

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Sarah Adriana do Nascimento Rocha

**Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante:
uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia
gasosa**

Outubro/ 2013, Salvador, BA

SARAH ADRIANA DO NASCIMENTO ROCHA

**Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante:
uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos
policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia
gasosa**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como pré-requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Química. Área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof^o Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira

Co-orientador: Prof^o Dr. Joil José Celino

Salvador, BA

Outubro /2013

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Rocha, Sarah Adriana do Nascimento

Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa / Sarah Adriana do Nascimento Rocha. – 2013.
100 f : il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira.

Co-orientador: Prof. Dr. Joil José Celino

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

1. Água – Análise. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 3. Extração (Química). 4. Derivatização. 5. Cromatografia de gás. 6. Espectrometria de massa. I. Teixeira, Leonardo Sena Gomes. II. Celino, Joil José. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD – 628.161

CDU – 543.3:543.63

TERMO DE APROVAÇÃO

SARAH ADRIANA DO NASCIMENTO ROCHA

Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa.

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira Leonardo Sena Gomes Teixeira
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Joil José Celino Joil José Celino
Doutorado em Geologia Regional pela Universidade Brasília (UNB)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira Pedro Afonso de Paula Pereira
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Geraldo Domingues Matos Geraldo Domingues Matos
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Antonio Fernando de Souza Queiroz Antonio Fernando de Souza Queiroz
Doutorado em Geologia/ Geoquímica do Meio Ambiente/Geoquímica de Manguezais,
Université Louis Pasteur de Strasbourg-França
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)

Prof. Dr. Marcos de Almeida Bezerra Marcos de Almeida Bezerra
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 11 de outubro de 2013.

“Se você quer os acertos,
esteja preparado para os erros”.

(Carl Yastrzemski)

DEDICO

Dedico este trabalho a uma pessoa guerreira,
amiga e de um amor incondicional: minha mãe.

AGRADEÇO

A Deus que me proporcionou essa maravilhosa experiência.

À minha família por todo amor e compreensão, em especial minha filha Layra pela espera e paciência durante todo esse tempo, principalmente na reta final.

Ao Prof. Dr. Leonardo Sena meus sinceros agradecimentos pela orientação, por todo conhecimento transmitido e por ter acreditado e confiado em mim desde o princípio.

Ao Prof. Dr. Joil Celino pela co-orientação, pelos ensinamentos e aconselhamentos durante este trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em química pela oportunidade e aos professores, funcionários e colegas que contribuíram para meu crescimento.

Aos responsáveis pelo LEPETRO, onde o trabalho foi desenvolvido, em especial à coordenadora Karina, que permitiu que o trabalho fosse desenvolvido durante minha jornada de trabalho, meu sincero agradecimento por toda compreensão e amizade.

Amigos do LEPETRO pelo auxílio e pelo agradável convívio, em especial à estudante de iniciação científica Cibele Rodrigues pelo auxílio na condução dos experimentos e Marcos, Paula e Gisele pelo companheirismo e amizade.

Ao Laboratório de Física Nuclear, onde foram realizadas todas as análises cromatográficas, em muitíssimo especial a Clementino Assis pela paciência, companheirismo e amizade.

Aos amigos em geral, que por muitos finais de semana sentiram minha falta.

A um amigo especial, Rennan Geovanny, que, mesmo longe, sempre esteve perto, me incentivando e orientando.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Um método de extração em ponto nuvem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi desenvolvido, utilizando tensoativos octilfenol polietoxilados com derivatização do coacervato, como etapa que antecede a detecção por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa. Foi realizado um estudo da influência da presença de aditivos na redução da temperatura de ponto nuvem do OPEO30 e do OPEO35, surfactantes com temperaturas de ponto nuvem superiores a 100 °C, através adição de sais, álcoois, OPEO7.5 e misturas de sais e álcoois. Observou-se em todos os casos diminuição da temperatura, sendo o sulfato de sódio o aditivo que resultou maior redução da temperatura. Selecionou-se o OPEO30 para as demais etapas do trabalho. Fez-se a otimização das condições da reação de derivatização do coacervato por meio de planejamento fatorial 2³, utilizando-se a resposta global para avaliar os resultados. Selecionou-se as condições do ponto central do planejamento fatorial, ou seja, 125 µL de BSTFA, 100 µL de piridina e banho de água à 70 °C por 45 min, para a derivatização de 30 µL de fase rica em surfactante. O procedimento de ponto nuvem foi otimizado, sendo avaliadas as variáveis concentração de surfactante, temperatura e tempo de banho de água, sendo proposta a seguinte metodologia: 1,0 mL de OPEO30 10% m v⁻¹, 10,0 mL de amostra, 1,25 g de sulfato de sódio anidro, banho de água à 70 °C por 10 min, centrifugação à 3000 rpm por cinco min. O método mostrou-se seletivo, sendo observado efeito de matriz intenso, o qual foi corrigido. Os limites de quantificação obtidos estão entre 39 e 176 ng L⁻¹. O método proposto também foi comparado com o método USEPA 3510C, estando as concentrações obtidas, quando analisada uma amostra real de água subterrânea, bem próximas, com recuperações variando entre 90,0 e 97,5 %. O método proposto foi aplicado a amostras de água subterrânea coletadas em poços localizados em postos de revenda de combustíveis. Em todas as amostras foram detectados HPA.

Palavras-chave: octilfenoxipolioxietileno éteres, CG-EM, Extração em ponto nuvem, HPA, derivatização.

ABSTRACT

A method for cloud point extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons was developed using surfactants octylphenol polyethoxylated with the coacervate derivatization as step prior to gas chromatography-mass spectrometry detection. An influence of additives study on the reduction of cloud point temperature OPEO30 and OPEO35, surfactants with cloud point temperatures above 100 ° C, was conducted, by addition of salts, alcohols, and mixtures OPEO7.5 salts and alcohols. It was observed in all cases cloud point reduction and sodium sulfate was the additive that result in a most effective. The OPEO30 was selected for others work steps. The factorial design 2^3 was used to optimize the reaction of derivatization, using the global response to evaluate the results. Were selected the central point experimental design condition, 125 μL of BSTFA, 100 μL of pyridine and water bath at 70 °C for 45 min for 30 μL of surfactant-rich phase derivatization. The cloud point extraction procedure was optimized and surfactant concentration, heating bath temperature and time variables, were evaluated. Was proposed the following method: 1,0 mL of OPEO30 10% v m⁻¹ solution, 10,0 mL of sample, 1,25 g of anhydrous sodium sulfate, water bath at 70 °C for 10 min. The centrifugation was performed at 3000 rpm for five min, removing the aqueous layer after each centrifugation step. A 30 μL coacervate aliquot was withdrawn, and performed derivatization and subsequent GC-MS analysis. The method was validated. The method was selective, an intense matrix effect was observed and was corrected. The quantification limits obtained were between 39 and 176 ng L⁻¹.

The proposed method has also been compared to USEPA 3510C method, the concentrations obtained, when analyzing a sample of real groundwater, have recoveries ranging from 90.0 to 97.5%. The proposed method was applied to groundwater samples collected from wells located in fuel stations. In all samples were detected some polycyclic aromatic hydrocarbon.

Keywords: octylphenoxypolyoxyethylene ethers, GC-MS, cloud point extraction, PHA, derivatization.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros dos surfactantes não iônicos que são comumente utilizados. Fonte: Adaptado de WANG e DAI, 2010.....**9**
- Tabela 2:** Determinação de compostos orgânicos de interesse ambiental por CG após extração por EPN.....**17**
- Tabela 3:** Razões de massa (m/z) dos íons moleculares monitorados dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em estudo.....**28**
- Tabela 4:** Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central para otimização da reação de derivatização da fase rica em surfactante resultante da extração em ponto nuvem.....**45**
- Tabela 5:** Respostas dos analitos em estudo, obtidas a partir da matriz de planejamento 2^3 com triplicata do ponto central.....**48**
- Tabela 6:** Efeito da resposta cromatográfica induzida pela presença da matriz resultante da EPN com posterior derivatização.....**60**
- Tabela 7:** Limites de detecção e de quantificação do método proposto.....**62**
- Tabela 8:** Recuperações do HPA adicionados em amostras de águas subterrâneas utilizando EPN/ CG-EM desenvolvido.....**66**
- Tabela 9:** Comparação do método proposto (EPN) com o método de referência (CG-EM) na quantificação dos 16 HPA em amostra de água subterrânea.....**69**
- Tabela 10:** Resultados da análise de HPA das amostras de água subterrânea coletadas em poços de distribuidores de combustíveis utilizando o método desenvolvido e validado, em comparação com valores de referência recomendados por órgão orientadores.....**70**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Classificação dos surfactantes de acordo com a composição do grupo cabeça: (a) não iônico, (b) aniônico, (c) catiônico e (d) anfótero. Fonte: adaptado de SILVA, 2008b.....3
- Figura 2:** Formação de um agregado micelar. Fonte: adaptado de BEZERRA et. al., 2005.....4
- Figura 3:** Representação esquemática da extração em ponto nuvem. Fonte: adaptado de XIE et. al., 2010.....7
- Figura 4:** Fórmula genérica dos surfactantes pertencentes à classe dos OPEO. O número de grupos de oxietileno (EO) é dado pela letra n.10
- Figura 5:** Técnicas analíticas empregadas em procedimento de Extração em Ponto Nuvem, de acordo com a base de dados da Analytical Abstracts. Fonte: adaptado de SILVA, 2008c.....15
- Figura 6:** Mecanismo para a reação de sililação.....21
- Figura 7:** Estrutura dos reagentes de sililação mais utilizados em reações de derivatização. Fonte: adaptado de TAKAGAI e HINZE, 2009.....22
- Figura 8:** Temperatura de Ponto Nuvem da solução dos surfactantes em estudo em função da concentração molar de nitrato de sódio adicionada.....31
- Figura 9:** Efeito da diminuição da TPN da solução de surfactante 0,9% m v⁻¹ através da adição de diferentes sais halogenados monovalentes em diferentes concentrações. a) OPEO30 e b) OPEO35.....33
- Figura 10:** Efeito da diminuição da TPN da solução de Triton 0,9% m v⁻¹ através da adição de diferentes ânions e cátions em diferentes concentrações. a) OPEO30 e b) OPEO35.....34
- Figura 11:** Efeito da diminuição da TPN da solução de OPEO30 e da solução de OPEO35 após a adição de OPEO7.5 em diferentes concentrações.....36
- Figura 12:** Efeito da diminuição da TPN: (a) solução de OPEO30 0,9% m v⁻¹ e (b) solução de OPEO35 0,9% m v⁻¹ através da adição de álcoois em diferentes concentrações.....38
- Figura 13:** Efeito da diminuição da TPN da solução de surfactante 0,9 % m v⁻¹ através da adição da mistura de diferentes concentrações de sulfato de sódio e pentanol ou isobutanol. a) OPEO30 e b) OPEO35.....40

Figura 14: Cromatograma da fase rica em surfactante após a derivatização com BSTFA e piridina como catalisador antes da otimização. a) com 50 µL de derivatizante e b) com 100 µL de derivatizante.....	43
Figura 15: Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 23.....	47
Figura 16: Cromatogramas da fase rica em surfactante após a derivatização com BSTFA e piridina como catalisador. a) antes da otimização, b) condições experimentais do experimento 1 e c) condições experimentais do ponto central.....	49
Figura 17: Espectro de massa do pico em 40,74 min do OPEO30 derivatizado, para n = 6 utilizando BSTFA, com o equipamento operando em modo de varredura (scan).....	50
Figura 18: Volume de fase rica em surfactante (Vr) em função da concentração total de OPEO30 adicionado.....	52
Figura 19: Fator de pré-concentração (Fc) em função da concentração total de OPEO30 adicionado.....	53
Figura 20: Efeito da temperatura do banho de EPN na recuperação dos analitos em estudo.....	54
Figura 21: Efeito do tempo do banho de EPN na recuperação dos analitos em estudo.....	55
Figura 22: Cromatograma da matriz de água natural na presença de HPA na concentração final 500 µg L ⁻¹ , após EPN utilizando o OPEO30, seguido de derivatização, obtido no modo SIM.....	57
Figura 23: Cromatograma CG-EM dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (1) acenaftileno, (2) acenafteno e (3) floureno. (-) representa o cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão desses analitos. (-) representa o cromatograma observado após injeção da fase rica em surfactante do OPEO30 derivatizada.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP - Alquilfenóis (alkylphenols)

BSA - N,O-bis(trimetilsilil)acetamida

BSTFA - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

C_{AQ} - Concentração da solução aquosa antes da etapa de pré-concentração

EC - Eletroforese Capilar

CG - Cromatografia à gás

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CMC - Concentração Micelar Crítica

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

C_s - Concentração de analito na fase rica em surfactante

CV - Coeficiente de variação

ELL - Extração líquido-líquido

EM - Espectrometria de massa

EO - óxido de etileno (do inglês, *ethylene oxide*)

EPN - Extração em Ponto Nuvem

F AAS - Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês, *Flame Absorption Atomic Spectrometry*)

F_c - Fator de Pré-concentração

HLB - Balanço hidrofílico-lipofílico (do inglês, *Hydrophilic-lipophilic balance*)

HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

K_d - Coeficiente de distribuição

LDM - Limite de detecção do método

LQM - Limite de quantificação do método

MS - Ministério da Saúde

MSTFA - N-metil-N-(trimetilsililimidazol)trifluoroacetamida

OPE - octilfenoxi polioxietileno éter

OPEO30 - Octylphenol Ethoxylate que contém 30 unidades de óxido de eileno

OPEO35 - Octylphenol Ethoxylate que contém 35 unidades de óxido de eileno

OPEO7.5 - Octylphenol Ethoxylate que contém entre 7 e 8 unidades de óxido de eileno

OPEO9.5 - Octylphenol Ethoxylate que contém entre 9 e 10 unidades de óxido de eileno

POP - Poluentes Orgânicos Persistentes

RCA - Razão entre coeficientes angulares

RCL - Razão entre coeficientes lineares

RSD - desvio padrão relativo (do inglês, *Relative Deviation Standard*)

S/R - Razão sinal ruído

SDSA - ácido dodecanosulfônico de sódio (do inglês, *sodium dodecanesulfonic acid*)

SIM - Monitoramento de íon selecionado (do inglês, *select ion monitoring*).

