENDURADA, M.F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in water by solid phase microextraction high performance liquid chromatpgraphy with photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 211-218, 1998.

50. BRONDI, S.H.G.; SILVA, J.C.R.; LANÇAS, F.M. Development and validation of a methodology for the determination of pesticides in water by SPME-LC/DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 2909-2919, 2005.

51. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução número 899 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília: ANVISA, 2003.

52. EURACHEM Guide. **The fitness or purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Eurachem Working Group, 1996.

53. THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v.4, p. 835-855, 2002.

54. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Analytical Terminology for Codex Use: Procedure Manual**. Roma: FAO/WHO Food Standards Programme, 2004.

55. AOAC/FAO/IAEA/IUPAC. **Method Validation for Pesticide Residue**. Expert Consultation, 1999.

55. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

56. LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos**. São Carlos: IQSC, 2000. 76 páginas.

57. POLITO, W.L. **Validação em Química Analítica**. São Carlos: USP, 2002, 71 páginas.

58. SHABIR, G.A. Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

59. JENKE, D. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, p. 719-736, 1996.

60. JENKE, D. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, p. 737-757, 1996.

61. JENKE, D. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. III. Ruggedness, Revalidation and System Suitability. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.19, p. 1873-1891, 1996

62. STOEV, G.; MICHAILOVA, S.A. Quantitative assessment of the reliability of identification by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1031, p. 11-16, 2004.

63. SHARPLESS, K.E.; GREENBERG, R.R.; SCHANTZ, M.M.; WELCH, M.J.; WISE, S.A.; IHNAT, M. Filling the AOAC triangle with food matrix standard

reference materials. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 1161-1167, 2004.

64. GARCIA, I.; ORTIZ, M.C.; SARABIA, L.; VILCHES, C.; GREDILLA, E. Advances in methodology for the validation of methods according to the International Organization for Standardization Application. **Journal of Chromatography A**, v. 992, p. 11-27, 2003.

65. WISE, S.A. Standard Reference Materials for the determination of polycyclic aromatic compounds. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 22, p. 197-230, 2002.

66. HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.R. Guidelines for in house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

67. VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, p. 867-869, 1998.

68. HUANG, S.D.; HUANG, H.I.; SUNG, Y.H. Analysis of triazine in water samples by solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 64, p. 887-893, 2004.

69. QUEIROZ, M.E.C.; LANÇAS, F.M. Practical tips on preparing plasma samples for drug analysis using SPME. **LC-GC**, v22, p. 970-980, 2004.

70. LIU, Y.; LEE, M.L.; HAGEMAN, K.J.; YANG, Y.; HAWTHORNE, S.B. Solid phase microextraction of PAHs from aqueous samples using fibers coated with HPLC chemically bonded silica stationary phases. **Analytical Chemistry**, v.69, p. 5001-5005, 1997.

