

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NPGQ
MESTRADO EM QUÍMICA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE BTEX EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS AQUOSAS EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E GC-FID**

ALAIN GAUJAC

Dissertação apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Sergipe como um
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea

**SÃO CRISTÓVÃO
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE BTEX EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS AQUOSAS EMPREGANDO
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E GC-FID**

ALAIN GAUJAC

Dissertação apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em
Química da Universidade
Federal de Sergipe como um
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea

**SÃO CRISTÓVÃO
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Gaujac, Alain

G268o Otimização e validação de método para determinação de BTEX em amostras ambientais aquosas empregando microextração em fase sólida e GC-FID / Alain Gaujac. - - São Cristóvão, 2006.

106 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe.

Orientador: Prof. Dr. Haroldo Silveira Dórea

1. Química analítica – Determinação de BTEX. 2. Microextração em fase sólida. 3. Otimização multivariada. 4. Matrizes aquosas. 5. Métodos químicos de análise. I. Título.

CDU 543.2

Este trabalho é dedicado a meus pais.

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Haroldo Dórea pela orientação, pelo aprendizado e pelos exemplos de humildade e perseverança;
- Ao professor Sandro Navickiene por estar sempre disposto a contribuir com sua experiência e por ter ajudado enormemente em momentos difíceis do trabalho;
- Às professoras Luciane Pimenta e Ana Paula Gervásio pelas observações pertinentes no exame de qualificação;
- Ao professor Sérgio Ferreira pelo aprendizado em otimização multivariada e pela ajuda oferecida;
- A todos os professores que transmitiram seus conhecimentos e que foram fundamentais à minha formação;
- A todos os meus colegas do LCP que sempre estiveram dispostos a ajudar e que também foram essenciais a essa conquista;
- A Robson Dantas pela ajuda nos artigos;
- À Maria do Carmo Barreto e Ricardo Bispo pela ajuda na PETROBRAS;
- À minha mãe por estar sempre presente e ter me dado grande força em todos os momentos;
- Ao meu filho que, mesmo sem perceber, me deu coragem para continuar em frente, buscando sempre o melhor caminho;
- À Kyu pelo apoio, paciência, cumplicidade, pelo amor e carinho que tem me dedicado.

Sem vocês teria sido muito difícil.

Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTAS DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. JUSTIFICATIVA.....	4
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
4.1. BTEX E AS AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA.....	6
4.2. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	7
4.3. ASPECTOS GERAIS DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME).....	13
4.4. ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA SPME.....	19
4.5. ASPECTOS CINÉTICOS DA SPME.....	23
4.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS.....	25
4.6.a. IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES SIGNIFICATIVOS.....	27
4.6.b. DETERMINAÇÃO DOS VALORES CRÍTICOS.....	31
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
6.1. MATERIAIS.....	44
6.2. LIMPEZA DOS MATERIAIS.....	44
6.3. REAGENTES.....	45
6.4. PADRÕES E SOLUÇÕES.....	45
6.5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	45
6.6. METODOLOGIA SPME.....	46
6.7. METODOLOGIA PURGE & TRAP.....	46
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
7.1. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	47
7.2. SELEÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO.....	48
7.2.a. MODO DE EXTRAÇÃO.....	49
7.2.b. RECOBRIMENTO DAS FIBRAS.....	49

7.2.c. SALINIDADE.....	50
7.2.d. TEMPERATURA.....	51
7.2.e. VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
7.2.f. VOLUME DISPONÍVEL PARA A FASE HEADSPACE.....	52
7.2.g. TEMPO DE EXTRAÇÃO.....	52
7.2.h. CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO.....	53
7.2.i. OUTRAS CONSIDERAÇÕES.....	53
7.3. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO.....	54
7.3.a. O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO.....	55
7.3.b. O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.....	65
7.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	74
7.4.a. O TESTE DE ROBUSTEZ.....	74
7.4.b. LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO.....	79
7.4.c. SENSIBILIDADE.....	79
7.4.d. PRECISÃO DO MÉTODO.....	80
7.4.e. EXATIDÃO.....	82
7.4.f. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (LD e LQ).....	89
8. CONCLUSÕES.....	92
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	93
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
11. ANEXOS.....	100

CURRICULUM VITAE

Nome: Alain Gaujac

Nascimento: 14 de março de 1971 em Aracaju / SE

Filiação: Lucien Henri Gaujac e Denise Gaujac

FORMAÇÃO

- Graduação: Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Sergipe

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- Desde 1990 exerce atividades ligadas à educação em química, em diversos estabelecimentos particulares de ensino.
- De 2003 a 2005 atuou como professor substituto no departamento de química da Universidade Federal de Sergipe (UFS).
- Desde 2005 atua como professor efetivo de química na Escola Agrotécnica Federal de São Cristóvão (EAFSC).

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO

- 2004 - Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão-SE) - IV Workshop da pós-graduação em química.
- 2005 - Universidade Federal Fluminense (Niterói-RJ) - 13º Encontro Nacional de Química Analítica. Curso Poluentes Orgânicos Persistentes. Apresentação do trabalho "Otimização de Método para Análise de BTEX por SPME e GC/PID-FID"
- 2006 - Universidade Federal da Bahia (Salvador-BA) - 1º Escola de Verão em Química da Bahia – Analítica, Alimentos e Ambiental. Cursos: Análise de Pesticidas e Controle de Qualidade de Alimentos
- 2006 - Sociedade Brasileira de Química (Águas de Lindóia-SP). 29º Reunião Anual da SBQ. Curso: A Contextualização no Ensino-Aprendizagem da Química. Apresentação do trabalho "Determinação de BTEX em Efluentes por P&T-GC-PID/FID"

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos.....	06
Figura 2. Métodos de preparação de amostras com pouca ou nenhuma dependência de solventes orgânicos.....	10
Figura 3. Configuração do dispositivo proposto nos primeiros trabalhos em SPME.....	15
Figura 4. Dispositivo SPME comercial e detalhe da fibra.....	16
Figura 5. Etapas da microextração em fase sólida.	18
Figura 6. Gráfico de Pareto.....	30
Figura 7. Superfície de resposta.....	32
Figura 8. Cromatograma padrão GC-FID para uma solução com concentração em BTEX de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	48
Figura 9. Gráfico de Pareto para o benzeno.....	58
Figura 10. Gráfico de Pareto para o tolueno.....	58
Figura 11. Gráfico de Pareto para o etilbenzeno.....	59
Figura 12. Gráfico de Pareto para o m,p-xilenos.....	59
Figura 13. Gráfico de Pareto para o o-xileno.....	60
Figura 14. Gráfico de Pareto para a resposta múltipla.....	60
Figura 15. Gráfico de probabilidade normal para o modelo.....	64
Figura 16. Histograma para os resíduos.....	64
Figura 17. Valores previstos <i>versus</i> valores observados.....	65
Figura 18. Superfície de resposta obtida para o benzeno.....	69
Figura 19. Superfície de resposta obtida para o tolueno.....	69
Figura 20. Superfície de resposta obtida para o etilbenzeno.....	70
Figura 21. Superfície de resposta obtida para o m,p-xilenos.....	70
Figura 22. Superfície de resposta obtida para o o-xileno.....	71
Figura 23. Superfície de resposta obtida para a resposta múltipla.....	71
Figura 24. Gráfico de probabilidade normal para o modelo quadrático.....	73

Figura 25. Histograma dos resíduos para modelo quadrático.....	73
Figura 26. Valores previstos <i>versus</i> valores observados para modelo quadrático.....	74
Figura 27. Gráfico de Pareto para o benzeno - teste de robustez.....	76
Figura 28. Gráfico de Pareto para o tolueno - teste de robustez.....	77
Figura 29. Gráfico de Pareto para o etilbenzeno - teste de robustez.....	77
Figura 30. Gráfico de Pareto para o m,p-xilenos - teste de robustez.....	78
Figura 31. Gráfico de Pareto para o-xileno - teste de robustez.....	78
Figura 32. Comparação entre as técnicas <i>Purge & Trap</i> e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito benzeno.....	84
Figura 33. Comparação entre as técnicas <i>Purge & Trap</i> e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito tolueno.....	84
Figura 34. Comparação entre as técnicas <i>Purge & Trap</i> e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito etilbenzeno.....	85
Figura 35. Comparação entre as técnicas <i>Purge & Trap</i> e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito m,,p-xilenos.....	85
Figura 36. Comparação entre as técnicas <i>Purge & Trap</i> e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito o-xileno.....	86
Figura 37. Cromatograma para análise de efluente de Bonsucesso via SPME.....	88
Figura 38. Cromatograma para análise de efluente de Bonsucesso via P&T.....	89
Figura 39. Cromatograma para análise de água do rio Sergipe via SPME.....	103
Figura 40. Cromatograma para análise de água do rio Sergipe via P&T.....	103
Figura 41. Cromatograma para análise de água do mar via SPME.....	104
Figura 42. Cromatograma para análise de água do mar via P&T.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores máximos de referência para os compostos orgânicos selecionados nesse estudo.....	07
Tabela 2. Propriedades físicas dos analitos.....	101
Tabela 3. Tempos de retenção para os compostos analisados.....	47
Tabela 4. Tipos de fibras disponíveis comercialmente para cromatografia gasosa.....	102
Tabela 5. Matriz para o planejamento fatorial fracionário com cinco fatores em dois níveis (2^{5-1}).....	56
Tabela 6. Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário.....	57
Tabela 7. Constantes de partição dos BTEX.....	61
Tabela 8. Fatores e níveis para o planejamento composto central.....	66
Tabela 9. Matriz para o planejamento composto central.....	68
Tabela 10. Valores críticos para os fatores otimizados e modelos matemáticos com valores codificados.....	72
Tabela 11. Matriz para o teste de robustez.....	75
Tabela 12. Linearidade para BTEX.....	79
Tabela 13. Coeficientes de variação.....	81
Tabela 14. Intervalos de confiança da média.....	81
Tabela 15. Comparação entre as técnicas SPME e P&T.....	83
Tabela 16. Teste F para avaliar a precisão entre os métodos.....	87
Tabela 17. Resultados da análise do efluente de Bonsucesso.....	88
Tabela 18. Curvas de calibração para determinação dos limites de detecção e quantificação para os compostos.....	105
Tabela 19. Limites de detecção para o método.....	90
Tabela 20. Limites de quantificação para o método.....	91
Tabela 21. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para análise de BTEX em matrizes aquosas por purge & trap.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

SPME- Solid-phase microextraction (microextração em fase sólida, MEFS)
SPE- Solid-phase extraction (extração em fase sólida, EFS)
SFE - Supercritical fluid extraction (extração com fluido supercrítico, EFS)
PLE – Pressurized liquid extraction (extração com líquido pressurizado, ELP)
MAE – Microwave-assisted extraction (extração com auxílio de microondas)
LLE- Liquid-liquid extraction (extração líquido-líquido, ELL)
P&T- Purge and trap
EPA - U.S. Environmental Protection Agency
PDMS- Polidimetilsiloxano
PA- Poliacrilato
PDMS-DVB- Polidimetilsiloxano com divinilbenzeno
CW-DVB- Carbowax com divinilbenzeno
CW-TPR- Carbowax com *templated resin*
CAR-PDMS- Carboxen com polidimetilsiloxano
PDMS-DVB- Polidimetilsiloxano com divinilbenzeno
HS- *Headspace* ou fase gasosa em equilíbrio com amostra líquida
BTEX- benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
FID- Flame ionization detector (detector por ionização de chama. DIC)
GC- Gas chromatography (cromatografia gasosa, CG)
INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
ANOVA- Analysis of variance
RSD- Relative Standard Deviation
CV- Coeficiente de variação
IC- Intervalo de confiança da média
LD- Limite de detecção
LQ- Limite de quantificação
PAH- Polycyclic aromatic hydrocarbons

RESUMO

Este trabalho desenvolveu e avaliou a microextração em fase sólida na determinação de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros do xileno) em matrizes aquosas por cromatografia gasosa. Foram empregadas técnicas de otimização multivariada, planejamentos fatoriais e planejamento composto central para a definição das condições ótimas de trabalho. Investigou-se a concentração de NaCl, os tempos de extração e dessorção, o nível de agitação da amostra e o volume disponível para a fase *headspace*. Na primeira etapa do planejamento, com exceção do tempo de dessorção, todos os fatores foram considerados significativos para o processo, dentro do domínio avaliado. Na determinação das condições ótimas, através do planejamento composto central, determinou-se 16 min para o tempo ótimo de extração e para a concentração de NaCl, 35 g.L⁻¹. Foi utilizada uma fibra de polidimetilsiloxano com espessura de 100 µm. A técnica SPME demonstra bons níveis de precisão com coeficientes de variação inferiores a 5% para todos os compostos. A linearidade da técnica apresenta-se excelente na faixa de 2 a 200 µg.L⁻¹ com coeficiente de determinação igual a 0,9970 para o benzeno. Os limites de detecção estão na faixa de 0,04 a 0,27 µg.L⁻¹ e de quantificação, de 0,14 a 0,85 µg.L⁻¹. Foi realizada uma comparação com o método padrão de análise para analitos voláteis, *Purge & Trap*. Foram avaliados os níveis de concentração de BTEX nas águas do rio Sergipe, em água do mar, além de amostra de efluente da PETROBRAS (estação Bonsucesso, em Carmópolis-SE). A concentração de BTEX no efluente variou de 145,8 µg.L⁻¹, para o *o*-xileno, até 1224 µg.L⁻¹, para o tolueno.

Palavras-chave: Microextração em fase sólida, otimização multivariada, BTEX.

ABSTRACT

This work evaluated the solid phase microextraction for the analysis of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers) in water matrices through gas chromatography. Multivariate technics of optimization were adopted, such as factorial designs and central composite design for the determination the better conditions of work. The effects of NaCl concentration, duration of extraction and desorption, agitation of the sample and the available volume for the headspace phase were investigated. In the first stage of the optimization all the factors had been considered significant for the process, excepted for desorption time. After, a central composite design was performed, resulting in time of extraction of 16 min and NaCl concentration of 35 g.L⁻¹. A 100 µm polydimethylsiloxane fiber was used. Technique demonstrated good precision with relative standard deviation less than 5% for all the composites. The linearity of the technique was excellent in the range of 2-200 µg.L⁻¹ with coefficient of determination equal to 0,9970 for benzene. The detection limits ranged from 0,04 to 0,27 µg.L⁻¹ and quantification limits from 0,14 to 0,85 µg.L⁻¹. A comparison with the Purge & Trap standard method for volatile analytes was carried out. The concentration level of BTEX was investigated in Sergipe river, sea water and effluent from PETROBRAS (Bonsucesso station, Carmópolis-SE). The concentration of BTEX in effluent ranged from 145,8 µg.L⁻¹, for *o*-xylene, to 1224 µg.L⁻¹, for toluene.

Keywords: Solid-phase microextraction, multivariate optimization, BTEX.

1. INTRODUÇÃO

Um grande número de atividades humanas contribui para a presença de poluentes em concentrações ao nível de traços, em inúmeros sistemas naturais. Dentre várias, podemos destacar a mineração, a queima de carvão e combustíveis fósseis, os processos industriais, a agricultura e efluentes domésticos (FIFIELD, 2000).

Os hidrocarbonetos aromáticos voláteis benzeno, tolueno, etilbenzeno e os isômeros do xileno (BTEX), freqüentemente, contaminam solos, sedimentos e grandes massas de água, devido a vazamentos de petróleo e seus derivados. Nos seres humanos, tais compostos causam distúrbios no sistema nervoso central, sendo classificados como poluentes prioritários pela agência norte-americana de proteção ambiental, EPA. Além disso, o benzeno está associado à ocorrência de leucemia, câncer que afeta o sistema imunológico humano.

A determinação, em matrizes aquosas, de compostos orgânicos voláteis (*Volatile Organic Compound* - VOC), tais como éteres de pequena cadeia carbônica e hidrocarbonetos leves, incluindo estes aromáticos, é usualmente realizada por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama, FID. Tradicionalmente, a etapa de extração dos voláteis em matrizes aquosas é realizada por extração líquido-líquido, empregando-se grandes quantidades de solventes orgânicos, de elevado grau de pureza, portanto, de alto custo, e não raramente prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana. Além desses inconvenientes, a técnica exige um tempo excessivamente longo. Assim, tem-se dado grande importância ao desenvolvimento de métodos que na etapa de preparação de amostra sejam mais rápidos e façam uso reduzido de solventes orgânicos (MENÉNDEZ et al, 2000).

Dentre os métodos modernos de extração de voláteis presentes em matrizes aquosas, para quantificação em sistemas de cromatografia gasosa, destaca-se o *Purg & Trap* (P&T), empregado como método padrão recomendado pela EPA (PAWLYSZIN et al., 1992). Apesar de não empregar os tradicionais solventes de alta pureza das extrações convencionais, a técnica é relativamente dispendiosa devido ao alto custo da aparelhagem e do gás hélio, empregado para extrair os analitos da amostra.

Uma opção que tem apresentado excelentes resultados na preparação de amostras é a microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction* – SPME) que consiste, basicamente, de uma fibra ótica recoberta com um filme micrométrico de um polímero, que tem a função de adsorver os analitos atuando de modo altamente seletivo. A SPME é uma técnica extremamente simples e versátil que envolve, num tempo extremamente reduzido e em apenas duas etapas, a extração, pré-concentração, *clean-up* da amostra e introdução dos analitos no sistema de cromatografia gasosa. Além da grande simplicidade, tem também como característica o fato de dispensar completamente o uso de qualquer solvente orgânico, em concordância com as políticas de controle e proteção ambiental (EISERT & LEVSEN, 1996).

Geralmente, existem vários parâmetros a serem otimizados para que um método analítico seja validado. Por outro lado, há dois modos de executar a otimização de um determinado processo: os planejamentos univariado e multivariado. O planejamento multivariado traz grandes vantagens sobre o primeiro, pois além da análise individual de cada fator sobre a resposta, leva também em consideração a interação conjunta entre os fatores avaliados e reduz drasticamente o número de experimentos necessários à otimização do processo, gerando ganho de tempo e economia de material.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método por SPME para determinação dos compostos orgânicos voláteis benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em matrizes aquosas, por meio da otimização dos parâmetros experimentais empregando-se técnicas de planejamento multivariado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer as condições cromatográficas para determinar BTEX por GC-FID;
- b) Obter as condições experimentais ideais para a microextração em fase sólida para BTEX em amostras de água, utilizando técnicas de planejamento multivariado para a otimização do método;
- c) Validar o método otimizado;
- d) Realizar um estudo comparativo entre as técnicas *purge & trap* e a microextração em fase sólida para determinação de BTEX em água por GC-FID;
- e) Aplicar o método desenvolvido em amostras ambientais de água marinha, de rio e de descarte.

3. JUSTIFICATIVA

Os hidrocarbonetos voláteis benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são encontrados como poluentes em corpos d'água devido, principalmente, às atividades de exploração do petróleo e de produção, distribuição e consumo de seus derivados. São compostos de elevado grau de toxicidade e, por isso, as legislações de controle ambiental de todo o mundo limitam os níveis de BTEX em fontes d'água, para consumo humano, em poucos microgramas por litro.

Dessa forma, os métodos que detectam e quantificam tais compostos em matrizes aquosas devem apresentar grande sensibilidade a fim de atender a este requisito. A cromatografia em fase gasosa, acoplada a detectores de alta sensibilidade e precisão, é amplamente utilizada para este fim. No entanto, as técnicas de preparação de amostras não acompanharam na mesma velocidade a evolução nos métodos de separação e quantificação. As extrações líquido-líquido, tradicionalmente utilizadas para o tratamento de matrizes aquosas, se mostram ineficientes por apresentarem perdas excessivas do analito devido ao grande número de etapas que envolvem. Além disso, empregam quantidades enormes de solventes tóxicos, em discordância com as políticas de proteção ambiental.

Alternativas vêm sendo criadas para resolver estes impasses. Uma delas é a microextração em fase sólida ou SPME, uma metodologia de preparação de amostras totalmente isenta de solventes orgânicos, extremamente rápida, menos propensa a erros humanos, versátil e de baixo custo, apresentando excelentes níveis de precisão e exatidão.

Para o desenvolvimento da metodologia SPME deve-se encontrar as condições de trabalho que asseguram o máximo desempenho. Por outro

lado, quanto maior o número de fatores a investigar em um método analítico, maior também será o número de ensaios necessários para se chegar à conclusão sobre as melhores condições de trabalho. As técnicas de planejamento multivariado são importantes ferramentas empregadas largamente na otimização de processos, pois permitem a seleção dos fatores mais significativos para o sistema em estudo e conduzem aos seus valores ótimos, com um número mínimo de experimentos, resultando em economia de tempo e material. Além disso, permitem uma avaliação mais criteriosa sobre o processo, pois avaliam conjuntamente todos os fatores envolvidos e não apenas a influência isolada de cada um deles.

Portanto, a determinação dos níveis de contaminação por BTEX em fontes de água, através de metodologias modernas, eficientes, baratas e que não empreguem solventes orgânicos é um importante avanço na análise química. A microextração em fase sólida apresenta-se como uma opção potencialmente viável para este fim, mostrando-se como uma técnica extremamente econômica e de rápida execução.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. BTEX E AS AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA

Os compostos da classe BTEX são líquidos incolores que evaporam e queimam com facilidade, de cheiro perceptível no ar e na água em concentrações inferiores a 10 partes por milhão (anexo A, tabela 2). A agência americana de proteção ambiental (EPA), monitora os locais mais críticos de descarte que constituem o que chamam de “*National Priority List*” (NPL) – em mais de 60% destes o benzeno e o tolueno estão presentes de acordo com o órgão federal americano, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (<http://www.atsdr.cdc.gov/>). Têm várias aplicações na indústria, sendo largamente empregados na fabricação de tintas, borracha sintética, defensivos agrícolas e como intermediários químicos.

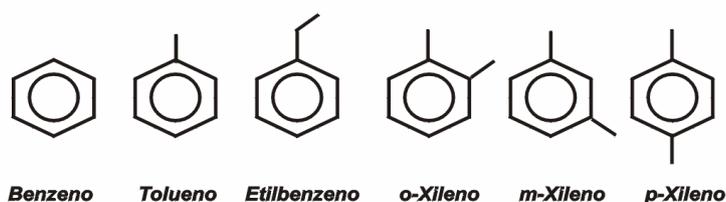


Figura 1. Estruturas químicas do benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos.

Estes hidrocarbonetos voláteis podem estar presentes em amostras ambientais de água e provêm, principalmente, do uso do petróleo como a mais importante fonte de energia disponível. Convém também ressaltar que através de outros mecanismos tais substâncias podem ser introduzidas no meio-ambiente como despejos domésticos e industriais, queima da biomassa e madeira, além da queima incompleta de óleo combustível (MENICONI et al., 2002).

A contaminação de grandes volumes de água por BTEX é um problema comum relacionado ao meio-ambiente e assim, se faz necessário um monitoramento rígido sobre a quantidade destes em fontes naturais de água. Devido à alta toxicidade apresentada por estes compostos, os limites toleráveis em fontes naturais de água, estão na ordem de partes por bilhão. A legislação Européia estabelece o nível de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o benzeno em água potável e, o nível de contaminação máximo de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi estabelecido pelo *U.S. Environmental Protection Agency* (ARAMBARRI et al., 2004). A Tabela 1 mostra os níveis máximos toleráveis de BTEX de acordo com a legislação brasileira, resolução 357 de 17 de março de 2005 do CONAMA e a portaria nº518/2004 do Ministério da Saúde.

Tabela 1. Valores máximos de referência para os compostos orgânicos selecionados nesse estudo.

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xilenos
CONAMA – Padrão para água doce, classe 1 - consumo humano (em $\mu\text{g.L}^{-1}$)	5	2	90	300
CONAMA – Padrão para água salina, classe 1 - pesca e recreação (em $\mu\text{g.L}^{-1}$)	51	-	-	-
MS – Água Potável (em $\mu\text{g.L}^{-1}$)	5	-	-	-

Fontes: resolução 357/2005 do CONAMA e portaria nº518/2004 do Ministério da Saúde.

4.2. TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Todos os passos de um procedimento analítico são fundamentais para o sucesso na determinação quantitativa das espécies químicas presentes em uma matriz ambiental: a coleta e manipulação da amostra, a separação e quantificação dos analitos, a análise estatística, a interpretação dos dados e as conclusões finais. É importante perceber que cada uma dessas fases do processo analítico só tem início com o término da etapa anterior. Por outro lado, a etapa mais lenta do procedimento determina a velocidade do processo como um todo. Erros cometidos em qualquer uma delas empobrecem o desempenho do método (PAWLISZYN, 1997).

Dentre as etapas citadas, as mais susceptíveis a erros são as iniciais: coleta e manipulação da amostra. Basicamente, elas envolvem a coleta do

material, armazenamento em condições que favoreçam a integridade da matriz, extração, *clean-up* e pré-concentração. Nestas a intervenção humana é mais direta e, conseqüentemente, estão mais propensas a erros. Além disso, costumam ser mais lentas devido ao grande número de sub-etapas envolvidas - a redução do número de etapas de um procedimento analítico, tende a diminuir a possibilidade de erros cometidos pelo analista.

Um método de preparação de amostras deve, idealmente, ser de fácil manipulação, envolver poucas etapas e o mínimo de tempo possível; deve ser barato e permitir uma recuperação quantitativa, sem perdas nem destruição dos analitos; deve produzir um meio adequado ao método analítico a ser utilizado e, finalmente, deve gerar uma solução que contenha as substâncias de interesse, numa concentração adequada à sensibilidade do sistema de detecção, sem que haja a necessidade de concentrá-la (SKOOG et. al., 2002).

O aumento do interesse da sociedade moderna em controlar os níveis de poluição no ar, água e solo, gerou um crescimento considerável de pesquisas voltadas à determinação de poluentes nas mais variadas matrizes ambientais. Novos métodos de separação e quantificação foram estabelecidos objetivando uma maior seletividade e sensibilidade, requeridas pelas análises ambientais – assim, a etapa de preparação das amostras também teve que se adequar a esta nova realidade.

Buscou-se então por procedimentos mais rápidos, que diminuíssem o consumo de solventes orgânicos caros e nocivos à saúde do analista e que pudessem ser facilmente automatizados. Além disso, procurou-se também por métodos que atendessem aos baixos limites de detecção das novas técnicas de separação e quantificação, que oferecessem melhor reprodutibilidade e um bom nível de recuperação. Assim, as pesquisas se dirigiram, principalmente no caso das matrizes sólidas, à manipulação das propriedades físicas do solvente utilizado na extração, e para as matrizes líquidas, na aplicação de adsorventes seletivos. A partir disto, surgiram técnicas importantes como a extração por fluido supercrítico (SFE), extração com líquido pressurizado (PLE) e extração em fase sólida (SPE), entre outras (RAYNIE, 2004).

A preparação de amostras ambientais, normalmente, procura extrair o analito da matriz e concentrá-lo num pequeno volume de solvente apropriado. As extrações clássicas trazem consigo alguns inconvenientes: o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos e extremamente dispendiosos e são realizadas em várias sub-etapas, o que faz aumentar a probabilidade de erros e consumir a maior parte do tempo da análise. A utilização de tais solventes orgânicos, por si só, gera graves problemas ambientais e, freqüentemente, envolve baixa seletividade, fato que dificulta bastante a análise das matrizes ambientais, altamente complexas (HUANG et al., 1996).

No sentido de diminuir o uso de solventes orgânicos, em concordância com o documento assinado por vários países no final da década de 80, *The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer* (www.unep.org), métodos como a extração líquido-líquido e extração Soxhlet vêm sendo progressivamente substituídos por outros menos dependentes do emprego de solventes. As pesquisas voltaram-se então para a miniaturização dos processos de extração, a utilização de materiais adsorventes e a manipulação das propriedades físicas do próprio solvente com o propósito de facilitar a extração. Nos últimos tempos, vem sendo dada grande ênfase à automação dos processos extrativos, acoplados aos sistemas de separação e quantificação - numa outra vertente, os trabalhos concentram-se na pesquisa de dispositivos que permitem a coleta dos analitos no próprio meio natural (PAWLISZYN, 2003).

As técnicas modernas de preparação de amostras podem ser classificadas de acordo com a natureza física da fase extrativa, como pode ser observado na figura 2. Caracterizam-se por envolver poucas etapas e por serem, normalmente, realizados em um curto período de tempo.

As propriedades físicas do solvente, especialmente a temperatura e a pressão, podem ser manipuladas a fim de se aumentar a capacidade de extrair analitos de uma grande variedade de amostras, principalmente as sólidas. A simples modificação destas propriedades pode resultar num fluido supercrítico (SFE - *supercritical fluid extraction*), em um líquido aquecido acima do seu ponto de ebulição normal (PLE - *Pressurized Liquid Extraction*)

ou um líquido aquecido por meio de micro-ondas (MAE – *Microwave-Assisted Extraction*). Modificações na temperatura e pressão dos líquidos podem resultar em diminuição da tensão superficial, aumento da solubilidade dos analitos, bem como, possíveis alterações na polaridade do solvente (RAYNIE, 2004).

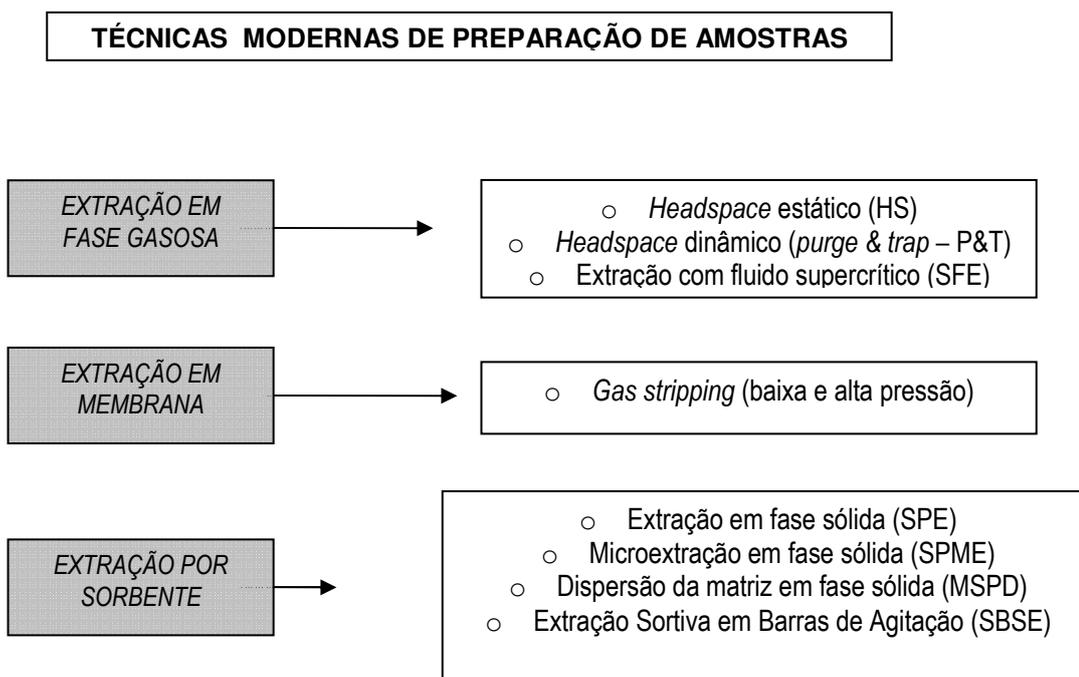


Figura 2. Métodos de preparação de amostras com pouca ou nenhuma dependência de solventes orgânicos. Adaptado de Z. MESTER et al. (2001).

A extração com fluido supercrítico (SFE) geralmente envolve o emprego do dióxido de carbono como fluido principal de extração. O CO₂ é pressurizado a cerca de 50 atm se usado como líquido, ou acima de 75 atm, como fluido supercrítico. Um controle rígido de temperatura é necessário - as temperaturas variam entre 35°C e 200°C, para o CO₂ supercrítico, e menores para o líquido. Modificações na combinação pressão-temperatura provocam alterações marcantes nas propriedades do solvente. A polaridade da fase extrativa pode ser alterada adicionando-se cerca de 20% de um co-solvente. Atualmente, as vantagens e usos analíticos desta metodologia são bem conhecidos. Características interessantes do método são: a capacidade

de extrair compostos lábeis e a possibilidade de acoplamento direto com o equipamento cromatográfico (DÓREA, 1999).

A extração com líquido pressurizado (PLE) é uma metodologia semelhante a anterior em relação às temperaturas de operação, sempre superiores ao ponto de ebulição normal do líquido, tipicamente na faixa de 100-200°C. Por outro lado, a pressão tem menor importância, bastando apenas que seja suficiente para manter o solvente extrativo no estado líquido. Pressões em torno de 100 atm são usualmente aplicadas. Tanto a água, assim como solventes orgânicos, podem ser empregados – a utilização de água aquecida e pressurizada é, na verdade, uma técnica híbrida entre a SFE e a PLE. Do ponto de vista físico, incluindo a instrumentação empregada, os dois métodos, SFE e PLE, guardam entre si grande similaridade (RAYNIE, 2004).