S_N2 - Substituição Nucleofílica Bimolecular

TMCS - Trimetilclorosilano

TMS - Trimetil-silil

TMSA - Trimetil-silil azida

TMSI - N-trimetilsililimidazol

TPN - Temperatura de Ponto Nuvem

Triton X-100 - Polioxietileno(9-10)p-tercotilfenol

Triton X-114 - Polioxietileno(7-8)p-tercotilfenol

Triton X-305 - Polioxietileno(30)p-tercotilfenol

Triton X-405 - Polioxietileno(35)p-tercotilfenol

TX-100 - Polioxietileno(9-10)p-tercotilfenol

USEPA - United States Environmental Agency Protection

UV-vis - Ultravioleta e visível

V_{aq} - Volume de fase aquosa inicial

V_r - Volume da fase rica em surfactante após a separação de fase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Extração em Ponto Nuvem.....</i>	3
1.2 <i>Surfactantes octilfenoxi polioxietileno éter (OPE) em EPN.....</i>	8
1.3 <i>Extração em ponto nuvem na determinação de espécies orgânicas.....</i>	13
1.4 <i>Derivatização química em cromatografia à gás.....</i>	19
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	24
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	24
3. EXPERIMENTAL.....	25
3.1 <i>Reagentes.....</i>	25
3.2 <i>Soluções.....</i>	25
3.3 <i>Equipamentos.....</i>	26
3.4 <i>Procedimentos.....</i>	26
3.4.1 <i>Efeito da presença de aditivos.....</i>	26
3.4.2 <i>Extração em ponto nuvem.....</i>	27
3.4.3 <i>Derivatização.....</i>	27
3.4.4 <i>Análises cromatográficas.....</i>	27
3.5 <i>Coleta de amostras de água subterrânea.....</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. <i>Medida da temperatura de ponto nuvem experimental das soluções aquosas dos surfactantes.....</i>	30
4.2 <i>Efeito da presença de aditivos na TPN dos surfactantes.....</i>	31
4.2.1 <i>Efeito da adição de sais inorgânicos.....</i>	32

4.2.2 Efeito do surfactante não iônico OPEO7.5.....	35
4.2.3 Efeito da adição de álcoois.....	37
4.2.4 Efeito da adição da mistura de álcoois e sulfato de sódio.....	39
4.3 <i>Otimização multivariada do procedimento de derivatização.....</i>	41
4.4 <i>Otimização da pré-concentração com EPN.....</i>	51
4.5 <i>Validação do método analítico.....</i>	56
4.5.1 Especificidade e seletividade.....	56
4.5.2 Limite de detecção e de quantificação.....	61
4.5.3 Precisão e exatidão.....	63
4.6 <i>Aplicação do método analítico proposto.....</i>	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6. PRESPECTIVAS FUTURAS.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1- INTRODUÇÃO

A crescente demanda do uso de água subterrânea, como fonte alternativa de abastecimento para o consumo humano, deve-se ao fato da escassez e da poluição desses mananciais superficiais, o que torna os custos de tratamento cada vez mais elevados. Além disso, são potáveis, dispensando, portanto, tratamento avançado, o custo para implantação e manutenção de um sistema de captação dessas fontes é bem menor, quando comparados com aqueles que envolvem a captação de águas superficiais (BARBOSA, 2007; ANJOS, 2012).

A contaminação de águas subterrâneas por hidrocarbonetos derivados do petróleo deve-se principalmente aos vazamentos de reservatórios de combustíveis instalados em postos de abastecimento de combustível, sendo objeto de crescente preocupação dos órgãos ambientais em todo o mundo (FORTE *et. al.*, 2007; ANJOS, 2012).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), existem no Brasil 39.027 postos de revenda, dentre eles, 2.205 estabelecimentos no Estado da Bahia, e quase duzentos na cidade de Salvador (ANP, 2012). Muitos desses postos foram instalados na década de 70, o que torna a situação ainda mais crítica, já que a vida útil dos tanques de combustível é de aproximadamente 25 anos. Grande parte dos tanques enterrados nos postos combustível é confeccionada em aço, sem revestimento, ou seja, sem proteção contra corrosão (SANDRES, 2004). Desde 2000, esses tanques vêm sendo substituídos por outros mais seguros, devido à implantação da legislação nº 273 de novembro de 2000, estabelecida pelo CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008).

Dentre os derivados do petróleo que são comercializados como combustíveis, estão a gasolina e o óleo diesel, além do etanol, produzido a partir da cana-de-açúcar (FORTE *et. al.*, 2007). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são objetos de grande preocupação ambiental, em virtude do seu potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico. Devido à toxicidade e ao fato de serem resistentes à biodegradação, 16 HPA foram incluídos na lista dos

contaminantes prioritários de interesse ambiental (SANDRES, 2004; VALENTIN, 2006).

A quantificação dos HPA derivados do petróleo é realizada utilizando-se os métodos propostos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA) ou Métodos Padrões (Standard Methods) (SILVA *et. al.*, 2002; SANDRES, 2004; MINDRISZ, 2006; VALENTIN, 2006). Em ambos os protocolos, é recomendada a extração líquido-líquido (ELL), seguida de pré-purificação (“*clean-up*”) com sílica e determinação dos analitos por cromatografia à gás (CG), ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Apesar de ser uma técnica relativamente simples e quantitativa, a ELL apresenta algumas desvantagens como o uso de uma grande quantidade de solventes orgânicos, além da necessidade de solventes de alta pureza (FARIA, 2003).

Uma proposta para a substituição de solventes tóxicos para a separação e pré-concentração de compostos orgânicos é a utilização de surfactantes, também conhecidos como tensoativos ou detergentes. Os surfactantes são importantes em Química Analítica devido, principalmente à capacidade de modificar algumas propriedades reacionais, com conseqüente melhoria na sensibilidade e/ ou seletividade, pela formação de ambientes organizados, chamados de ambientes micelares. Soluções aquosas de certas micelas de alguns surfactantes exibem comportamento de separação de fases, com uma turbidez da solução, devido à alteração da temperatura ou da pressão (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; FARIA *et. al.*, 2007; LIANG *et. al.*, 2009; RIZZATTI *et. al.*, 2009; LIMA e OLIVEIRA, 2010; WANG e DAI, 2010; XIE *et. al.*, 2010).

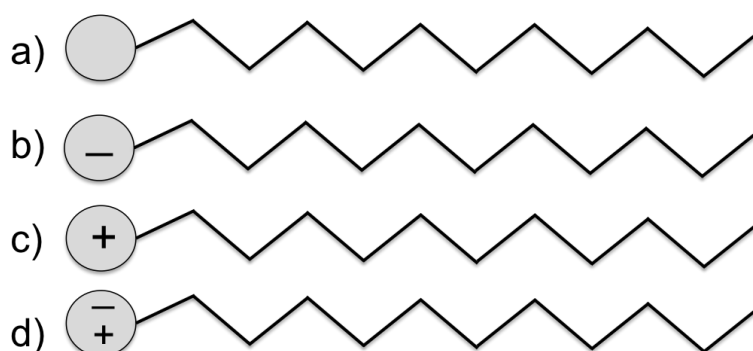
A separação por CLAE com detecção por absorção UV-visível, fluorescência, e/ou detecção eletroquímica, tem sido empregada na quantificação de compostos orgânicos, utilizando a extração em ponto nuvem (QUINA e HINZE, 1999). Porém são muito raros os trabalhos que empregam a cromatografia à gás como método de quantificação desses compostos, já que pode ocorrer a adsorção do surfactante na fase estacionária e alteração da polaridade desta última, resultando em tempos de retenção do analito não reprodutivos (TAKAGAI, 2009).

Em geral, etapas de “*clean-up*” têm sido empregadas para superar esse problema (XIE *et. al.*, 2010). Recentemente, Takagai e Hinze (2009) propuseram a derivatização com surfactante como uma etapa de pós-extração / pré-concentração de HPA antes da análise por cromatografia à gás. Essa etapa de derivatização pode melhorar o desempenho do equipamento resultando em um cromatograma livre de picos provenientes do surfactante, tempos de retenção reproduzíveis e resultados quantitativos.

1.1 Extração em ponto nuvem

Os surfactantes, também chamados tensoativos, são moléculas orgânicas que apresentam em sua estrutura uma longa cadeia anfipática com uma extremidade polar hidrofílica ou carregada. Um tensoativo simples possui a estrutura R-X, onde R é uma longa cadeia alquílica contendo de 8 a 18 átomos de carbono, e X é o grupo de cabeça polar (ou iônico). A classificação dos tensoativos (**Figura 1**) como não iônicos, catiônicos, aniônicos ou anfóteros (ou zwitteriônico) é dependente da natureza da região hidrofílica (BEZERRA *et. al.*, 2005; ANDRADE, 2008; SILVA, 2008b).

Figura 1: Classificação dos surfactantes de acordo com a composição do grupo cabeça: (a) não iônico, (b) aniônico, (c) catiônico e (d) anfótero. Fonte: adaptado de SILVA, 2008b.



Os surfactantes não iônicos, investigados neste trabalho, são derivados do polioxietileno e polioxipropileno (de compostos com alquil fenol e álcool, ésteres de ácidos graxos, alquilaminas, amidas e mercaptanas) ou polialcoóis,

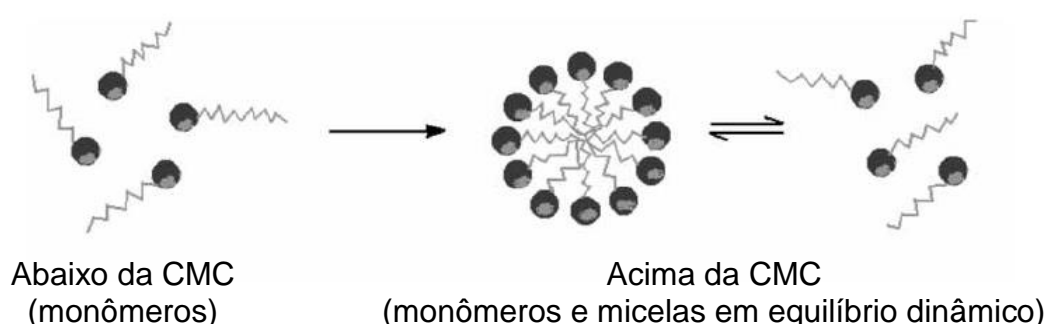
ésteres de carboidratos, amidas de álcoois graxos e óxidos de amidas graxas. Dentre os mais utilizados estão polioxietileno(9-10)p-tercetilfenol (Triton X-100), Polioxietileno dodecanol (Brij 35) (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; SILVA, 2008c).

Em solução aquosa, e em baixas concentrações, moléculas de surfactantes são encontradas na forma de monômeros, embora também sejam encontrados na forma de dímeros e trímeros. As moléculas anfifílicas podem se auto associar em solvente aquosos ou apolares, formando diferentes estruturas organizadas como micelas (normais ou reversas), bicamadas, microemulsões e vesículas, sendo que a estrutura final dessas estruturas organizadas é determinada pela natureza do surfactante e do tipo de solvente. A auto associação espontânea das moléculas anfifílicas ocorre devido a atração promovida por forças intermoleculares, minimização da energia interfacial, características anfifílicas da estrutura molecular e efeito hidrofóbico (ESCALEIRA, 2005).

Quando a concentração do surfactante aumenta acima de certo limiar, chamado de concentração micelar crítica (CMC), monômeros de surfactantes espontaneamente se acumulam para formar aglomerados de tamanho coloidal, conhecidos como micelas. Abaixo da CMC, o tensoativo está predominantemente na forma de monômeros. As micelas apresentam uma dinâmica característica, sendo que, após a ocorrência da autoagregação dos monômeros em concentrações superiores à CMC, sempre haverá um equilíbrio envolvendo os agregados formados e os monômeros que permanecem dispersos em solução (**Figura 2**) (BEZERRA *et. al.*, 2005; WANG e DAI, 2010).

Figura 2: Representação esquemática da formação de um agregado micelar.

Fonte: adaptado de BEZERRA *et. al.*, 2005.



A CMC é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante a uma dada temperatura e concentração eletrolítica, depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições experimentais (força iônica, contra-íons, temperatura etc.) (MANIASSO, 2001; PALEOLOGOS *et. al.*, 2005; RIZZATTI *et. al.*, 2009).