Conceitualmente, a extração com auxílio de micro-ondas (MAE- *Microwave-Assisted Extraction*) é bastante similar a PLE. Ou seja, os solventes líquidos são aquecidos em temperaturas adequadas à extração. No caso da MAE, a radiação de micro-ondas é empregada para aquecer o sistema solvente/amostra. O solvente ou a amostra deve apresentar certa polaridade para que possam absorver a radiação. Um emprego da MAE que vem ganhando popularidade é a utilização das micro-ondas para expulsar analitos voláteis, da amostra para a fase gasosa sobre a mesma (*headspace*), e subsequente extração destes por microextração em fase sólida (CRIADO et al., 2004).

Numa outra linha de pesquisa, a experiência com as fases estacionárias empregadas no recobrimento interno das colunas capilares, deu origem a outras técnicas de extração. Nestas, um filme polimérico líquido recobre um suporte adsorvente, normalmente a base de sílica. Tal líquido tem a capacidade seletiva de coletar os analitos da amostra. As técnicas que se baseiam neste princípio geralmente trabalham com matrizes líquidas complexas que exigem grande seletividade na extração. A migração das moléculas do analito para a fase extrativa pode ser total, no caso de uma extração exaustiva, ou tender a um equilíbrio entre as fases envolvidas, quando temos um processo não exaustivo.

A agência americana de proteção ambiental (EPA) tem como método padrão de preparação de amostras envolvendo matrizes aquosas contendo BTEX, a técnica de extração *Purge & Trap* (*headspace* dinâmico) que se processa da seguinte maneira: um fluxo de gás hélio de alta pureza, atravessa a amostra de água contendo os analitos e arrasta suas moléculas. Estas encontram no caminho um material polimérico de grande afinidade (*trap*) e lá ficam retidas. O fluxo se mantém por certo período de tempo, até que o *trap* começa a ser aquecido para dessorver os analitos. Os compostos são arrastados para dentro da coluna cromatográfica onde serão separados e, posteriormente, quantificados. Esta técnica analítica apresenta-se como uma alternativa muito interessante na extração de compostos voláteis, tendo apresentado excelentes resultados para a quantificação de BTEX em matrizes aquosas (ROSELL et al., 2003).

Na extração em fase sólida (SPE) a amostra líquida é introduzida em um cartucho de plástico (tubo), ou numa membrana em forma de disco, contendo uma fase estacionária altamente seletiva. Os analitos e alguns interferentes lá ficam retidos – usualmente, faz-se passar um solvente seletivo que arrasta consigo os interferentes e, em seguida, os analitos são eluídos fazendo-se passar no cartucho (ou membrana) uma pequena quantidade de outro solvente apropriado. Parte do volume deste é evaporado, a fim de aumentar a concentração dos analitos na amostra (BISPO, 2005).

A SPE foi desenvolvida em meados dos anos 70 e surgiu como uma potente ferramenta na extração de compostos orgânicos em matrizes aquosas ambientais. Comparada às técnicas convencionais, extração líquido-líquido (LLE) ou a extração Soxhlet, traz vantagens como a redução do tempo de análise e importante economia de solventes. Porém, ainda apresenta alguns problemas - um deles refere-se à etapa de dessorção: ou empregam-se volumes razoáveis de solvente orgânico (ainda menores do que nas técnicas tradicionais) ou realiza-se a dessorção térmica que requer equipamento próprio, demasiadamente caro. O segundo entrave da SPE tem sido a grande variabilidade na qualidade dos adsorventes de um fabricante para outro, o que faz com que se tenha que otimizar a quantidade

de solvente empregado, quando se muda a marca do fabricante da fase estacionária (LANÇAS, 2004).

A redução das dimensões do suporte sólido, e a conseqüente diminuição do volume do recobrimento líquido polimérico reduzem drasticamente os inconvenientes da SPE. Estes conceitos fizeram surgir a microextração em fase sólida (SPME), que não tende a ser uma técnica exaustiva de extração, como a SPE. Consiste, principalmente, no equilíbrio do analito entre as fases envolvidas no processo. Todo o procedimento apresenta apenas duas etapas: a exposição à amostra de uma fibra ótica recoberta com um filme líquido polimérico, onde ocorre a partição dos analitos nas fases recobrimento/amostra e a dessorção térmica dos compostos diretamente no equipamento analítico (PAWLISZYN, 1997).

Uma variante da SPE é a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD). Foi originalmente criada para o preparo de amostras biológicas sólidas ou semi-sólidas e utiliza um suporte sólido coberto geralmente com uma fase quimicamente ligada como, por exemplo, o C-18. O suporte sólido funciona como um abrasivo que facilita a ruptura da arquitetura geral da amostra e, quando se utiliza uma fase lipofílica como C-18, age também como solvente ajudando na ruptura das membranas celulares. A mistura da amostra macerada e do suporte é utilizada como recheio de uma coluna SPE e pode ser eluído seqüencialmente com solventes apropriados. (DÓREA & LANÇAS, 1998).

A extração sortiva em barras de agitação (SBSE) usa praticamente o mesmo princípio da SPME, sendo que no lugar de recobrir uma microfibras de sílica com o filme polimérico, cobre-se a barra de agitação. Esta é inserida na amostra a ser analisada e decorrido certo intervalo de tempo, a barra é removida da solução e, por aquecimento, os analitos são dessorvidos (LANÇAS, 2004).

4.3. ASPECTOS GERAIS DA MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A SPME é um aperfeiçoamento da extração em fase sólida (SPE) e foi criada com o intuito de simplificar a etapa de preparação de amostras,

diminuindo assim o tempo envolvido nas análises (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

Os testes iniciais foram publicados no final dos anos 80, nos quais foram utilizadas pequenas seções de fibra ótica de sílica fundida, algumas recobertas com líquido polimérico ou com um material sólido adsorvente e outras sem qualquer recobrimento. Eram mergulhadas em amostras líquidas por certo período de tempo e, logo após, inseridas no injetor do GC. Para isso se fazia necessário abrir o injetor o que acarretava em perdas de pressão na coluna. Apesar disto, os resultados mostraram-se muito satisfatórios e comprovaram a utilidade da técnica tanto para compostos polares como para os apolares, com extrações rápidas e reproduzíveis (BELARDI & PAWLISZYN, 1989).

O desenvolvimento da técnica se intensificou a partir da introdução da fibra no interior de uma agulha adaptada numa micro-seringa, o que facilitou bastante a coleta dos analitos e a introdução da amostra no injetor do cromatógrafo (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

A SPME envolve a captura dos analitos em uma fibra capilar de sílica fundida quimicamente modificada, com posterior dessorção por ação do calor, no injetor de um cromatógrafo. A SPME pode ser empregada em matrizes líquidas, normalmente aquosas, em meios gasosos ou sólidos. A fase extrativa é composta por filme líquido polimérico de um material de elevada massa molar ou de um sólido poroso com grande superfície de adsorção.

Uma vez introduzida no septo do recipiente contendo a amostra, a fibra de sílica é exposta ao meio onde ocorrerá a extração dos analitos. A fase extrativa pode ser posicionada diretamente na fase líquida ou, no caso de amostras gasosas, em contato com o gás, ou ainda em contato com o vapor em equilíbrio com a amostra líquida. Após um certo período de tempo, necessário para que se estabeleça o equilíbrio entre as fases envolvidas, a fibra é reposicionada no interior da agulha. Em seguida, a seringa é levada a um cromatógrafo a gás, onde a fibra é introduzida no seu injetor, ficando mais uma vez exposta ao meio. Sob ação do calor os analitos são dessorvidos e, após certo período de tempo, a fibra é re-introduzida na

agulha, a seringa é retirada do injetor e o processo de separação/quantificação então tem início (MESTER et al., 2001).

O método traz melhoras sensíveis no tempo envolvido na preparação das amostras, bem como uma menor demanda de custos, devido a sua simplicidade. A SPME é uma técnica simples, rápida, de baixo custo, altamente versátil e tem apresentado crescente aplicabilidade nas análises ambientais (HUANG et al., 1996).

Devido às reduzidas dimensões do dispositivo a SPME permite a coleta de materiais *in natura*, mesmo nos sistemas mais diminutos – a fibra pode ser inserida em bulbos de flores para análises das substâncias emitidas durante a sua curta vida e, a utilização de fibras sub-micrométricas permite a investigação do ambiente interno de células individuais. Como a técnica não remove exaustivamente os analitos da amostra, a sua presença no meio não promove grandes perturbações. Nas análises ambientais, a possibilidade de coleta dos analitos diretamente no meio natural, é um diferencial muito interessante da microextração em fase sólida (PAWLISZYN, 1997).

A instrumentação da técnica SPME é, originalmente, uma adaptação das microseringas utilizadas para injeção das amostras nos cromatógrafos a gás (figura 3) (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

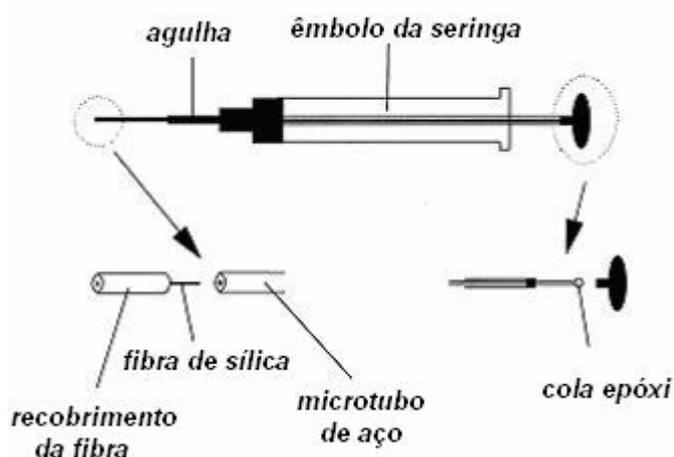


Figura 3. Configuração do dispositivo proposto nos primeiros trabalhos em SPME, através de adaptações feitas em seringas para cromatografia gasosa. Adaptado de Lord & Pawliszyn (2000).

Na sua configuração mais comumente utilizada, o dispositivo comercial consiste de uma fibra de sílica fundida com dimensões capilares, da ordem de poucos micrometros de diâmetro, inserida na agulha da seringa (figura 4). A fibra ótica é, na maior parte das aplicações, recoberta com uma micro-camada de um filme líquido polimérico altamente seletivo. A fibra encontra-se posicionada dentro da agulha que tem a finalidade de protegê-la quando não está em uso, bem como de perfurar o septo de borracha, momentos antes da exposição da fibra à amostra, ou na dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo.

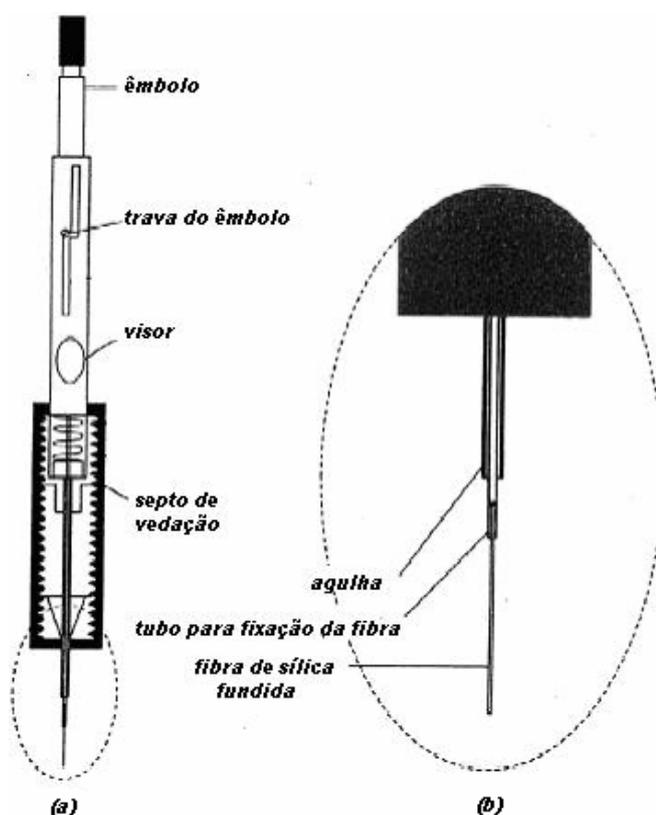


Figura 4. (a) dispositivo SPME comercial e (b) detalhe da fibra. Adaptado de Lord & Pawliszyn (2000).

Adaptações no dispositivo foram realizadas em aplicações específicas, como nas análises clínicas, coleta de amostras ambientais em campo, acoplamento direto com GC e HPLC, entre outras. Para a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) foi desenvolvida uma técnica denominada *in-tube* SPME, na qual um tubo capilar de sílica fundida é

recoberto internamente com o material polimérico adsorvente. Este tubo posiciona-se entre a agulha do amostrador automático e a válvula de injeção. A amostra é injetada, os analitos são adsorvidos pelo material de recobrimento interno e, em seguida, uma pequena quantidade de solvente apropriado, ou a própria fase móvel, passa pelo tubo, dessorvendo os analitos que entram na coluna para a separação e posterior detecção. (LORD & PAWLISZYN, 2000).

Basicamente, há dois modos pelos quais a extração pode ser conduzida em SPME: a extração diretamente da matriz, líquida ou gasosa, ou o modo *headspace*, no qual a fibra entra em contato com o vapor em equilíbrio com a amostra líquida ou sólida (figura 5). Em todos os modos de extração, salvo algumas situações particulares, é necessário um certo grau de agitação da matriz, com o intuito de facilitar a passagem dos analitos da amostra para a fibra coletora (KATAOKA et al., 2000). Isto minimiza problemas de saturação na interface fibra/amostra e diminui o tempo necessário ao alcance do equilíbrio, no modo direto. No modo *headspace*, facilita a saída de compostos menos voláteis.

No modo direto, principalmente, a agitação é um fator imprescindível quando se trata de amostras líquidas, por minimizar os problemas relativos à transferência de massa entre a fase líquida, geralmente aquosa, e a fase extrativa. Em certos casos, a presença na amostra de certas substâncias de elevado peso molecular e/ou não-voláteis, aliado a mudanças no pH da amostra líquida, poderiam causar danos irreversíveis à fibra – nestes casos a extração é feita, posicionando-se a fibra no vapor, acima da superfície do líquido, ou modo *headspace*. Quando a fase extrativa entra em contato com o vapor da amostra, os analitos presentes nesta fase começam a migrar para a fibra coletora. A partir do momento que a quantidade destes torna-se mínima na fase gasosa, aqueles que se encontram na fase líquida, vencerão as forças atrativas do líquido, passando assim para o vapor, sendo posteriormente aprisionados na fase extrativa (THEODORIDIS et al., 2000).

Emprega-se o modo *headspace* quando a amostra poderia causar danos ao recobrimento da fibra, porém este modo está limitado apenas a compostos voláteis e alguns semivoláteis. Quando a matriz se apresenta

bastante “suja” e contém analitos menos voláteis, o que inviabiliza a SPME pelos modos direto e *headspace*, utiliza-se uma membrana de proteção que tem por principal função evitar danos à fibra. A fibra é envolta na membrana e mergulhada na solução por certo período de tempo. O material empregado na confecção da membrana pode ajudar na seletividade da extração. A cinética do processo é menor do que na extração direta porém, pode ser aumentada utilizando-se membranas de espessura reduzida e maior temperatura de extração (PAWLISZYN, 1997).

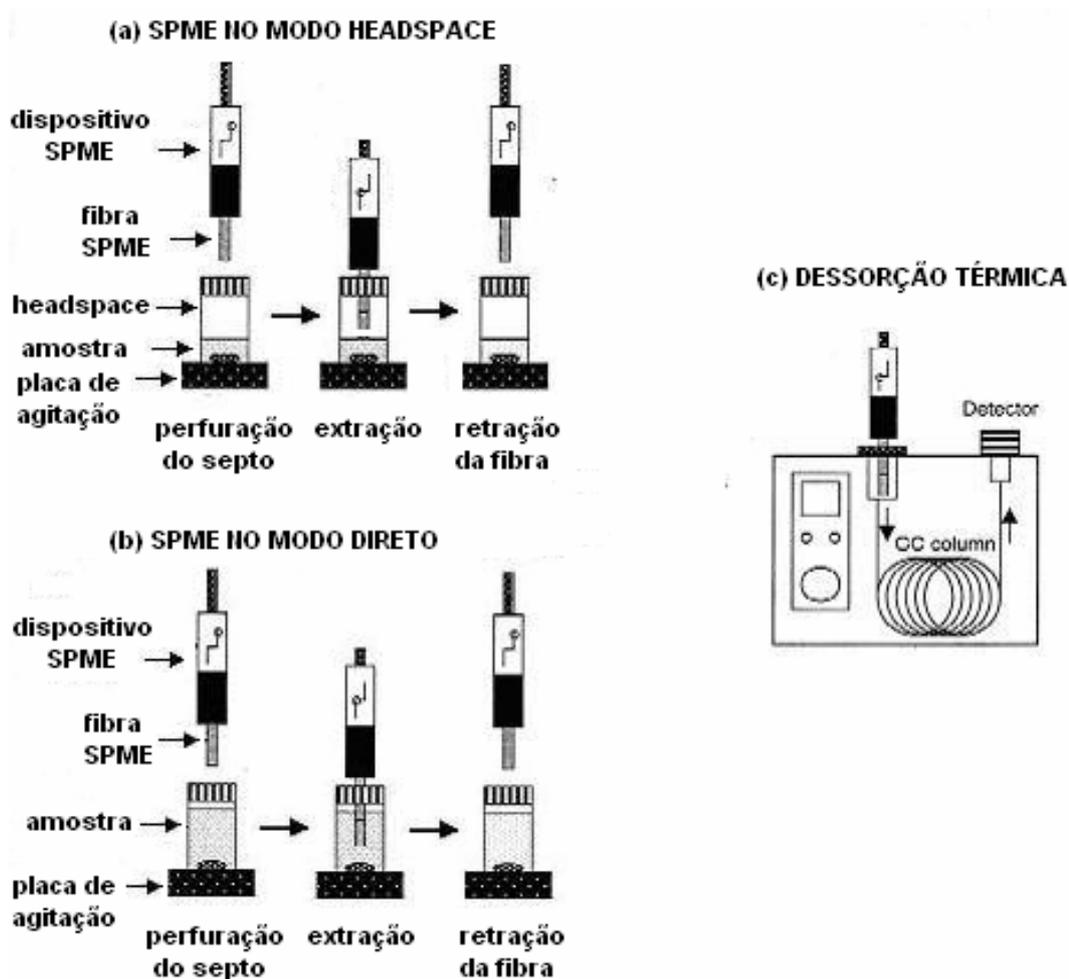


Figura 5. Etapas da microextração em fase sólida. (a) extração no modo *headspace* (b) extração no modo direto (c) dessorção dos analitos no cromatógrafo. Adaptado de kataoka et al. (2000).

Na extração no modo *headspace* de analitos muito voláteis, deve-se considerar que tais espécies se encontram em maior quantidade na fase

gasosa, do que os semivoláteis, fazendo com que a velocidade de transferência de massa entre as fases seja maior para os compostos mais voláteis. Caso a análise tenha interesse pelos semivoláteis, um tempo maior de extração é requerido para que estes possam ser coletados. Nestes casos, é aconselhável um sistema de agitação intensa da amostra líquida, com a finalidade de facilitar a saída dos compostos menos voláteis, diminuindo assim o tempo de extração. O aquecimento, apesar de diminuir a quantidade dos analitos retidos, é também empregado com esse objetivo (MESTER et al., 2001).

A quantidade retida de cada analito, na microcamada polimérica, é independente do modo SPME empregado, desde que no modo *headspace* sejam usados volumes idênticos das fases líquida e gasosa. Pode ser determinada pela equação: $n = K_{FA} V_F C_0$, onde, n é a quantidade retida do analito; K_{FA} é a constante de distribuição do analito nas fases fibra/amostra; V_F é o volume do recobrimento polimérico e C_0 é a concentração inicial do analito. Pode-se perceber uma relação linear entre a quantidade de analito extraído da amostra e a concentração inicial deste na matriz.

A microextração em fase sólida é uma técnica de extração não-exaustiva por natureza, ou seja, a fibra não tem o poder de coletar todas as moléculas do analito, presentes na amostra. Por outro lado, caso o volume da amostra seja muito pequeno e as constantes de distribuição dos analitos sejam razoavelmente altas, a extração dos compostos pode se dar de modo completo. Além disso, maiores espessuras de recobrimento podem extrair uma maior quantidade de substâncias. Estes fatos devem ser observados quando se deseja uma extração exaustiva (PAWLISZYN, 1997).

4.4. ASPECTOS TERMODINÂMICOS DA SPME

A micro extração em fase sólida baseia-se no equilíbrio da concentração do analito na amostra e na fase extrativa. Logo após a introdução da fibra, os analitos começam a migrar da matriz para o meio extrativo. Considera-se o final do processo, na maioria das vezes, o

momento a partir do qual o analito alcança a concentração de equilíbrio nas fases - após esse instante, a quantidade de analito retido permanece constante com o passar do tempo. Em uma análise em particular, deve-se encontrar o intervalo de tempo requerido para que o sistema atinja o equilíbrio (ULRICH, 2000).

A SPME no modo direto, envolve o equilíbrio do analito em duas fases distintas, e no modo *headspace*, entre três fases – a amostra líquida (ou gasosa), a fase de vapor sobre a amostra líquida (*headspace*) e a fase extrativa (líquido polimérico ou sólido adsorvente). Idealmente, a matriz deve ser completamente homogênea e os analitos estáveis nas fases envolvidas. O tratamento termodinâmico abaixo se refere ao processo de partição, característico dos recobrimentos da fibra com filme líquido polimérico. Nos casos em que se utiliza como fase extrativa um sólido adsorvente, como sílica fundida, as equações são similares na análise ao nível de traços, salvo algumas restrições (PAWLISZYN, 1997).

A quantidade total do analito nas três fases pode ser dada pelo balanço de massa abaixo:

$$C_0V_A = C_F^\infty V_F + C_H^\infty V_H + C_A^\infty V_A \quad (1)$$

onde, C_0 é a concentração inicial do analito na amostra; C_F^∞ , C_H^∞ , C_A^∞ são as concentrações no equilíbrio do analito, na fibra extrativa, no *headspace* e na amostra, respectivamente, e V_F , V_H e V_A são, nessa ordem, os volumes da película de recobrimento da fibra, do *headspace* e da amostra.

A constante de distribuição do analito entre as fases fibra/*headspace*, K_{FH} , pode ser dado por:

$$K_{FH} = \frac{C_F^\infty}{C_H^\infty} \quad (2)$$

E a constante de distribuição do analito entre as fases *headspace*/amostra, K_{HA} , é definida como:

$$K_{HA} = \frac{C_H^\infty}{C_A^\infty} \quad (3)$$

A quantidade do analito recolhido na fibra extrativa, n , é calculada pela expressão:

$$n = C_F^\infty V_F \quad (4)$$

onde C_F^∞ é a concentração em equilíbrio do analito na fibra extrativa e V_F é o volume do recobrimento da fibra. Utilizando as equações anteriores, obtém-se para a quantidade de analito extraído:

$$n = \frac{K_{FH} K_{HA} V_F C_0 V_A}{K_{FH} K_{HA} V_F + K_{HA} V_H + V_A} \quad (5)$$

Como a constante de distribuição do analito nas fases fibra/amostra, K_{FA} , é igual ao produto $K_{FH}K_{HA}$, temos que:

$$K_{FA} = K_{FH} K_{HA} \quad (6)$$

Assim:

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0 V_A}{K_{FA} V_F + K_{HA} V_H + V_A} \quad (7)$$

Considerando a extração da amostra no modo direto, a parcela $K_{HA}V_H$ pode ser desprezada. Deste modo, a equação (7) assume a forma:

$$n = \frac{K_{FA} V_F C_0 V_A}{K_{FA} V_F + V_A} \quad (8)$$

Como K_{FA} apresenta, geralmente, uma ordem de grandeza muito pequena, aliada ao fato de que, normalmente, o volume da amostra, V_A , é muito superior ao volume do recobrimento da fibra, V_F , podemos aplicar a aproximação de que $K_{FA}V_F \ll V_A$ (PAWLISZYN, 1997). Logo, a equação (8) pode ser abreviada para:

$$n = K_{FA}V_F C_0 \quad (9)$$

Podemos perceber uma relação linear entre a quantidade de analito extraído da amostra e a concentração inicial deste na matriz, ou seja:

$$n = KC_0 \quad (10)$$

onde, $K = K_{FA}V_F$.

No modo *headspace*, partindo-se da equação (7), podemos inicialmente considerar que as fases amostra/*headspace* apresentam o mesmo volume:

$$V_A = V_H \quad (11)$$

Deste modo, a equação (7) pode ser escrita por:

$$n = \frac{K_{FA}V_F C_0 V_A}{K_{FA}V_F + (1 + K_{HA})V_A} \quad (12)$$

Usando o mesmo raciocínio empregado para o modo direto, temos:

$$K_{FA}V_F \ll (1 + K_{HA})V_A \quad (13)$$

A equação (12) pode ser escrita como:

$$n = \frac{K_{FA}V_F}{(1 + K_{HA})} C_0 \quad (14)$$

Conclui-se então que a quantidade do analito coletado pela fibra, no modo *headspace*, segue também uma dependência linear com a concentração inicial do analito na amostra:

$$n = k' C_0 \quad (15)$$

$$\text{onde, } k' = \frac{K_{FA} V_F}{(1 + K_{HA})}$$

Uma outra constatação interessante é a de que a quantidade extraída do analito independe do volume da amostra em análise. Assim, a coleta dos analitos pode ser feita diretamente no ambiente natural, expondo a fibra extrativa ao sistema em estudo, como a atmosfera, a água de um rio ou efluentes industriais (PAWLISZYN, 1997).

4.5. ASPECTOS CINÉTICOS DA SPME

A SPME, como já discutido, baseia-se no equilíbrio da analito entre duas ou três fases. Principalmente no modo direto, envolvendo amostras líquidas, o tempo necessário ao estabelecimento do equilíbrio pode ser bastante prejudicado pelo fenômeno de exaustão, que ocorre na fronteira entre a amostra líquida e a fibra extrativa. Nesta interface, forma-se uma camada estática que contém o analito em uma concentração menor do que no seio da solução. Tal gradiente de concentração gera dificuldades para o processo de captação dos analitos pela fibra – a transferência do analito para a fibra, nesta camada estática, ocorre através de um lento processo de difusão. Porém, esta situação desfavorável pode ser facilmente minimizada, efetuando-se uma agitação eficiente da amostra líquida (ULRICH, 2000).

O tempo requerido para o equilíbrio, t_e , no modo direto, depende apenas da espessura do filme líquido da fibra, L_f , e do coeficiente de difusão do analito na fibra extrativa, D_f :

$$t_e = \frac{L_F^2}{2D_F} \quad (16)$$

Aumentos na espessura do recobrimento, apesar de propiciar uma maior quantidade de analito retido pela fibra, gera maiores tempos de extração. Por outro lado, alguns parâmetros de operação devem ser cuidadosamente avaliados, como a temperatura de extração e o nível de agitação da amostra, a fim de otimizar o coeficiente de difusão do analito na fibra coletora (PAWLISZYN, 1997).

No modo *headspace* sem agitação da amostra, o tempo de equilíbrio pode ser expresso por (VALENTE & AUGUSTO, 2000):

$$t_e = 1,8 \left(\frac{L_H}{K_{HA} D_H} + \frac{L_S}{1,6 D_A} \right) K_{FA} L_F \quad (17)$$

onde L_H , L_A e L_F são as espessuras do *headspace*, da amostra e do filme líquido, respectivamente; D_H e D_A , os coeficientes de difusão do analito no *headspace* e na amostra, nesta ordem; e K_{HA} e K_{FA} as constantes de distribuição do analito nas fases *headspace*/amostra e fibra/amostra, respectivamente.

Uma análise da equação (17) nos revela que reduções na espessura das fases diminuem o tempo de equilíbrio, porém tais reduções são limitadas a alguns aspectos: uma diminuição na espessura do filme líquido, L_F , diminui também a capacidade da fibra em extrair os analitos – como já discutido, as películas mais finas retêm uma menor quantidade de analitos, o que pode comprometer a análise de matrizes ao nível de traços. Além disso, reduções significativas da espessura da amostra, L_A , podem também comprometer a sensibilidade do método e, quando aliada à diminuição da espessura do *headspace*, L_H , pode também produzir efeitos indesejáveis à termodinâmica do processo, principalmente, quando a concentração do analito difere bastante nas duas fases – amostra e *headspace* (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

Um aumento nos coeficientes de difusão, D_H e D_A , também diminui o tempo de extração. Isto pode ser conseguido com agitação eficiente da amostra e/ou aquecimento. Quanto às constantes de distribuição, K_{HA} e K_{FA} , o tempo de extração é otimizado para analitos com pequenas constantes de distribuição entre as fases fibra/amostra, K_{FA} , e com grandes constantes de distribuição nas fases *headspace*/amostra, K_{HA} (VALENTE & AUGUSTO, 2000). No desenvolvimento do método, a compreensão da cinética do processo é de grande utilidade para se alcançar os objetivos da análise.

É importante salientar que pode-se trabalhar fora da condição de equilíbrio, principalmente nos casos em que o tempo de extração é excessivamente longo. No entanto, as condições de extração devem ser extremamente bem controladas para assegurar a precisão do método, tais como o grau de agitação da amostra e a temperatura. Nestes casos, é fundamental uma boa reprodutibilidade dos tempos de extração em cada amostra, pois variações deste comprometeriam facilmente as determinações. Amostradores automáticos são mais indicados nestas situações (MESTER et al., 2001).

4.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um bloco de experimentos de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que desejamos. Basicamente, existem dois meios através dos quais pode-se otimizar um determinado processo – o primeiro, a otimização univariada, que leva em consideração apenas os efeitos das variações de um determinado fator sobre a resposta, sem levar em conta as interações entre os fatores envolvidos - e o planejamento multivariado, no qual além da análise dos efeitos individuais, são também investigadas as interações entre os diversos fatores (NETO et al., 2003).

O planejamento univariado é anti-econômico, com um número excessivo de ensaios e com grande gasto de material. Além disso, é válido apenas nos casos em que as interações entre os fatores não são significativas para o processo em estudo. As técnicas multivariadas têm sido

largamente utilizadas por serem rápidas, mais econômicas e por conduzirem, de modo efetivo, a otimização simultânea de mais de um fator (FERREIRA et al., 2002).

A otimização multivariada tem como etapa inicial a seleção dos fatores estatisticamente mais significativos para o processo e, na segunda etapa, a determinação das condições ótimas de operação. A primeira etapa é normalmente executada através de planejamentos fatoriais, fracionários ou completos, nos quais os fatores sofrem variações em apenas dois níveis. Tais planejamentos produzem, com um número bem reduzido de experimentos, uma idéia inicial do sistema a otimizar. No passo seguinte, procura-se pela região do domínio onde o sinal analítico é máximo e, para isto, os fatores mais significativos são variados em mais de dois níveis. Assim, uma superfície de resposta é gerada, apontando possíveis regiões de máximo. Planejamentos do tipo composto central, Box-Behnken e matriz Doehlert são bastante empregados para este fim (FERREIRA et al., 2004).

Na etapa inicial, devem ser definidos os critérios e objetivos do trabalho, de modo a facilitar a escolha da variável de resposta e dos fatores a serem investigados, nos níveis mínimo e máximo do domínio experimental (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Como resultado da execução deste planejamento teremos um modelo de primeira ordem e a função que relaciona a resposta obtida e os fatores em estudo, no caso de apenas dois fatores, pode se apresentar nas formas:

$$Y(X) = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + R \quad (18)$$

$$Y(X) = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + R \quad (19)$$

Onde, a_0 é o termo independente; a_1 e a_2 são os coeficientes dos termos lineares e R é o resíduo. A diferença básica entre estes dois modelos é que no segundo (equação 19) considera-se a interação entre os fatores.

Na segunda etapa, o objetivo principal do planejamento é encontrar as melhores condições de trabalho, isto é, maximizar ou minimizar a resposta de interesse. A técnica conveniente é a metodologia de superfícies

de resposta (RSM) que também se baseia na modelagem por mínimos quadrados. Uma vez encontrada a equação que descreve a influência das variáveis sobre a resposta que leva às melhores condições operacionais, deve-se avaliar a qualidade do ajuste do modelo proposto (NETO et al., 2003).

A função $Y(X)$ que correlaciona a resposta obtida e os fatores de interesse é um polinômio de segunda ordem. Assim, para o caso de dois fatores teremos uma equação do tipo:

$$Y(X) = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{12}X_1X_2 + R \quad (20)$$

Onde, a_0 é o termo independente; a_1 e a_2 são os coeficientes dos termos lineares; a_{11} e a_{22} são os coeficientes dos termos quadráticos; a_{12} é o coeficiente da interação e R é o resíduo.

4.6.a. IDENTIFICAÇÃO DOS FATORES SIGNIFICATIVOS

O planejamento fatorial em dois níveis é uma técnica de planejamento multivariado bastante empregada para avaliar quais fatores exercem maior significância para um determinado processo em estudo. O modelo gerado é linear e, portanto, não fornece os valores críticos (ótimos) que produzem as melhores respostas analíticas, servindo apenas para estudos preliminares do processo ou para testar a robustez de um método já otimizado (BOSQUE-SENDRA et al., 1999).

O planejamento em dois níveis pode ser representado por 2^k , onde K representa o número de fatores e 2, o número de níveis (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Obviamente, a medida em que se aumenta o número de fatores K , cresce também o número de ensaios necessários para executar o planejamento. Dessa forma, para $k=2$, teremos $2 \times 2 = 4$ ensaios; para $k=3$, teremos $2 \times 2 \times 2 = 8$ ensaios; e para k fatores, teremos $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios.