As micelas são termodinamicamente estáveis, facilmente reprodutíveis, sendo desfeitas pela diluição com água, quando a concentração do tensoativo ficar abaixo da CMC. O processo de formação das micelas ocorre num intervalo pequeno de concentração, e pode ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do tensoativo como a tensão superficial, pressão osmótica e condutividade (no caso dos tensoativos iônicos) (RIZZATTI *et. al.*, 2009). Cada micela é composta por certo número de moléculas de tensoativo, denominado como número de agregação, que rege geralmente o tamanho e a geometria do sistema micelar (MANIASSO, 2001).

Do ponto de vista analítico, uma das mais importantes propriedades destas estruturas organizadas é a sua capacidade de solubilizar analitos de diferentes características e natureza. Estes solutos podem interagir eletrostaticamente, hidrofobicamente ou por uma combinação desses dois eventos. Quaisquer componentes presentes originalmente em solução, que sejam capazes de se ligar ou serem dissolvidos no interior hidrofóbico do agregado micelar, podem ser extraídos da solução original e concentrados em um pequeno volume de fase rica em surfactante. A extensão da extração depende fortemente da força de interação entre o soluto e a micela (XIE *et. al.*, 2010).

Soluções aquosas de surfactantes não iônicos, quando submetidas ao aquecimento, tornam-se turvas em uma estreita faixa de temperatura conhecida como temperatura de ponto nuvem (TPN). Várias causas têm sido consideradas como sendo responsáveis por esse fenômeno. Nos últimos anos alguns autores têm dado uma interpretação termodinâmica para a turvação dos surfactantes e de soluções poliméricas. O equilíbrio entre as interações hidrofílicas/ hidrofóbicas tem sido apontada como fator determinante para a temperatura em que a separação de fases ocorre (GU e GALERA-GOMEZ, 1999; SCHOTT, 2001; MAHAJAN *et. al.*, 2008).

Acima da TPN ocorre a separação em duas fases isotrópicas, uma delas rica em surfactante, também chamada de coacervato, e a outra aquosa (ou fase diluída de surfactante), contendo uma concentração de surfactante próxima da CMC. O fenômeno é reversível e, sob resfriamento, uma única fase é novamente obtida (MANIASSO, 2001; FARIA *et. al.*, 2005; BEZERRA e FERREIRA, 2006b; WANG e DAI, 2010).

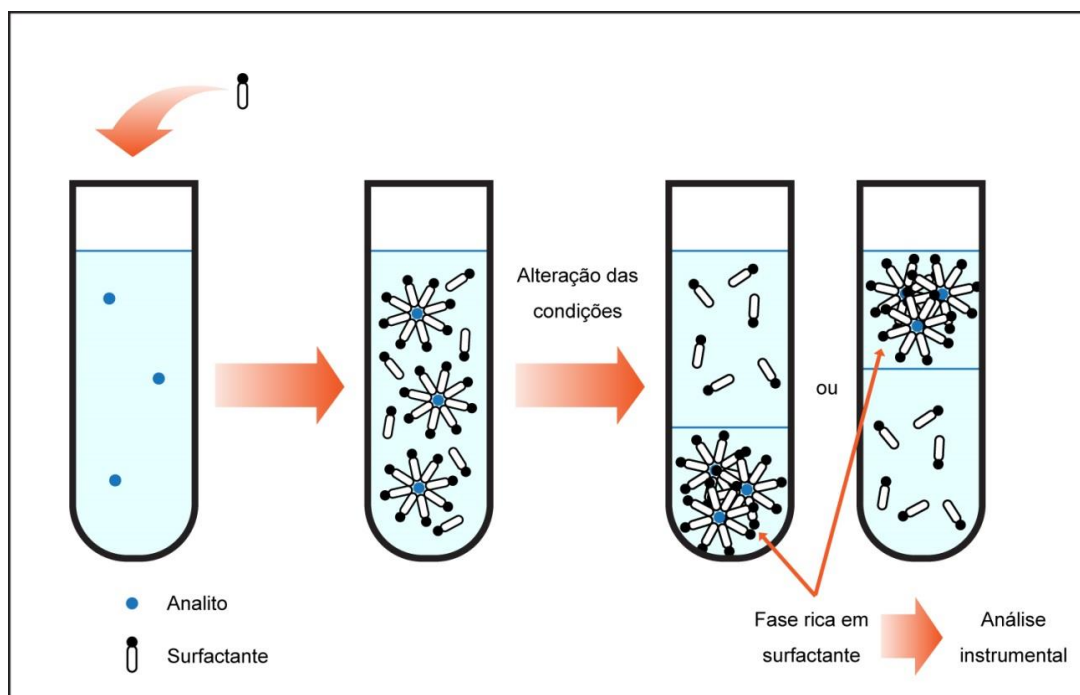
O método de extração em ponto nuvem (EPN) foi primeiramente adotado por Watanabe e Tanaka (1977) para a extração de íons metálicos. Esse método tem sido extremamente investigado na pré-concentração e separação de íons metálicos, poluentes orgânicos, proteínas, hormônios e vírus (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; GORTZI *et. al.*, 2008; SILVA, 2008c; WU *et. al.*, 2008; TALBI *et. al.*, 2009; WANG e DAI, 2010).

O mecanismo de separação de fases na EPN ainda é objeto de debates. Alguns autores defendem que a separação ocorre devido ao aumento no número de agregação micelar (aumento no tamanho das micelas), quando a temperatura é aumentada. Outros têm sugerido que o mecanismo de separação de fase pode ser causado por uma mudança na interação micelar, que é repulsiva a baixas temperaturas e atrativa a altas temperaturas. Há também a hipótese de que ocorre um processo de desidratação na camada externa de moléculas de surfactantes não iônicos quando a temperatura é aumentada (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; SILVA, 2008c; MUKHERJEE *et. al.*, 2011).

O processo de extração por separação de fase em meio micelar, ou ponto nuvem, ocorre em várias etapas (**Figura 3**). Inicialmente o surfactante (ou uma solução de surfactante concentrada) é adicionado à solução aquosa que contém o(s) componente(s) a ser(em) extraído(s) e/ou pré-concentrado(s). A quantidade de surfactante adicionado deve ser tal que assegure a formação de agregados micelares na solução, ou seja, a concentração final do surfactante deve exceder sua CMC. Em seguida, as condições do meio são alteradas, através da diminuição ou aumento da temperatura, adição de um sal ou outro surfactante, para assegurar que a solução micelar se separe em uma fase rica em surfactante (micelar ou coacervato) e em uma fase aquosa diluída. Uma etapa adicional de centrifugação pode ser empregada para acelerar a

separação das duas fases. Dependendo da densidade da fase rica em surfactante, ela pode estar no topo ou no fundo do tubo de ensaio (MANIASSO, 2001; FARIA *et. al.*, 2005; XIE *et. al.*, 2010).

Figura 3: Representação esquemática da extração em ponto nuvem. Fonte: adaptada de XIE *et. al.*, 2010.



A extração em ponto nuvem deve ser realizada sob condições ideais a fim de que o fator de pré-concentração seja maximizado e para atingir o máximo de eficiência de extração. O fator de pré-concentração (F_C) é um parâmetro utilizado para comparar a capacidade de extração de analitos em sistemas micelares. É definido como a relação entre a concentração de analito na fase rica em surfactante (C_s) e a concentração da solução aquosa antes da etapa de pré-concentração (C_{AQ}), ou seja, $F_C = C_s / C_{AQ}$. Em geral, o F_C é ditado por V_{aq} / V_R , ou seja, a relação entre o volume de fase aquosa inicial (V_{aq}) e o volume da fase rica em surfactante (V_R), após a separação de fase. Isso depende da relação de fase, ou seja, do coeficiente de distribuição (K_d) do analito entre as fases rica e aquosa e da concentração de surfactante. Vários fatores devem ser levados em conta, a fim de obter o máximo de F_C . Sabe-se que o processo de extração e de pré-concentração pode ser alterado pelos tipos e

concentração dos surfactantes e aditivos, pH, temperatura e tempo de equilíbrio e condições de centrifugação (LI e CHEN, 2003; XIE *et. al.*, 2010).

Há uma estreita faixa de concentração do surfactante em que a separação de fases ocorre mais facilmente, e na qual a eficiência de extração e o sinal analítico são máximos. Acima dessa faixa, o sinal analítico é prejudicado devido ao aumento do volume final da fase micelar, afetando o fator de pré-concentração. No entanto, se a concentração de surfactante é menor do que a recomendada, a precisão e reprodutibilidade, provavelmente, serão afetadas devido à fase resultante rica em surfactante não ser suficiente para serem obtidas medidas reprodutíveis da extração e separação (PALEOLOGOS *et. al.*, 2005).

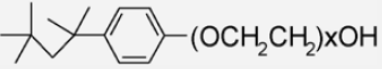
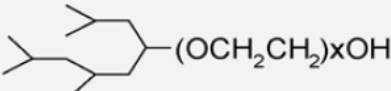
1.2 Surfactantes octilfenoxi polioxietileno éter (OPE) em EPN

Algumas características são desejáveis para que um surfactante possa ser utilizado em EPN, como a baixa temperatura no ponto nuvem, alta densidade, disponibilidade comercial, baixo custo e toxicidade (CARABIAS-MARTÍNEZ *et. al.*, 2000; SILVA, 2008c; MUKHERJEE *et. al.*, 2011). Os tensoativos não iônicos representam uma classe de surfactantes que possuem menor custo e tem grande potencial de aplicação como emulsificantes, solubilizantes e detergentes em cosméticos, produtos farmacêuticos, flotação de minérios, métodos de extração em ponto nuvem, fluidos de perfuração e processos de recuperação de petróleo (GU e GALERA-GOMEZ, 1995; WU *et. al.*, 2008; IGLAUER *et. al.*, 2010; MUKHERJEE *et. al.*, 2011).

A temperatura de turvação de um tensoativo varia de acordo com seu número de grupos óxido de etileno (n). Quando n aumenta, a solubilidade do surfactante aumenta e a TPN tende a ser maior. Por exemplo, o TX-405 possui $n = 35$, tem um ponto de turvação maior de 100 °C. No entanto, TX-45, com $n = 5$, tem uma TPN inferior a 0 °C (AI-GHAMDI e NASR-EL-DIN, 1997). As características mais utilizadas dos surfactantes não iônicos estão resumidas na **Tabela 1**. Para um determinado tensoativo não iônico com mesmo grupo hidrofóbico, o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) e a correspondente TPN

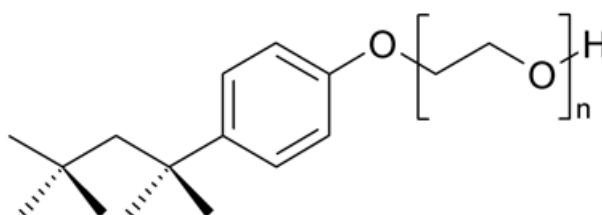
aumentam com o número de unidades de oxietileno (EO) (AKBAS e BATIGOC, 2009).

Tabela 1: Parâmetros dos surfactantes não iônicos que são comumente utilizados em EPN. Fonte: adaptado de WANG e DAI, 2010.

Surfactante	Grupo Hidrofóbico	Média de unidades de		TPN (°C)	CMC (mM)
		EO	HLB		
Polietileno glicol monoéteres $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{i-1}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$					
Brij 30	Lauril	4	9,7		0,023
Brij 35	Lauril	23	16,9	100	0,09
Brij 56	cetil	10	12,9	64-69	0,0006
Brij 58	cetil	20	15,7		
<i>t</i> -Octilfenoxietileno éteres 					
OPEO4.5	<i>t</i> -Octilfenoxi	4,5	9,8		0,103
OPEO7.5	<i>t</i> -Octilfenoxi	7,5	12,3	25	0,2
OPEO9.5	<i>t</i> -Octilfenoxi	9,5	13,4	66	0,21
OPEO30	<i>t</i> -Octilfenoxi	30	17,3	> 100	2,13
OPEO35	<i>t</i> -Octilfenoxi	35	17,6	> 100	2,71
Tergitol TMN 					
Tergitol TMN-3		3	8,1		
Tergitol TMN-5		5	10,8		
Tergitol TMN-6		6	13,1	36	
Tergitol TMN-10		10			0,16

Os surfactantes não iônicos do tipo OPE, série dos Triton X, são os mais empregados, sobretudo devido às suas baixas temperaturas de ponto nuvem e a viabilidade comercial na sua obtenção. Dentre os surfactantes mais utilizados em EPN, destacam-se o OPEO7.5 (Triton X-114) e o OPEO9.5 (Triton X-100). A seguir (**Figura 4**) está demonstrada a estrutura básica da série dos Triton X.

Figura 4: Fórmula genérica dos surfactantes pertencentes à classe dos OPEO. O número de grupos de oxietileno (EO) é dado pela letra n .



A maioria dos estudos com surfactantes da série OPE se utilizam de surfactantes com $n \leq 15$ e TPN < 100 °C, sendo os dados de surfactantes com TPN superior a esse limite, escassos. No entanto, surfactantes não iônicos com n até 100 estão disponíveis comercialmente e são utilizados em formulações industriais (SCHOTT, 2001; AKBAS e BATIGOC, 2009).