Inicialmente, deve-se definir qual domínio e quais fatores serão avaliados no planejamento. Nas situações em que o conhecimento do caso

limita-se a apenas alguma experiência prática ou pequena informação bibliográfica, planejamentos fatoriais podem ser realizados para avaliar as variáveis mais importantes no processo. São extremamente econômicos e podem ser usados para estudar a influência de dezenas de fatores de uma só vez, com um mínimo possível de experimentos (ARAMBARRI et al., 2004).

Deve-se realizar replicatas dos ensaios para que seja possível a determinação dos erros experimentais e podem ser feitas no ponto central do planejamento, quando for possível. Os ensaios devem ser conduzidos de forma completamente aleatória (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

A representação +1 e -1 indica os valores codificados dos fatores, no nível baixo (-1) e no nível alto (+1). A equação abaixo é utilizada para converter valores codificados em valores reais, e vice-versa.

$$C_i = \left| \frac{X_i - X_i^0}{CX_i} \right| k \quad (21)$$

onde, C_i é o valor codificado; X_i é o valor real; X_i^0 é o valor central do planejamento; CX_i é o passo central do planejamento, que corresponde a metade da amplitude do domínio e k é o valor codificado máximo que a variável assume no planejamento.

Para se avaliar a importância de cada fator no processo se faz necessário o cálculo dos efeitos gerados. Existem efeitos principais, aqueles nos quais estão envolvidos um único fator e os efeitos das interações, que consideram a ação conjunta de mais de um fator na resposta obtida. Considerando um planejamento com dois fatores em dois níveis, o efeito principal do fator 1 é por definição a média dos efeitos deste fator nos dois níveis do fator 2 (NETO et al., 2003). O efeito principal do fator 1 pode ser determinado pela equação abaixo:

$$E_1 = \frac{(\bar{y}_2 - \bar{y}_1) + (\bar{y}_4 - \bar{y}_3)}{2} \quad (22)$$

onde E_j representa o valor do efeito principal da fator 1 e \bar{y}_i é a resposta média entre as replicatas nas condições do i-ésimo ensaio.

Valores positivos para o efeito indicam que, com o aumento no valor do parâmetro, dentro do domínio em estudo, provoca também aumento na resposta. Valores negativos sugerem que ao se aumentar o valor do fator, haverá perda de resposta. Através da análise dos efeitos pode-se, portanto, estimar a significância estatística de um dado fator, ou da interação entre fatores, sobre o processo. Após a execução dos experimentos, com posse dos dados obtidos, pode-se lançar mão de *softwares* estatísticos, como o STATISTICA 6.0 da StatSoft Inc.(Tulsa-USA) (CALADO & MONTGOMERY, 2003) para determinar a importância dos fatores e suas interações, por meio da análise de variância (ANOVA). A interpretação pode também ser obtida por meio dos diagramas de pareto, que são gráficos em barras horizontais (ou linhas) cujo tamanho é proporcional ao efeito estimado do fator ou das interações. Na figura 6, observamos um exemplo deste tipo de diagrama.

Verifica-se na figura 6 que o fator A é significativo para o processo, pois a barra horizontal ultrapassa a linha vertical (pontilhada vermelha), que corresponde ao limite de confiança de 95%. Por outro lado, o fator B e a sua interação com o fator A não são importantes para o processo. O efeito do fator A é positivo, indicando que para a otimização do processo, deve-se definir, na etapa posterior da otimização, um novo domínio experimental em torno do nível alto. Para o fator B se verifica exatamente o contrário.

Se o planejamento apresenta um número grande de fatores a serem investigados, se faz necessário aplicar um planejamento reduzido para que a quantidade de experimentos não seja excessiva, comprometendo uma das principais vantagens das estratégias multivariadas. O planejamento fatorial fracionário, assim como o planejamento Plakett-Burman, tem a função de conhecer os fatores mais significativos para o processo que se deseja otimizar, com o mínimo de ensaios possíveis (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

Segundo Montgomery (2002), através do planejamento fracionário é possível avaliar os efeitos de k fatores em dois níveis, sobre uma resposta de interesse, através da realização de 2^{k-p} ensaios. Se p é igual a um, o

número de ensaios é igual à metade do que seria efetuado por meio de um planejamento fatorial completo e para p igual a dois, o número de ensaios necessários representaria 25% do total requerido para um planejamento completo.

O planejamento fracionário despreza as interações de ordens superiores e considera apenas os efeitos principais e as interações de ordem menor, normalmente de segunda ordem. Isto reduz sobremaneira o número de experimentos que seriam necessários, caso o planejamento fatorial fosse completo, economizando tempo e material sem comprometer a qualidade das conclusões obtidas com a análise dos resultados (NETO et al., 2003).

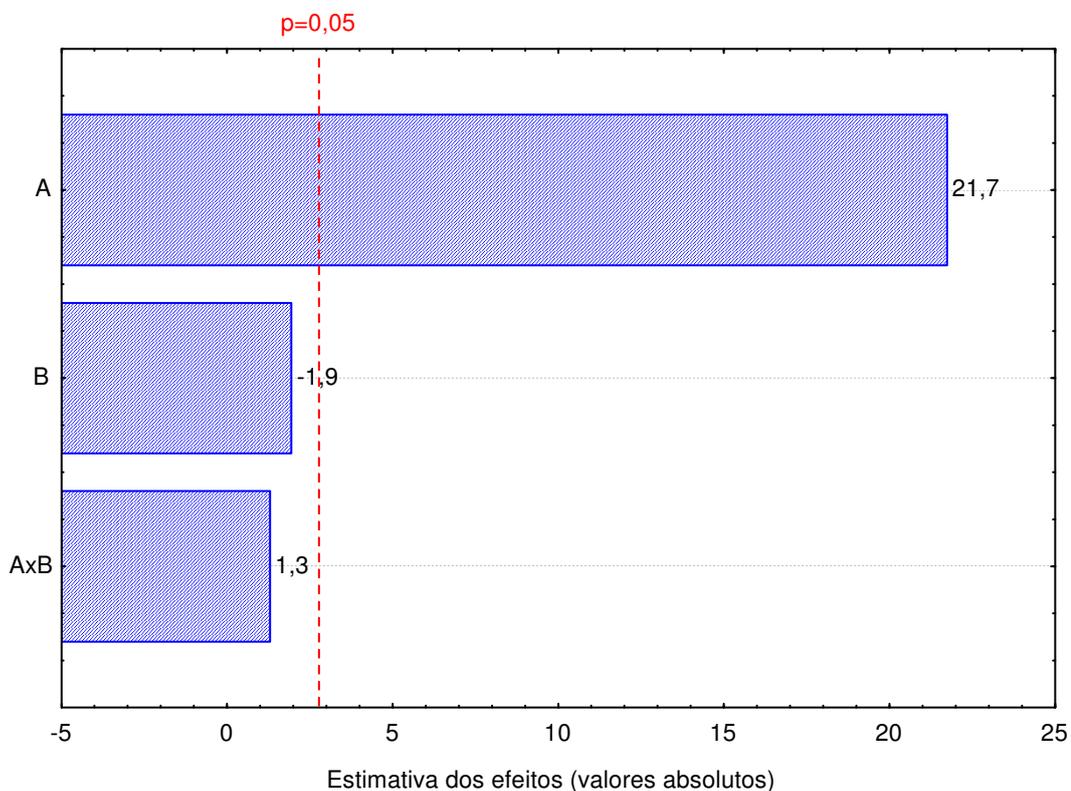


Figura 6. Gráfico de Pareto

Assim, para um sistema com cinco fatores a investigar, teríamos um planejamento completo do tipo 2^5 , ou seja, com 32 corridas. Se não fosse possível executar réplicas no ponto central (no caso de existir um fator qualitativo, por exemplo) dever-se-ia realizar os experimentos em duplicata, o que elevaria o número de ensaios para 64. Um planejamento fracionário

com cinco fatores, representado por 2^{5-1} , seria realizado em apenas 16 ensaios e, com no mínimo, mais 3 ensaios no ponto central do planejamento.

4.6.b. DETERMINAÇÃO DOS VALORES CRÍTICOS

A segunda etapa da otimização busca os parâmetros ótimos de operação. Para isto pode-se trabalhar com uma metodologia de superfícies de resposta, que é capaz de gerar um modelo quadrático do qual se pode obter pontos de máximo (ou mínimo) para o processo. Dentre os planejamentos mais utilizados para este fim podemos citar o planejamento composto central. Neste, assume-se que o ponto central para cada um dos fatores é 0 (valor codificado) e o planejamento é simétrico ao redor deste valor central (ARAMBARRI et al., 2004).

O Planejamento composto central é constituído dos pontos experimentais do planejamento fatorial fracionário (2^k) acrescido $2k$ “pontos estrela” – estes encontram-se localizados a uma distância $+\alpha$ e $-\alpha$ do ponto central do domínio escolhido. Além destes pontos são realizadas replicatas no ponto central, geralmente de 3 a 5 réplicas. Assim, teremos para o total de pontos necessários à execução do planejamento:

$$N = 2^k + 2k + C_0 \quad (23)$$

onde k é o número de fatores investigados e C_0 é a quantidade de réplicas no ponto central. Os planejamentos composto central são largamente utilizados na otimização de metodologias da química analítica (FERREIRA et al., 2004)

A distância α é denominada condição de rotabilidade e a inclusão destes pontos no planejamento gera condições de igualdade em todas as direções. (ARAMBARRI et al., 2004). Segundo Calado e Montgomery (2003), a rotabilidade (α) é uma propriedade esférica, isto é, ela é um critério do projeto, usado quando a região de interesse é uma esfera. No entanto, não é importante ter uma rotabilidade exata para se ter um bom planejamento. Na verdade, para uma região esférica de interesse, a melhor

escolha de α , do ponto de vista de previsão de variância, pode ser calculada pela relação $\alpha = (k)^{1/2}$, onde k é o número de fatores em análise. Todos os pontos do planejamento fatorial e axial ficam sobre uma esfera de raio $(k)^{1/2}$.

Uma vez executado o planejamento, teremos dados experimentais suficientes para construir o modelo quadrático com sua correspondente superfície de resposta (figura 7). Ao derivarmos esta função em relação a cada uma das variáveis independentes em estudo e, igualando-se a zero esta derivada, teremos os pontos críticos do projeto, ou seja, as condições que geram a melhor resposta analítica (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

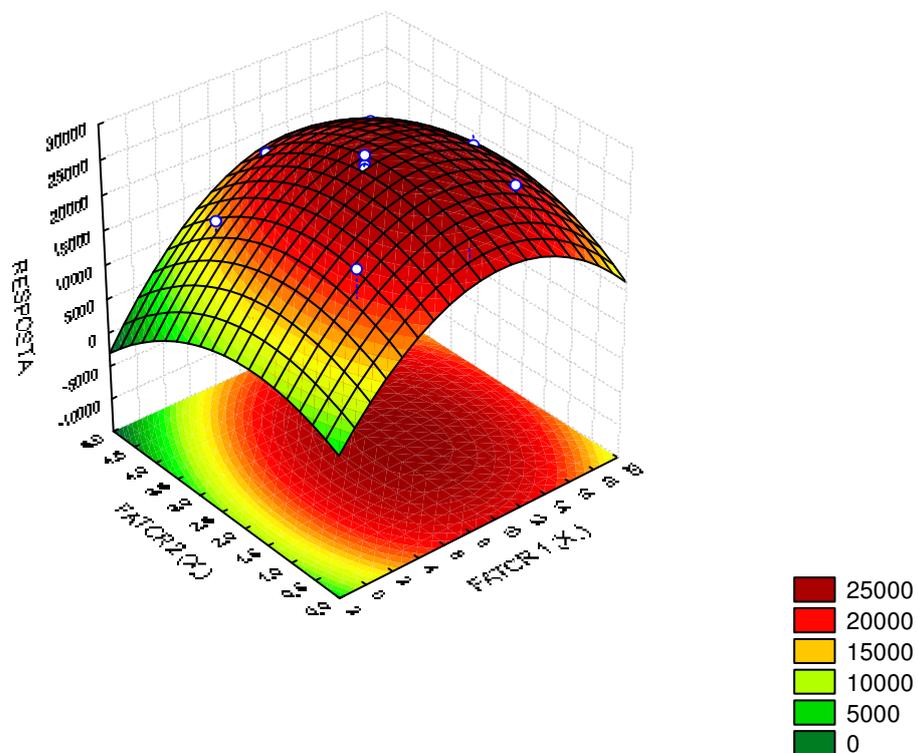


Figura 7. Superfície de resposta.

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os primeiros trabalhos publicados sobre a técnica SPME relatam os principais aspectos deste método de preparação de amostras.

Arthur e Pawliszyn (1990) desenvolveram um trabalho com o objetivo de avaliar algumas características da microextração em fase sólida como o tempo de extração, efeito da agitação da amostra sobre o tempo de extração, linearidade, seletividade, efeito de interferentes, efeito da força iônica e reprodutibilidade. As fibras de sílica fundida, sem qualquer tipo de recobrimento, foram usadas na extração de bifenilos policlorados e benzenos clorados, e eram recobertas com poliamida no caso da extração de haletos de alquila. A quantificação dos compostos foi feita a partir de um detector por captura de elétrons (ECD). Foi feita uma adaptação de seringas utilizadas na injeção de amostras em cromatografia gasosa, para alojar a fibra no seu interior. Constatou-se que o tempo de extração é maior quando não se aplica qualquer tipo de agitação na amostra. A variação da concentração de NaCl nas amostras não provoca qualquer tipo de alteração significativa no sinal analítico obtido. Por outro lado, verificou-se baixa precisão dos dados obtidos. Dois fatos foram atribuídos a isto: o equilíbrio não foi completamente atingido em muitos dos ensaios e a mudança da posição da fibra na dessorção, gera diferenças marcantes na resposta obtida.

Louch, Motlagh e Pawliszyn (1992) verificaram o desempenho das fibras PDMS com diversas espessuras de recobrimento no modo direto de extração. Vários modos de agitação foram testados como ultra-som, agitação magnética, inserção e retração manual da fibra. Evidenciou-se que quanto mais eficiente o nível de agitação da solução, menor o tempo requerido para completar a extração. Confirmou-se que, com o aumento da

espessura da camada de PDMS, aumenta-se também a quantidade de analito extraído da amostra, porém gera um aumento significativo do tempo de equilíbrio. Concluiu-se que há possibilidade de perda do analito no transporte do dispositivo até o cromatógrafo, com o término da extração. As constantes de distribuição dos analitos nas fases recobrimento/água foram medidas, encontrando-se os valores: 125 para o benzeno, 294 para o tolueno e 831 para o p-xileno. O trabalho também conclui que a quantidade de analito extraído é diretamente proporcional à concentração do mesmo na amostra, porém a variação de concentração da solução aquosa não afeta o tempo de equilíbrio. O limite de quantificação para a técnica é de aproximadamente $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ com fibra de 56 micrometros de espessura e detecção FID.

Arthur e co-autores (1992) avaliaram um modo de automação da técnica SPME. Para isto empregaram um amostrador automático. Os fatores que afetam a precisão e exatidão do método foram testados e otimizados. A precisão foi afetada por variações na posição da fibra dentro do injetor. As análises apresentaram RSD abaixo de 4%, após otimização de fatores que afetam diretamente a exatidão do método. A exatidão não foi afetada pela presença de metanol ou cloreto de sódio em concentração abaixo de 1%, e pH na faixa de 4-10 para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. A temperatura também não tem efeito significativo sobre o método no domínio de 0 a 40°C . Os limites de detecção alcançaram de $0,3$ a $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os compostos em estudo utilizando uma fibra de sílica fundida com 56 μm de recobrimento PDMS com detector FID.

Potter e Pawliszyn (1992) estudaram a hifenção SPME-GC-IT-MS, usando fibras de PDMS com 100 micrometros de espessura na extração de BTEX em amostras de água, através da inserção da fibra diretamente na solução aquosa (amostras de água de descarte, amostras de água do próprio laboratório e água potável). Foi encontrado para a técnica um limite de quantificação 50 pg.mL^{-1} de benzeno em água, o que corresponde a uma quantidade de 5 pg de benzeno absorvido pela fibra. O limite de detecção para o benzeno encontrado foi de 15 pg.mL^{-1} . Para o o-xileno em soluções a 50 pg.mL^{-1} , foram absorvidos pela fibra 50 pg indicando LQ e LD 10 vezes

maior do que aqueles encontrados para o benzeno. A linearidade do método abrange uma faixa de concentração que varia de 50 pg.mL⁻¹ até 50 ng.mL⁻¹. Os desvios padrão relativos variaram de 2,7 a 5,2% para soluções de BTEX a 15 ng.mL⁻¹ e de 5,5 a 7,5% para soluções aquosas de BTEX a 50 pg.mL⁻¹.

Zhang e Pawliszyn (1993) desenvolveram um estudo teórico-experimental do equilíbrio e da cinética, relativos a microextração em fase sólida no modo *headspace*. Utilizou-se uma fibra com 56 µm de espessura para capturar moléculas de BTEX e PAHs na fase gasosa acima da solução aquosa. Os tempos de equilíbrio para os BTEX foram menores em torno de 1 min, contra os 5 min necessários no modo direto. O modo *headspace* permite, além disso, a análise de matrizes sólidas. Foi também avaliado um modelo cinético unidimensional que estuda o processo de difusão das moléculas do analito. Os dados gerados pelo modelo teórico são condizentes com os dados experimentais. As constantes de partição nas fases *headspace*/água para o benzeno, tolueno e p-xileno são similares, assim quanto maiores forem as constantes de distribuição destes nas fases recobrimento/*headspace* maior o tempo de equilíbrio. Avaliaram também o efeito do nível de agitação da amostra aquosa sobre o tempo de equilíbrio através da análise de soluções aquosas contendo benzeno e o-xileno, na concentração de 1 mg.L⁻¹. Para o benzeno a agitação não exerce nenhuma influência significativa no tempo de equilíbrio. Por outro lado, para o analito o-xileno, um maior nível de agitação reduz consideravelmente o tempo de equilíbrio.

Sarna e co-autores (1994) publicaram um trabalho que relata as vantagens obtidas pelo emprego de uma coluna capilar aberta, na separação de BTEX a partir da microextração em fase sólida com fibra PDMS 100, em matrizes aquosas e detecção por ionização de chama. A utilização deste tipo de coluna foi importante por dois motivos: (1) a não necessidade de *cryofocussing*, necessário em todos os estudos já realizados com SPME. (2) constatou-se boa resolução dos picos do m- e p-xilenos – em trabalhos anteriores seja por técnicas convencionais de extração ou por SPME, os dois componentes apresentam os mesmos tempos de retenção,

sendo representados por um mesmo pico cromatográfico. Estudou-se também a posição ótima da fibra no injetor do cromatógrafo a gás. O limite mínimo de detecção da técnica ficou entre 0,05 ng, para o etilbenzeno, e 0,4 ng para benzeno e tolueno. Os coeficientes de determinação ficaram entre 0,9507 (benzeno) e 0,9973 (o-xileno).

Um trabalho publicado em 1995, também de autoria de Zhang e Pawliszyn, investigou a influência do aquecimento de amostras de areia e água contaminadas com BTEX, por HS-SPME, com resfriamento interno da fibra. Sabe-se que o aumento da temperatura da solução aquosa facilita a saída dos hidrocarbonetos da amostra em direção a fase *headspace*. Isto faz com que os tempos necessários ao equilíbrio dos analitos nas fases envolvidas sejam menores. Por outro lado, também é conhecido o fato de que com o aumento da temperatura da fibra, uma menor quantidade de analito é extraída pela camada polimérica. Ou seja, apesar de acelerar a cinética do processo de extração, o aumento da temperatura prejudica a sensibilidade do método. Uma possível solução é um dispositivo no qual a fibra seja resfriada internamente com fluxo de gás carbônico. Extrações quantitativas foram conseguidas com esse dispositivo em intervalos de tempo menores que 5 min. Os limites de detecção estão entre 0,12 e 0,33 pg.g⁻¹ para os compostos investigados. Os autores também desenvolveram um estudo da termodinâmica do processo e calcularam as constantes de partição dos analitos nas fases recobrimento/*headspace*.

Facchetti et al. (1997), desenvolveram estudos inter-laboratoriais para a validação da microextração em fase sólida, na extração e quantificação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) em matrizes aquosas, incluindo BTEX. A SPME foi comparada com as técnicas usuais, *Purge & Trap* e *headspace estático*. A repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão, para o método SPME, foi similar às encontradas para as outras técnicas. Uma melhor precisão para a SPME foi alcançada no modo *headspace*, contra o modo direto. A linearidade foi boa em todos os casos e os limites de detecção encontrados, em vários casos, esteve abaixo de 100 ng.L⁻¹.

Após a consolidação da técnica como método analítico, as pesquisas voltaram-se mais para a aplicação desta metodologia na análise diretamente

em campo, envolvendo amostras gasosas, sólidas e aquosas, e aplicações práticas nos diversos ramos da análise química como: alimentos, saúde, meio ambiente, biologia, medicina, dentre vários outros.

Kageura et al. (2000) otimizaram a SPME, no modo *headspace*, para a extração de hidrocarbonetos voláteis em amostras de sangue. Vinte diferentes hidrocarbonetos foram incluídos no estudo: alifáticos, do n-hexano ao n-tridecano, e aromáticos, do benzeno ao trimetilbenzeno. O método pode ser aplicado na medicina forense, no exame de corpos queimados, para se chegar a conclusão de a morte ter ocorrido antes ou depois do incêndio. As fibras PDMS 100 foram expostas na fase *headspace* das amostras de sangue, por 30 min. Em seguida os analitos eram dessorvidos no cromatógrafo a gás, equipado com detector de massas. O método apresenta baixo limite de detecção ($0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$). As linearidades (R^2) encontradas foram, na faixa de $0,01$ até $4 \mu\text{g.g}^{-1}$: de $0,9392$ a $0,9935$ para os hidrocarbonetos alifáticos e de $0,9638$ a $0,9994$ para os aromáticos. Os coeficientes de variação, na concentração de $0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ ficaram abaixo de $8,6\%$ (n-undecano).

Menéndez et al. (2000) compararam a quantificação de BTEX em amostras de água por cromatografia gasosa com detector FID, via diferentes métodos de preparação de amostras: *headspace* estático (HS), microextração em fase sólida no modo direto (SPME) e microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). Para a microextração em fase sólida empregou-se fibra PDMS com espessura de recobrimento de 100 micrometros. A fibra virgem foi condicionada no injetor do cromatógrafo a 250°C , durante 1 hora. Para a extração no modo direto empregou-se um tempo de 10 min para a coleta dos analitos e de 3 min para a dessorção dos mesmos no injetor a 250°C . Empregou-se agitação constante para diminuir o tempo de extração na temperatura ambiente, 10 ml de amostras de água em vial de 12 mL. No modo *headspace*, tempo de extração de 4 min com agitação constante de 12 mL de amostras aquosas em vial de 22 mL, nas mesmas condições de dessorção empregada no modo direto. De acordo com os dados recolhidos, os autores concluem que as três técnicas são exatas e apresentam boa precisão e afirmam que a técnica de microextração

em fase sólida no modo *headspace* é a mais adequada para a coleta de BTEX em matrizes aquosas. Além de oferecer os menores limites de detecção envolve também menor tempo na extração.

Ménard et al. (2002) conduziram um estudo sobre a contaminação de um aquífero usado como fonte de água potável, a partir de múltiplas técnicas analíticas. O objetivo principal desse trabalho foi constatar a presença de gasolina e outros derivados do petróleo, além de outros compostos orgânicos voláteis em água para consumo humano. Foi de interesse também determinar o gradiente de contaminação em diferentes profundidades no aquífero. As técnicas empregadas nas análises de amostras de água, incluíram: cromatografia gasosa com detecção FID e espectrometria de massas, microextração em fase sólida e *headspace* CG-MS. O estudo revelou que os hidrocarbonetos presentes na amostra A (próximo à superfície da água, 0 a 5m) eram basicamente provindos de gasolina e frações mais pesadas de petróleo. As concentrações de TPHs (hidrocarbonetos totais do petróleo) e BTEX, 1070 e 155 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. As amostras colhidas entre 15 e 16 metros de profundidade, amostra B, também estavam contaminadas, mas em um grau bem menor. As concentrações de TPH e BTEX foram iguais a 130 e 2,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de água do aquífero, respectivamente. Além disso, a presença de uma grande variedade de compostos clorados foi também identificada.

Matisová et al. (2002) investigaram a precisão e repetibilidade da técnica SPME no modo *headspace* na análise de BTEX em amostras de água. Para isto foram testados dois tipos de frascos: o comum, selado com septo comum e outro, desenvolvido pela equipe de pesquisa, com uma tampa fixa de teflon com um orifício capilar central. Traz como principais vantagens iniciais a redução de custos pela não necessidade de reposição do septo. Além disto, os autores enfatizam que é melhor ter um erro constante a ter erros que variam com o formato do septo no vial fechado. Estudos anteriores comprovaram a perda negligenciável de analitos pela abertura capilar no vial, nas condições dos experimentos. As extrações foram efetuadas com agitação da amostra de água na temperatura de 25°C, com fibras de polidimetilsiloxano com 100 μm de espessura. O tempo de

extração foi de 5 minutos e 1,5 minuto para a dessorção. Os dados obtidos mostraram a possibilidade de se utilizar a técnica SPME com frascos de tampa perfurada, sem prejuízos para os resultados.

Xiong, Chen e Pawliszyn (2003) desenvolveram, um método para calibração do método SPME na extração de BTEX no ar, diretamente no local de coleta da amostra. (1) antes de expor a fibra ao ar, ela é colocada em contato com a solução gasosa do padrão (tetracloroetileno), capturando as moléculas do mesmo; (2) a fibra é exposta a amostras reais ou sintéticas de ar, contaminado com os analitos de interesse (BTEX). As fibras testadas foram CAR-PDMS 75 μm , PA 85 μm , PDMS 100 μm e PDMS-DVB 65 μm . Aquela que apresentou maior poder de retenção dos analitos em estudo foi a CAR-PDMS 75 μm . Resultados bastante satisfatórios foram obtidos na quantificação de BTEX na atmosfera local de um posto de gasolina com tetracloroetileno. A técnica se mostrou apropriada para a coleta de BTEX no ar e pode ter várias aplicações como a detecção de vazamentos de óleo cru ou de combustíveis derivados do petróleo.

Nardi (2003), propõe uma adaptação à técnica SPME, denominada *in-tube SPME*, na extração de BTEX em matrizes aquosas. O método proposto sugere o recobrimento interno (48 nm) de fibras capilares de tamanhos diversos (5.7, 13.5 e 170 cm) com diâmetro interno de 0,21 mm. Extrações com os capilares de menor comprimento requereram 30 s para se completarem, enquanto que o capilar de 170 cm, necessitou de tempo maior para que o equilíbrio entre as fases fosse atingido. Devido a sua reduzida espessura de recobrimento, 2084 vezes menor do que o de uma fibra comercial PDMS 100 μm , os capilares extratores realizam uma extração em tempo mínimo e com a extração não há mudança significativa da concentração livre dos analitos na amostra. A técnica pode encontrar várias aplicações na análise ambiental bem como na forense, áreas que muitas vezes disponibilizam um volume muito pequeno de amostra a ser analisada.

Chen et al. (2003) investigaram a coleta em campo e extração rápida de BTEX com fibras PDMS-DVB e CAR-PDMS por SPME. Um sistema de fluxo contínuo da solução aquosa padrão de BTEX foi idealizado para simular as condições naturais. Parâmetros que afetam o processo de

extração foram avaliados incluindo tempo de extração, concentração, velocidade do fluxo de água e temperatura. Várias concentrações da solução padrão foram testadas e verificou-se que a massa obtida em cada extração varia linearmente com a concentração do analito na amostra. O aumento do fluxo da solução aquosa faz aumentar também a massa capturada de BTEX, porém de modo não linear. A temperatura não afeta significativamente a massa extraída nas condições de coleta dos analitos em campo. Com os dados obtidos foi sugerido um modelo empírico e, as massas obtidas nos ensaios aproximam-se bastante daquelas previstas pelo modelo. O modelo foi também testado em coletas de BTEX em amostras de ar e verificou-se que também pode ser utilizado para este fim.

Cho et al. (2003) sugeriram uma metodologia de extração de BTEX por SPME no modo *headspace*, empregando fibra Carboxen-PDMS. De modo geral, as respostas obtidas com a nova fibra são muito melhores do que aquelas obtidas com a fibra mais usualmente empregada, PDMS. Apesar disso, verificou-se também uma redução da quantidade extraída dos analitos quando a fibra Carboxen-PDMS se encontrava num meio contendo vários tipos de analitos, devido a competição entre os mesmos por sítios ativos na camada polimérica. A afinidade dos analitos pela fibra decresce na ordem: xilenos > etilbenzeno > tolueno > benzeno. Além disso, a quantidade de benzeno e tolueno extraída pela fibra não apresenta uma tendência compatível com o aumento da concentração destes analitos. Os resultados indicam prudência no emprego deste tipo de fibra na extração de BTEX, em matrizes aquosas.

Paschke & Popp (2004), propuseram-se a testar um modelo semi-empírico para a extração de voláteis orgânicos, neste caso BTEX e clorobenzenos, em matrizes aquosas, por SPME no modo direto. Tal modelo tem como principal objetivo, propor uma metodologia para se diagnosticar a concentração do analito nas amostras de água, por meio da determinação da massa retida pela fibra após a extração. As massas de BTEX retidas pela fibra PDMS-DVB 65 µm, diferem consideravelmente daquelas publicadas em trabalhos anteriores, mostrando que a comparação de desempenho na extração entre diferentes fibras é uma importante questão a se debater,

quando os resultados são expressos em termos de massa dos analitos. Propõem uma modificação no modelo semi-empírico e sugerem que sejam feitos mais ensaios.

Arambarri et al. (2004) desenvolveram um método para análise simultânea de BTEX e éteres de baixa massa molar presentes na gasolina. Propuseram a extração dos analitos via HS-SPME e posterior injeção em cromatógrafo a gás equipado com detecção por ionização de chama. A otimização das melhores condições para a etapa de extração empregou técnicas de planejamento multivariado, tanto na escolha dos fatores mais significativos para o método, bem como nos seus valores ótimos. Estudou-se, entre outros aspectos, o comportamento de dois tipos de fibras: PDMS e a fibra mista PDMS-DVB.

Na primeira etapa da otimização se empregou uma matriz de Plackett-Burman. Após esta etapa, concluem que não são estatisticamente significativos o tempo de extração, o pH do meio e o tempo de dessorção, fixados em 10 min, 5,8 e 1 min, respectivamente. Na segunda etapa, utilizando um planejamento do tipo composto central, definiram os valores ótimos para os fatores: temperatura de extração, concentração de NaCl na amostra e volume disponível para a fase gasosa (*headspace*). A execução do planejamento ofereceu como melhores condições de extração: temperatura de 9,9°C, volume da fase *headspace* 20 mL e concentração de NaCl de 294,3 g.L⁻¹.

Na análise de amostras reais foram empregadas amostras de água em Gipuzkoa, norte da Espanha, sendo 16 delas em localidades próximas a postos de gasolina e 9 em atracadouros de barcos pesqueiros. Foi empregada a fibra PDMS-DVB, tempo de extração de 10 min e temperatura de 10°C. Agitaram-se as amostras na taxa de 1000 rpm e empregou-se um tempo de dessorção de 1 min a 250°C. Estas análises revelaram que o tolueno foi o analito mais encontrado (90% das amostras).

Liu et al. (2005) propuseram, através deste trabalho, a utilização de um recobrimento iônico líquido em fibra para SPME de BTEX em tintas a base de água, no modo *headspace*. Empregou-se cromatografia gasosa na separação e detecção por ionização de chama (FID). Antes de cada

extração, a fibra de sílica fundida foi recoberta com o líquido iônico, a fibra era então exposta a fase headspace da amostra, extraindo os analitos, que eram então dessorvidos no injetor do cromatógrafo. A fibra era então lavada com solventes e ficava pronta para receber uma nova camada do líquido iônico. Os resultados obtidos com esta fibra foram similares aos encontrados com fibras SPME comerciais. Para as quatro amostras de tintas estudadas, o benzeno se encontrava abaixo do limite de detecção do sistema, porém os outros BTEX estavam em quantidades relativamente altas (56-271 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e com recuperações entre 70-114%. Comparando-se com as fibras comerciais, o recobrimento em estudo apresenta-se mais econômico, reprodutibilidade similar (RSD < 11%), apresentando-se como boa alternativa na extração de BTEX.