Os surfactantes OPEO30 (Triton X-305) e OPEO35 (Triton X-405) são listados na literatura como tendo TPN superior a 100 °C. São raros os trabalhos na literatura em que são utilizados esses surfactantes em EPN (Al-GHAMDI e NASR-EL-DIN, 1997; SCHOTT, 2001; AKBAS e BATIGOC, 2009). Esse fato se deve à necessidade de execução da EPN à temperatura ambiente já que durante o processo de extração, geralmente, se faz necessária a centrifugação para separar mais facilmente as fases. Esse procedimento leva à diminuição da temperatura da solução da amostra, desfazendo a turvação, já que abaixo da TPN existe somente uma fase em solução (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; AKBAS e BATIGOC, 2009, TAECHANGAM *et. al.*, 2009). Nesse sentido, é importante que estudos sejam conduzidos com o intuito de testar a adição de diferentes aditivos e avaliar seus efeitos na diminuição da TPN desses surfactantes, possibilitando-se realizar o procedimento à temperatura ambiente.

Apesar de existem métodos físicos como a turbidimetria, refratometria, viscosimetria, impedância elétrica, espectrofotometria de absorção molecular, e

entre outros, para se detectar a separação de fases (MUKHERJEE *et. al.*, 2011), a temperatura de ponto nuvem de soluções de surfactantes é, em sua grande maioria, determinada por observação visual da mudança abrupta na aparência da solução de surfactante que ocorre durante o aquecimento da solução (BAI *et. al.*, 2001; SHARMA *et. al.*, 2003, DELGADO *et. al.*, 2004; MAHAJAN *et. al.*, 2008; LI *et. al.*, 2009; PATEL *et. al.*, 2010).

A TPN de um surfactante depende da sua estrutura e concentração, e pode ser modificada, monitorada ou controlada pela presença de aditivos, sendo que a temperatura pode ser aumentada (efeito *salting-in*) ou diminuída (efeito *salting-out*). Esses aditivos podem modificar a interação solvente-surfactante e, em consequência, mudar a CMC, o tamanho das micelas e o comportamento das soluções de surfactantes, além de, também poderem afetar a eficiência de extração e o fator de pré-concentração do processo de extração em ponto nuvem (CARABIAS-MARTÍNEZ *et. al.*, 2000; BAI *et. al.*, 2001; LI e CHEN, 2003, ESCALEIRA, 2005; SILVA *et. al.*, 2006; MUKHERJEE *et. al.*, 2011).

Vários trabalhos descrevem o estudo e a utilização de eletrólitos com a finalidade de redução do ponto nuvem. A eficiência de cada sal para alterá-lo irá depender da capacidade que cada íon apresenta para hidratar-se quando em solução (BAI *et. al.*, 2001; SCHOTT, 2001; AKBAS e BATIGOC, 2009; LI *et. al.*, 2009; WANG e DAI, 2010; BATIGOC e AKBAS, 2011a).

Íons com baixa capacidade de hidratação são denominados caotrópicos e podem resultar no aumento da TPN devido à formação de uma estrutura mais coesa das moléculas de água (Eq. (1)), acarretando em uma melhor solvatação dos monômeros (Eq. (2)). Contrariamente, quando um íon tem a capacidade de hidratação ele é caracterizado por ter caráter cosmotrópico. Esses íons promovem a redução de ligações de hidrogênio envolvendo a rede de moléculas da água, com consequente hidratação dos grupos oxietileno, reduzindo a solubilidade dos monômeros do surfactante (Eqs. (3) e (4)), e a consequente separação de fases. Esse fenômeno é descrito na literatura como *salting-out*. Os ânions F^- , Cl^- , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} são chamados de cosmótopos. Os cátions se ligam aos grupos oxietileno resultando no fenômeno chamado efeito *salting-in*. SCN^- , I^- e Br^- são denominados ânions caótropos (Eq. (5)) (WANG e DAI, 2010; BATIGOC *et. al.*, 2011b):



No geral, a temperatura de ponto nuvem de surfactantes não iônicos pode ser diminuída através da adição de outros surfactantes não iônicos. Quando a solução contém dois diferentes surfactantes não iônicos, observa-se que a temperatura de ponto nuvem da mistura é intermediária entre as TPN individuais dos surfactantes não iônicos envolvidos (LI *et.al.*, 2009).

Há alguns estudos sobre a TPN de misturas binárias de surfactantes não iônicos mantendo constante a concentração total de surfactante (GU e GALERA-GÓMEZ, 1995). Dessa maneira, é possível obter praticamente qualquer temperatura de ponto nuvem desejada para uma aplicação de EPN mediante escolha dos tensoativos não iônicos para a mistura. Além disso, os sistemas mistos de surfactantes apresentam maior atividade superficial do que um único tensoativo mostrando propriedades como coestabilizador e cossensibilizante e, algumas vezes, melhorando a seletividade da análise (DELGADO *et.al.*, 2004).

A TPN de soluções micelares pode ser efetivamente reduzida através da adição de outras substâncias hidrofóbicas como hidrocarbonetos de cadeia carbônica longa e álcoois. À medida que a solubilidade em água diminui, o efeito da adição dessas substâncias é mais efetivo. Álcoois com pequena cadeia carbônica possuem boa solubilidade ou são infinitamente miscíveis em água. A presença destes compostos pode modificar a capacidade de solubilização da água, levando à formação de um meio menos polar. Esse fator associado à adsorção desses álcoois na interface micela-água dá origem à uma restrição na micelização das moléculas do surfactante, elevando a

temperatura de ponto nuvem. Inversamente, álcoois de cadeia carbônica longa, os quais são parcialmente solúveis em água, tem suas moléculas solubilizadas nas micelas e adsorvidas na interface micela água, acarretando o crescimento da micela e diminuição da TPN (BEZERRA e FERREIRA, 2006b; WANG e DAI, 2010).

1.3 Extração em ponto nuvem na determinação de espécies orgânicas

A utilização de sistemas micelares, tais como na EPN, tem atraído considerável atenção dos pesquisadores nos últimos anos, principalmente porque está de acordo com os princípios da "Química Verde". A EPN pode ser considerada um "método limpo" pelas seguintes razões: (a) utiliza como meio extrator soluções diluídas dos tensoativos que são de baixo custo, resultando na economia de reagente e pequena geração de resíduos de laboratório; (b) os surfactantes possuem baixa toxicidade, são não voláteis, e não são facilmente inflamáveis, ao contrário de solventes orgânicos utilizados na extração líquido-líquido convencional (TOBISZEWSKI *et.al.*, 2009).

A solubilização de poluentes orgânicos persistentes (POP) no núcleo micelar hidrofóbico é uma propriedade inerente de todos os sistemas de surfactante. Portanto, é amplamente explorada para a extração/pré-concentração destes poluentes provenientes de matrizes complexas tais como amostras ambientais (solo, sedimentos, lamas, carvão, e cinzas de madeira), fluidos biológicos e organismos (CARABIAS-MARTÍNEZ *et.al.*, 2000; XIE *et.al.*, 2010), sendo amplamente difundida em várias áreas de concentração da ciência, como por exemplo, indústria alimentícia, indústria farmacêutica, química aplicada, química ambiental, biologia, medicina, entre outras (BEZZERRA *et.al.*, 2005; LOPES, 2005; GORTZI *et.al.*, 2008; TAECHEGAN *et.al.*, 2009; MUKHERJEE *et.al.*, 2011).

Mais recentemente, o uso da técnica de extração em ponto nuvem, como etapa de extração e / ou pré-concentração do analito que antecede a análise cromatográfica (líquido ou gás) de composto orgânico de importância ambiental, tem se tornado foco de interesse considerável. Isto é o fruto da

intensa busca em desenvolver procedimentos rápidos, simples e eficientes para o preparo de amostra. A EPN pode também ser associada a outras tecnologias incluindo micro-ondas, ultrassom e agitação, para a determinação eficaz de compostos orgânicos (YAO e YANG, 2007; YAO e YANG, 2008; XIE *et.al.*, 2010)

Usualmente, uma alíquota da fase rica em surfactante contendo o analito orgânico não pode ser introduzida diretamente no sistema de separação cromatográfica, devido aos problemas relacionados ao surfactante, como, por exemplo, alta viscosidade, absorção na região do ultravioleta, adsorção na coluna capilar etc. Diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para redução desse problema, dependendo, sobretudo, do objetivo e/ou subsequente utilização do material recuperado (FARIA *et.al.*, 2005).

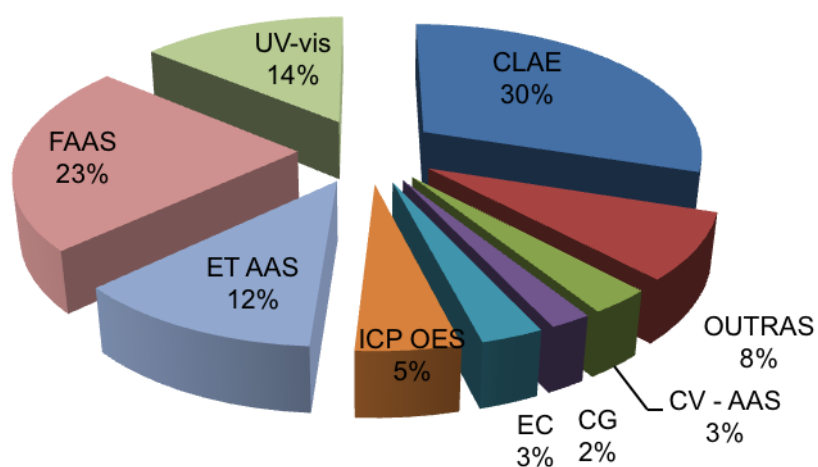
A maioria dos trabalhos empregando a extração em ponto nuvem, almejando a determinação de compostos orgânicos, utiliza como técnica de análise a CLAE. Apesar de alguns trabalhos aplicarem a extração em ponto nuvem associada com a cromatografia a gás e com eletroforese capilar, a análise de compostos orgânicos por essas técnicas é pouco explorada (FARIA *et.al.*, 2005).

Silva (2008a) realizou uma pesquisa na base de dados da *Analytical Abstracts*, em novembro de 2007, nos últimos vinte anos (1987 a 2007), utilizando a palavra chave “*cloud point*“, mostrou que, dentre as técnicas analíticas que têm sido empregadas para a quantificação após procedimento de extração e / ou pré-concentração, a determinação por CLAE representa 30% dos trabalhos, seguida por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), 23 %, e espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível (UV-vis), em torno de 14 %, demonstrando a potencialidade da EPN em diversas áreas da Química Analítica. Ainda, a pesquisa reporta outras técnicas analíticas que são utilizadas, como a eletroforese capilar (EC), com 3% e a cromatografia à gás (CG), com 2 %, como está apresentado na **Figura 5**.

Um problema inerente em EPN é a elevada viscosidade da fase rica em surfactante, impossibilitando a amostragem por uma microseringa. Assim, em algumas aplicações, um volume relativamente pequeno de um solvente

apropriado, como água, metanol, etanol, acetonitrila ou uma solução aquosa de outro surfactante, deve ser adicionado (XIE *et.al.*, 2010). Apesar desse problema, Hung e colaboradores (2007) fizeram a extração de alguns HPA utilizando surfactantes não iônicos para posterior separação e determinação por CLAE, com injeção direta da fase rica em surfactante no sistema cromatográfico.

Figura 5: Técnicas analíticas empregadas em procedimento de extração em ponto nuvem, de acordo com a base de dados da Analytical Abstracts. Fonte: adaptado de SILVA, 2008a.



A maioria das aplicações de EPN para extração de compostos orgânicos utiliza a CLAE com fase reversa, devido à fase rica em surfactante obtida no processo de extração ser compatível com as fases hidro-orgânicas usualmente empregadas nesse modo cromatográfico (CARABIAS-MARTÍNEZ *et.al.*, 2000; XIE *et.al.*, 2010).

A principal desvantagem na utilização da eletroforese capilar está relacionada com a introdução da fase rica em surfactante utilizando soluções aquosas no tubo capilar de sílica fundida, devido a problemas de adsorção do surfactante na fase estacionária, resultando em perdas de eficiência e reprodutibilidade dos tempos de retenção do analito (YIN *et.al.*, 2007; WEI *et.al.*, 2008; ZHONG *et.al.*, 2011). Para resolver esse problema, têm sido utilizados meios não aquosos, possibilitando a separação eletroforética de amostras com altas concentrações de surfactante, evitando a adsorção de surfactante na parede do tubo. Porém, o tempo de vida do tubo é reduzido. No

entanto, pode-se fazer a diluição da fase rica em surfactante com solventes orgânicos (XIE *et.al.*, 2010; YIN *et.al.*, 2010).