A possibilidade de quantificar BTEX a partir da fase *headspace* das misturas líquidas orgânicas empregadas na limpeza de material sujo com asfalto, por meio de SPME e cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, foi avaliada por Tang e Isacson (2005). Além destes analitos investigou-se também o 1,3,5-trimetilbenzeno e o 1,2,4-trimetilbenzeno. Foram estudados os parâmetros experimentais que influenciam a eficiência do HS-SPME: tempo de equilíbrio entre as fases envolvidas, quantidade de amostra e efeito da matriz. Os limites de detecção encontrados ficaram na faixa de 0,03 – 0,8 $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Boa linearidade foi observada ($r^2 > 0,999$) para todos os analitos. O desvio padrão relativo ficou abaixo de 10% (geralmente abaixo de 5%), revelando boa repetibilidade do método. A exatidão do método, dada pela taxa de recuperação, ficou entre 85% e 106% (geralmente entre 95 e 105%). O método pode se constituir numa ferramenta válida para extração de hidrocarbonetos aromáticos em diferentes tipos de matrizes orgânicas

Wang et al. (2005) estudaram a padronização interna do método SPME por meio da adição de um padrão à fibra antes da exposição da mesma à amostra. Foram investigados modos possíveis de carregar a fibra com quantidades reprodutíveis do padrão. Foi encontrado que, ao se adicionar alguns miligramas de padrões como benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos (BTEX) e/ou naftaleno em poucos gramas de óleo para

bombas, em vial selado de 20 mL, tem-se um excelente gerador de padrões. Uma única solução pode conduzir a pelo menos a cem padronizações da fibra, com reprodutibilidade muito boa (RSD < 4%). Quando a fibra carregada com o padrão é inserida no vial contendo os analitos ocorre, simultaneamente, a dessorção do padrão na amostra e a captação das moléculas de interesse. A quantificação é baseada no equilíbrio de distribuição das moléculas dos padrões e dos analitos, entre a fibra e a amostra dentro do vial. Uma comparação foi feita entre os perfis de equilíbrio obtidos no modo tradicional de padronização interna e no modo proposto.

Em trabalho desenvolvido por Ji e co-autores (2006), foi proposta uma metodologia de quantificação de BTEX em matrizes aquosas no campo. Um equipamento portátil de cromatografia gasosa com um micro-detector por ionização de chama foi empregado. Foram estudados os seguintes fatores: recobrimento da fibra, tempo de extração, taxa de agitação da amostra, a relação entre os volumes das fases *headspace* e amostra e a concentração de cloreto de sódio. As melhores respostas foram obtidas com: fibra PDMS-DVB com 65 µm de espessura, nível de agitação de 900 rpm, volume do *headspace* em 3,0 mL (em vial de 4 mL) e concentração de NaCl em peso/volume igual a 35%. Um tempo e extração de 1,0 min foi suficiente para os analitos alcançarem o equilíbrio entre as fases. O RSD para o método variou entre 5,4% a 8,3%. O limite de detecção do método ficou em 1,5 µg.L⁻¹, o qual é suficientemente sensível para detectar BTEX em amostras naturais de água. O método otimizado foi empregado para análise em campo de BTEX em água de descarte.

Liu & Pawliszyn (2006) investigaram a permeabilidade de uma membrana não-porosa de polidimetilsiloxano por microextração em fase sólida, com fibras PDMS 100. Um modelo matemático foi criado para explicar o processo de permeação e deduzir as equações para o cálculo da permeabilidade. Medidas de permeabilidade da acetona e BTEX foram determinadas e comparadas com valores constantes na literatura.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. MATERIAIS

Balão volumétrico (5, 10, 100 e 2000 mL), vidros de relógio, becker (50 e 250 mL), espátula, proveta de 500 mL, balança analítica Sartorius BL 2105, bastão de vidro, garra, suporte, agitador magnético Fisher Scientific e barras de agitação de 10 mm recobertas com teflon, micropipeta modelo 800 com capacidade máxima de 100 µL da Nichiryo (Japão), pipeta volumétrica de 3 mL, vial com tampa de rosca e septo de silicone/teflon (5, 6,5 e 9 mL), dispositivo (*holder*) para microextração em fase sólida e fibra de polidimetilsiloxano com 100 µm de recobrimento (PDMS 100) da Supelco (USA). Amostrador *Purge&Trap Velocity* XPT da Tekmar (USA) e seringa Hamilton (USA) modelo 26294. *Software* STATISTICA® 6.0 da Stat-Soft (USA), registrado sob código ABA112B386107FA.

6.2. LIMPEZA DOS MATERIAIS

A limpeza das vidrarias utilizadas no trabalho baseou-se nos seguintes passos. Inicialmente deve-se enxaguar com água corrente por três vezes e lavar os materiais com solução de *extran* a 2%. Enxaguar com água corrente por três vezes e, em seguida, com água destilada. Enxaguar com acetona e deixar secando. Cobrir com papel alumínio as extremidades e guardar em armário fechado.

6.3. REAGENTES

Cloreto de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), diclorometano (Merk, Darmstadt, Alemanha), metanol (Merk, Darmstadt, Alemanha).

6.4. PADRÕES E SOLUÇÕES

O padrão certificado de BTEX foi adquirido da Chem Service (West Chester, PA, USA) com concentração de 2000 mg.L⁻¹ em metanol. As soluções de trabalho foram preparadas instantes antes do início de cada trabalho, a partir da diluição direta das soluções estoque de BTEX em metanol a 40 e 500 mg.L⁻¹. As soluções estoque foram armazenadas a -5°C, por um período máximo de 2 meses.

6.5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas do GC-FID, Shimadzu 17A (Kyoto, Japão), foram: tempo de splitless de 5 min, temperaturas do injetor split/splitless, 250°C, do detector FID, 250°C. Gás hélio (99,999% de pureza) como gás carregador com fluxo de 5,98 mL.min⁻¹ e velocidade linear de 36,5 cm.s⁻¹ na coluna, adquirida da J&W Scientific, DB-624 (75m x 0,53mm x 3µm). Foi empregado gás hidrogênio de alta pureza como combustível da chama do detector FID, com pressão de 55 KPa, e ar sintético como agente oxidante, com pressão de 30 KPa. Como gás auxiliar foi empregado nitrogênio de alta pureza na pressão de 30 KPa. A vazão total dos gases foi igual a 68 mL.min⁻¹ e pressão de 71 KPa. Programação de temperatura para a coluna: 70°C (1min), 7°C.min⁻¹ até 180°C (1 min). As corridas foram gerenciadas pelo *software Shimadzu GC Solution*[®].

6.6. METODOLOGIA SPME

Inicialmente as amostras de 3 mL são acondicionadas em *vial* de 6,5 mL contendo uma barra de agitação magnética de 10 mm. No caso da amostra ser de água doce, acrescentar também 0,1 g de NaCl (concentração aproximadamente igual a 35 g.L⁻¹). Fecha-se o *vial* com tampa de septo silicone/teflon. Deixa-se o sistema em repouso por cerca de 5 min. A temperatura de trabalho é a ambiente. O agitador magnético é ligado em velocidade de 1000 rpm e insere-se a agulha do dispositivo SPME no *frasco* contendo a amostra e expõe-se a fibra na fase *headspace*, no centro do vórtex e o mais próximo possível da superfície líquida. O sistema permanece deste modo por 16 min. Após o tempo de extração, a fibra é reposicionada dentro da agulha e o dispositivo é imediatamente levado ao cromatógrafo para dessorção dos analitos e permanece no injetor do equipamento, a 250°C, durante 1 minuto. No transporte do *holder* para o cromatógrafo, com duração média de 30 segundos, a ponta da agulha deve estar selada com um septo de borracha.

6.7. METODOLOGIA PURGE & TRAP

Colher 5 mL da amostra com a uma seringa Hamilton modelo 26294 e acrescentar 10 microlitros de solução 5 mg.L⁻¹ do padrão interno α,α,α -trifluorotolueno. Injetar a amostra diretamente no equipamento para *Purge & Trap* e dar o *start* no sistema. As condições de trabalho foram: 26°C para a temperatura de purga com duração 11 min, hélio com 99,995% de pureza como gás carregador e fluxo de 40 mL.min⁻¹, *trap* TENAX, 180°C para a dessorção durante 4 min e fluxo do gás hélio durante a dessorção de 8 mL.min⁻¹. A linha de transferência foi mantida na temperatura de 100°C. A limpeza térmica (*bake*) foi efetuada a 200°C durante 5 min com um fluxo do gás hélio igual a 50 mL.min⁻¹.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Os trabalhos iniciais voltaram-se à determinação das melhores condições cromatográficas para separação dos analitos, buscando-se boa resolução dos picos e o menor tempo de corrida possível. As condições cromatográficas foram definidas a partir de trabalhos desenvolvidos no laboratório e em estudos anteriores (CUNHA, 2005). A partir do intervalo de temperatura limitado pelos pontos de ebulição dos compostos (ver tabela 2, no Anexo A), várias programações de temperatura foram testadas dentro deste domínio, a fim de se obter um resultado satisfatório para a separação das substâncias de interesse. Assim obtivemos a seguinte rampa de temperatura: 35°C (durante 1 min), 7°C.min⁻¹ até 180°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min. Inicialmente, cada corrida cromatográfica foi realizada em 22,74 min.

Tabela 3. Tempos de retenção para os compostos analisados

ANALITOS	Tempo de Retenção (min)
Benzeno	8,0
Tolueno	10,7
Etilbenzeno	13,5
m, p-Xilenos	13,8
o-Xileno	14,6

Procurando-se diminuir ainda mais o tempo de corrida, aumentou-se a temperatura inicial da coluna para 70°C fazendo com isso que os compostos

ficassem menos tempo retidos (tabela 3). Assim, o tempo de corrida foi reduzido a 17,71 min, com cerca de 6 min para o equipamento estar apto a uma nova injeção (figura 8). O pico inicial que pode ser observado no cromatograma, refere-se ao solvente metanol, com tempo de retenção de 4 min.

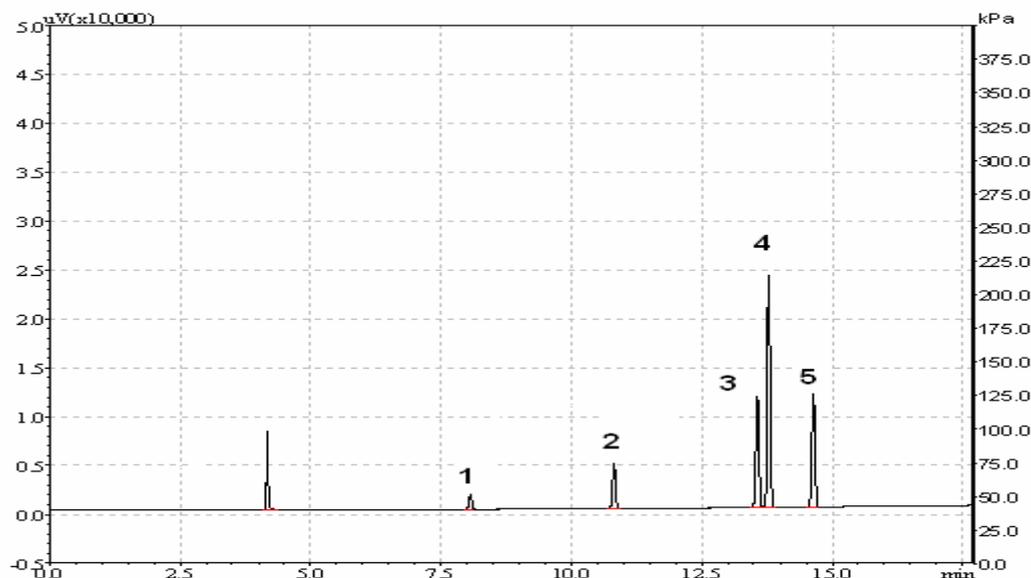


Figura 8. Cromatograma padrão GC-FID para uma solução com concentração em BTEX de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$. 1- Benzeno, 2- Tolueno, 3- Etilbenzeno, 4- m,p-Xilenos e 5- o-Xileno.

7.2. SELEÇÃO DOS PARÂMETROS PARA DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR SPME

A eficiência da microextração em fase sólida sofre a influência de alguns fatores como o modo de extração, o recobrimento das fibras, a concentração salina da amostra, a temperatura, o nível de agitação da amostra, o volume disponível para a fase *headspace*, o tempo de extração e as condições de dessorção. A escolha correta do melhor conjunto de parâmetros de trabalho, leva a menores tempos de extração, boa sensibilidade e precisão.

7.2.a. MODO DE EXTRAÇÃO

Para a escolha do modo mais adequado à extração, direto ou *headspace*, devemos levar em conta o tipo de amostra a ser trabalhada e os analitos que ela contém. Quando se trata de amostras muito “suja” ou aquelas que contêm substâncias que poderiam danificar a fibra, o modo *headspace* é o mais apropriado, na condição dos analitos apresentarem boa volatilidade. Para amostras que não apresentam tais incompatibilidades com o material da fibra, tanto o modo *headspace* como o modo direto pode ser empregado. No caso específico deste trabalho, devido à presença de sais nas amostras de água, em níveis de concentração que poderiam afetar o desempenho da fibra, e também devido à grande volatilidade dos analitos, optou-se pelo modo *headspace* de extração. Além disso, o modo *headspace* leva a tempos de equilíbrio bem menores que no modo direto (ZANG & PAWLISZYN, 1993).

7.2.b. RECOBRIMENTO DAS FIBRAS

Em relação ao tipo de recobrimento da fibra, dois aspectos devem ser levados em consideração: a espessura do recobrimento e o material empregado para extrair os analitos. Películas de menor espessura geram menores tempos de extração, porém obtém-se uma menor quantidade de analito extraído, o que não é desejável por comprometer a sensibilidade do método. Por outro lado, o tipo de analito que se deseja analisar determina o tipo de recobrimento empregado na fibra (NAMIESNIK et al., 2000).

A seleção do tipo de fibra mais apropriado segue o princípio geral que semelhante dissolve (ou adsorve) semelhante, analito com maior caráter polar requer uma fibra com certo caráter polar, ao passo que fibras de características apolares retêm com maior eficiência os analitos também apolares (THEODORIDIS et al., 2000). As fibras disponíveis comercialmente são: PDMS com 7, 30 e 100 μm , PA 85 μm , PDMS-DVB 60 e 65 μm , Carboxen-PDMS 75 μm , CW-DVB 65 μm e CW-TPR 50 μm (anexo B, tabela

4). No caso de analitos apolares, observa-se que a fibra mais recomendável é aquela com recobrimento PDMS.

Devido a baixa concentração de BTEX em amostras ambientais, usualmente abaixo de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, neste trabalho optou-se por aquela de maior espessura de recobrimento, $100 \mu\text{m}$, pois oferece maior capacidade de retenção de BTEX. A fibra PDMS-100 foi adquirida da Supelco (Bellefonte, PA, USA) e condicionada por aquecimento no injetor do cromatógrafo a 250°C , durante 30 min.

7.2.c. SALINIDADE

A solubilidade em água de compostos orgânicos apolares é significativamente reduzida com adição de sais inorgânicos como, por exemplo, o cloreto de sódio. O efeito conhecido como *salting out* é amplamente empregado nos processos de extração líquido-líquido, objetivando uma transferência mais eficiente dos orgânicos da fase aquosa para o solvente orgânico. O aumento da concentração salina do meio também pode ser utilizado para melhorar a eficiência da extração por SPME. Um sal apropriado é adicionado diretamente à amostra para se avaliar a influência da concentração do mesmo sobre o processo (KATAOKA et al., 2000). As amostras para a execução dos planejamentos foram fortificadas com BTEX a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. Após o preparo, as soluções foram imediatamente analisadas. A água empregada para o preparo das amostras recebeu a adição de quantidades pré-estabelecidas de NaCl. Nos testes iniciais, foram adicionados quantidades de NaCl próximas ao ponto de saturação do solvente (250g.L^{-1}). Percebeu-se com isso, problemas de precisão nas medidas: a adição de grande quantidade de NaCl às amostras aumentava bastante a área dos picos cromatográficos, porém perdia-se muito em relação a precisão dos ensaios. O domínio em estudo para a concentração salina foi diminuído em níveis que não afetavam a precisão do método que se procurava otimizar. Foi decidido, dessa forma, manter as concentrações de NaCl próximas às das amostras reais com que se planejava trabalhar posteriormente (água marinha). No primeiro planejamento a concentração de

NaCl variou entre 0 e 40 g.L⁻¹. No planejamento composto central, entre 20 e 40g.L⁻¹. Verificou-se que na faixa de concentrações avaliada na execução do planejamento composto central, a concentração de NaCl pouco interferia na resposta analítica. Após a otimização, os ensaios de validação foram conduzidos com concentração de NaCl igual a 35g.L⁻¹, por ser mais próxima às concentrações salinas das amostras naturais de água marinha.

7.2.d. TEMPERATURA

Segundo Huang et al. (1997), a faixa ideal de temperatura de extração para o benzeno e seus derivados, utilizando-se a fibra PDMS 100, localiza-se no intervalo de 20 a 30°C. Temperaturas próximas a 0°C causam diminuição da taxa de difusão dos compostos para a fibra, exigindo tempos de extração maiores. Por outro lado, deve-se ressaltar que aumentos na temperatura causam prejuízos na sensibilidade do processo. Com o aquecimento, a constante de distribuição dos analitos na fibra diminui e, dessa forma, a quantidade retida é menor (THEODORIDIS et al., 2000). Nesse estudo os ensaios foram realizados, em todas as etapas do trabalho, na temperatura do próprio laboratório, cerca de 23°C, sem prejuízo para a precisão do método.

7.2.e. VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DA AMOSTRA

O aumento no grau de agitação da amostra favorece o processo de extração, pois minimiza os problemas de transferência do analito para a fibra, principalmente nos casos em que os analitos não são muito voláteis ou no modo direto de extração, por facilitar a transferência do analito de uma fase para a outra (KATAOKA et al., 2000). Neste trabalho, devido mais uma vez a grande volatilidade dos compostos estudados, optou-se por trabalhar variando-se o nível de agitação entre 200 e 1200 rpm, na execução do planejamento fracionário. Na etapa seguinte dos trabalhos, fixou-se o nível de agitação em 1000 rpm, na execução do planejamento composto central.

7.2.f. VOLUME DISPONÍVEL PARA A FASE HEADSPACE

O volume disponível para a fase *headspace* foi também investigado. Utilizaram-se três diferentes recipientes para acomodar a amostra durante as extrações, ambos com o mesmo formato e, aproximadamente, o mesmo diâmetro, porém com volumes totais diferentes: o menor, de 5,0 mL de capacidade, outro com 6,5 mL e o terceiro com 9,0 mL. O volume da amostra foi fixado em 3 mL em todos os ensaios e, desse modo, pôde-se variar o volume disponível da fase *headspace*: para o menor vial, o volume disponível foi de 40%, para o intermediário 53,8%, e para o maior 66,7%. Após a execução do planejamento inicial, optou-se pelo vial de 53,8%.

7.2.g. TEMPO DE EXTRAÇÃO

O tempo empregado no processo extrativo é aquele a partir do qual o analito alcança uma situação de equilíbrio entre as fases envolvidas - após este instante, a concentração do mesmo na fibra extrativa permanece constante com o passar do tempo. Na extração no modo *headspace* deve-se ter maior atenção na determinação do tempo necessário para se alcançar o equilíbrio, pois, em certos casos, antes que o sistema atinja o equilíbrio, tende a ocorrer uma redução significativa na inclinação do perfil de extração que pode levar a conclusões equivocadas sobre o tempo de extração. Tal situação deve-se ao fato de que a transferência do analito para a fibra processa-se através do meio gasoso – quando a quantidade do analito no *headspace* é praticamente nula, as moléculas do analito na fase aquosa começam a migrar lentamente para a fase gasosa e, finalmente, para a fibra. Assim, verifica-se a partir desse ponto, apenas um pequeno acréscimo do analito na fase extrativa (PAWLISZYN, 1997).

O tempo de extração foi um dos parâmetros otimizados neste trabalho. A extração de BTEX da amostra por HS-SPME consistiu em posicionar a fibra na fase gasosa acima da amostra líquida (*headspace*) por um certo período de tempo: 1 min, 11 min e 21 min, para o primeiro planejamento, e nos tempos de 1,1 min, 4 min, 11 min, 18 min e 20,9 min

para o planejamento composto central. Após a otimização do processo, trabalhou-se com o tempo de extração igual a 16 min.

7.2.h. CONDIÇÕES DE DESSORÇÃO

Um aspecto bastante desejável no momento da dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo, é que eles sejam rapidamente levados pelo fluxo do gás de arraste, sem que haja tempo suficiente para que suas moléculas se dispersem no meio. Devido à ausência de solventes orgânicos no processo SPME, não há o fenômeno de expansão do solvente no *liner* do injetor, não sendo necessário o emprego de *liner* de maior volume. Portanto, deve-se optar por aqueles de pequeno diâmetro interno a fim de minimizar a dispersão dos analitos dentro do injetor, favorecendo dessa forma a sensibilidade do método. Foi utilizado neste trabalho um liner com diâmetro interno de 0,8 mm da SUPELCO (Bellefonte, PA, USA) próprio para SPME. A fibra deve estar centralizada no *liner*, o qual deve ser aquecido a temperaturas adequadas à volatilidade dos analitos, levando-se em conta as limitações estabelecidas pelo material do revestimento. A fibra foi mantida na sua profundidade máxima, dentro do *holder*. O aumento da temperatura de dessorção contribui para diminuir o tempo de exposição da fibra ao calor do injetor. Recomenda-se, portanto, utilizar a maior temperatura indicada para o recobrimento empregado a fim de diminuir o tempo de dessorção. Nas análises realizadas o injetor foi mantido aquecido a 250°C, com o tempo de dessorção variando de 0,05 a 4 minutos na execução do planejamento fatorial fracionário. Nas outras etapas do trabalho foi fixado em 1 minuto.

7.2.i. OUTRAS CONSIDERAÇÕES

Dentre os vários fatores que afetam a precisão das medidas em SPME podemos destacar: o volume do recobrimento da fibra, a condição em que se encontra a fibra (rachaduras, adsorção de substâncias de alta massa molar), umidade na agulha, a temperatura, as características da matriz, o

nível de agitação da amostra, o tempo de extração, o volume da amostra e da fase *headspace*, o formato do vial, o tempo entre extração e análise cromatográfica, adsorção dos analitos nas paredes do recipiente, a geometria do injetor, o posicionamento da fibra durante a injeção, as condições do injetor (pedaços do septo) e a estabilidade da resposta do detector (PAWLISZYN, 1997).

Confirmou-se na execução dos trabalhos um problema freqüente relativo ao uso do dispositivo SPME: a obstrução da coluna cromatográfica por pequenos pedaços de borracha do septo do injetor – as agulhas são mais grossas para acomodar sem danos a fibra extrativa e provoca um desgaste mais rápido do septo. Este fato acarreta em alargamento das bandas cromatográficas, problemas de precisão e até mesmo o entupimento da coluna, impossibilitando o fluxo normal do gás carregador.

O volume da fase *headspace* pode ser um importante fator na precisão do método nas extrações envolvendo três fases – é relativamente simples ser preciso nas medidas de volume de um líquido, no entanto os recipientes que acomodam as amostras não são fabricados exatamente com o mesmo volume: espessuras da parede e formato da base podem variar bastante de um para o outro. Além disso, o formato do septo do vial fechado pode variar do côncavo ao convexo. Todos estes fatores podem afetar o volume total disponível da fase *headspace*.

Nos ensaios foi necessário vedar com um septo de borracha a extremidade da agulha do dispositivo SPME. Percebeu-se, no início dos trabalhos, pouca precisão nos dados obtidos, provavelmente devido a perda dos analitos no transporte do dispositivo até o cromatógrafo, após efetuada a extração. Este problema relativo a precisão foi resolvido selando a agulha do dispositivo SPME com um pedaço de septo do injetor.

7.3. OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DO MÉTODO

Foi analisada a variação conjunta dos fatores que mais exercem influência no desempenho da extração de hidrocarbonetos voláteis presentes em amostras de água ambiental por SPME, através das técnicas

de planejamento multivariado. Nesta direção, inicialmente, os ensaios foram realizados com o intuito de avaliar a significância para o processo dos seguintes fatores: concentração de NaCl, nível de agitação da matriz aquosa, volume disponível da fase *headspace*, tempo de dessorção e tempo de extração. O segundo passo da otimização consistiu em determinar os valores ótimos de operação, dos fatores estatisticamente mais significativos para a microextração em fase sólida.

7.3.a. O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

Foi realizado um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{5-1} para verificar a significância dos fatores dentro dos seus respectivos domínios (tabela 5). Para a determinação do erro experimental, os ensaios foram realizados em triplicata no ponto central do planejamento. No total foram realizadas 16 corridas que correspondem ao planejamento fracionário com cinco fatores e mais três réplicas no ponto central. A análise do desempenho de cada corrida teve como base o rendimento obtido na extração de BTEX em cada um dos ensaios, ou seja, a área dos picos cromatográficos obtida. As amostras apresentaram volume de 3 mL com concentração de BTEX em $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Os cinco fatores (volume disponível para *headspace*, velocidade de agitação da amostra, concentração de NaCl, tempos de extração e de dessorção) foram variados em dois níveis. Os fatores e seus respectivos domínios podem ser observados na tabela 6.

Uma alíquota de 3 mL da amostra aquosa salina, com concentração de NaCl variando de 0 a 40 g.L^{-1} e fortificada com BTEX foi acondicionada em vial de 5mL, 6,5 mL ou 9 mL. Acrescentou-se a seguir uma barra magnética de 10 mm e o vial foi fechado com uma tampa de rosca provida de septo de teflon/silicone. As extrações foram realizadas na temperatura do laboratório.

Tabela 5. Matriz para o planejamento fatorial fracionário com cinco fatores em dois níveis (2^{5-1})

Ensaio	C_s , g.L ⁻¹ (1)	t_E , min (2)	t_D , min (3)	V_H , % (4)	v_A , rpm (5)	Área dos Picos Cromatográficos					
						Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m,p-Xilenos	o-Xileno	Resposta múltipla
1	0 (-1)	1 min (-1)	0,05 (-1)	40 (-1)	1200 (1)	1676,30	4615,50	9775,00	19869,70	9011,40	2,76
2	40 (1)	1 min (-1)	0,05 (-1)	40 (-1)	200 (-1)	1581,60	4099,80	7960,80	16281,00	7407,00	2,38
3	0 (-1)	21 (1)	0,05 (-1)	40 (-1)	200 (-1)	1790,10	5401,80	13198,00	27479,90	13846,00	3,54
4	40 (1)	21 (1)	0,05 (-1)	40 (-1)	1200 (1)	2416,00	7516,90	19210,40	40022,60	19806,30	5,00
5	0 (-1)	1 (-1)	4 (1)	40 (-1)	200 (-1)	1591,30	4275,00	8914,70	17584,70	7746,40	2,52
6	40 (1)	1 (-1)	4 (1)	40 (-1)	1200 (1)	1968,90	5290,10	10503,50	21655,00	10274,00	3,12
7	0 (-1)	21 (1)	4 (1)	40 (-1)	1200 (1)	1940,40	5958,40	15513,30	32109,70	15519,20	3,98
8	40 (1)	21 (1)	4 (1)	40 (-1)	200 (-1)	2354,50	7289,40	17460,40	36492,70	18763,00	4,71
9	0 (-1)	1 (-1)	0,05 (-1)	66,7 (1)	200 (-1)	1337,50	3874,60	8804,90	18063,00	8515,30	2,41
10	40 (1)	1 (-1)	0,05 (-1)	66,7 (1)	1200 (1)	1493,70	4190,10	10735,80	19547,70	9776,70	2,72
11	0 (-1)	21 (1)	0,05 (-1)	66,7 (1)	1200 (1)	1564,00	4753,50	12183,70	25652,00	13021,80	3,21
12	40 (1)	21 (1)	0,05 (-1)	66,7 (1)	200 (-1)	1749,40	5285,70	12635,10	26910,40	14591,80	3,49
13	0 (-1)	1 (-1)	4 (1)	66,7 (1)	1200 (1)	1375,70	4043,80	9235,70	19273,60	9168,80	2,53
14	40 (1)	1 (-1)	4 (1)	66,7 (1)	200 (-1)	1057,60	2907,60	6079,70	13077,60	7223,60	1,84
15	0 (-1)	21 (1)	4 (1)	66,7 (1)	200 (-1)	1348,50	4092,60	10690,00	23009,00	10941,70	2,78
16	40 (1)	21 (1)	4 (1)	66,7 (1)	1200 (1)	1888,70	5843,40	14809,90	31358,70	16482,10	3,94
17 (C)	20 (0)	11 (0)	2 (0)	53,8 (0)	700 (0)	1973,60	6005,80	14541,40	30483,40	15527,40	3,92
18 (C)	20 (0)	11 (0)	2 (0)	53,8 (0)	700 (0)	1916,80	5916,60	14758,20	30852,40	15443,60	3,90
19 (C)	20 (0)	11 (0)	2 (0)	53,8 (0)	700 (0)	1935,80	5996,80	14956,20	31128,40	15659,50	3,95

Tabela 6. Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário

Fatores	Nível baixo	Nível alto
(1) Concentração de NaCl (C_S), $g.L^{-1}$	0	40
(2) Tempo de extração (t_E), min	1	21
(3) Tempo de dessorção (t_D), min	0,05	4
(4) Volume headspace (V_H), %	40,0	66,7
(5) Velocidade de agitação da amostra (v_A), rpm	200	1200

Foi utilizado um agitador magnético da Fisher Scientific com nível máximo de agitação em 1200 rpm para facilitar a transferência do BTEX da fase aquosa para a fase gasosa; as velocidades de agitação empregadas foram iguais a 200, 700 e 1200 rpm. A agulha do dispositivo SPME perfurava o septo do recipiente contendo a amostra, e a fibra PDMS era exposta e permanecia desta forma por um período de tempo mínimo de 1 minuto, e máximo de 21 minutos. Após a extração dos analitos, a fibra era reconduzida ao interior da agulha, o dispositivo SPME era retirado do vial e a fibra era inserida no injetor do cromatógrafo, mais uma vez exposta e submetida à alta temperatura (250 °C), onde permanecia por um período de tempo de 0,05 minuto e, no nível máximo, de 4 minutos.

A análise individual do gráfico de Pareto para os compostos e a análise conjunta por meio da resposta múltipla (figuras 9 a 14), gerado pelo *software* STATISTICA® 6.0, levou à conclusão de que, com exceção do tempo de dessorção, todos os fatores são significativos dentro do domínio estudado. O tempo de extração, para a maioria dos compostos, foi o mais significativo dos fatores. Percebe-se que o efeito do tempo de extração cresce do benzeno para o analito o-xileno, ou seja, do composto mais volátil para o de menor volatilidade. Além disso, estes efeitos são todos positivos, indicando que dentro do domínio estudado, para se obter um melhor sinal analítico, é necessário optar por tempos de extração mais próximos ao nível alto do domínio. O tempo de extração foi melhor avaliado no planejamento composto central, etapa seguinte da otimização, no qual foi estudado dentro do domínio de 4 min a 18 min.

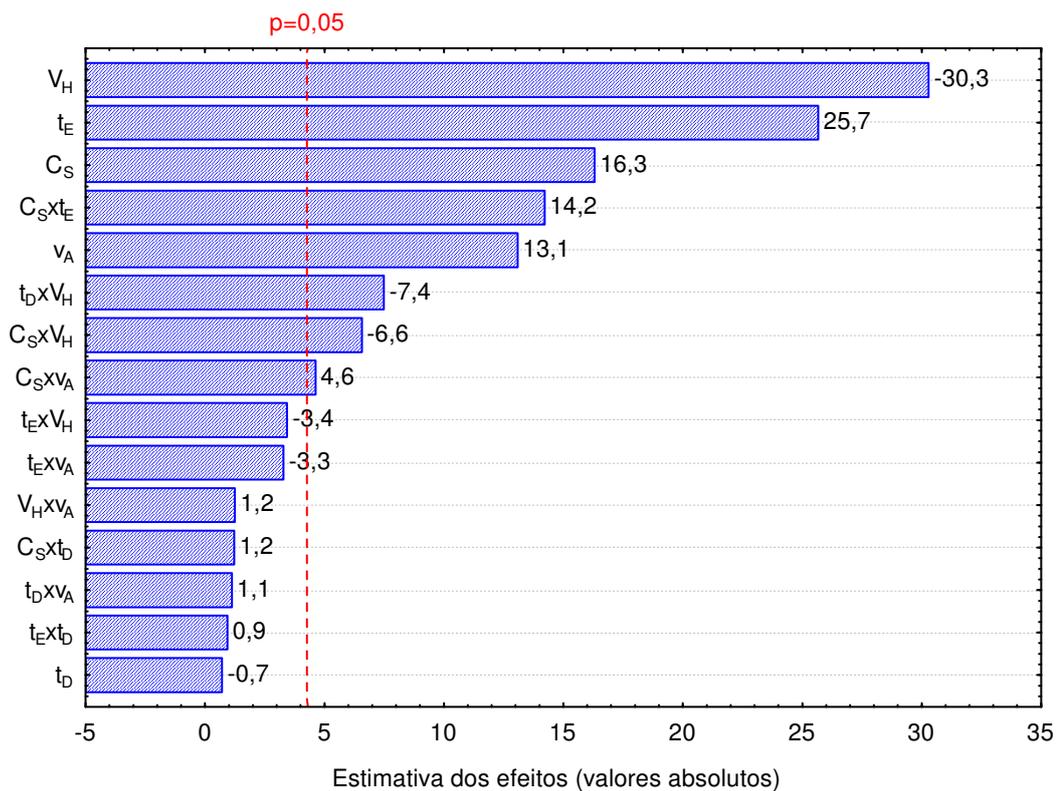


Figura 9. Gráfico de Pareto para benzeno.

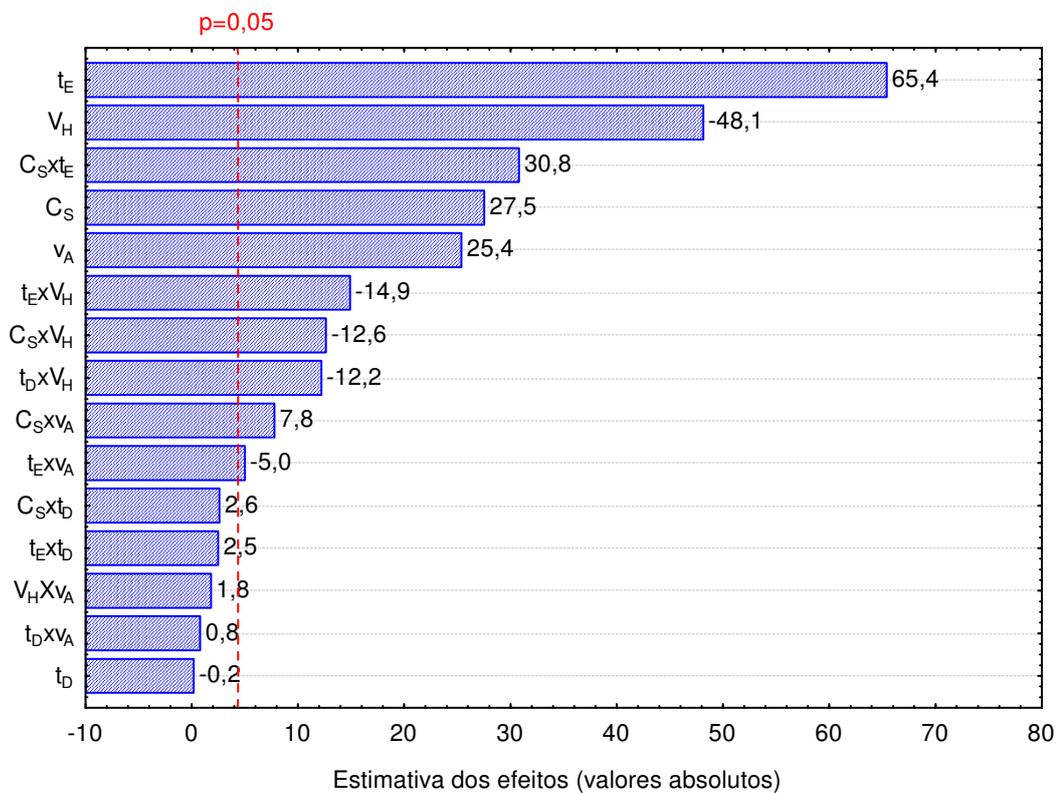


Figura 10. Gráfico de Pareto para tolueno.

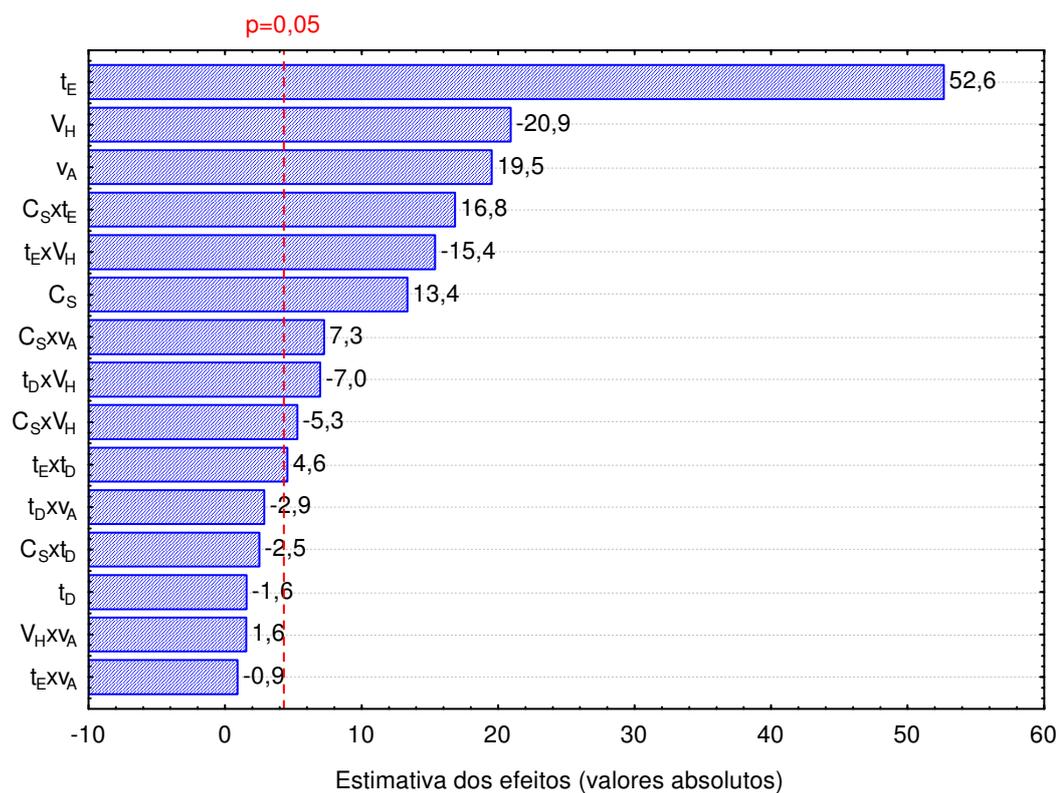


Figura 11. Gráfico de Pareto para etilbenzeno.

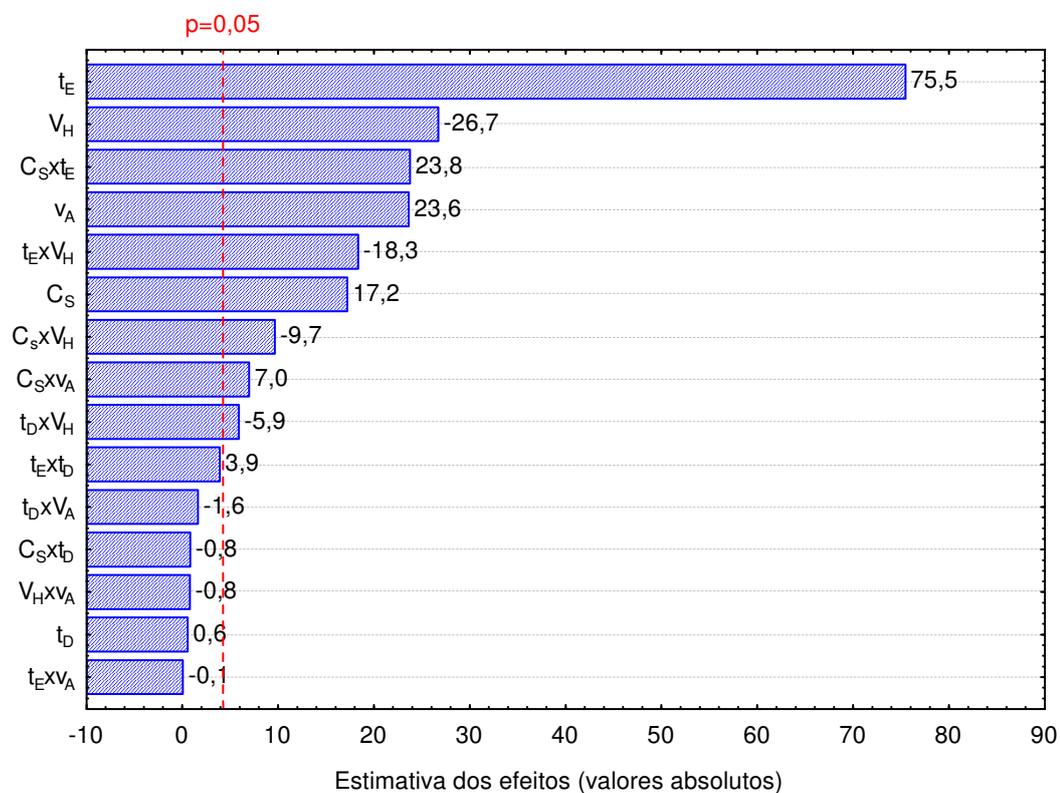


Figura 12. Gráfico de Pareto para m,p-xilenos.

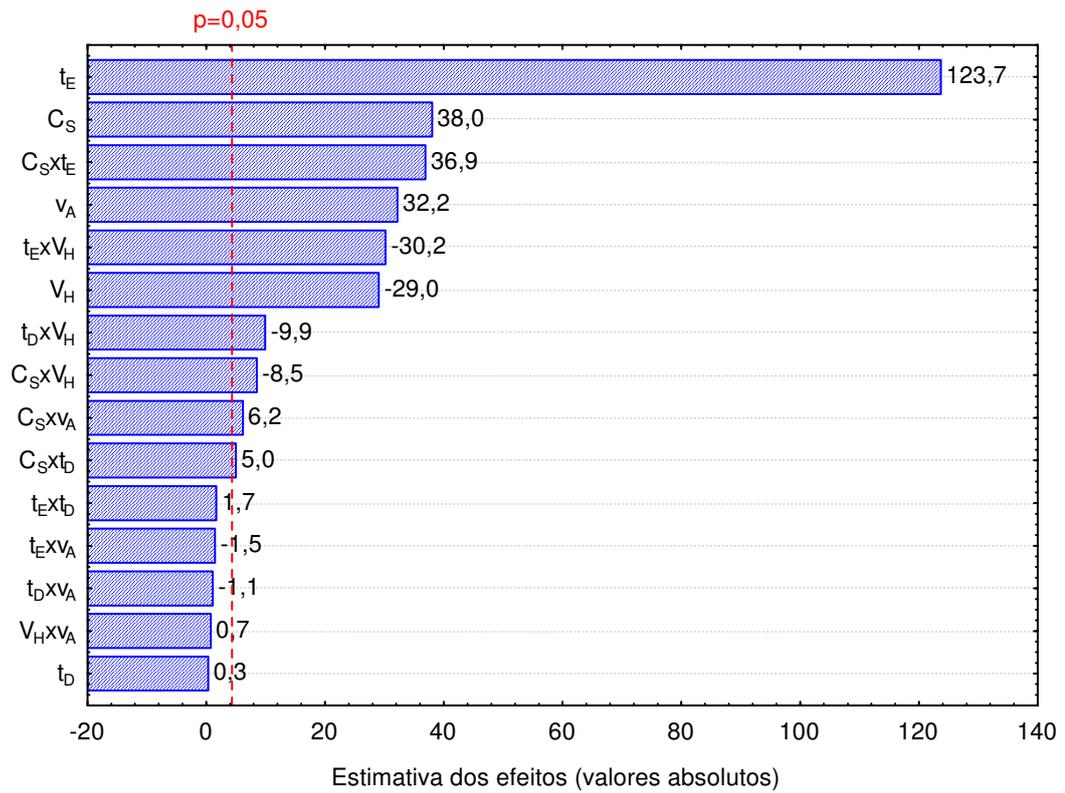


Figura 13. Gráfico de Pareto para o-xileno.

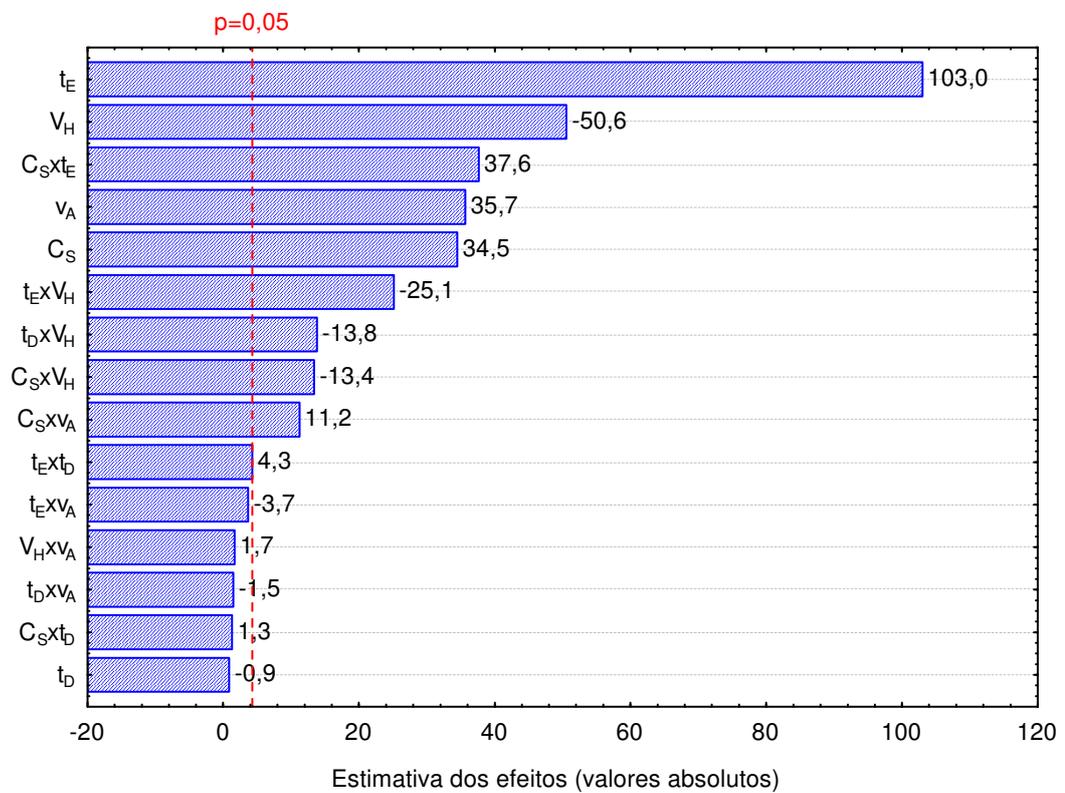


Figura 14. Gráfico de Pareto para a resposta múltipla.

Como se pôde observar a quantidade extraída do analito por SPME, no modo *headspace*, pode ser calculada pela equação (5):

$$n = \frac{K_{FH} K_{HA} V_F C_0 V_A}{K_{FH} K_{HA} V_F + K_{HA} V_H + V_A}$$

A constante de partição dos compostos entre as fases *headspace* e amostra, K_{HA} , apresentam valores aproximadamente iguais e pequenos, como pode ser observado na tabela 7. Portanto, a parcela $K_{FH} \cdot K_{HA} \cdot V_F$ pode ser negligenciada por ser V_F , o volume do recobrimento da fibra (na ordem de microlitros), extremamente pequeno.

Tabela 7. Constantes de partição dos BTEX.

Constantes	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	p-Xileno	o-Xileno
K_{FH}	493	1322	3266	3507	4417
K_{HA}	0,26	0,26	0,16	0,24	0,15

Fonte: ZANG & PAWLISZYN (1993).

A constante de partição dos analitos entre a fibra e a fase *headspace* pode ser dada por $K_{FH} = C_F^\infty / C_H^\infty$, onde C_F^∞ é a concentração de equilíbrio do analito na fibra e C_H^∞ , a concentração de equilíbrio do analito na fase *headspace*. Conseqüentemente, os analitos de menor K_{FH} apresentam menor quantidade retida na fibra e, com isso, o equilíbrio é alcançado mais rapidamente. Por outro lado, aqueles de maior K_{FH} , apresentam maiores tempos de extração, pois o processo necessita de tempo maior para que a fibra consiga captar, da fase *headspace*, uma maior massa de analito. A tabela 7 mostra as constantes de partição para os compostos em estudo. Com esta análise, justifica-se o tempo de extração ser menos significativo para o benzeno (menor K_{FH}) e aumentar em importância para os demais compostos, na mesma ordem em que se aumenta as constantes de partição, K_{FH} , tendo maior efeito para o analito o-xileno.

Por outro lado, o volume da fase *headspace* foi também bastante significativo. A análise dos efeitos, todos negativos para os cinco compostos em relação a este fator, denota que a resposta é maior no nível mais baixo.

Porém, o vial de menor volume, 5,0 mL, oferece um pequeno volume disponível para a fase *headspace*, de 40% do vial (2 mL), podendo ocorrer que a fibra toque acidentalmente a superfície da matriz líquida, o que não é absolutamente desejável. Sendo assim, optou-se pelo vial de volume intermediário, que possibilita uma manipulação mais confortável para o operador, gerando praticamente a mesma área para os picos cromatográficos sem que seja, portanto, prejudicada a sensibilidade do método.

A concentração de NaCl mostrou-se também significativa dentro do domínio em estudo. Efeitos positivos para os cinco compostos evidenciaram melhores respostas no nível mais alto da concentração. Aumentos na concentração salina do meio tendem a diminuir a solubilidade dos orgânicos apolares no meio aquoso, provocando aumento na concentração destes na fase *headspace* (efeito *salting out*). Este fator foi melhor avaliado no passo seguinte do planejamento, onde a concentração de NaCl foi estudada nos níveis de 20 e 40 g.L⁻¹.

O nível de agitação da amostra também foi significativo dentro do domínio avaliado. Percebe-se que o efeito deste fator é maior para o *o*-xileno (menos volátil) do que para o analito mais volátil, o benzeno, comprovando que a velocidade de agitação da amostra tem maior importância para os compostos de menor volatilidade. A análise dos efeitos gerados pela execução do planejamento no domínio estudado indica que, aumentos na velocidade de agitação da amostra geram picos cromatográficos de maior área. Por outro lado, devido a limitações do aparelho em relação ao ajuste do nível de agitação, este fator foi mantido constante em 1000 rpm nas etapas seguintes do trabalho.

O tempo de dessorção não mostrou ser significativo dentro do domínio em estudo, de 0,05 a 4 minutos. Provavelmente devido à alta temperatura do injetor, 250 °C, os analitos extremamente voláteis e, em pequena quantidade, são rapidamente dessorvidos da fibra, mesmo nos primeiros segundos. Nas etapas posteriores foi empregado um tempo de dessorção igual a 1 min, suficiente para garantir a dessorção total dos

analitos. Foram feitos testes com a fibra depois da análise não sendo possível detectar a presença dos analitos.

Para avaliar o comportamento conjunto de todos os analitos foi determinada uma resposta normalizada (resposta múltipla, R_m). Tomando como exemplo a corrida de número 1:

$$R_m = \frac{1676,3}{2416} + \frac{4615,5}{7516,9} + \frac{9775}{19210,4} + \frac{19869,7}{40022,6} + \frac{9011,4}{19806,3} = 2,76$$

Ou seja, as áreas obtidas para cada composto foram divididas pelo valor máximo de área correspondente a cada um deles, dentro do planejamento fracionário executado. O modelo gerado para a resposta múltipla, pela execução do planejamento fracionário, é representado pela relação com valores codificados:

$$A = 0,65 t_E - 0,32V_H + 0,22v_A + 0,22C_S + 0,24C_{StE} - 0,16t_EV_H - 0,09t_DV_H - 0,08C_SV_H + 0,07C_Sv_A + 0,03t_Et_D + 3,18 \quad (24)$$

A análise residual denota boa adequação do modelo. O gráfico de probabilidade normal e o histograma demonstram que os resíduos seguem uma distribuição normal, conforme apresentado nas figuras 15 e 16. Por outro lado, o modelo proposto descreve bem os dados obtidos experimentalmente, como pode ser constatado na figura 17, relação entre valores previstos e valores observados.

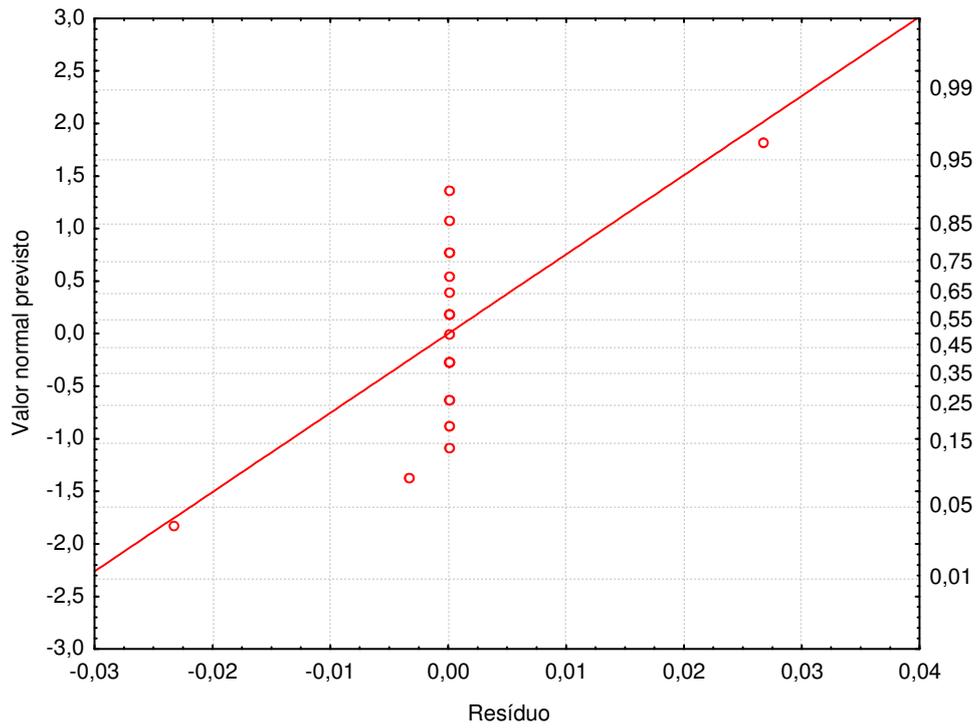


Figura 15. Gráfico de probabilidade normal para o modelo.

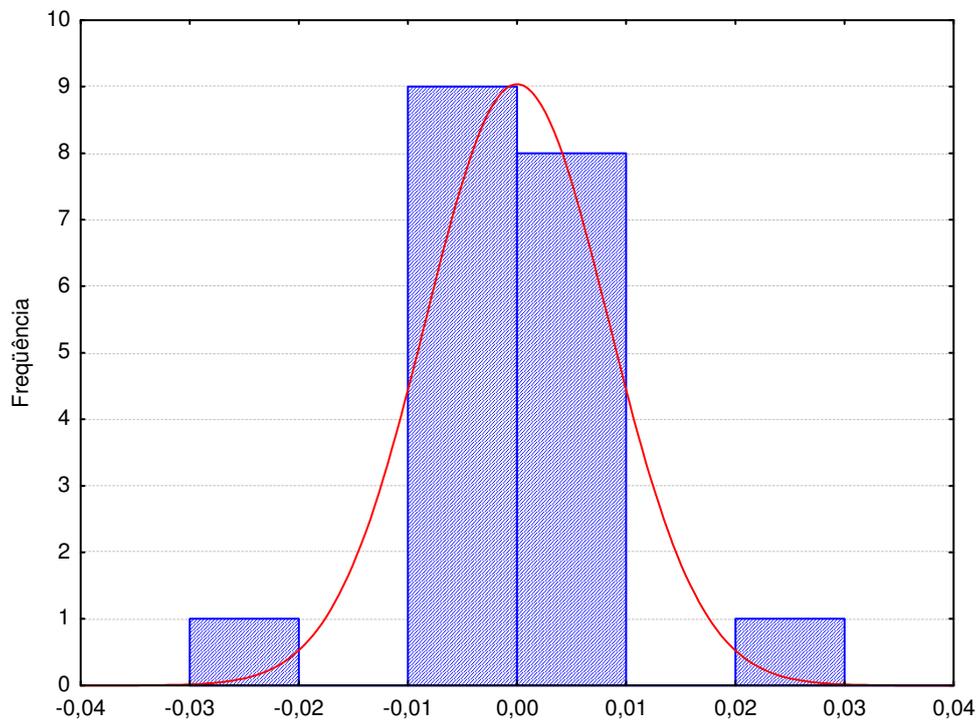


Figura 16. Histograma para os resíduos.

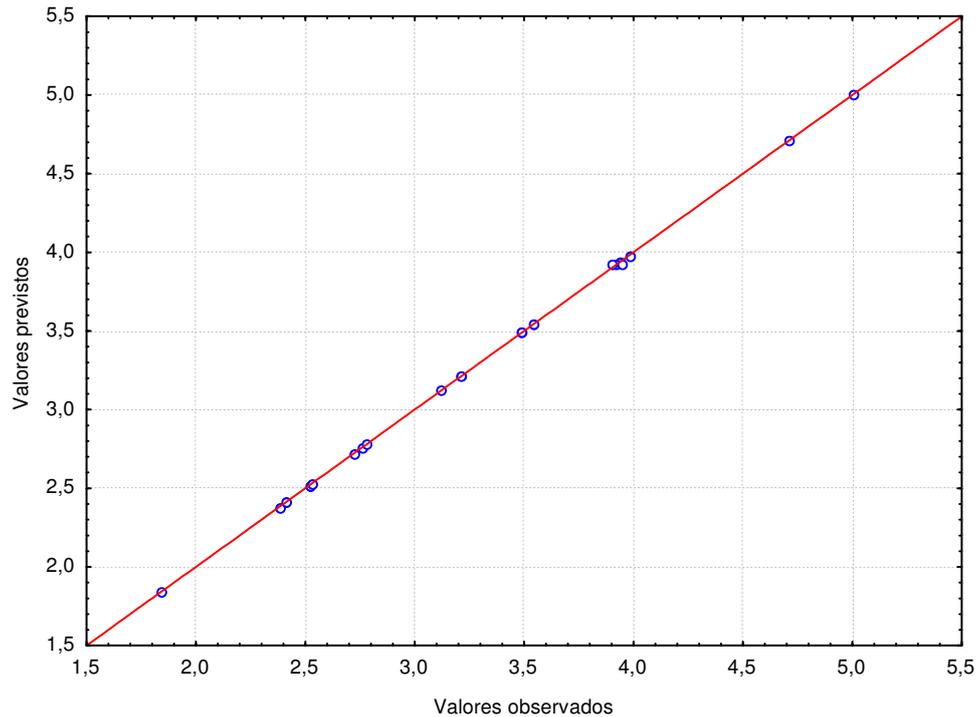


Figura 17. Valores previstos *versus* valores observados.

A análise da curvatura do modelo, obtida também pelo STATISTICA[®] 6.0, revela que este parâmetro é importante e, assim sendo, os valores independentes dos parâmetros dos termos quadráticos devem ser determinados. Na busca pelos valores ótimos de operação do tempo de extração e da concentração de NaCl, um maior número de pontos foram incluídos para a execução de um planejamento composto central.

7.3.b. O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Após a seleção dos fatores estatisticamente significativos, foi realizada uma nova análise da variação dos mesmos dentro de domínios de estudo mais próximos das condições otimizadas. Para a escolha das condições analíticas mais adequadas à técnica, foi aplicada a metodologia de superfícies de resposta empregando-se um planejamento composto central. Os fatores tempo de extração (t_E) e concentração de NaCl (C_S), foram trabalhados nos seguintes domínios:

Tabela 8. Fatores e níveis para o planejamento composto central

Fatores	Nível baixo	Nível alto
(1) Tempo de extração (t_E), min	4	18
(2) Concentração de NaCl (C_s), g.L ⁻¹	20	40

Na execução do planejamento composto central, o volume disponível da fase gasosa (*headspace*) foi fixado em 53,8% do vial, pois o vial de 6,5 mL era o mais apropriado dentre os disponíveis, conforme justificativa apresentada anteriormente. O tempo de dessorção foi também fixado em 1 min, suficiente para que a alta temperatura do injetor fosse capaz de dessorver todos os analitos. O nível de agitação da matriz foi mantido constante em 1000 rpm, pois já se concluiu no planejamento anterior que aumentos na velocidade de agitação, conduzem a melhores respostas analíticas.

Todas as amostras contendo BTEX na concentração de 100 µg.L⁻¹ apresentaram volume de 3 mL e a fibra utilizada foi a mesma do planejamento anterior. Variando-se os tempos de extração e concentração de NaCl (ver tabela 8) foi realizado um segundo planejamento com a finalidade de obter os valores ótimos para estes fatores. Foram definidos dois níveis para os tempos de extração (4 e 18 min) e concentração de NaCl (20 e 40 g.L⁻¹) para ensaios com planejamento composto central. Foram realizados 12 ensaios sendo 4 deles correspondentes aos valores máximo e mínimo dentro do domínio de estudo, mais 4 replicatas no ponto central (tempo de extração de 11 min e concentração de NaCl igual a 30 g.L⁻¹) e ainda 4 ensaios em pontos fora do domínio denominados pontos axiais, tempo de extração de 1,1 e 20,9 min e concentração de NaCl com 15,9 e 44,1 g.L⁻¹ (ver matriz do planejamento na tabela 9).

Os dados assim obtidos foram lançados no *software* STATISTICA[®], o qual gerou superfícies de resposta para os analitos. Nas figuras 18 a 22 são apresentadas as superfícies de resposta para os compostos individualmente e, na figura 23, a análise conjunta por meio da resposta múltipla.

A partir das derivadas parciais das equações correspondentes às curvas, foi possível extrair os valores críticos para os fatores estudados

(tabela 10), ou seja, os parâmetros que oferecem melhores respostas analíticas para o processo. Fixou-se, portanto, o tempo de 16 min para as extrações pois, apesar de ser maior do que todos os valores sugeridos pelo *software* STATISTICA[®], garante uma excelente robustez para o processo. Além disso, é adequado tendo em vista que o cromatógrafo só se restabelece para uma nova injeção após 24 min. A concentração de NaCl foi fixada em 35 g.L⁻¹ para os ensaios de validação. Apesar dos resultados apontarem para valores de maior concentração em NaCl, optou-se por manter a concentração no nível de 35 g.L⁻¹, pois as amostras reais apresentam salinidades as vezes muito diferentes, sendo portanto pouco prático estabelecer um valor fixo para a concentração com base na resposta gerada pelo planejamento. Além disso, verifica-se pouca variação da resposta, quando se modifica a concentração de NaCl dentro do domínio em estudo (20 a 40 g.L⁻¹). No teste de robustez realizado na validação, conclui-se que no domínio de 30 a 40 g.L⁻¹ não há variação significativa no sinal analítico, sendo portanto possível trabalhar dentro desse nível de concentração, sem que haja prejuízo para a metodologia otimizada.

Tabela 9. Matriz para o planejamento composto central

Ensaio	t _E , min (1)	C _S , g.L ⁻¹ (2)	Área dos Picos Cromatográficos					
			Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m,p-Xilenos	o-Xileno	Resposta múltipla
1	4 (-1)	20 (-1)	1836,10	5444,00	12792,60	26795,10	13973,20	3,98
2	4 (-1)	40 (1)	1857,00	5426,80	12218,30	25823,70	13863,10	3,92
3	18 (1)	20 (-1)	1978,40	5975,40	15279,30	31993,00	16030,50	4,53
4	18 (1)	40 (1)	2068,10	6223,90	15450,10	32294,80	16865,60	4,67
5	1,1 (-1,41)	30 (0)	1732,40	4886,70	10810,60	22356,70	10736,60	3,41
6	20,9 (1,41)	30 (0)	1963,40	6001,80	15262,10	32021,90	16395,50	4,55
7	11 (0)	15,9 (-1,41)	1872,30	5534,40	13982,70	29222,10	14795,10	4,21
8	11 (0)	44,1 (1,41)	2186,00	6653,30	16565,60	34908,10	17952,30	5,00
9 (C)	11 (0)	30 (0)	2107,40	6616,10	15830,90	33090,90	16933,00	4,79
10 (C)	11 (0)	30 (0)	2080,00	6365,90	15940,40	33040,40	16797,10	4,76
11 (C)	11 (0)	30 (0)	2097,30	6301,00	15810,50	33155,50	16883,90	4,75

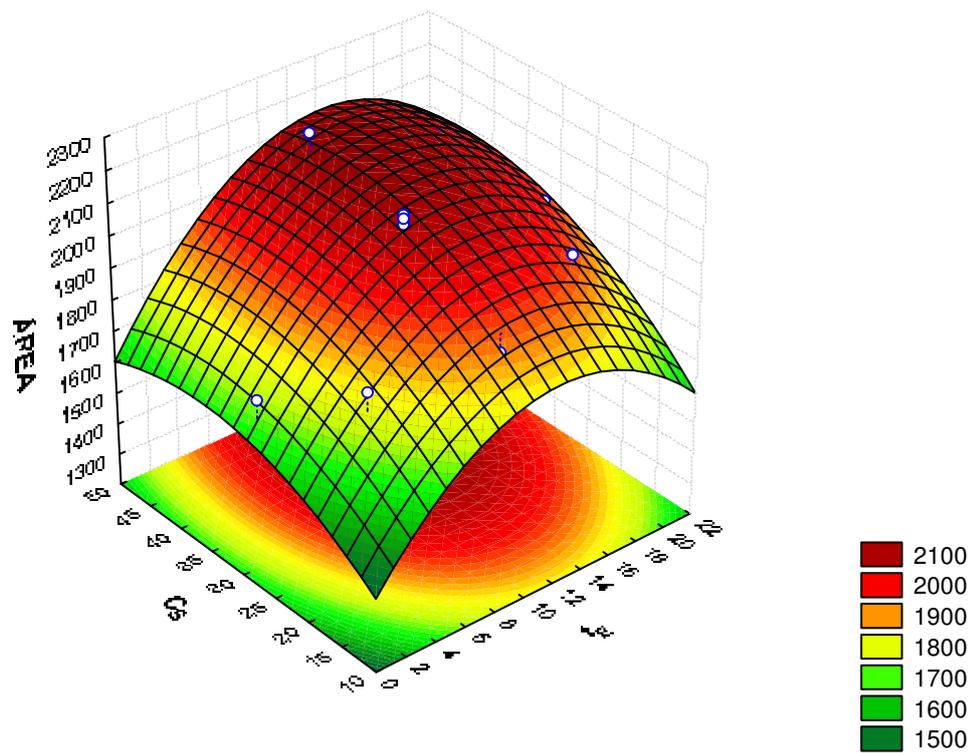


Figura 18. Superfície de resposta para benzeno.