São raros os trabalhos que empregam a cromatografia à gás como método de quantificação de compostos orgânicos após EPN, principalmente porque a fase rica em surfactante deve ser tratada adequadamente, visando eliminação do surfactante antes da sua introdução no sistema cromatográfico a gás. Isso porque pode ocorrer a adsorção do surfactante na fase estacionária e alteração da polaridade dessa última, resultando em pouca reprodutibilidade dos tempos de retenção do analito (TAKAGAI e HINZE, 2009). Além disso, pode ocorrer também contaminação do *liner* do injetor. Dessa maneira, após a EPN e antes da injeção no sistema cromatográfico, se faz necessário uma etapa adicional para eliminação do surfactante. Em geral, dois métodos têm sido empregados para superar esse problema. O primeiro deles, é uma etapa de *clean-up* passando a fase rica em surfactante por duas colunas, e o segundo, é a re-extração do analito do coacervato como uma etapa de pré-concentração antes da análise por CG (XIE *et.al.*, 2010).

Minicolunas com fases estacionárias de troca iônica, sílica gel ou florissil têm sido empregadas conjuntamente com fases móveis água/metanol, metanol/hexano ou hexano para separar e recuperar os analitos de interesse da fase rica em surfactante. Após a troca de solvente e redução do volume do extrato em evaporador rotativo, tem-se a injeção no sistema cromatográfico a gás. Através do uso desse protocolo, a EPN tem sido empregada com sucesso como etapa de pré-concentração para determinação de bifenilas policloradas em água e fenoltriazina em soro humano por CG (TAKAGAI e HINZE, 2009).

Faria e colaboradores (2007) propuseram um método alternativo, usando EPN e CG, para extração de dissulfoton em amostras de água. Para a extração em ponto nuvem, foi utilizado o surfactante não iônico OPEO7.5. Antes da separação por CG, uma etapa de *clean-up*, utilizando duas colunas, foi otimizada. Inicialmente a fase rica em surfactante foi percolada através de uma coluna de sílica gel e eluição com metanol/hexano (1:1). Em seguida, o OPEO7.5 remanescente foi removido em uma coluna com florissil, resultando na remoção de cerca de 95 % do surfactante.

Outra alternativa envolve a extração líquido-líquido convencional dos analitos da fase rica em surfactante utilizando solvente orgânico pouco miscível em água. Após a EPN, os analitos são re-extraídos do coacervato, através da utilização de solventes com baixa solubilidade no surfactante utilizado. O extrato orgânico resultante é então diretamente injetado no CG. Porém, apesar de todas estas etapas, pode não haver completa eliminação do surfactante, que será evidenciado através do aparecimento de picos do surfactante no cromatograma (TAKAGAI e HINZE, 2009).

Seis HPA foram pré-concentrados de soluções aquosas e amostras sólidas por EPN utilizando os surfactantes não iônico e iônico (OPEO7.5 e SDSA), como etapa anterior à análise por CG. Os HPA foram re-extraídos com iso-octano da fase rica em surfactante através de microondas ou sonicação, e diretamente analisados por CG com detecção por ionização em chama. A recuperação dos analitos foi entre 92 e 105%. A análise de material de referência certificado foi realizada e os valores obtidos concordaram com os valores certificados. Os limites de detecção foram de 0,9 a 9,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SIKALOS e PALEOLOGOS, 2005). Jia e colaboradores (2008) utilizaram um sistema similar para determinação de pesticidas organofosforados em urina humana e alcançaram limites entre 0,04 e 0,08 ng mL^{-1} .

Takagai e Hinze (2009) propuseram a derivatização do surfactante OPEO7.5 como uma etapa de pós-extração / pré-concentração de seis HPA antes da análise por CG. Neste procedimento, o surfactante presente na fase rica em surfactante foi derivatizado com N, O-bis (trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA) antes da injeção no cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massa. Essa etapa derivatização pode melhorar o desempenho do equipamento resultando em um cromatograma livre de picos provenientes do surfactante, tempos de retenção reprodutíveis e resultados quantitativos. Os tempos de retenção dos seis HPA determinados (acenafteno, acenaftileno, antraceno, bifenila, dibenzofurano e fluoreno), foram reprodutíveis com desvios padrão relativos na faixa de 0,5 - 0,8 %.

Na **Tabela 2** são sumarizadas algumas aplicações de EPN para compostos orgânicos de interesse ambiental, utilizando cromatografia à gás como técnica de detecção.

Tabela 2: Determinação de compostos orgânicos de interesse ambiental por CG após EPN.

Analito	Matriz	Surfactante	Limite de detecção	Procedimento pós-EPN	Deteção	Referência
Inseticida	Água	OPEO7.5	47 µg L ⁻¹		Ionização em chama	FARIA <i>et.al.</i> , 2005
Inseticida	Água	OPEO7.5		<i>clean-up</i> ” com coluna de sílica gel e florissil	Ionização em chama	FARIA <i>et.al.</i> , 2007
Pesticidas organofosforados	Urina humana	OPEO7.5 e SDSA	0,04-0,08 ng mL ⁻¹	re-extração com iso-octano e micro-ondas ou sonicação	Ionização em chama	JIA <i>et.al.</i> , 2008
HPA	Água e sedimento	OPEO7.5 e SDSA	0,9 a 9,9 µg L ⁻¹	re-extração com iso-octano e micro-ondas ou sonicação	Ionização em chama	SIKALOS e PALEOLOGOS, 2005
HPA	Água	OPEO7.5		derivatização com BSTFA	Espectrometria de massa	TAKAGAI e HINZE, 2009

1.4 Derivatização química em cromatografia à gás

Poucos trabalhos têm mencionado a cromatografia à gás com detecção por espectrometria de massa (CG-EM) como técnica de determinação de compostos orgânicos extraídos por EPN, devido, principalmente, aos problemas de adsorção do surfactante na coluna cromatográfica. Dentre as alternativas destacadas do decorrer deste trabalho, com o intuito de solucionar essa desvantagem, a utilização de reagentes de derivatização parece ter um bom potencial, devido ao grande número de reagentes que podem ser utilizados em combinação com diferentes surfactantes.

A derivatização é a transformação de um composto químico em outro com a finalidade de melhorar o perfil cromatográfico; aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade do analito; melhorar a especificidade, seletividade, precisão e sensibilidade do método; diminuir a polaridade dos compostos; e evitar a perda do analito por adsorção à coluna ou por decomposição térmica (DROZD, 1975; DANIELSON *et. al.*, 2000). Resumindo, o reagente de derivatização é uma substância utilizada para modificar quimicamente um composto para produzir um composto novo cujas propriedades sejam adequadas para análise por cromatografia. Ele deve produzir mais do que 95 % do produto derivatizado, não deve provocar rearranjo ou alterações estruturais dos compostos durante a reação, não deve contribuir para perda de amostra durante a reação, deve produzir um derivado que não interaja irreversivelmente com a fase estacionária da coluna em CG e deve produzir derivados que sejam estáveis por certo tempo (ORATA, 2012).

A reação de derivatização pode ser realizada antes, durante (*in situ*) ou depois de uma etapa de extração dos analitos. Pode-se realizar a derivatização após a etapa de extração quando se deseja converter os analitos em formas compatíveis com a subsequente detecção ou pode ocorrer no ponto de injeção do sistema cromatográfico ou na coluna cromatográfica (XU *et. al.*, 2009).

Moléculas contendo grupos funcionais como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ e $-\text{SH}$ podem formar ligações de hidrogênio intermolecular contribuindo significativamente para a atração intermolecular, acarretando na diminuição da volatilidade, insuficiente estabilidade térmica e interações com a fase

estacionária da coluna. Substituindo o hidrogênio destes grupos através de reações de derivatização de acilação, alquilação ou sililação, pode-se aumentar a volatilidade significativamente, especialmente em compostos com múltiplos grupos polares. Através destes três processos, materiais polares, tais como ácidos orgânicos, amidas, compostos poli-hidroxilados e aminoácidos, são tornados adequados para a determinação por CG tornando-os suficientemente voláteis (LOPES, 2011).

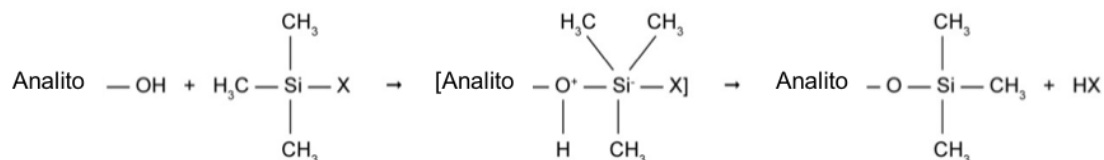
A sililação é o método de derivatização mais mencionado nos trabalhos publicados, uma vez que facilmente gera produtos facilmente volatilizados, sendo adequado para amostras para análise por CG. A reação de sililação é simples, rápida e versátil, e os derivados formados são estáveis em solução por dias e até mesmo semanas. Durante a reação, o hidrogênio ativo presente no grupo polar ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ e $-\text{SH}$) é substituído por um grupo trimetil-silil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) do reagente silanizante, produzindo derivados mais voláteis, menos polares (OLIVEIRA, 2012).

Através da reação de derivatização utilizando reagentes sililantes, a estrutura química do composto é modificada mediante substituição dos hidrogênios livres ativos por outros que impeçam as ligações do tipo hidrogênio e, conseqüentemente, o padrão de fragmentação do novo composto também é alterado (TIVERON, 2010). O derivado pode ter uma estrutura semelhante ou intimamente relacionada, mas não a mesma estrutura do produto químico original. A derivatização aumentará a polaridade e a volatilidade dos analitos para que possam ser eluídos a temperaturas razoáveis sem decomposição térmica ou rearranjo molecular (CHEN *et. al.*, 2008).

O mecanismo da reação de derivatização (**Figura 6**) ocorre por meio de uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$). O par de elétrons do heteroátomo (oxigênio, enxofre ou nitrogênio) presente na amostra age como nucleófilo ávido por um centro positivamente carregado. O ataque nucleofílico ocorre sobre o átomo de silício do grupo silil, doador do grupo trimetil-silil, pela região de menor impedimento estérico, produzindo um estado de transição bimolecular. O grupo trimetil-silil (TMS) ao deixar a porção "X" do reagente derivatizante deve possuir a capacidade de estabilizar a carga negativa (baixa

basicidade) para que o derivado silanizado seja formado. Como a formação do estado de transição é reversível, a derivatização irá ocorrer completamente apenas se a basicidade do grupo de saída “X” for maior que a do restante da cadeia da amostra (KNAPP, 1979; LOPES, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Figura 6: Mecanismo para a reação de sililação. Fonte: adaptado de OLIVEIRA, 2012.

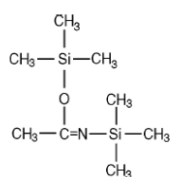


A facilidade de sililação dos grupos funcionais segue a seguinte ordem: álcool > fenol > ácido carboxílico > amina > amida. O impedimento estérico é também um fator a ser considerado dentro da classe de compostos orgânicos (DANIELSON *et. al.*, 2000).

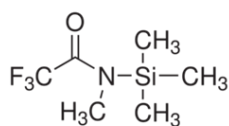
Em geral, os reagentes de sililação são instáveis e devem ser protegidos da umidade, sendo a reação realizada em frasco selado e com reagente em excesso. A escolha do solvente é um fator crítico, já que a sililação ocorre em hidrogênios ativos. Desta maneira, devem ser evitados solventes próticos. A piridina é um solvente bastante utilizado, atuando também como catalisador. Em muitos casos, o próprio reagente de derivatização é utilizado como solvente, já que deve estar em excesso (LOPES, 2011; TAKAGAI e HINZE, 2009).

Dentre os agentes sililantes rotineiramente empregados na derivatização estão o trimetilclorosilano (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimetilsililimidazol (TMSI) e N-metil-N-(trimetilsililimidazol)trifluoroacetamida (MSTFA), além da mistura entre eles, objetivando-se catalisar reações ou derivatizar misturas mais complexas. A ordem geral de atividade para TMS reagentes é TMSI > BSTFA > TMSA (trimetil-silil azida). As estruturas desses derivatizantes estão apresentadas na **Figura 7** (TAKAGAI e HINZE, 2009).

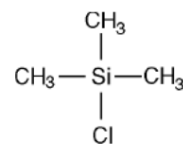
Figura 7: Estrutura dos reagentes de sililação mais utilizados em reações de derivatização. Fonte: adaptado de TAKAGAI e HINZE, 2009.



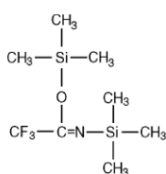
BSA



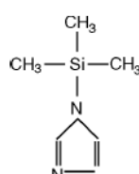
MTSFA



TMCS



BSTFA



TMSI

O TMCS é o reagente mais simples que pode ser utilizado, sendo frequentemente aplicado na derivatização de ácidos carboxílicos (DANIELSON *et. al.*, 2000; LOPES, 2011). Dificilmente é utilizado sozinho em aplicações analíticas, mas é geralmente misturado com outros reagentes de sililação para aumentar sua reatividade, como por exemplo, BSTFA/TMCS, BSA/TMCS, na derivatização de álcoois, alcalóides, amins biogênicas, fenóis e esteróis.

O BSTFA é o mais potente e comumente utilizado em aplicações analíticas. Seu potencial de sililação é similar ao do BSA e do MTSFA. A grande maioria dos trabalhos reportados na literatura que se referem a derivatização de surfactantes estão relacionados à sua aplicação no preparo de amostras ambientais, como água e sedimento. Bai-Juan e colaboradores (2007) desenvolveram um método analítico baseado na extração em fase sólida de alquilfenóis (AP) em amostras de água, com derivatização *in situ* do surfactante, e detecção por CG-EM.