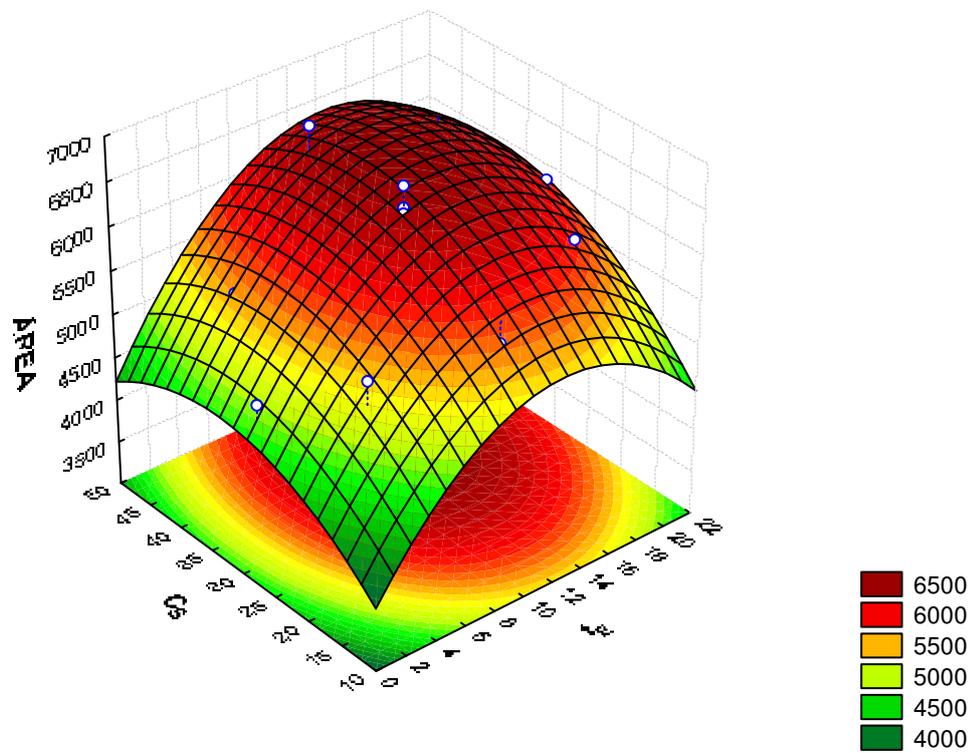


Figura 19. Superfície de resposta para tolueno.

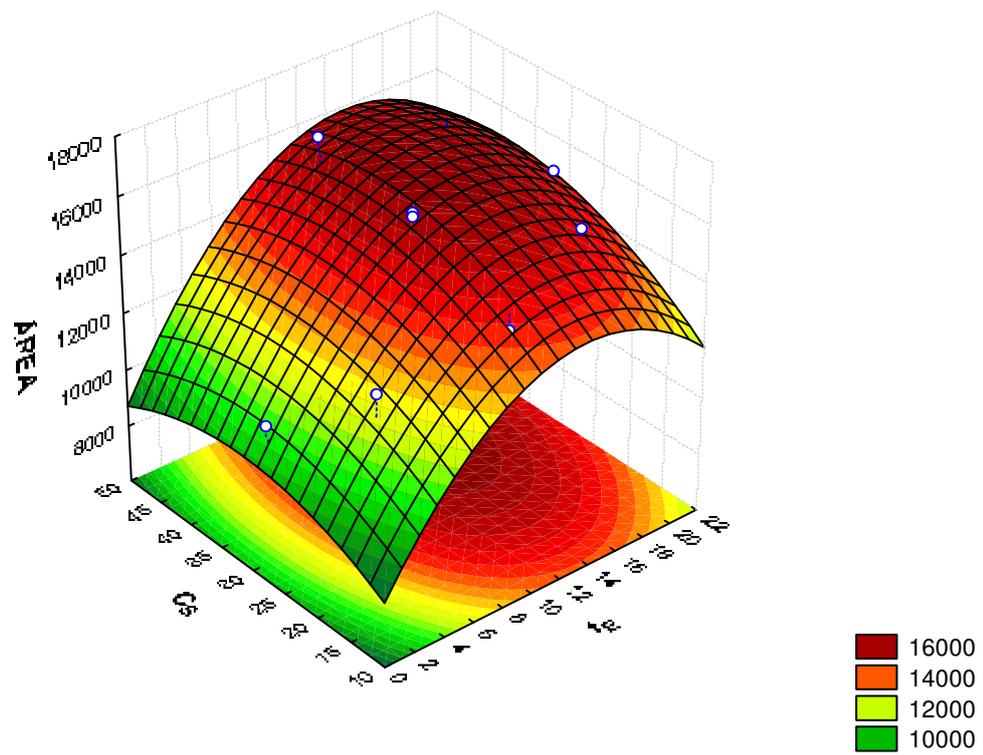


Figura 20. Superfície de resposta para etilbenzeno.

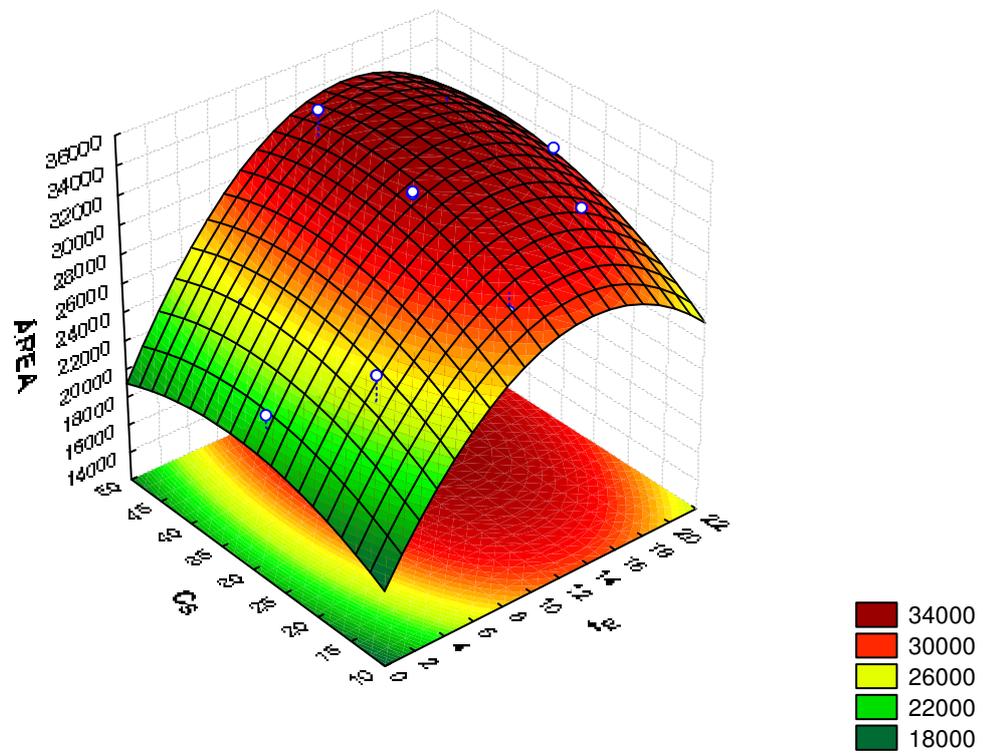


Figura 21. Superfície de resposta para m,p-xilenos.

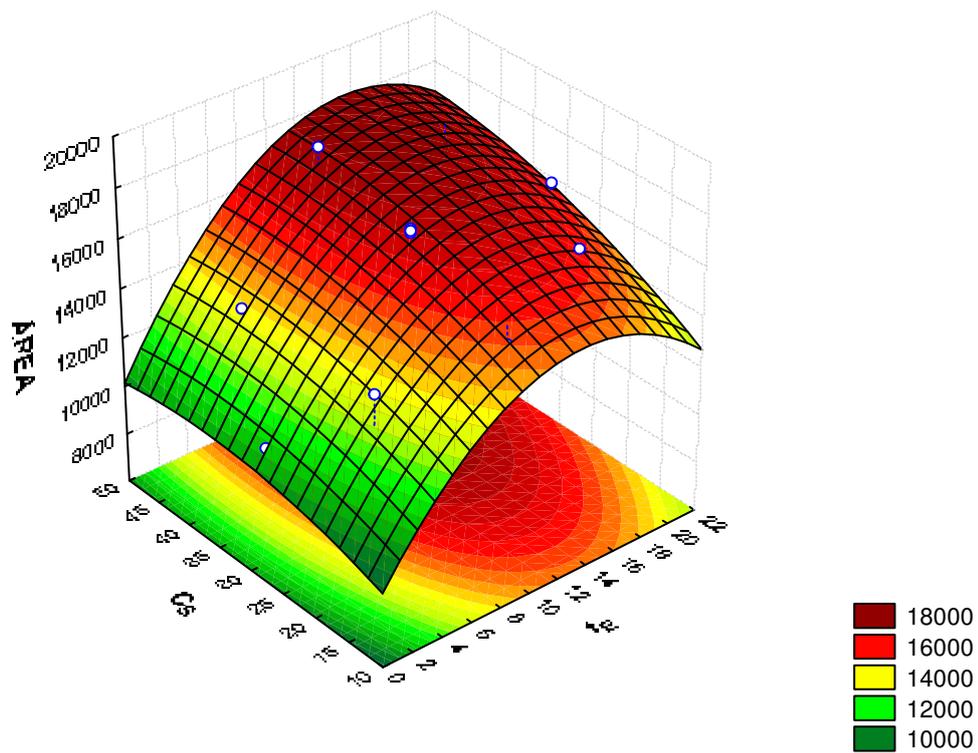


Figura 22. Superfície de resposta para o-xileno.

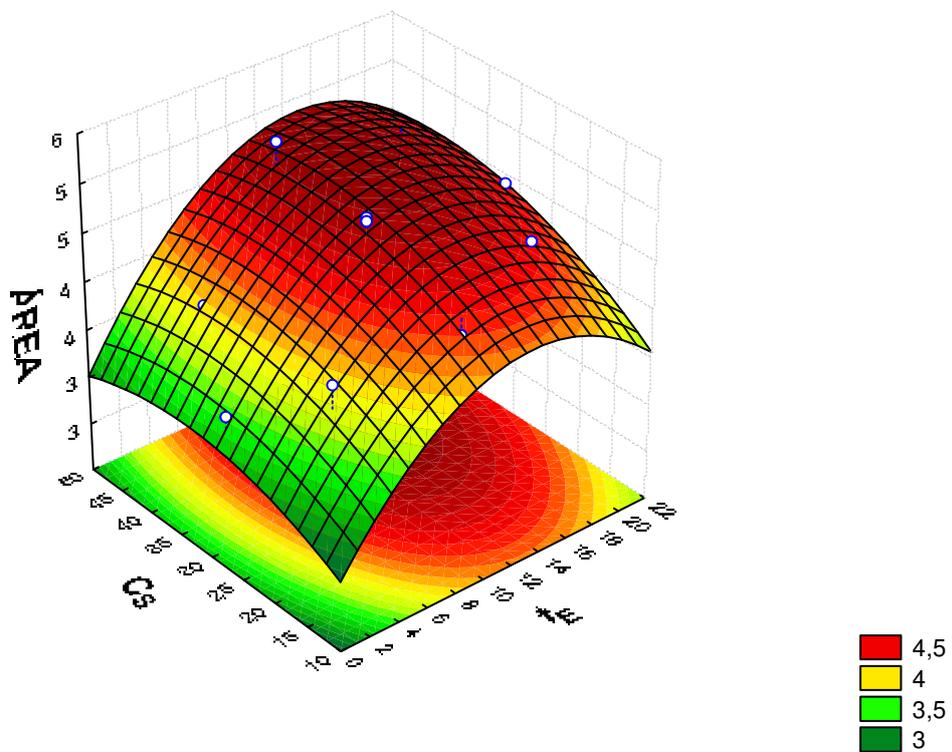


Figura 23. Superfície de resposta para análise conjunta por resposta múltipla.

Tabela 10. Valores críticos para os fatores otimizados e modelos matemáticos com valores codificados.

Analitos	Modelo Otimizado	Tempo de Extração (t_E), min	Concentração de NaCl (C_S), g.L⁻¹
Benzeno	$A = 85,01t_{EXT} - 124,41t_{EXT}^2 + 69,28C_{NaCl} - 33,78C_{NaCl}^2 + 17,20t_{EXT} C_{NaCl} + 2094,90$	13,9	41,3
Tolueno	$A = 363,19t_{EXT} - 492,09t_{EXT}^2 + 226,71C_{NaCl} - 167,29C_{NaCl}^2 + 66,42t_{EXT} C_{NaCl} + 6427,67$	13,9	37,6
Etilbenzeno	$A = 1501,73t_{EXT} - 1467,17t_{EXT}^2 + 406,16C_{NaCl} - 348,27C_{NaCl}^2 + 186,28t_{EXT} C_{NaCl} + 15860,60$	14,9	37,3
m,p-Xilenos	$A = 3167,21t_{EXT} - 3053,29t_{EXT}^2 + 921,45C_{NaCl} - 615,39C_{NaCl}^2 + 318,30t_{EXT} C_{NaCl} + 33095,60$	15,0	38,9
o-Xileno	$A = 1632,84t_{EXT} - 1599,34t_{EXT}^2 + 648,74C_{NaCl} - 195,51C_{NaCl}^2 + 236,30 t_{EXT} C_{NaCl} + 16871,33$	15,6	50,6

Determinou-se também o modelo com base na resposta múltipla gerada nos ensaios. Os valores ótimos obtidos, considerando a resposta conjunta dos dois fatores, são 15 min, para o tempo de extração, e 40 g.L⁻¹, para a concentração de NaCl. O modelo pode ser representado pela equação:

$$A = 0,36t_E - 0,39t_E^2 + 0,15C_S - 0,08C_S^2 + 0,05 t_E C_S + 4,77 \quad (25)$$

A análise residual deste modelo demonstra que os resíduos obedecem a uma distribuição normal como pode ser observados nos gráficos das figuras 24 e 25. A observação do gráfico que correlaciona os valores previstos e observados (fig 26) denota excelente adequação do modelo uma vez que os pontos encontram-se bastante próximos à reta.

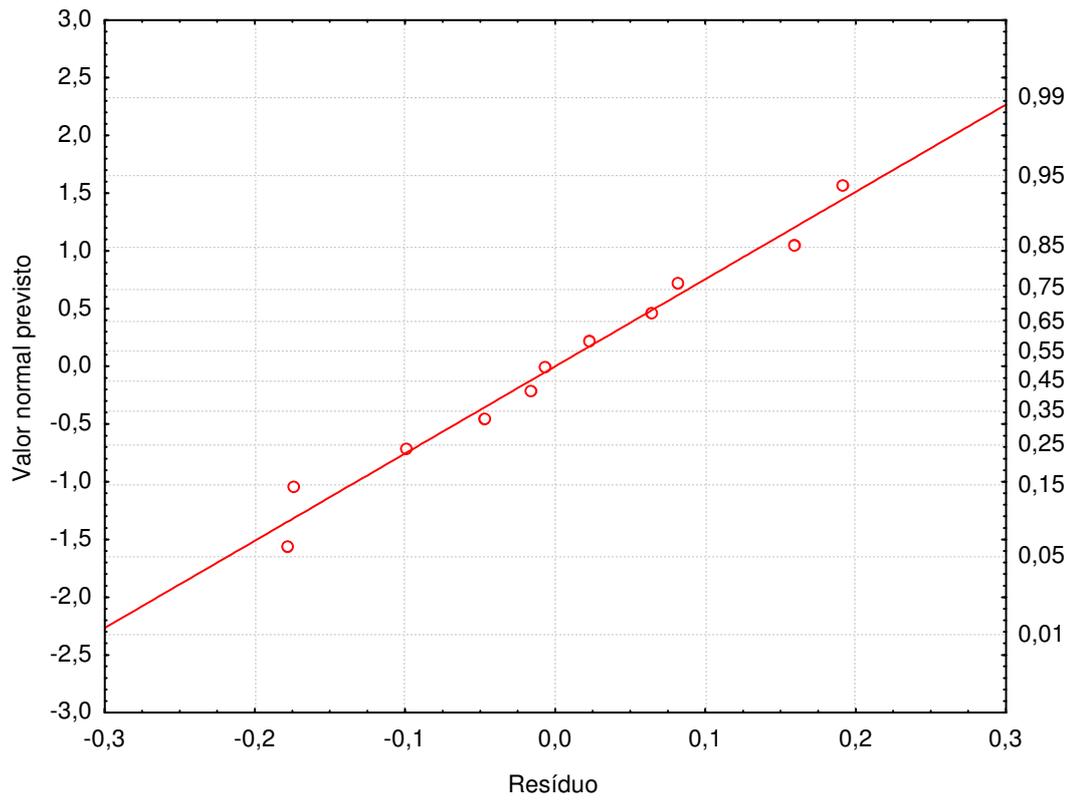


Figura 24. Gráfico de probabilidade normal para modelo quadrático.

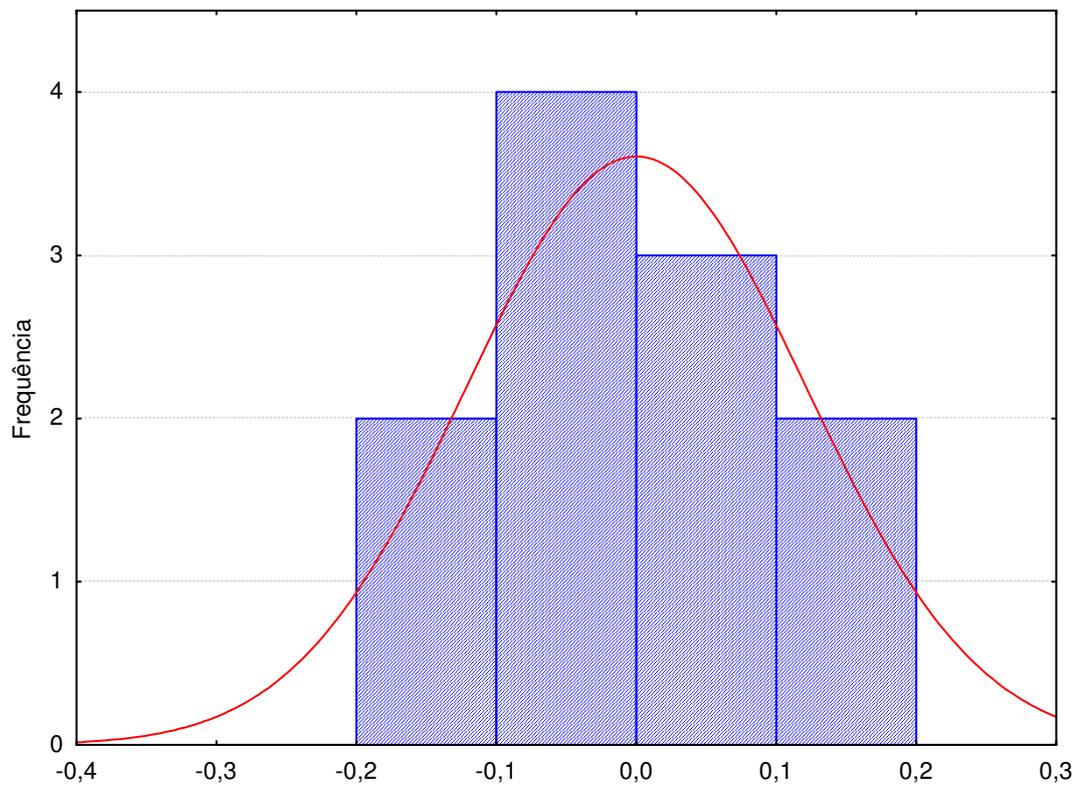


Figura 25. Histograma dos resíduos para o modelo quadrático.

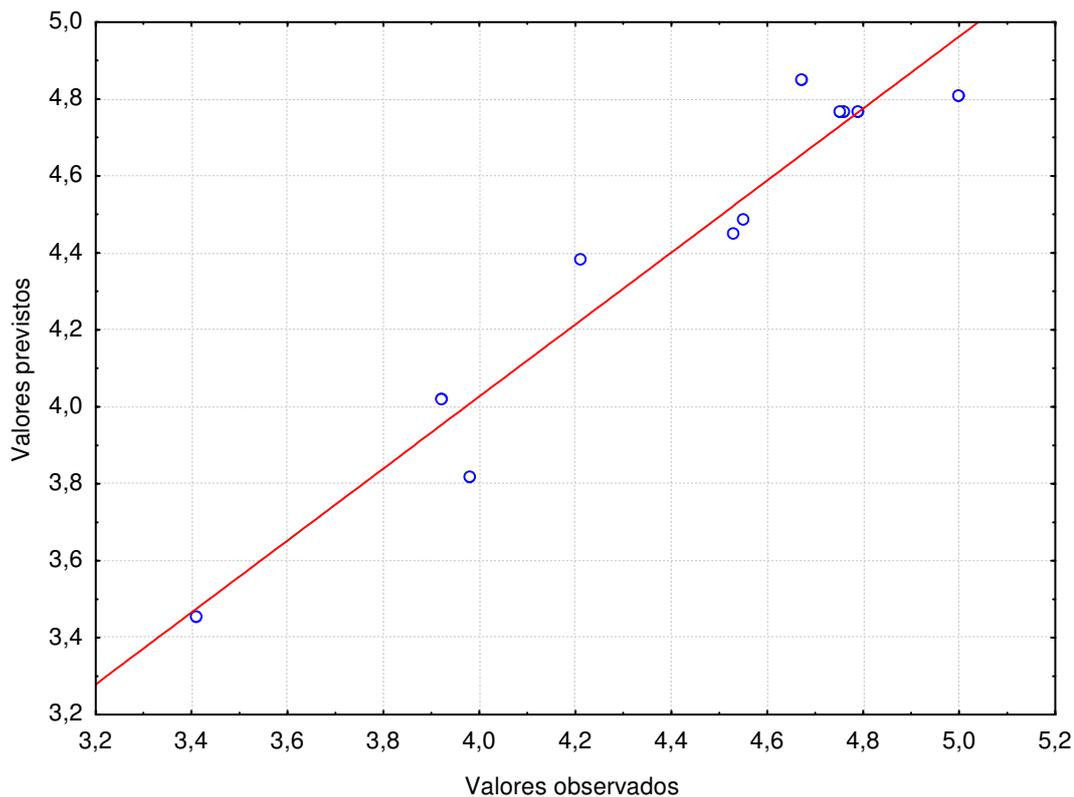


Figura 26. Valores previstos *versus* valores observados para modelo quadrático.

7.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação é um conjunto de ensaios que se destinam a verificar se um determinado método analítico é apto a produzir resultados confiáveis e adequados aos objetivos a que se propõe. É através da validação que se tem conhecimento das limitações e da confiabilidade das medidas obtidas na análise por meio da metodologia desenvolvida (BRITO et al., 2003). Neste trabalho foram avaliados a robustez, a linearidade, a faixa de trabalho, a sensibilidade, a precisão do método, a exatidão e os limites de detecção e quantificação.

7.4.a. O TESTE DE ROBUSTEZ

A robustez do método analítico se refere ao quanto o sinal analítico se mantém inalterado sob pequenas variações nos parâmetros do método já

otimizado. Os testes de robustez avaliam os fatores que podem influenciar de modo mais significativo a resposta de interesse (BRITO et al., 2003). Um método é dito robusto quando se mostra praticamente insensível a pequenas mudanças nas condições de trabalho, ou seja, quanto maior a robustez do método, maior será a confiança deste em relação a sua precisão (INMETRO, 2003).

Para se determinar a robustez do procedimento otimizado pode-se realizar um planejamento fatorial no qual os parâmetros são variados dentro de um domínio estreito de estudo. A análise do gráfico de pareto nos mostra se existe, ou não, significância dos fatores no domínio em estudo.

Neste trabalho, julgou-se apropriado avaliar os efeitos nas variações das concentrações de cloreto de sódio (30-40 g.L⁻¹), do tempo de extração (15,5-16,5 min) e da velocidade de agitação da amostra (900-1100 rpm). No caso do tempo de dessorção, o mesmo se mostrou não significativo já no primeiro planejamento realizado neste estudo. Portanto, o método é seguramente robusto em relação a este parâmetro. Com relação ao volume da fase *headspace*, devido à dificuldade em se variar de forma controlada o volume disponível para a fase gasosa dentro de um limite restrito, sem modificar o volume da amostra, a robustez do método em relação a este parâmetro não foi testada.

Tabela 11. Matriz para o teste de robustez.

Ensaio	C _S , g.L ⁻¹ (1)	t _E , min (2)	v _A , rpm (3)	Área dos Picos Cromatográficos				
				Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	m,p-Xilenos	o-Xileno
1	30	15,5	900	2602,40	8078,90	20891,70	43614,40	21693,20
2	40	15,5	900	2747,40	8609,60	22108,40	46241,10	22986,10
3	30	16,5	900	2698,20	8364,10	21812,50	45572,00	22305,00
4	40	16,5	900	2697,40	8401,70	21607,80	45265,00	22623,20
5	30	15,5	1100	2719,60	8508,80	22434,50	46660,60	22734,90
6	40	15,5	1100	2731,60	8558,10	22146,20	46279,80	23001,50
7	30	16,5	1100	2719,00	8534,00	22114,20	46113,00	22570,00
8	40	16,5	1100	2654,20	8479,60	21263,40	44467,60	22385,80
9 (C)	35	16	1000	2739,70	8547,90	22066,10	46065,20	22727,10
10 (C)	35	16	1000	2610,80	8133,30	21084,80	44086,60	21980,00
11 (C)	35	16	1000	2753,30	8590,30	22456,30	46929,70	22962,80
12 (C)	35	16	1000	2681,90	8335,60	21541,50	45047,40	22349,30
13 (C)	35	16	1000	2591,70	8011,10	20629,90	43035,30	21650,80

Assim, os ensaios foram realizados (tabela 11) mantendo-se constantes o volume da fase *headspace*, em 53,8%, e o tempo de

dessorção, em 1 min. A análise dos gráficos de pareto (figuras 27 a 31) gerados pelo STATISTICA[®], revela que para todos os analitos as estimativas dos efeitos encontram-se abaixo do limite delimitado por p e, portanto, nenhum dos fatores avaliados dentro destes domínios, modifica significativamente o sinal analito gerado, ou seja, a área dos picos cromatográficos.

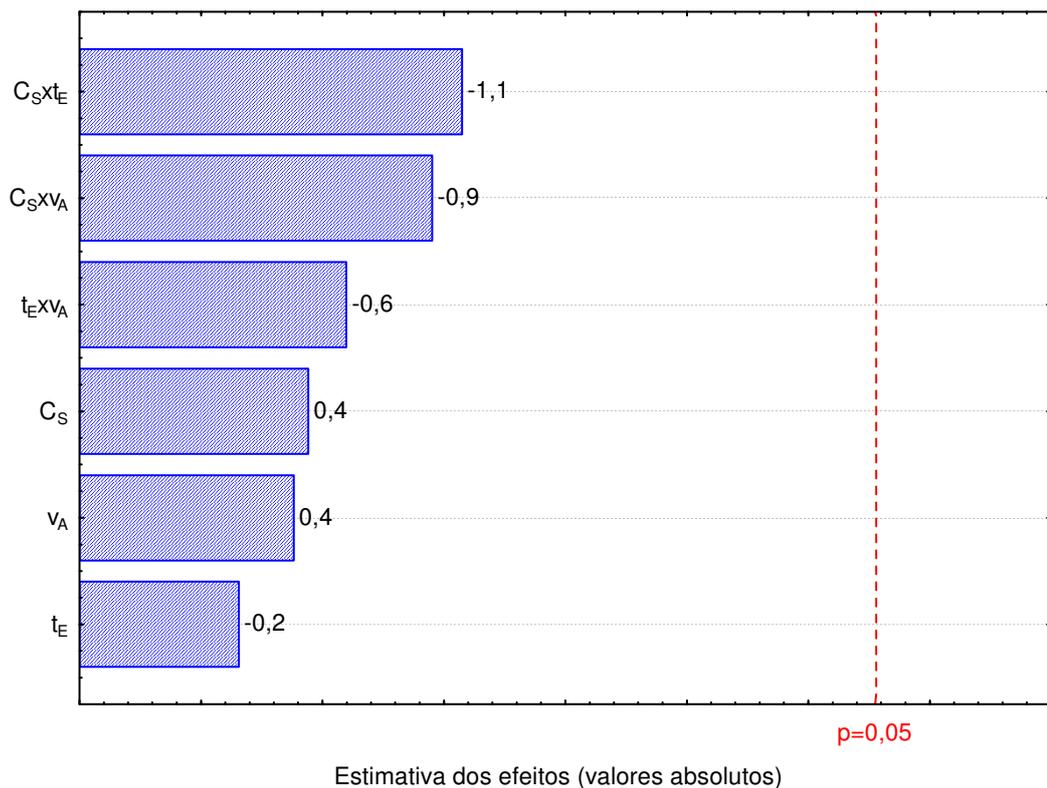
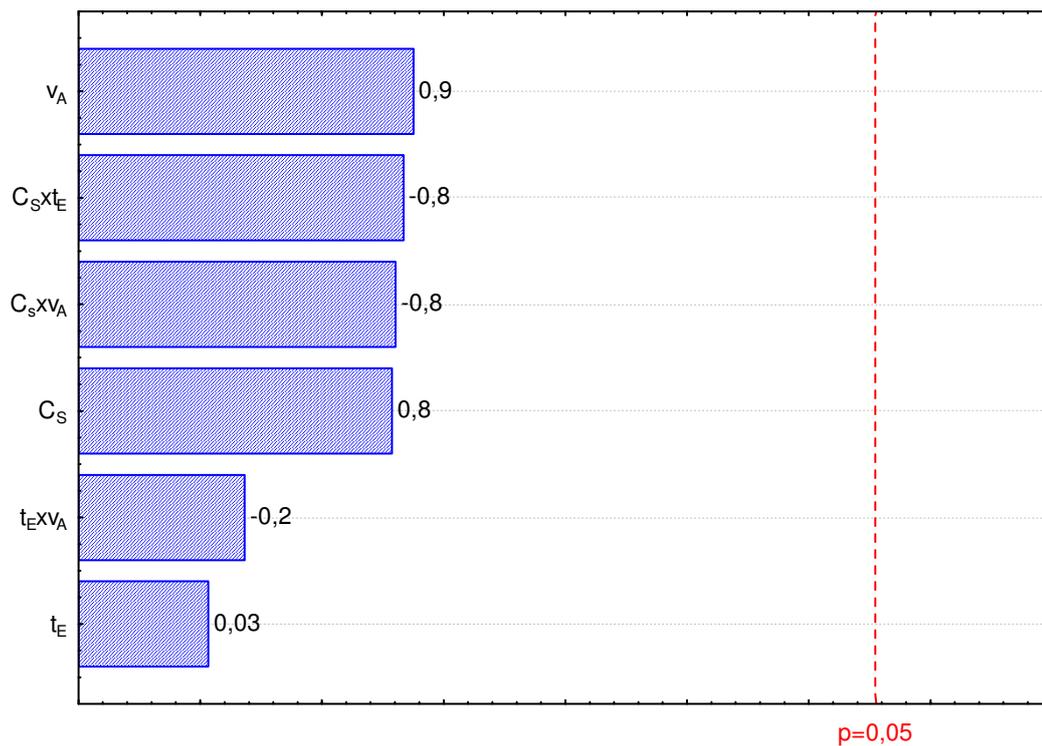
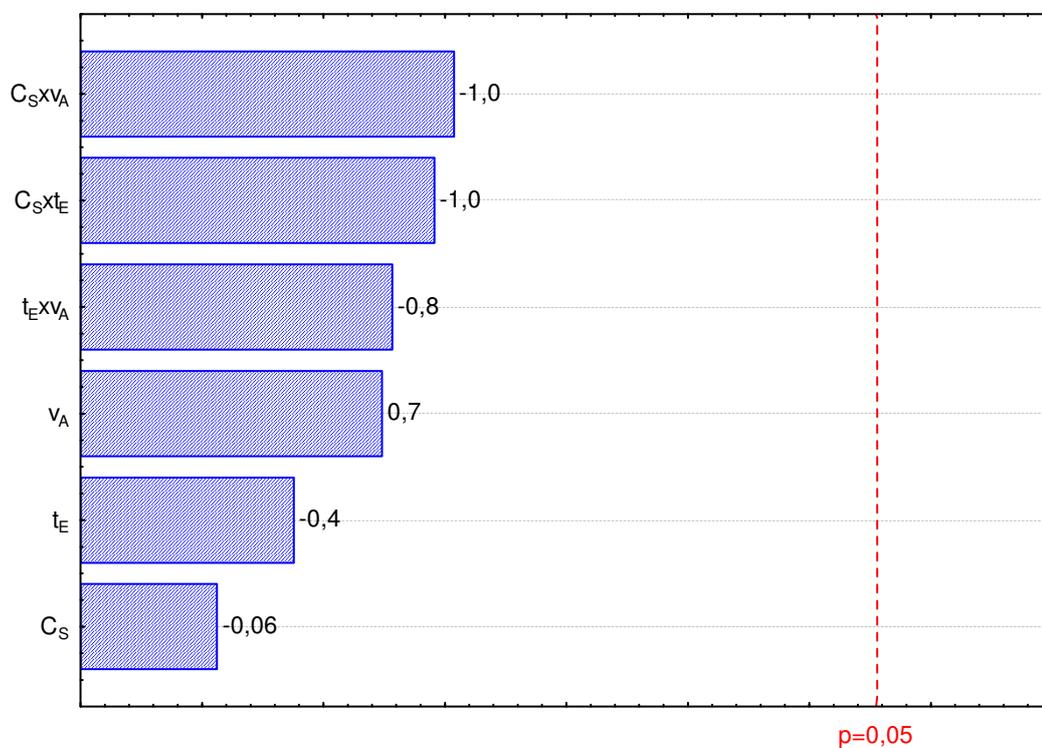


Figura 27. Gráfico de Pareto para benzeno – teste de robustez.



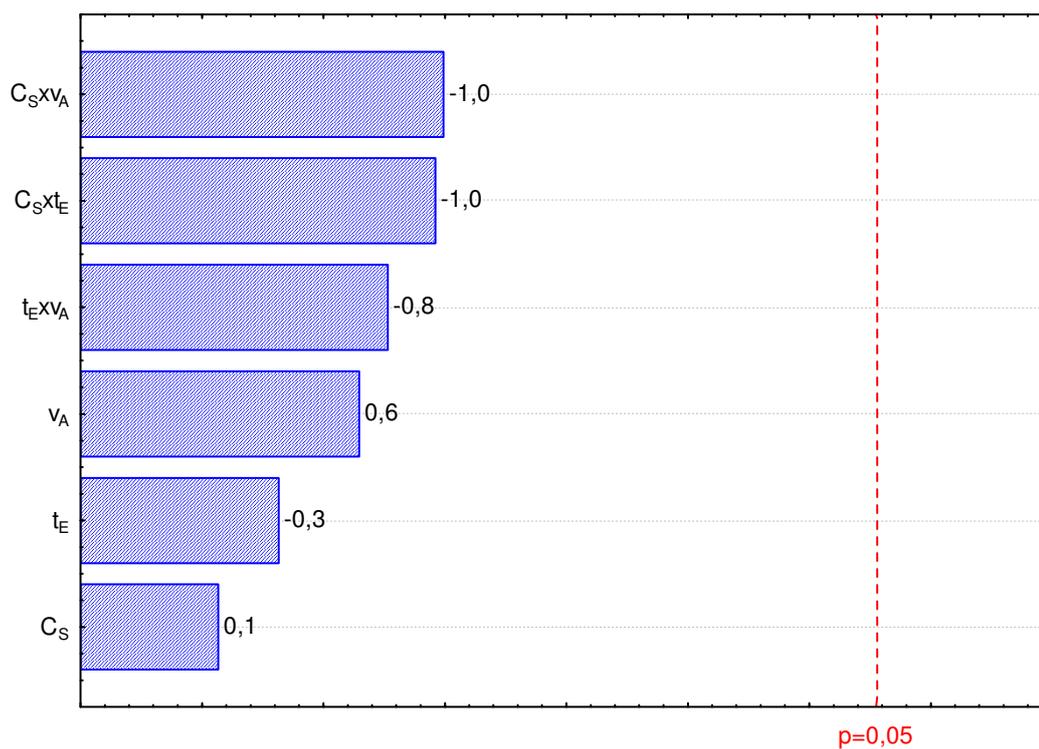
Estimativa dos efeitos (valores absolutos)

Figura 28. Gráfico de Pareto para tolueno – teste de robustez.



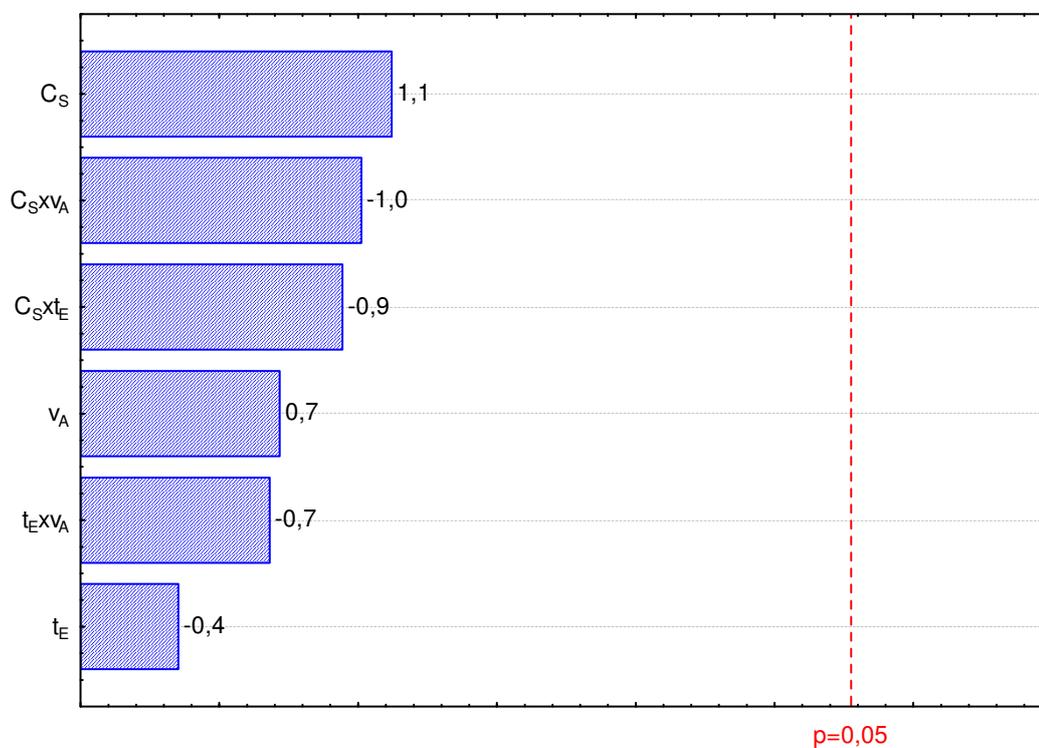
Estimativa dos efeitos (valores absolutos)

Figura 29. Gráfico de Pareto para etilbenzeno – teste de robustez.



Estimativa dos efeitos (valores absolutos)

Figura 30. Gráfico de Pareto para m,p-xilenos – teste de robustez.



Estimativa dos efeitos (valores absolutos)

Figura 31. Gráfico de Pareto para o-xileno – teste de robustez.

7.4.b. LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO

Neste estudo procurou-se avaliar se a linearidade do método era adequada ao nível de concentrações que se almejava trabalhar. Assim, na construção da curva de calibração foram injetadas amostras de BTEX a 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os coeficientes de determinação (r^2) das curvas para cada um dos analitos são superiores a 0,9970, denotando uma excelente relação de linearidade entre a concentração e o sinal analítico. As equações de reta para cada analito podem ser observadas no quadro abaixo:

Tabela 12. Linearidade para BTEX, na faixa de concentrações de 2 a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Analitos	Equações	Coefficientes de Determinação (r^2)
Benzeno	$Y = 28,073x - 76,798$	0,9970
Tolueno	$Y = 87,489x - 201,28$	0,9977
Etilbenzeno	$Y = 225,14x - 590,65$	0,9977
m,p-Xilenos	$Y = 471,53x - 1235,7$	0,9978
o-Xileno	$Y = 232,24x - 403,5$	0,9984

7.4.c. SENSIBILIDADE

De acordo com o INMETRO (2003), a sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e que pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração. O método apresenta melhor sensibilidade para o etilbenzeno e xilenos, pois os coeficientes angulares das equações de reta são maiores para estes compostos. Isto significa que pequenas variações na concentração (x) geram maiores variações no sinal analítico medido (Y), ou seja, as áreas dos picos cromatográficos.

7.4.d. PRECISÃO DO MÉTODO

A precisão de um método pode ser definida como sendo a própria concordância entre os valores experimentais obtidos, ou seja, quanto menor a amplitude destes valores em relação à média entre eles, maior a sua precisão. Para se determinar a precisão de um conjunto de dados, podemos calcular o desvio destes em relação à sua média aritmética, ou seja, a estimativa do desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) (LEITE, 1998):

$$CV = \frac{s \cdot 100\%}{\bar{x}} \quad (26)$$

Onde \bar{x} é a média aritmética das medidas e s a estimativa do desvio-padrão, dado pela equação abaixo:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (27)$$

A precisão intra-ensaios (repetitividade) representa a concordância entre os resultados de análise de um determinado método, realizados nas mesmas condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo instrumento etc (RIBANI et al., 2004). Ela pode ser avaliada através da realização de nove determinações dentro do intervalo de três diferentes concentrações em triplicata, ou com um mínimo de seis determinações para uma única concentração (BRITO et al., 2003). Neste trabalho foi determinada a precisão em três níveis de concentração: 20, 40 e 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (tabela 13). Os coeficientes de variação são inferiores a 5% em todos os níveis, denotando uma excelente precisão da técnica.

Tabela 13. Coeficientes de variação para os compostos nos níveis de concentração de 20, 40 e 80 µg.L⁻¹

Analitos	Concentração (µg.L ⁻¹)		
	20	40	80
Benzeno	1,11%	2,78%	0,86%
Tolueno	1,69%	3,61%	1,05%
Etilbenzeno	2,87%	4,03%	1,87%
m,p-Xilenos	2,88%	4,23%	2,07%
o-Xileno	2,94%	4,15%	1,69%

O intervalo de confiança da média (*IC*) é uma outra medida da precisão de um método. Segundo Ribani et al. (2004), o intervalo de confiança da média representa uma faixa de valores na qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor para uma dada variável e pode ser calculado da seguinte forma:

$$IC = \bar{x} \pm \frac{t_{95\%} s}{\sqrt{N}} \quad (28)$$

onde \bar{x} é a média, $t_{95\%}$ é o fator t de student para um nível de confiança de 95%, s é a estimativa do desvio padrão das medidas e N é o número de replicatas. Os resultados obtidos para o nível de confiança de 95% são apresentados na tabela 14:

Tabela 14. Intervalos de confiança da média nos níveis de concentração: 20, 40 e 80 µg.L⁻¹

Analitos	Concentração (µg.L ⁻¹)		
	20	40	80
Benzeno	19,8 ± 0,400	39,1 ± 1,83	73,3 ± 1,06
Tolueno	19,4 ± 0,553	38,3 ± 2,33	73,0 ± 1,29
Etilbenzeno	19,6 ± 0,950	38,2 ± 2,59	73,3 ± 2,31
m,p-Xilenos	19,4 ± 0,943	38,3 ± 2,73	73,0 ± 2,55
o-Xileno	19,6 ± 0,905	39,7 ± 2,77	73,4 ± 2,09

7.4.e. EXATIDÃO

A exatidão de um método pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência, aceito como verdadeiro (RIBANI et al., 2004). Dentre os procedimentos mais empregados para determinar a exatidão de um método podemos citar o emprego de materiais de referência, a recuperação e a comparação com um método padrão de análise.

Neste estudo a metodologia SPME foi comparada com a técnica padrão para matrizes aquosas contendo voláteis, *Purge & Trap*. Inicialmente foram preparadas soluções aquosas salinas, contendo NaCl a 35 g.L⁻¹, fortificadas com BTEX nos seguintes níveis: 5, 10, 25 e 50 µg.L⁻¹ e analisados em duplicata através das duas técnicas (tabela 15). Para realizar uma comparação entre as técnicas podemos, a partir do método dos mínimos quadrados, determinar a equação da reta que melhor ajusta as respostas obtidas pelas duas técnicas e assim determinar o coeficiente de correlação para o modelo linear proposto (CHRISTIAN, 1994).

As equações das retas obtidas para cada um dos compostos, podem ser observadas nas figura 32 a 36, apresentando coeficientes de determinação (r^2) entre 0,9983 e 0,9994, isto é, há uma correlação excelente entre as respostas geradas pelas duas metodologias.

Neste trabalho foi também feita uma comparação entre a precisão das duas técnicas através do teste F (tabela 16). O teste F envolve o cálculo da razão entre as variâncias de dois métodos:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (29)$$

onde s_1^2 é variância do método 1 e s_2^2 é a variância do método 2. Nesta equação, o numerador sempre assume a maior variância. Se esta razão é maior do que o valor crítico tabelado, pode-se concluir que existe uma

diferença significativa entre as precisões dos dois métodos (MILLER & MILLER, 1993).

Tabela 15. Comparação entre as técnicas SPME e *Purge & Trap*.

Analitos	Técnica	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
		5	10	25	50
Benzeno	SPME	5,85	11,8	26,0	45,6
	P & T	5,76	11,3	24,3	46,0
Tolueno	SPME	5,45	11,2	26,3	44,6
	P & T	5,84	11,2	24,7	45,8
Etilbenzeno	SPME	5,61	11,4	26,9	44,6
	P & T	5,67	10,8	24,4	44,2
m,p-Xilenos	SPME	5,74	11,3	26,7	44,8
	P & T	5,42	10,6	24,1	44,1
o-Xileno	SPME	5,02	10,7	25,2	45,4
	P & T	5,15	10,0	23,7	45,0

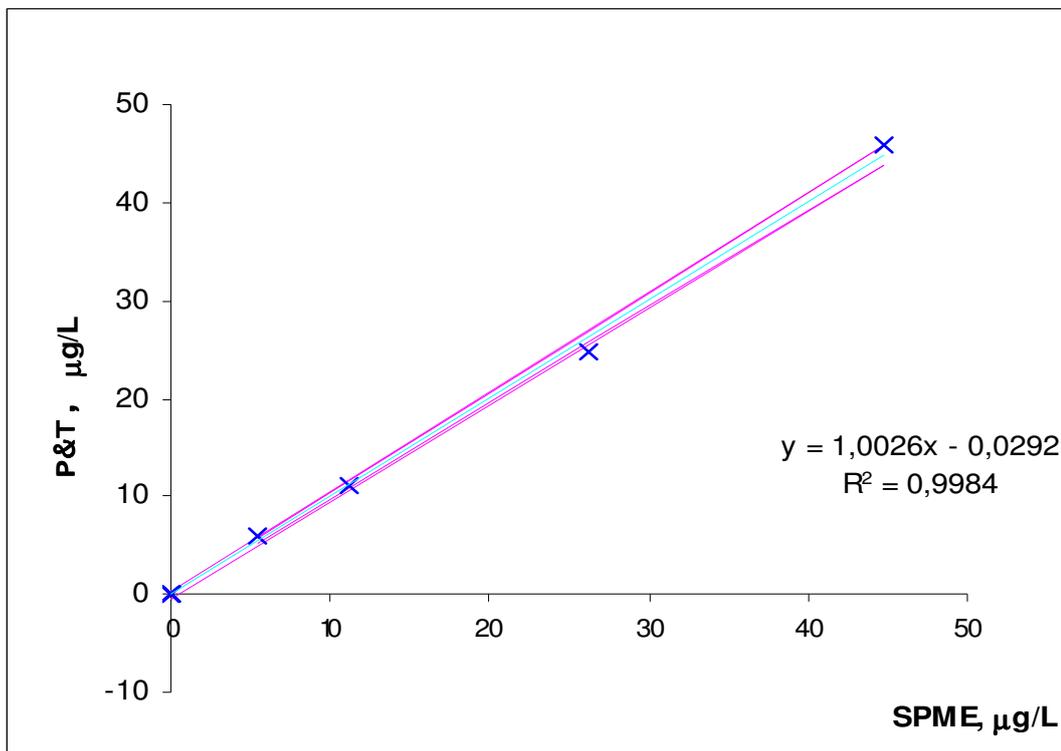


Figura 32. Comparação entre as técnicas *Purge & Trap* e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito benzeno.

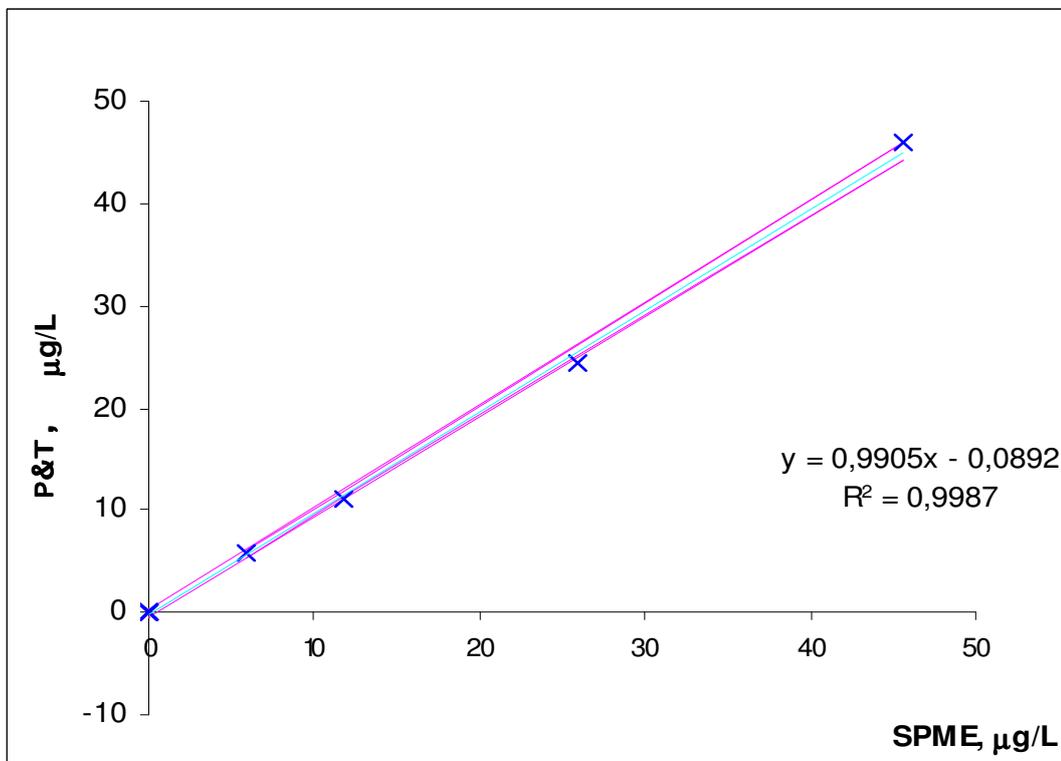


Figura 33. Comparação entre as técnicas *Purge & Trap* e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito tolueno.

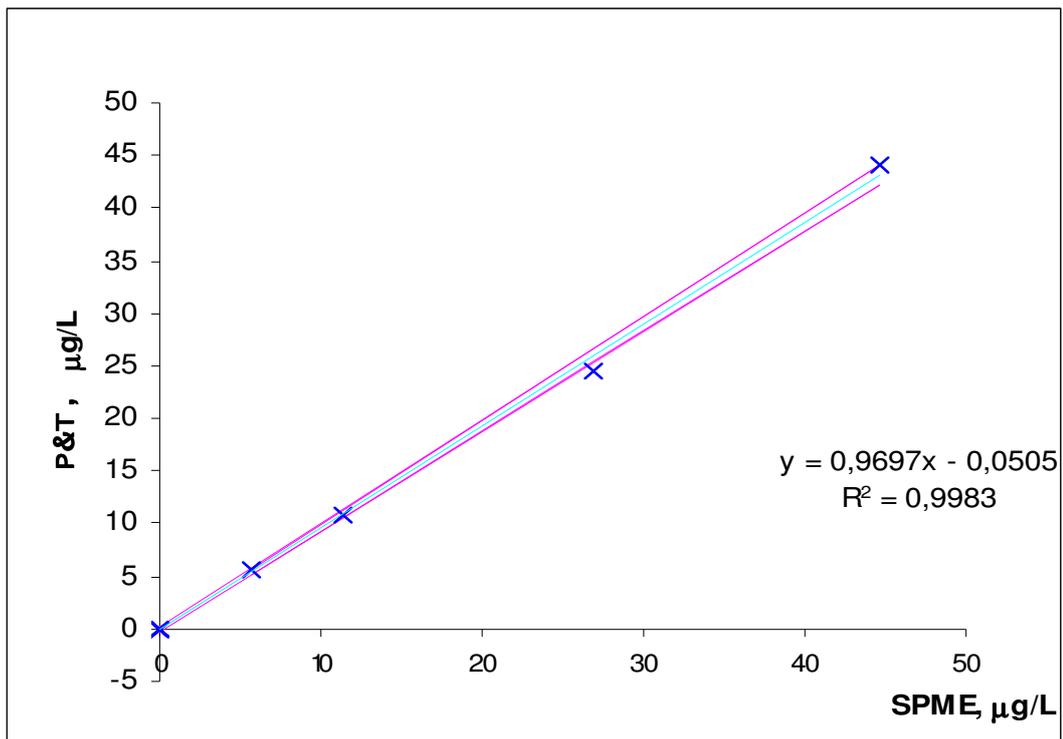


Figura 34. Comparação entre as técnicas *Purge & Trap* e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito etilbenzeno.

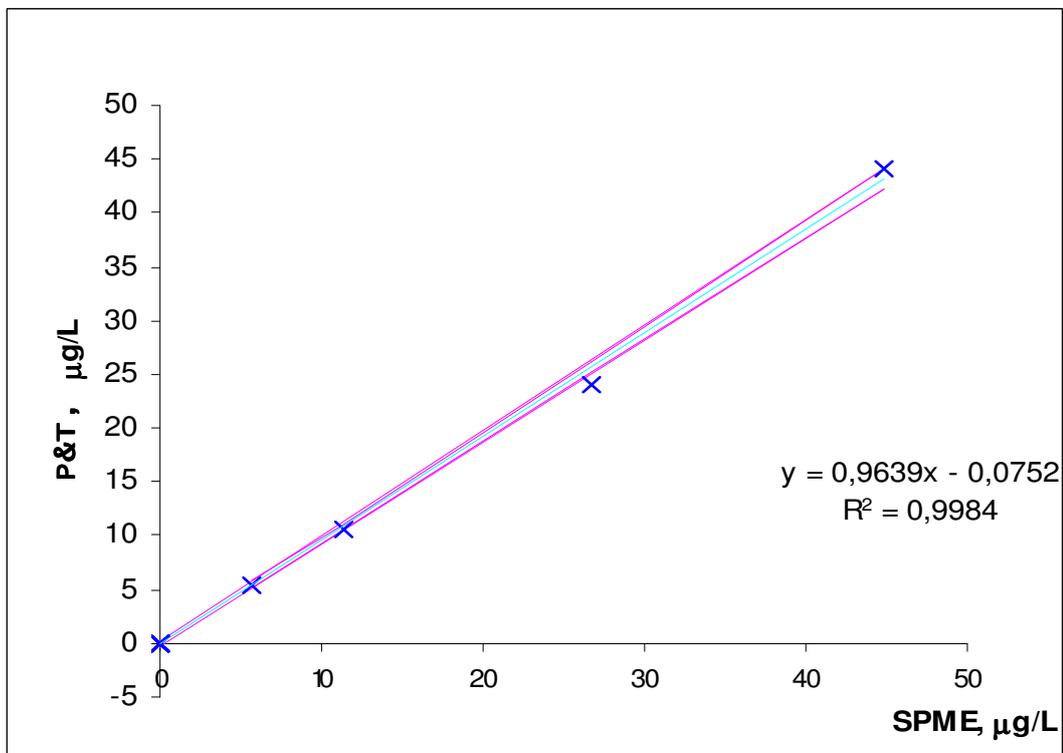


Figura 35. Comparação entre as técnicas *Purge & Trap* e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito m,p-xilenos.

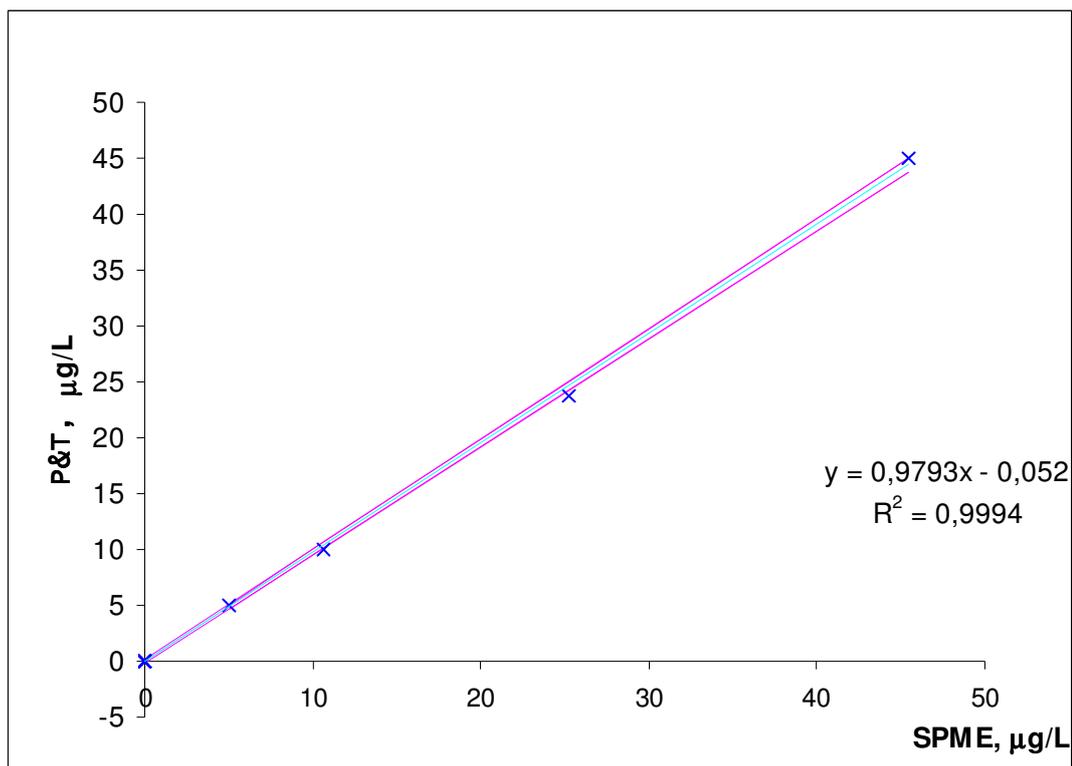


Figura 36. Comparação entre as técnicas *Purge & Trap* e SPME - Equação da reta e coeficiente de determinação para o analito o-xileno.

Calculou-se a variância dos dois métodos em todos os níveis de concentração investigados. As variâncias do método *Purge & Trap* foram maiores do que as da técnica SPME, em praticamente todos os ensaios. A seguir dividiu-se a maior variância pela menor para se determinar o parâmetro F. Estes dados podem ser observados na tabela 16.

Os ensaios foram realizados em duplicata para ambos os métodos, portanto temos o valor 1 para o número de graus de liberdade. Considerando 95% de confiança, o valor de F tabelado é igual a 161,4 (NETO et al., 2003). Como pode ser constatado, no nível de 5 µg.L⁻¹, não há diferença significativa para a precisão dos dois métodos, com exceção para o m,p-xileno, onde a precisão da técnica *purge & trap* é significativamente maior. Porém, nos outros níveis de concentração e para todos os analitos, com exceção para o benzeno no nível de 25 µg.L⁻¹, a técnica SPME apresentou precisão superior à da técnica padrão.

Tabela 16. Teste F para avaliar a precisão entre os métodos

Analitos	Valores de F nos diferentes níveis de concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	5	10	25	50
Benzeno	1,98	$1,44.10^3$	23,3	342
Tolueno	1,04	$1,30.10^3$	$2,19.10^3$	$3,55.10^4$
Etilbenzeno	9,40	$1,10.10^3$	$2,65.10^3$	$1,12.10^4$
m,p-Xilenos	225*	$1,08.10^3$	$8,41.10^2$	$1,03.10^3$
o-Xileno	25,8	$3,15.10^4$	$2,30.10^3$	$1,57.10^3$

* Maior variância para a técnica SPME. Nos outros conjuntos de dados, a técnica Purge & Trap apresenta maior variância.

Foi avaliada também a precisão das duas técnicas com amostras reais. Foram coletadas amostras do rio Sergipe, no terminal hidroviário, ao lado das embarcações que fazem a rota Aracaju-Barra dos Coqueiros. A análise destas amostras, pelas duas técnicas (figuras 39 e 40 do anexo C), foi realizada logo em seguida, não sendo detectada a presença de BTEX naquelas amostras. O mesmo ocorreu com água marinha coletada na praia de Atalaia, como pode ser visto nas figuras 41 e 42, do anexo C, na qual não foram detectados BTEX.

O efluente do campo petrolífero em Carmópolis-SE foi analisado em duplicata através das duas técnicas e os dados podem ser observados na tabela 17. Como as amostras apresentavam concentração de BTEX acima do máximo estabelecido pelas curvas de calibração ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$), foram então diluídas com água deionizada: para a análise por SPME por um fator de 10 e, por *Purge&Trap*, diluídas por um fator de 20. Os cromatogramas referentes a estas análises estão representados nas figuras 37 e 38.

Tabela 17. Resultados da análise do efluente de Bonsucesso e teste F.

Analitos	SPME ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Purge&Trap ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$F = S_1^2 / S_2^2$
Benzeno	1221	976,1	100,9
Tolueno	1224	1006	1560
Etilbenzeno	243,7	221,6	37,44
m,p-Xilenos	205,1	189,7	82,96
o-Xileno	145,8	145,8	525,05

Mais uma vez o método SPME apresentou variâncias menores do que a técnica *Purge & Trap*. O parâmetro F calculado para o tolueno e o-xileno são superiores ao tabelado, portanto a técnica SPME é significativamente mais precisa para estes compostos. Para os outros analitos não houve diferença significativa entre as precisões dos dois métodos.

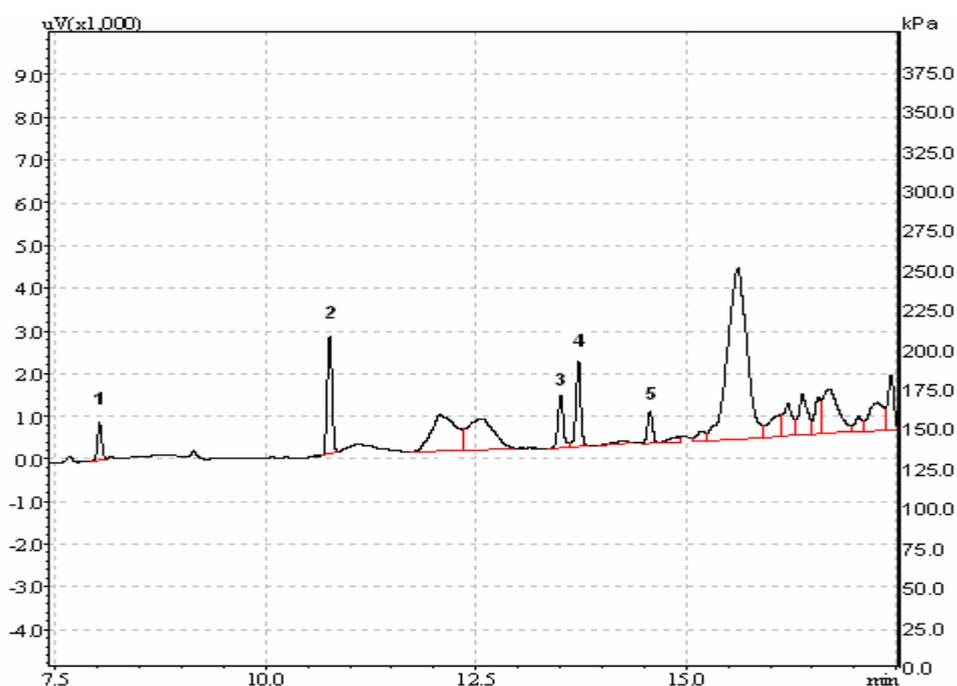


Figura 37. Cromatograma para análise de efluente de Bonsucesso via SPME. 1. benzeno, 2. tolueno, 3. etilbenzeno, 4. m,p-xilenos, 5. o-xileno.

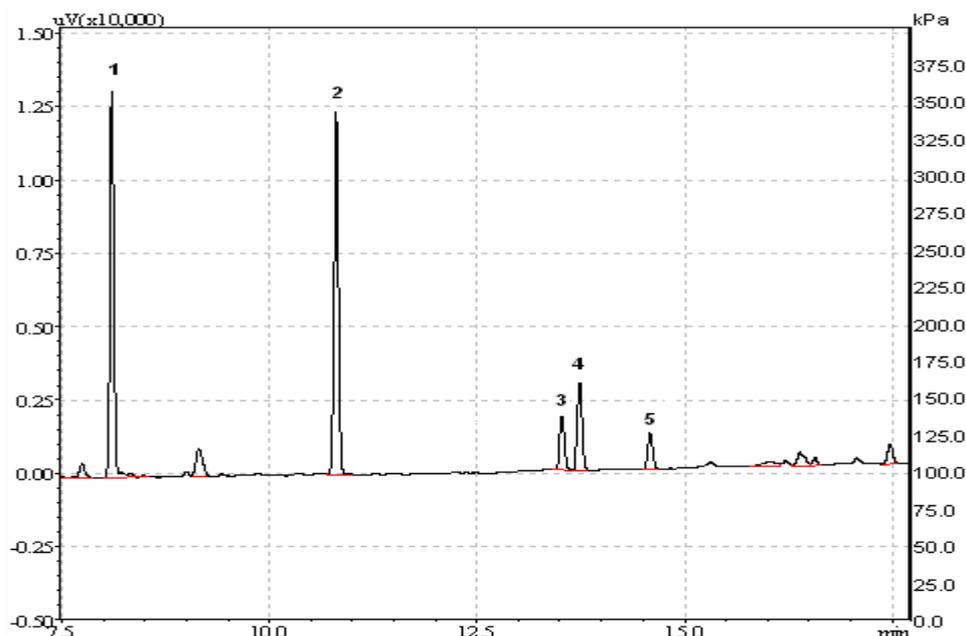


Figura 38. Cromatograma para análise de efluente de Bonsucesso via P&T. 1. benzeno, 2. tolueno, 3. etilbenzeno, 4. m,p-xilenos, 5. o-xileno.