Gatidou e colaboradores (2007) desenvolveram um método de extração em fase sólida para determinação simultânea de cinco nonilfenol polietoxilatos em águas residuais (dissolvido e particulado) e lodo por análise cromatográfica, após a derivatização utilizando BSTFA. Mais recentemente, Takagai e Hinze

(2009) estudaram a derivatização do surfactante OPEO7.5 presente no coacervato resultante da extração em ponto nuvem de compostos orgânicos, como etapa que antecede a detecção cromatográfica.

Diante do exposto, o uso da extração em ponto nuvem para a separação e pré-concentração de compostos orgânicos já está bem estabelecido como alternativa aos métodos convencionais. Suas características analíticas são, na maioria dos casos, melhores que as dos métodos de extração convencionais. Os surfactantes não iônicos com muitas unidades de óxido de etileno raramente são utilizados em EPN, devido às elevadas temperaturas de ponto nuvem, porém na presença de aditivos possibilitam sua utilização em procedimentos à temperatura ambiente.

A cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massa vem sendo menos utilizada como técnica de determinação de compostos orgânicos extraídos e pré-concentrados por EPN, por causa da adsorção da fase rica em surfactante na fase estacionária da coluna cromatográfica. A introdução de uma etapa derivatização do surfactante após a EPN utilizando reagentes de trimetilsililação resulta em um produto mais volátil possibilitando a injeção da fase rica no sistema cromatográfico. A associação da EPN com posterior derivatização da fase rica em surfactante e detecção por CG-EM é uma abordagem alternativa e promissora, possibilitando a aplicação do método para determinação de HPA em amostras de águas naturais.

Neste contexto, o presente trabalho propõe a utilização de surfactantes não iônicos do tipo OPE (octilfenoxipolioxietileno éteres), na extração em ponto nuvem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais, e posterior determinação por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massa.

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de extração em ponto nuvem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), utilizando tensoativos octilfenol polietoxilados (OPE) com derivatização da fase rica em surfactante, como etapa que antecede a detecção por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a temperatura de ponto nuvem experimental do OPEO30 e do OPEO35;
- Avaliar o efeito da adição de eletrólitos e não-eletrólitos, bem como a mistura desses, na TPN de diferentes surfactantes não iônicos;
- Otimizar o procedimento de derivatização do coacervato, utilizando ferramentas quimiométricas;
- Otimizar as condições da EPN de HPA, utilizando surfactantes não iônicos.
- Empregar a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa como técnica analítica para determinação de HPA.
- Validar o método de extração em ponto nuvem de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, com derivatização da fase rica em surfactante, como etapa que antecede à detecção por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa.
- Aplicar o método proposto na determinação de HPA, em amostras de águas naturais.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

Os surfactantes não iônicos usados neste estudo foram do tipo octilfenol polioxietilados (série dos Triton-X). Os surfactantes Triton X-114 (OPEO7.5), Triton X-100 (OPEO9.5), Triton X-305 (OPEO30) e Triton X-405 (OPEO35) utilizados foram de grau analítico (Sigma, EUA).

Os reagentes de derivatização trimetilclorosilano (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimethylsililimidazol (TMSI) e N-metil-N-(trimetilsililimidazol) trifluoroacetemida (MSTFA) também foram de grau analítico (Sigma, EUA). O padrão estoque contendo os 16 HPA (Sigma, EUA) foi de concentração total de 4.000 mg L⁻¹, para cada analito.

Para o estudo do efeito de aditivos foram utilizados os sais nitrato de sódio (Merck, EUA), nitrato de potássio (Merck, EUA), sulfato de sódio (Merck, EUA), sulfato de potássio (Quimex, Brasil), sulfato de amônio (Quimex, Brasil), cloreto de sódio (Quimex, Brasil), fluoreto de sódio (Sigma, EUA) e brometo de potássio (Sigma, EUA) e os álcoois pentanol (JTBaker, Europa) e isobutanol (JTBaker, Europa).

A água ultrapura usada para preparar as soluções da amostra foi duplamente destilada em bidestilador de quartzo e submetida a um sistema de ultrapurificação (MilliQ®).

3.2. Soluções

As soluções aquosas dos surfactantes OPEO9.5, OPEO30 e OPEO35 10% (m v⁻¹) utilizadas foram preparadas através da dissolução de 10 g de surfactante em água ultrapura, com diluição até 100 mL em balão volumétrico.

Preparou-se uma solução intermediária de 10,00 mg L⁻¹ em diclorometano dos 16 HPA prioritários da USEPA, a partir da solução de 4.000 mg L⁻¹, que foi

utilizada para as diluições subsequentes. A solução, utilizada nas extrações em ponto nuvem, com concentração 4,00 mg L⁻¹ em metanol, foi preparada através da diluição de 2,00 mL de solução de HPA 10,00 mg L⁻¹ em metanol, sendo o volume final 5,00 mL.

Nas análises cromatográficas foram feitas diluições da solução de HPA 10,00 mg L⁻¹, contendo os 16 HPA prioritários da USEPA, sendo preparados padrões em concentrações 0,05; 0,25; 1,00; 2,00 e 4,00 mg L⁻¹, em diclorometano, que foram utilizados na construção da curva de calibração.

3.3. Equipamentos

O aquecimento em banho de água da solução da amostra na extração em ponto nuvem e na derivatização, foi realizado utilizando uma chapa aquecedora com ajuste de temperatura (TENCNAL, modelo TE-0181, Brasil). As temperaturas foram medidas em termômetro digital (Minipa, Brasil), com precisão de $\pm 0,1$ °C. As amostras foram centrifugadas em centrífuga microprocessada (modelo Q222TM108, Quimis, Brasil).

A fase rica derivatizada da amostra foi analisada em cromatógrafo à gás (modelo GC2010, Shimadzu, Japão), acoplado ao espectrômetro de massa (modelo QP 2010 *Plus*, Shimadzu, Japão).

As amostras de água subterrânea foram coletadas através da utilização de uma bomba peristáltica de baixa vazão Solinst, (modelo 410, Brasil), acoplada a uma célula de fluxo MicroPurge basics (modelo MP20, Clean Environment Brasil), para amostragem de Baixa Vazão (Low-Flow Sampling).

3.4. Procedimentos

3.4.1. Efeito da presença de aditivos

Nos ensaios com sais, foi adicionado 1,00 mL da solução de surfactante 10 % (m v⁻¹) a um tubo de ensaio contendo 10,00 mL de água ultrapura e diferentes massas de cada sal estudado, a depender da sua solubilidade em

água. Em seguida a solução foi aquecida em banho de água isotérmico até turvação, quando a temperatura foi medida, sendo os ensaios realizados em duplicata.

Nos ensaios com álcoois e com OPEO7.5, foram adicionados 1,00 mL da solução de surfactante 10 % (m v⁻¹) a um tubo de ensaio, volumes crescentes de álcool ou do OPEO7.5 foram adicionados, e diluídos para 11,00 mL com água ultrapura. A solução contida no tubo de ensaio foi mergulhada em um banho de água isotérmico, sendo gradualmente aquecida até que a turvação fosse observada e temperatura de ponto nuvem medida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.2. Extração em Ponto Nuvem

A EPN foi realizada adicionando-se 1,00 mL de uma solução de surfactante 10 % (m v⁻¹) a um tubo de ensaio cônico de vidro com tampa, contendo 10,00 mL de água ultrapura ou amostra e 1,25 g de sulfato de sódio anidro. Em seguida fez-se agitação manual para completa dissolução do sal e mistura dos reagentes. Fez-se necessário mergulhar o tubo em banho de água à 70 °C por 10 min. Para acelerar a separação de fases, as soluções foram centrifugadas à 3.000 rpm por 5 min. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, retirou-se a fase aquosa (fase mais densa). Esse procedimento foi repetido por mais três vezes, quando não foi mais observada a formação de duas fases.

3.4.3. Derivatização

A derivatização de 30 µL da fase rica em surfactante foi conduzida mediante adição de 125 µL de reagente de derivatização e 100 µL de piridina. Foram utilizados os seguintes reagentes de derivatização: TMSI, BSA, BSTFA e MSTFA. Em seguida fez-se aquecimento em banho de água à 70 °C por 45 min, e posterior injeção no CG-EM.

3.4.4. Análises cromatográficas

O cromatógrafo estava equipado com uma coluna cromatográfica HP-5 (5% fenil, 95% metilsiloxano) com 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura do forno foi programada a 45 °C, com

rampa de aquecimento a 20 °C min⁻¹ até 130 °C, em seguida alcançou 180 °C com rampa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, depois com rampa de 6 °C min⁻¹ alcançou 240 °C por 01 min, e por fim até 310 °C com rampa de 10 °C min⁻¹, onde permaneceu por 03 min, totalizando 30 minutos de análise.

Foram injetados 2 µL com uma razão de *split* de 10. Utilizou-se hélio com 99,9999% de pureza (White Martins, Brasil), como gás de arraste com fluxo de 1,91 mL min⁻¹. A interface foi mantida a 260 °C e o detector operando no modo SIM (do inglês, *select ion monitoring*). Na **Tabela 3** são apresentados os 16 HPA monitorados e as respectivas razões de massa (*m/z*) dos íons moleculares.

Tabela 3: Razões de massa (*m/z*) dos íons moleculares monitorados dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em estudo.

HPA	<i>m/z</i>	HPA	<i>m/z</i>
Naftaleno	128	Benzo (a) antraceno	228
Acenaftileno	152	Criseno	228
Acenafteno	153	Benzo (b) fluoranteno	252
Fluoreno	166	Benzo (K) fluoranteno	252
Fenantreno	178	Benzo (a) pireno	252
Antraceno	178	Indeno (123-cd) pireno	276
Fluoranteno	202	Dibenzo (ah) antraceno	276
Pireno	202	Benzo (ghi) perileno	276

O detector também foi utilizado operando no modo *SCAN* para avaliar a reação de derivatização, através do perfil do cromatograma gerado. No modo de varredura, o injetor estava a uma temperatura de 280 °C, e o forno com temperatura inicial de 45 °C por 01 minuto, com rampa de aquecimento a 6 °C min⁻¹ até 280 °C, em seguida alcançou 320 °C com rampa de aquecimento de 8

°C min⁻¹ por 20 min, e por último, com rampa de 10 °C alcançou 325 °C, onde permaneceu por 1,33 min, totalizando 67 min de análise. Foram injetados 2 µL com uma razão de *split* de 100. Utilizou-se também hélio como gás de arraste com fluxo de 1,91 mL min⁻¹. A interface foi mantida a 300 °C e a varredura foi realizada numa razão de massa (*m/z*) de 40 a 699. A integração foi feita por meio do *software* GCMSSolution adquirido da Shimadzu, Japão.

3.5 Coleta de amostras de água subterrânea

As amostras de água subterrânea foram coletadas em poços instalados em postos de abastecimento e revenda de combustíveis da cidade de Salvador, localizados nos bairros do Dique do Tororó, Garibaldi, Ondina, Centenário, Vasco da Gama e Ogunjá, sendo um total de dez pontos amostrados. A coleta de água ocorreu através da utilização de uma bomba peristáltica de baixa vazão. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 1L, sendo em seguida refrigeradas até a chegada ao laboratório, onde foram analisadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de turvação do OPEO30 e do OPEO35 é superior à 100 °C e há poucos estudos sobre o efeito de eletrólitos quando a temperatura de ponto nuvem (TPN) de tensoativos é superior à 100 °C. Neste trabalho foi investigada a viabilidade de utilização destes tensoativos em procedimentos de extração em ponto nuvem de espécies orgânicas presentes em água subterrânea. Devido à necessidade dos procedimentos de EPN serem realizados à temperatura ambiente, foram realizados ensaios de medida e redução da TPN dos tensoativos supracitados.

4.1. Determinação da temperatura de ponto nuvem experimental das soluções aquosas dos surfactantes

A TPN de surfactantes altamente polietoxilados como o OPEO30 e o OPEO35 excedem a temperatura normal de ebulição de suas soluções aquosas, de modo que a TPN deve ser diminuída abaixo de 100 °C. A estimativa da TPN por extrapolação tem sido relatada na literatura (SCHOTT, 2001; AKBAS e BATIGOC, 2009), como uma alternativa aos sistemas pressurizados de medição. Íons Na⁺ diminuem a TPN de surfactantes com elevado número de grupos de óxido de etileno (SCHOTT, 2001).

Devido à dificuldade em se medir temperaturas de soluções aquosas superiores a 100 °C, as TPN dos tensoativos em estudo foram determinadas através da adição de diferentes concentrações de nitrato de sódio, e posterior extrapolação da concentração do sal para zero, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Nos ensaios foram adicionados diferentes concentrações de nitrato de sódio que variaram entre 0,1 e 4,5 mol L⁻¹. Para concentrações desse sal inferiores a 1,0 e 1,5 mol L⁻¹ não foi observada turvação à temperaturas menores que 100 °C, utilizando o OPEO35 e o OPEO30, respectivamente. As temperaturas obtidas mediante adição de concentrações de sal superiores a essas estão dispostas na **Figura 8**.