7.4.f. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (LD E LQ)

O limite de detecção se refere a menor concentração do analito na amostra que é capaz de gerar um sinal analítico detectável, mas que não necessariamente possa ser quantificado, a partir da utilização de uma metodologia analítica. O LD pode ser calculado através de diferentes técnicas: método visual, método sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho os limites de detecção e quantificação foram determinados por duas diferentes técnicas: a primeira utilizou o método sinal-ruído, no qual é feita a comparação entre as áreas dos picos gerados nas corridas cromatográficas de amostras, contendo os compostos de interesse em baixa concentração, e a amplitude do ruído. Assim, é estabelecida a concentração mínima que gera um pico cerca de três vezes maior do que o ruído do equipamento (LEITE, 1998). Em seguida, foram realizadas sete corridas com soluções dos compostos naquelas concentrações limite e empregou-se a equação abaixo para o cálculo do LD:

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S} \quad (30)$$

onde: LD é o limite de detecção, s é a estimativa do desvio padrão da resposta (área dos picos cromatográficos) e S é o coeficiente angular da curva analítica.

O outro método também consiste em determinar, com o mínimo de 7 corridas, o desvio padrão da concentração que gera picos cerca de três vezes maiores que o ruído. As áreas dos picos são convertidas em concentrações e calcula-se o desvio padrão. A equação empregada foi:

$$LD = t_{98\%} \cdot s \quad (31)$$

onde: LD é o limite de detecção, s é a estimativa do desvio padrão das concentrações e $t_{98\%}$ é o fator t de Student para um nível de confiança de 98% (t unilateral).

Foram determinadas curvas de calibração para os analitos (tabela 18 no anexo D), em baixos níveis de concentração ($0,1$ a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$) e os limites de detecção para todos os compostos, calculados pelos dois métodos, ficaram abaixo de $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ como mostra a tabela 19:

Tabela 19. Limites de detecção, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método por SPME

Analitos	$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S}$, ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$LD = t_{98\%} \cdot s$, ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Benzeno	0,28	0,27
Tolueno	0,19	0,18
Etilbenzeno	0,06	0,06
m,p-Xilenos	0,05	0,04
o-Xileno	0,05	0,04

Para o cálculo do limite de quantificação os dois princípios acima foram empregados, utilizando-se as relações:

$$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (32)$$

$$LQ = 10 \cdot s \quad (33)$$

Tabela 20. Limites de quantificação, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o método por SPME

Analitos	$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S}$, ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$LQ = 10 \cdot s$, ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Benzeno	0,84	0,85
Tolueno	0,57	0,57
Etilbenzeno	0,19	0,19
m,p-Xilenos	0,14	0,14
o-Xileno	0,15	0,14

Para todos os analitos os limites de quantificação são inferiores a 1 $\mu\text{g/L}$ (tabela 19), portanto o método atende as especificações estabelecidas pela legislação brasileira (CONAMA, 2005).

Comparando-se com a técnica padrão para análise de BTEX em matrizes aquosas, *purge & trap*, os limites de determinação e quantificação para a técnica SPME apresentam valores ligeiramente maiores, indicando uma melhor sensibilidade por *Purge & Trap* (tabela 21, anexo E).

8. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para a determinação de BTEX por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama mostrou-se facilmente executável, extremamente simples, rápido e sem uso de solventes orgânicos, apresentando excelentes resultados de precisão, sensibilidade e exatidão.

A otimização foi executada com êxito através de um planejamento fatorial fracionário para definir os fatores estatisticamente significativos e, na busca pelos valores críticos, por um planejamento composto central. Dentre os fatores estudados, tempos de extração e dessorção, nível de agitação da amostra, volume disponível para a fase *headspace* e concentração de NaCl, todos foram significativos com exceção do tempo de dessorção. Na etapa posterior da otimização procurou-se encontrar uma função de resposta para o método. Para isto, empregou-se um planejamento composto central envolvendo os fatores tempo de extração e concentração de NaCl. Para o primeiro foi encontrado o tempo de 16 min e para a concentração de NaCl, fixou-se o valor em 35 g.L⁻¹. Os outros fatores foram mantidos fixos em 1000 rpm para a velocidade de agitação da matriz, 1 min para o tempo de dessorção e 53,8% do *vial* para o volume da fase *headspace*. O método se mostrou bastante robusto através da realização de um planejamento fatorial completo.

A linearidade foi testada no intervalo de 2 a 200 µg.L⁻¹ apresentando coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,9970. A precisão do método, avaliada através do coeficiente de variação, apresenta menor valor para o benzeno (CV= 0,86%) no nível de 80 µg.L⁻¹ e maior valor para o m,p-xileno no nível de 40 µg.L⁻¹ (CV= 4,23%). Os intervalos de confiança da média também apresentam excelentes resultados para a precisão.

A sensibilidade da técnica SPME é comparável ao método padrão de análise, *purge & trap*. Os limites de detecção e quantificação são ligeiramente maiores para a microextração em fase sólida, com valores menores que $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ para os limites de detecção e, menores que $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, para os limites de quantificação.

Para determinar a exatidão da técnica foi feito um estudo comparativo com a técnica padrão para análise de BTEX em matrizes aquosas, o *purge & trap*. Inicialmente, foram analisadas soluções fortificadas com BTEX nos níveis de 5, 10, 25 e $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e, verificou-se que os coeficientes de determinação (r^2) são superiores a 0,9980 para todos os analitos, indicando excelente correlação linear entre as respostas geradas pelas duas técnicas. A precisão entre as duas técnicas também foi avaliada através do teste F. O método SPME mostrou ser mais preciso do que o *purge & trap*, praticamente, para todos os compostos e em todos os níveis de concentração. Foram analisadas amostras reais através das duas metodologias, obtendo-se valores bem próximos entre si.

Assim, podemos concluir que o método desenvolvido é apropriado para quantificar benzeno, tolueno, etilbenzeno, m,p-xilenos e o-xileno em matrizes aquosas. A técnica SPME, além de apresentar baixo custo, apresenta excelentes níveis de precisão e exatidão, oferecendo a possibilidade de detectar BTEX em concentrações ao nível de partes por bilhão, atendendo assim aos limites estabelecidos pela legislação ambiental brasileira.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Devido as suas características de extrema simplicidade e versatilidade, temos como perspectiva a aplicação da microextração em fase sólida para outros tipos de matrizes como urina, sólido contendo voláteis e sangue, desenvolvendo metodologias analíticas eficientes e de menor custo. Além disso, é de grande interesse a coleta de amostras diretamente em campo sem grandes perturbações do meio natural, possibilidade oferecida pela SPME.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater. Baltimore, United Book Press Inc., 1995.

ARAMBARRI, I; LASA, M; GARCIA, R; MILLÁN, E. Determination of Fuel Dialkil Ethers and BTEX in Water Using *Headspace* Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. **Journal of Chromatography A**, v.1033, 193-203, 2004.

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

ARTHUR, C L; KILLIAM, L M; BUCHHOLZ, K D; PAWLISZYN, J. Automation and Optimization of Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v.64, 1960-1966, 1992.

BELARDI, R; PAWLISZYN, J. The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibres in Extraction of Organics from Water Matrix Samples, and their Rapid Transfer to Capillary Column. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v.1, n.24, 179-191, 1989.

BELTRAN, J; LÓPEZ, F J; HERMÁNDEZ, F; ULRICH, S. Solid-Phase Microextraction in Pesticide Residue Analysis. **Journal of Chromatography A**, v.885, 389-404, 2000.

BISPO, J R L, Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Água Produzida Poe Extração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por Chama. São Cristóvão, 2005, 104 p. Dissertação de Mestrado. Núcleo de Pós Graduação de Química – Universidade Federal de Sergipe.

BRITO, N M; JUNIOR, O P A; POLESE, L; RIBEIRO, M. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.129-143, 2003.

Bosque-Sendra, J M; Nechar, M; Molina, M F. Application of Doehlert Optimization and Factorial Designs in Developing and Validating a Solid-phase Spectrophotometric Determination of Trace Levels of Cadmium. **Analytica Chimica Acta**, v. 382, p.117-130, 1999.

CALADO, V; MONTGOMERY, D C. Planejamento Fatorial Empregando o Statística, Rio de Janeiro, E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2003. 260p.

CHEN, Y; KOZIEL, J A; PAWLISZYN, J. Calibration for On-Site Analysis of Hydrocarbons in Aqueous and Gaseous Samples Using Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 23, n.75, p.6485 -6493, 2003.

CHO, H; BAEK, K; LEE, S; YANG, J. Competitive Extration of Multi-Contaminants in Water by Carboxen-polidimethylsiloxane Fiber During Solid-Phase Microextration. **Journal of Chromatography A**, v.988, p.177-184, 2003.

CHRISTIAN, G. Analytical Chemistry. New York, John Willey & Sons,1994. 812p.

CRIADO, M R; PEREIRO, I R; TORRIJOS, R C. Determination of polychlorinated biphenyls in ash using dimethylsulfoxide microwave assisted extraction followed by solid-phase microextraction. **Talanta**, v.63, n.3, p.533-540, 2004.

CUNHA, B B. Análise de BTEX em Água Produzida por Purge and Trap e GC/PID-FID. São Cristóvão, 2005, 55p. Monografia de Conclusão de Curso (Química Bacharelado). Departamento de Química – Universidade Federal de Sergipe.

DÓREA, H S. Análise Multirresíduo de Pesticidas Organofosforados e Piretróides em Frutas por CGC, após Extração com Fluido Supercrítico, Comparação com LLE, SPE e MSPD. São Carlos, 1999, 214 p. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

DÓREA, H S; LANÇAS, F M. Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction of Organophosphorus and Synthetic Pyrethroid Pesticids in Cashew Nut and Passion Fruits. In: 20° INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, Riva del Garda-Itália, 1998, **Proceedings – CDROM**. Riva del Garda-Itália, 1998.

DUNEMANN, L; HAJIMIRAGHA H. Development of a Screening Method for the Determination of Volatile Organic Compounds in Body Fluids and Environmental Samples using Purge and Trap Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.283, p.199-206, 1993.

EISERT R; LEVSEN K. Solid-phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography: a new method for the analysis of organics in water. **Journal of Chromatography A**, v.733, p.143-157, 1996.

FACCHETTI S; FERRARI R; NILSSON T. Inter-Laboratory Studies for the Validation of Solid-Phase Microextration for the Quantitative Analysis of Volatile Organic Compounds in Aqueous Samples. **Analytical Chimica Acta**, v.356, p.113-123, 1997.

FERREIRA, S L C; SANTOS H C; FERNANDES, M S; CARVALHO, M S. Application of Doehlert Matriz and Factorial Designs in Optimization of Experimental Variables Associated with the Preconcentration and Determination of Molybdenum in Seawater by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v.17, p.115–120, 2002.

FERREIRA, S L C; SANTOS, W N L; QUINTELLA, C M; NETO, B B; BOQUE-SENDRA, J M. Doehlert Matrix: a Chemometric Tool for Analytical Chemistry. **Talanta**, v.63, p.1061-1067, 2004.

FIFIELD F. W; HAINES P J. Environmental Analytical Chemistry. London, Blackweel Science Ltd, 2000. 490p.

GROB, R L (ed). Modern Practice of Gas Chromatography. New York, Wiley-Interscience, 1995. 912p.

HARRIS, D C. Exploring Chemical Analysis, New York, W. H. Freeman and Company, 1996. 476p.

http://www.unep.org/ozone/Treaties_and_Ratification/2B_montreal_protocol.asp, acessado em 05/07/2005

<http://www.crq4.org.br/downloads/resolucao357.pdf>, acessado em 10/07/2005

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.html#bookmark03>, acessado em 21/01/2006

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.html#bookmark03>, acessado em 21/01/2006

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp110.html#bookmark03>, acessado em 21/01/2006

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp71.html#bookmark03>, acessado em 21/01/2006

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf, acessado em 12 de julho de 2006.

HUANG, S; CHENG, C; SUNG, Y. Determination of Benzene and Derivatives in Water by Solid-Phase Microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v.343, p.101-108, 1996.

JI, J; DENG, C; SHEN, W; ZHANG, X. Field Analysis of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes in Water by Portable Gas Chromatography–Microflame Ionization Detector Combined With *Headspace* Solid-Phase Microextraction. **Talanta**, v.69, n.4, p.894-899, 2006.

KAGEURA, M; LIU, J; HARA, K; KASHIMURA, S; KASHIWAGI, M; HAMANAKA, T; MIYOSHI, A. *Headspace* Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Screening for Volatile Hydrocarbons in Blood. **Journal of Chromatography B**, v.748, p.401-406, 2000.

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.

LANÇAS, F M. Extração em Fase Sólida (SPE). São Carlos, Ed. RiMa, 2004. 93p.

LEITE, F. Validação em Análise Química. Campinas, Editora Átomo, 1998. 224p.

LIU, J; LI, N; JIANG, G; LIU, J; JONSON J; WEN, M. Disposable Ionic Liquid Coating for *Headspace* Solid-Phase Microextraction of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xilenes in Paints Followed by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. **Journal of Chromatography A**, v.1066, p.27-32, 2005.

LIU, X; PAWLISZYN, J. Determination of Membrane Permeability Without Calibration Using Solid-Phase Microextraction (SPME). **Journal of Membrane Science**, v.268, p.65–73, 2006.

LORD, H; PAWLISZYN, J. Evolution of Solid-Phase Microextraction Technology. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.153-193, 2000.

LOUCH, D; MOTLAGH, S; PAWLISZYN, J. Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Silica Fibers. **Analytical Chemistry**, v.64, p.1187-1199, 1992.

MATISOVÁ, E; MEDVED'OVÁ, M; VRANIAKOVÁ, J; SIMON, P. Otimization of solid-phase microextraction of volatiles. **Journal of Chromatography A**, v.960, p.159-164, 2002.

MÉNARD, K; WANG, Z; FINGAS, M; SINGOIN, L. Characterization and Source of Hidrocarbons in Water Samples Using Analytical Techniques. **Journal of Chromatography A**, v.971, p.173-184, 2002.

MENÉNDEZ, J. C. F; SANCHES, M. L. F; URIA, J. E. S; MARTINEZ, E. F; SANS-MEDEL, A. Static *Headspace*, Solid-Phase Microextraction and *Headspace* Solid-Phase Microextraction for BTEX in Aqueous Samples by Gas Chromatography. **Analytical Chimica Acta**, v.415, p.9-20, 2000.

MENICONI, M F; GABARDO, I T; CARNEIRO, M E R; BARBANTI, S M; SILVA, G C; MASSONE, C G. Brazilian oil spills chemical characterization – Case Studies. **Environmental Forensics**, v.3, p.303-321, 2002.

MESTER, Z; STUERGEON, R; PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction as a Tool for Trace Element Speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v.56, p.233-260, 2001.

MILLER, J C; MILLER, J N. Statistics for Analytical Chemistry. Chichester, Ellis Horwood Limited, 1993. 233p.

MONTGOMERY, D C. Diseño y Analisis de Experimentos. Madrid, Editora Limusa, 2002. 686p.

NAMIESNIK, J; ZYGMUNT, B; JASTRZEBSKA, A. Application of Solid-Phase Microextraction for Determination of Organic Vapours in Gaseous Matrices. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.405-418, 2000.

NARDI, L. Capillary Extractors for “Negligible Depletion” Sampling of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xilenes by in-Tube Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.985, p.85-91, 2003.

NETO, B B; SCARMINIO, I S; BRUNS, R E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, Editora da Unicamp, 2003. 401p.

PASCHKE, A; POPP, P. Diffusion-Based Calibration for Solid-Phase Microextraction of Benzenes, Toluene, Ethylbenzene and Chlorobenzenes from Aqueous Samples. **Journal of Chromatography A**, v.1025, p.11-16, 2004.

PAWLISZYN, J. New Directions in Sample Preparation for Analysis of Organic Compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v.14, n.3, p.113-122, 1995.

PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction, New York, Willey-VHC, 1997. 247p.

PAWLISZYN, J. Sample Preparation: Quo Vadis? **Analytical Chemistry**, v.75, n.11, p.2543-2558, 2003.

POTTER, D. W; PAWLISZYN, J. Detection of substituted benzenes in water at the pg/mL level using solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry, **Journal of Chromatography**, v.625, p.247-255, 1992.

RAYNIE, D. E. Modern Extraction Techniques, **Analytical Chemistry**, v.76, n.16, p.4659-4664, 2004.

RIBANI, M; BETTOLI, C B G; COLLINS, C H; JARDIM, I C F S; MELO, L F C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos, **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROSELL, M; LACORTE, S; GINEBREDÀ, A; BARCELO, D. Simultaneous Determination of Methyl tert.-Butyl Ether and its Degradation Products, other Gasoline Oxygenates and Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes in Catalonian Groundwater by Purge-and-Trap-Gas Chromatography–Mass Spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v.995, p.171-184, 2003.

SARNA, L P; WEBSTER, G R B; FRIESEN-FISHER, M R; RANJAN, R S. Analysis of the Petroleum Components Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes in Water by Commercially Available Solid-Phase Microextraction and Carbon-Layer Open Tubular Capilar Column Gas Chromatography, **Journal of Chromatography A**, v.677, p.201-205, 1994.

SKOOG, D A; HOLLER, F J; NIEMAN, T A. Princípios de Análise Instrumental, 5ªed., Porto Alegre, Bookman, 2002. 836p.

TANG, B; ISACSSON, U. Determination of Aromatic Hydrocarbons in Asphalt Release Agents Using *Headspace* Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v.1069, p.235-244, 2005.

THEODORIDIS, G; KOSTER, E H M; JONG, G J. Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Biological Matrices, **Journal of Chromatography B**, v.745, p.49-82, 2000.

ULRICH, S. Solid-Phase Microextraction in Biomedical Analysis, **Journal of Chromatography A**, v.902, p.167-194, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003. 35p.

WANG, L; WELLER, C L. Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. **Trends in Food Science & Technology**, .v.17, n.6, p.300-312, 2006.

WANG, Y; O'REILLY, J; CHEN, Y; PAWLISZYN, J. Equilibrium in-Fibre Standardisation Technique for Solid-Phase Microextraction, **Journal of Chromatography A**, v.1072, p.13–17, 2005.

VALENTE, A L P; AUGUSTO, F. Microextração em Fase Sólida, **Química Nova**, v.23, n.4, p.523-530, 2000.

VRANA, B; MILLS, G A, ALLAN, I J; DOMINIAK, E; SVENSSON, K; KNUTSSON, J; MORRISON, G; GREENWOOD, R. Passive Sampling Techniques for Monitoring Pollutants in Water, **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.10, p.845-868, 2005.

XIONG, G; CHEN, Y; PAWLISZYN, J. On-site Calibration Method Based on Stepwise Solid-Phase Microextraction, **Journal of Chromatography A**, v.999, p.43-50, 2003.

ZANG, Z; PAWLISZYN, J. *Headspace* Solid-phase Microextraction, **Analytical Chemistry**, v.65, p.1843-1852, 1993.

ZANG, Z; PAWLISZYN, J. Quantitative Extraction Using an Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device, **Analytical Chemistry**, v.67, p.34-43, 1995.

11. ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2. Propriedades físicas dos analitos. Fonte: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (<http://www.atsdr.cdc.gov>)

Propriedades	BENZENO	TOLUENO	ETIL BENZENO	XILENOS		
				Meta	Orto	Para
Massa Molar (g.mol ⁻¹)	78,11	92,14	106,17	106,17	106,17	106,17
Estado Físico a 25°C e 760mmHg/Cor	Líquido incolor	Líquido incolor	Líquido incolor	Líquido incolor	Líquido incolor	Líquido incolor
Ponto de Fusão (°C)	5,5	-95	-95	-47,8	-25,2	13,2
Ponto de Ebulição (°C)	80,1	110,60	136,20	139,1	144,8	138,3
Densidade a 20°C (g.cm ⁻³)	0,8787 (15°C)	0,8669	0,8670	0,8640	0,8800	0,8611
Odor	aromático	aromático	doce	doce	doce	doce
Solubilidade em água (25°C)	w/w: 0,188%	534,8 mg.L ⁻¹	160 mg.L ⁻¹	161 mg.L ⁻¹	178 mg.L ⁻¹	162 mg.L ⁻¹
Solubilidade em outros solventes orgânicos (25°C)	Solúvel em álcool, éter e outros	Solúvel em álcool, éter e outros	Solúvel em álcool e éter	Solúvel em álcool e éter	Solúvel em álcool e éter	Solúvel em álcool e éter
Pressão de vapor (mmHg)	75	28,4	9,53	8,29	6,61	8,84
Constante da Lei de Henry (atm·m ³ ·mol ⁻¹)	5,5·10 ⁻³	5,94·10 ⁻³	8,43·10 ⁻³	7,18·10 ⁻³	5,18·10 ⁻³	6,90·10 ⁻³
Temperatura de auto-ignição (°C)	498	480	432	527	463	528
Odor perceptível	2 mg.L ⁻¹ (ar) 4,9 mg.m ⁻³ (água)	0,04 mg.L ⁻¹ (ar) 8,0 mg.L ⁻¹ (água)	0,029 mg.L ⁻¹ (ar) 2,3 mg.L ⁻¹ (água)	1,1 mg.L ⁻¹ (ar) 3,7 mg.L ⁻¹ (água)	1,8 mg.L ⁻¹ (ar) 0,08 mg.L ⁻¹ (água)	0,53 mg.L ⁻¹ (ar) 0,47 mg.L ⁻¹ (água)

ANEXO B

Tabela 4. Tipos de fibras disponíveis comercialmente para cromatografia gasosa. Adaptado de VALENTE & AUGUSTO (2000).

<i>Tipo</i>	<i>Composição Química</i>	<i>Espessura (µm)</i>	<i>Faixa de temperatura na dessorção (°C)</i>	<i>Aplicação Sugerida</i>
Não-polar	Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	200-270	Basicamente para compostos apolares, sendo possível a sua utilização para alguns analitos polares.
		30		
		7	220-320	
Polares	Poliacrilato (PA)	85	220-310	Adequadas para compostos altamente polares. Empregadas também para voláteis de média e alta polaridade
	Carbowax / Divinilbenzeno (CW-DVB)	65	200-260	
Bi-polares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis e não voláteis de alta e baixa polaridade.
	Carboxen-PDMS	75	-	

ANEXO C

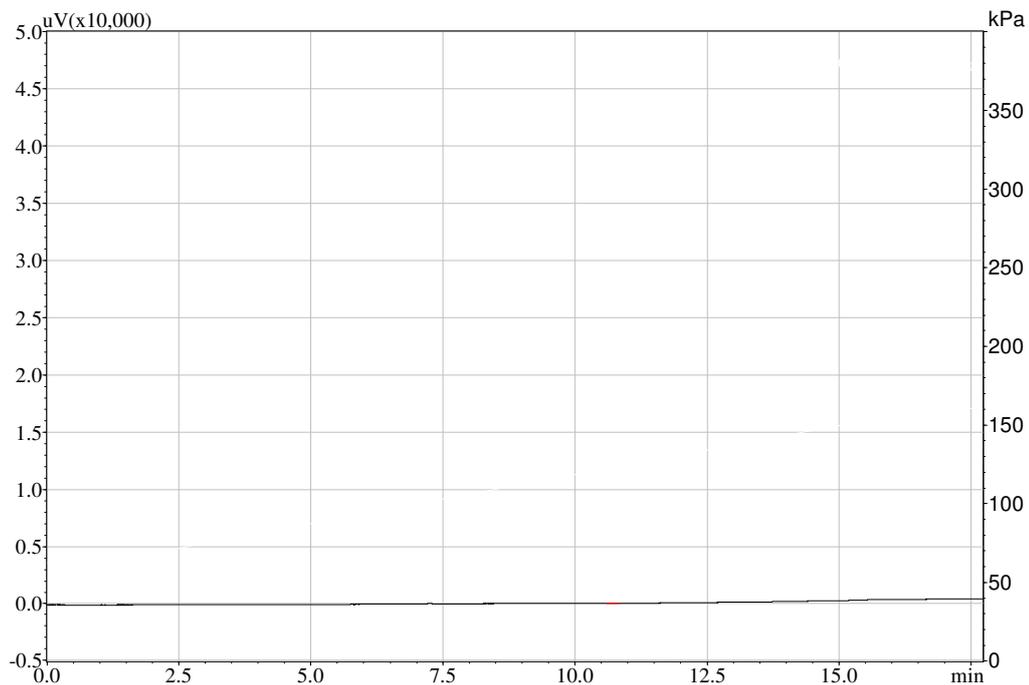


Figura 39. Cromatograma para análise de água do rio Sergipe via SPME

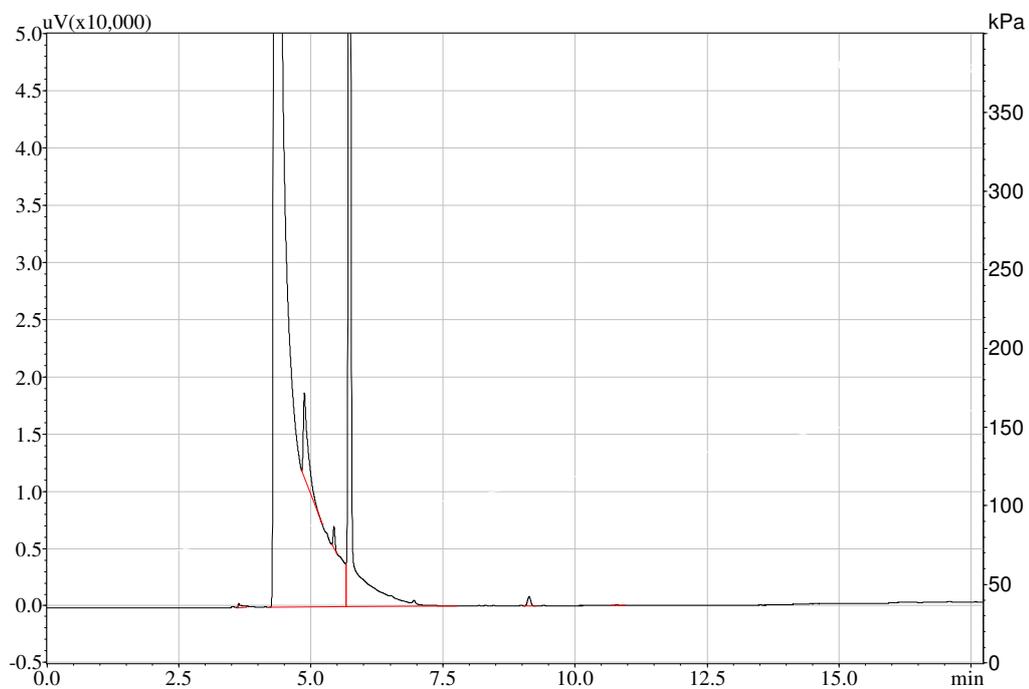


Figura 40. Cromatograma para análise de água do rio Sergipe via P&T.

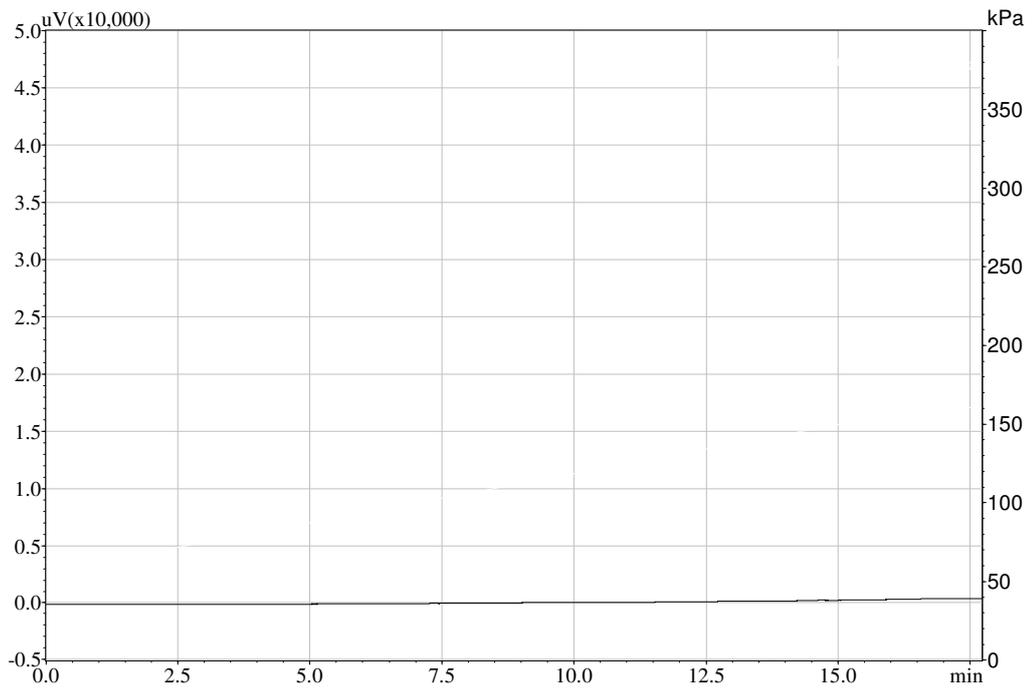


Figura 41. Cromatograma para análise de água do mar via SPME

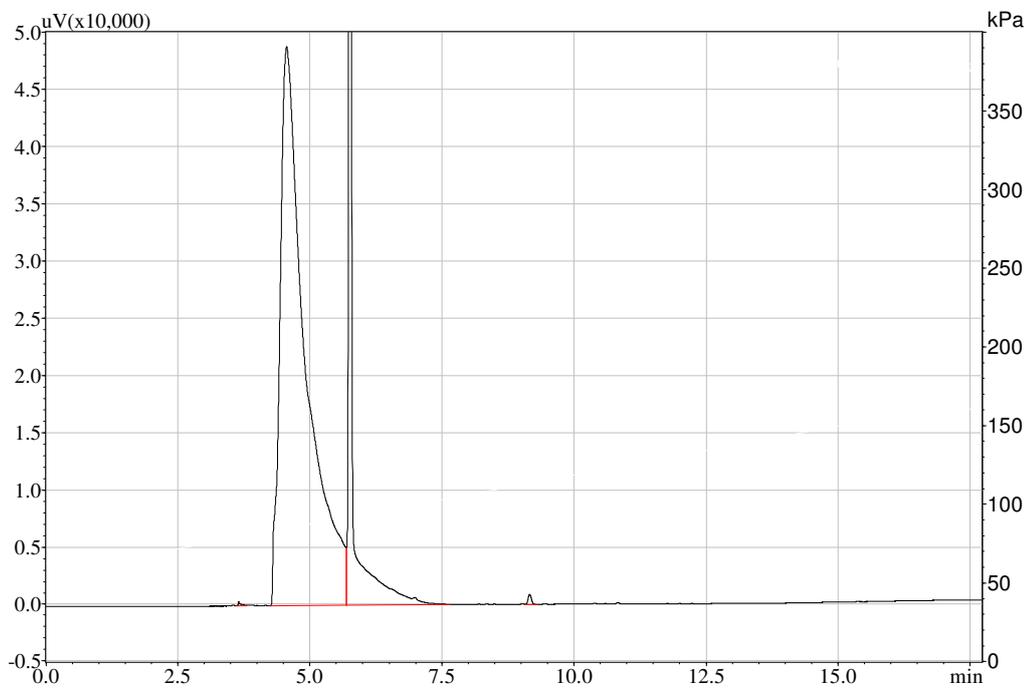


Figura 42. Cromatograma para análise de água do mar via P&T

ANEXO D

Tabela 18. Curvas de calibração para determinação dos limites de detecção e quantificação para os compostos.

Analitos	Curva de calibração	Faixa linear	Coefficiente de determinação (r^2)
Benzeno	$Y = 25,62x - 3,050$	$0,5-2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,9992
Tolueno	$Y = 82,33x + 9,134$	$0,2-2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,9978
Etilbenzeno	$Y = 188,82x - 1,811$	$0,1-2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,9991
m,p-Xilenos	$Y = 404,22x - 1,251$	$0,08-2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,9994
o-Xileno	$Y = 203,55x - 4,159$	$0,1-2 \mu\text{g.L}^{-1}$	0,9965

ANEXO E

Tabela 21. Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para análise de BTEX em matrizes aquosas por *purge & trap*. Fonte: Cunha (2005).

Analitos	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Benzeno	0,12	0,41
Tolueno	0,05	0,16
Etilbenzeno	0,10	0,32
M,p-Xilenos	0,06	0,21
o-Xileno	0,06	0,21

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)