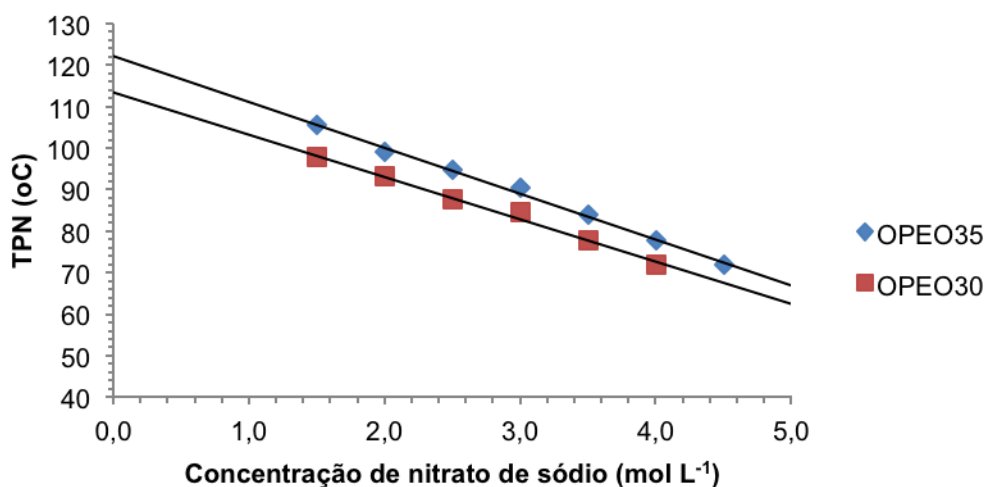
Na **Figura 8** é mostrado que há uma relação linear entre a concentração de sal e a TPN, expressa pelo coeficiente de determinação próximo à unidade em ambos os surfactantes. Após regressão linear, obteve-se a equação da reta para o OPEO30 (Equação 6) e para o OPEO35 (Equação 7):

$$\text{TPN} = -10,196 C_{\text{NaNO}_3} + 113,56 \quad R^2 = 0,993 \quad (6)$$

$$\text{TPN} = -11,040 C_{\text{NaNO}_3} + 122,25 \quad R^2 = 0,996 \quad (7)$$

em que C_{NaNO_3} é a concentração de nitrato de sódio.

Figura 8: Temperatura de Ponto Nuvem da solução de OPEO30 e OPEO35 0,9% (m v⁻¹) em função da concentração molar de nitrato de sódio adicionada.



Extrapolando-se a concentração de nitrato para zero ($C_{\text{NaNO}_3} = 0$) e através da equação da curva, obtida após regressão linear, o valor experimental da TPN da solução de OPEO35 0,9% (m v⁻¹) foi de $(122 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$, e da solução de OPEO30 0,9 % (m v⁻¹), $(113 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

O processo de extrapolação empírica foi validado através da medida da TPN do OPEO9.5, sem a adição de sal e com a adição de diferentes concentrações de nitrato de sódio, seguido de extrapolação da concentração para zero. Sem adição de sal, a TPN do OPEO9.5 0,9% (m v⁻¹) determinada experimentalmente foi $(67,8 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$, e com adição de sal, após extrapolação $(68,2 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$. Observa-se que os valores de TPN estão concordantes tanto na presença do eletrólito quanto na sua ausência, sendo, portanto, as TPN das soluções aquosas dos tensoativos em estudo, obtidas por extrapolação, validadas.

4.2 Efeito da presença de aditivos na TPN dos surfactantes

Os valores de TPN variam com o número de grupos de óxido de etileno presentes nos agentes tensoativos não iônicos. À medida que os grupos de óxido de etileno aumentam, a solubilidade dos agentes tensoativos em água aumenta, elevando a temperatura de ponto nuvem. Nesta etapa do trabalho,

será investigado o comportamento da TPN de uma solução de OPEO30 e de uma solução de OPEO35 quando adicionadas diferentes concentrações de sais, surfactante não iônico, álcoois ou a mistura destes.

4.2.1 Efeito da adição de sais inorgânicos

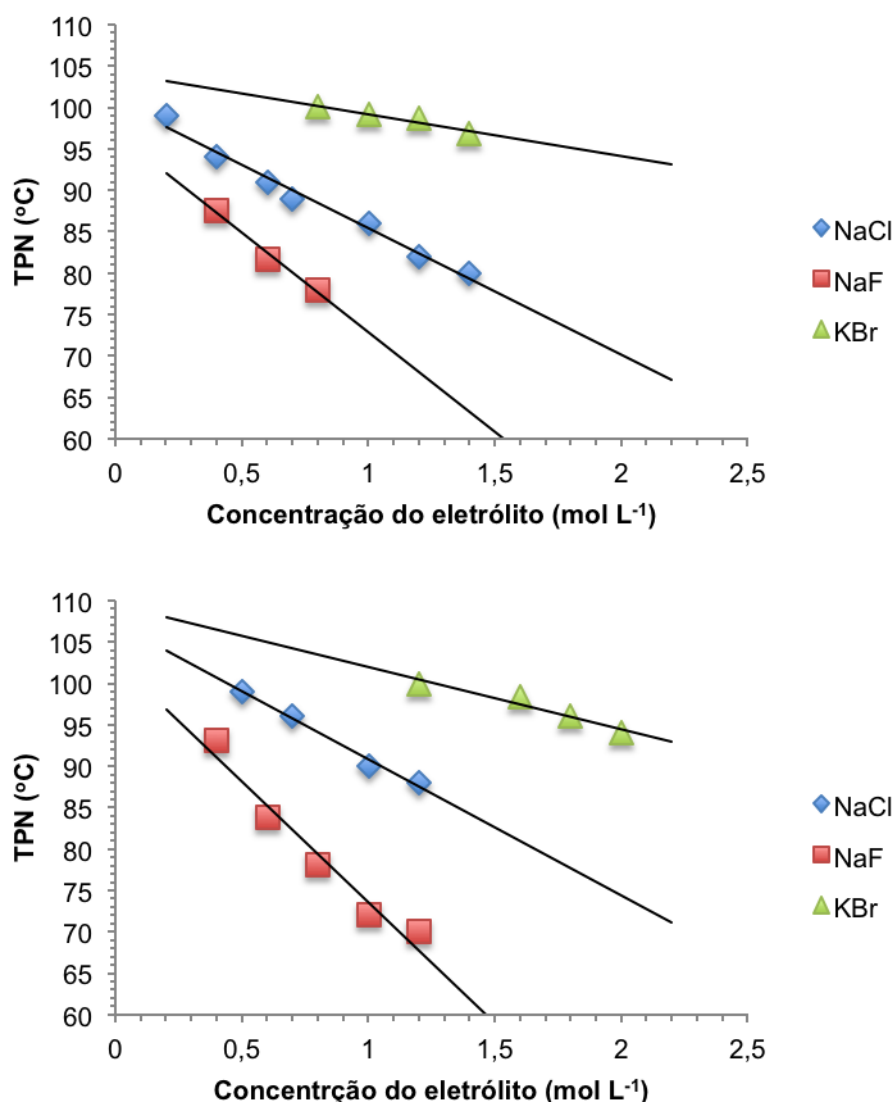
O efeito que a adição de íons acarreta na diminuição da temperatura de ponto nuvem depende do tipo de sal que é adicionado. Molina-Bolivar e colaboradores (2002) concluíram que o número de monômeros na micela aumenta na presença de eletrólitos. Akbas e Batigoc (2009) mostraram que a TPN de surfactantes não iônicos diminui quase que linearmente com o aumento da concentração de alguns eletrólitos, como, por exemplo, o sulfato de sódio. Dentre os sais mais estudados na literatura para a diminuição da TPN estão os sais de sódio e de potássio (BAI *et. al.*, 2001; LIANG *et. al.*, 2009, MUKHERJEE *et. al.*, 2011).

O efeito da adição dos sulfatos Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e K_2SO_4 , e de sais de halogênios como NaCl, NaF e KBr, além do KNO_3 , foram avaliados com respeito a diminuição da TPN da solução dos surfactantes supracitados. No geral, as concentrações dos sais estudados variaram de 0,2 a 2,2 mol L⁻¹.

Nos estudos, adicionando-se concentrações de KBr inferiores a 0,8 e 1,2 mol L⁻¹ para o OPEO30 e o OPEO35, respectivamente, não foi observada turvação em temperaturas inferiores a 100 °C. Na **Figura 9** pode-se observar o efeito da presença de halogênios monovalentes na TPN dos surfactantes. A adição de NaF resultou numa maior redução da TPN, principalmente quando comparado com o NaCl. Embora estes sais possuam o mesmo cátion e os ânions tenham caráter cosmotrópico, o F⁻ é menor, sendo mais hidratado, promovendo maior desidratação dos grupos oxietileno, o que reduz a solubilidade dos monômeros do surfactante e como consequência, a separação de fases.

Resultados semelhantes foram obtidos por Akbas e Batigoc (2009) para o OPEO35, e por Sharma e colaboradores (2003) utilizando a série de surfactantes não iônicos do tipo éter poli (oxietileno).

Figura 9: Efeito da diminuição da TPN da solução de surfactante 0,9% (m v⁻¹) através da adição de diferentes concentrações sais halogenados monovalentes. a) OPEO30 e b) OPEO35.

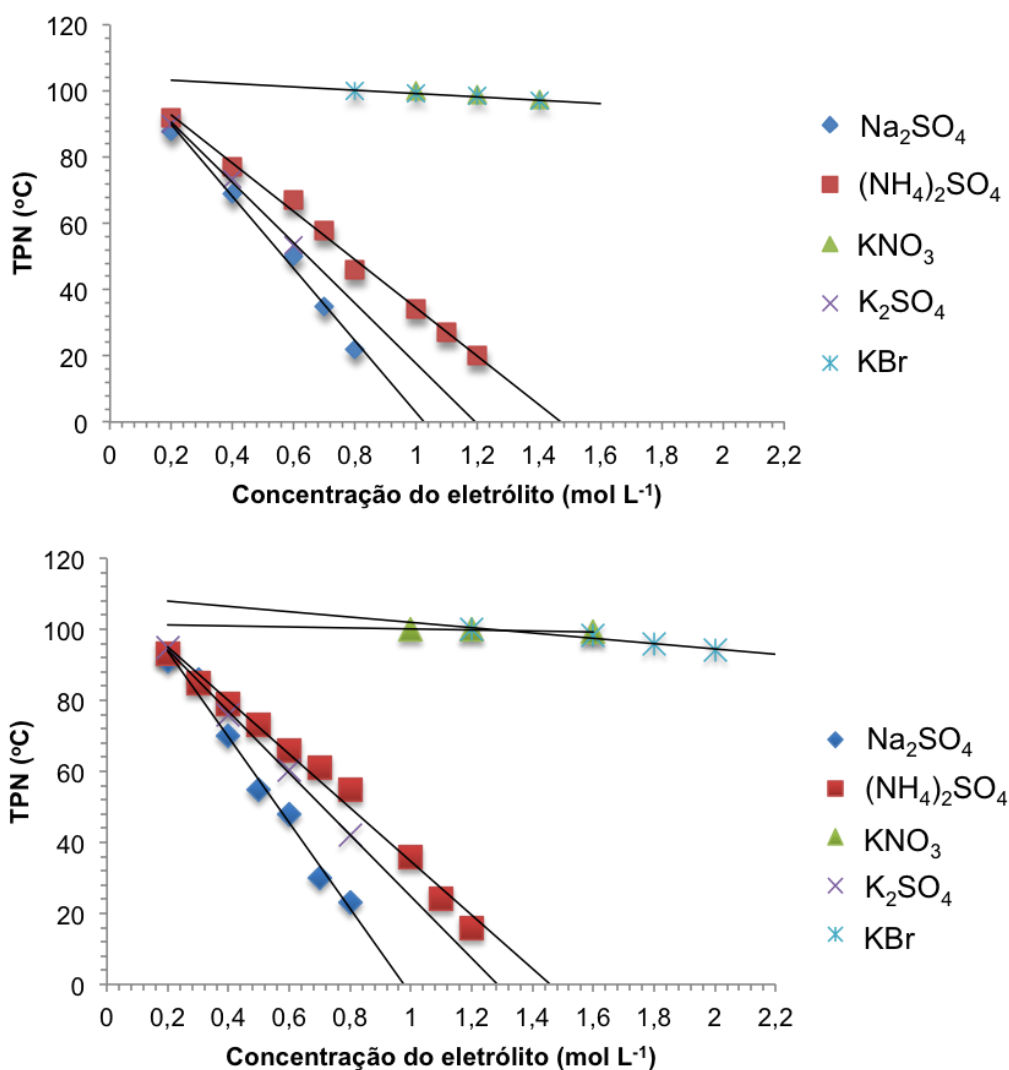


O efeito da presença de ânions monovalentes e bivalentes na TPN da solução de OPEO30 e OPEO35 estão representados na **Figura 10**. Não foi observada turvação à temperatura menor que 100 °C, quando adicionadas concentrações de nitrato de potássio inferiores a 1,0 mol L⁻¹.

Observa-se que o efeito do ânion bivalente SO₄²⁻ é mais pronunciado do que o efeito do ânion monovalente NO₃⁻. Íons que são formadores da estrutura da água, diminuem o ponto nuvem de surfactantes não iônicos, devido à diminuição da disponibilidade de moléculas de água não associadas para hidratar os grupos de óxido de etileno. Ânions polivalentes diminuem a TPN de

surfactantes não iônicos porque eles promovem maior associação entre as moléculas da água, através das ligações de hidrogênio, e competem com o surfactante pela água de hidratação (LI *et. al.*, 2009; BATIGOC e AKBAS, 2011a).

Figura 10: Efeito da diminuição da TPN da solução 0,9% m v⁻¹ através da adição de diferentes concentrações ânions e cátions. a) OPEO30 e b) OPEO35.



Bai e colaboradores (2001) estudaram o efeito da presença de sais inorgânicos no ponto nuvem do Tergitol 15-S-7 e concluíram que a adição de sais, exceto iodeto de sódio, diminuíram o ponto nuvem, sendo o sulfato de sódio o mais efetivo para a mesma quantidade de sal adicionada. Li e Chen (2003) adicionaram diferentes concentrações de sulfato de sódio a esse

mesmo surfactante e observaram que o excesso deste sal leva à formação de uma fase rica em surfactante muito viscosa. Mahajan e colaboradores (2008) investigaram a interação entre solventes e eletrólitos, para modificar a solubilidade e a TPN do OPEO9.5. Este mesmo efeito foi observado por Li e colaboradores (2009) mediante adição desses eletrólitos ao Tergitol 15-S-7, Tergitol 15-S-9 e Neodol 25-7.

O efeito global de um sal na TPN de uma solução de um tensoativo depende tanto do seu cátion quanto do seu ânion. De um modo geral, os efeitos dos cátions são relativamente menores em comparação com os de ânions, principalmente com ânions poliatômicos. Um sal que tem um efeito global de diminuição do ponto de turvação de um tensoativo não iônico, ou seja, diminui a solubilidade do tensoativo. Por outro lado, sais caotrópicos aumentam a solubilidade dos tensoativos em água e, conseqüentemente, aumentam suas temperaturas de ponto nuvem.

Dentre os sais estudados, o Na_2SO_4 foi o que proporcionou maior redução da TPN das soluções dos surfactantes em estudo, sendo necessário a adição de $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ (concentração final) do sal para o procedimento de EPN ser realizado à temperatura ambiente.

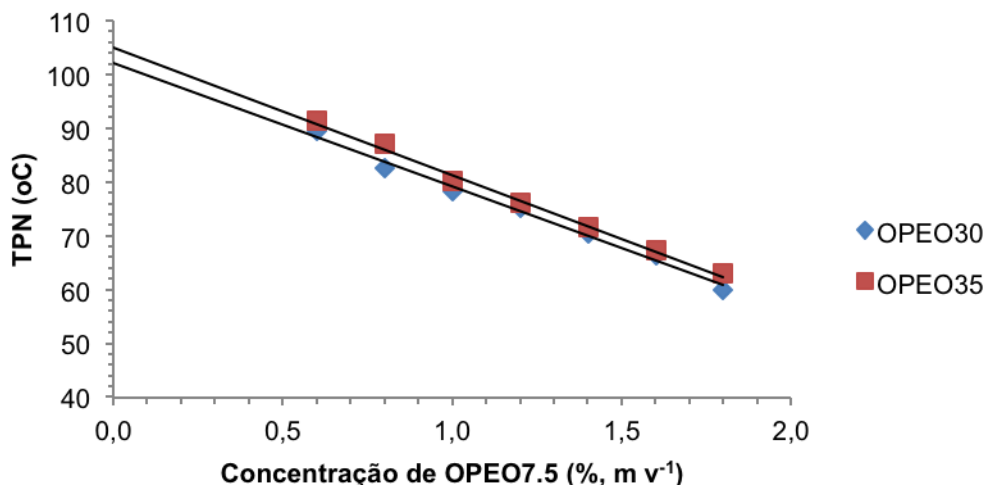
4.2.2 Efeito da adição da mistura da surfactantes não iônicos

Através da mistura de dois surfactantes não iônicos, é possível obter qualquer temperatura de ponto nuvem desejada para uma determinada aplicação analítica, mediante seleção dos tensoativos da mistura (DELGADO *et. al.*, 2004). O OPEO7.5 possui TPN à temperatura ambiente ($23 \text{ }^\circ\text{C}$). Espera-se, portanto, que a adição desse surfactante a uma solução de OPEO30 ou uma solução de OPEO35 acarrete a diminuição de suas TPN.

No presente estudo foram adicionadas às soluções dos surfactantes, diferentes proporções, em massa, do OPEO7.5 concentrado, que variaram entre 0,2 e 1,8 % (m v^{-1}) (**Figura 11**). Não foi observada turvação em

temperatura inferior à 100 °C, quando da adição de concentrações menores que 0,6% (m v⁻¹) do surfactante concentrado.

Figura 11: Efeito da diminuição da TPN da solução de OPEO30 e da solução de OPEO35 após a adição de diferentes concentrações de OPEO7.5.



Como previsto na literatura, a TPN dos surfactantes em estudo diminuem linearmente com a concentração de OPEO7.5 adicionada. Para a mistura OPEO30 / OPEO7.5 obteve-se correlação conforme Equação 8, descrita abaixo:

$$TPN_{OPEO30} = -22,929 C_{OPEO7.5} + 102,11 \quad (R^2= 0,9907) \quad (8)$$

Enquanto que, para a mistura binária dos surfactantes OPEO35 / OPEO7.5, obteve-se a correlação (Equação 9):

$$TPN_{OPEO35} = -23,732 C_{OPEO7.5} + 105,12 \quad (R^2= 0,9943) \quad (9)$$

em que, TPN representa a temperatura de ponto nuvem (em °C) da mistura dos surfactantes não iônicos e $C_{OPEO7.5}$, a concentração de OPEO7.5 em % (m v⁻¹).

A TPN da mistura de surfactantes nas concentrações estudadas foi intermediária entre a TPN dos surfactantes puros. A diminuição da TPN com o

aumento da concentração do OPEO7.5 foi resultante do aumento da concentração micelar e da separação de fases resultante da interação micela-micela (AKBAS e BATIGOC, 2009). Wang e colaboradores (2008) avaliaram o efeito da adição de surfactantes da série OPE (OPEO9.5 e OPEO7.5) no ponto nuvem do OPEO4.5, e concluíram que a mistura OPEO4.5 e OPEO9.5 resultou numa temperatura maior do que a da mistura OPEO4.5 e OPEO7.5.

Delgado e colaboradores (2004) avaliaram a diminuição da TPN do surfactante Pole adicionando Brij 30 ou OPEO7.5, e em seguida fizeram a extração e pré-concentração de compostos orgânicos em água do mar. Akbas e Batigoc (2009) estudaram o efeito da adição de OPEO7.5 no ponto nuvem do OPEO35, e inferiram que há diminuição da temperatura com o aumento da concentração do OPEO7.5.

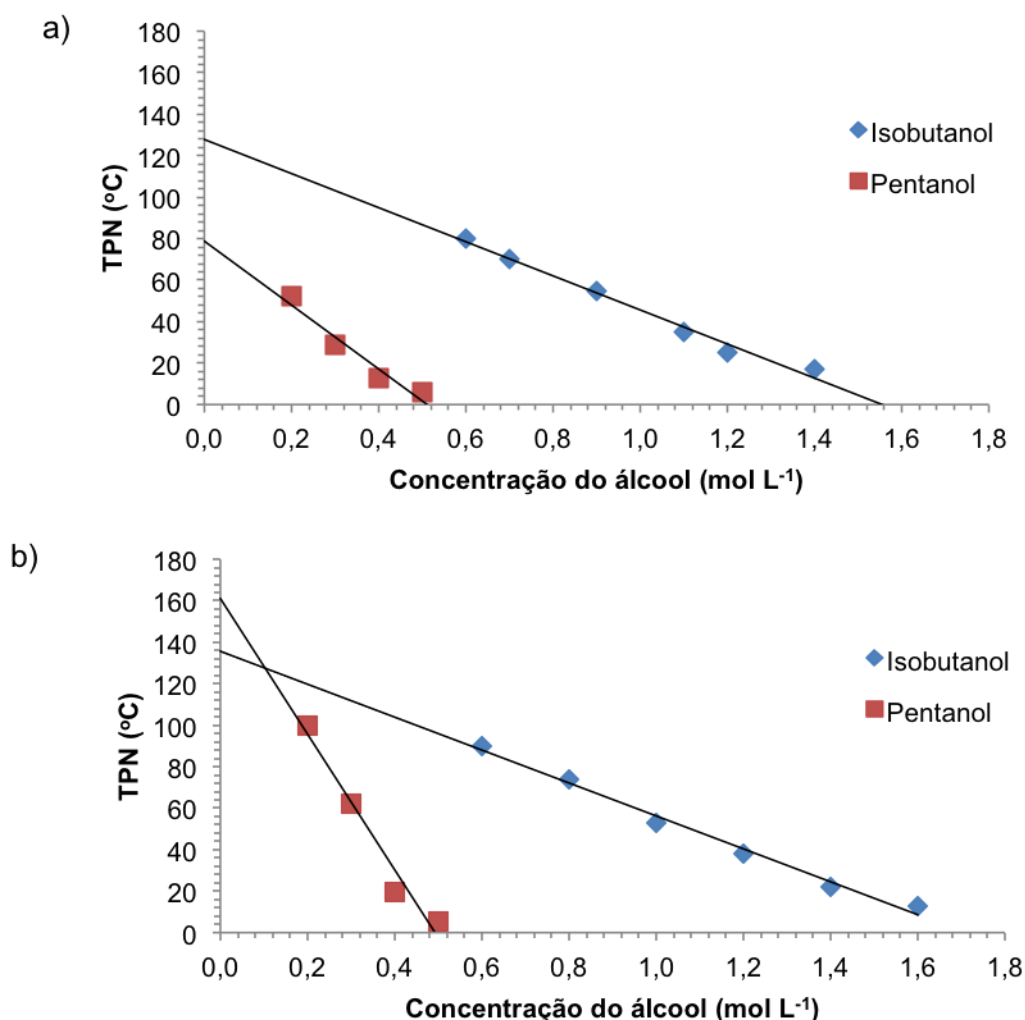
O modelo linear resultante da mistura de dois surfactantes não iônicos proporciona uma conveniência na formulação de sistemas de tensoativos mistos, já que através da adição de quantidades específicas de cada surfactante adicionado pode-se obter a TPN desejada para aplicações específicas.

4.2.3. Efeito da adição de álcoois

Devido aos surfactantes em estudo possuírem TPN superiores a 100 °C, não foi estudado o efeito da adição de álcoois com cadeia carbônica curta. Foram adicionadas concentrações entre 0,1 e 1,6 mol L⁻¹ de isobutanol e pentanol entre 0,1 e 0,5 mol L⁻¹, a soluções de surfactante 0,9% (m v⁻¹). Nos experimentos não foram utilizadas concentrações de isobutanol inferiores a 0,6 mol L⁻¹, já que não foi observada turvação em temperaturas inferiores a 100 °C.

Como observado na **Figura 12**, o efeito da adição de pentanol ao sistema em estudo foi mais pronunciado quando comparado à adição de isobutanol. Em ambos os casos, essa diminuição variou linearmente com a concentração dos aditivos.

Figura 12: Efeito da diminuição da TPN: (a) solução de OPEO30 0,9% (m v⁻¹) e (b) solução de OPEO35 0,9% (m v⁻¹) através da adição de diferentes concentrações de isobutanol e pentanol.



A seguir estão representadas as equações das curvas e seus respectivos coeficientes de determinação obtidos quando foram adicionados isobutanol (Equação 10) e pentanol (Equação 11) à solução de OPEO30 0,9% (m v⁻¹), e isobutanol (Equação 12) e pentanol (Equação 13) à solução de OPEO35 0,9% (m v⁻¹).

$$TPN_{OPEO30} = -82,206 C_{isobutanol} + 127,84 \quad (R^2 = 0,986) \quad (10)$$

$$TPN_{OPEO30} = -154,2 C_{pentanol} + 78,82 \quad (R^2 = 0,946) \quad (11)$$

$$TPN_{OPEO35} = -79,429 C_{isobutanol} + 135,70 \quad (R^2 = 0,989) \quad (12)$$

$$\text{TPN}_{\text{OPEO35}} = -327,1 C_{\text{pentanol}} + 161,11 \quad (R^2 = 0,964) \quad (13)$$

em que TPN representa a temperatura de ponto nuvem (em °C) da mistura do surfactante com o álcool, e $C_{\text{isobutanol}}$ e C_{pentanol} a concentração molar de isobutanol e de pentanol adicionada, respectivamente.

Gu e Galera-Gómez (1999) avaliaram o efeito de diferentes álcoois e solventes orgânicos polares sobre o ponto nuvem de uma solução aquosa de OPEO9.5. Os resultados mostraram que a adição de líquidos orgânicos polares infinitamente miscíveis em água, aumenta a temperatura de turvação do surfactante, enquanto que a adição de solventes orgânicos polares parcialmente solúveis em água, diminui o ponto nuvem. Resultados similares foram obtidos por Soni e colaboradores (2011), utilizando soluções aquosas de surfactantes de silicone.

Li e colaboradores (2009) estudaram o efeito da adição de álcoois com cadeia carbônica até cinco carbonos na temperatura de ponto nuvem do Tergitol 15-S-7. Foi observado um aumento da temperatura de turvação quando adicionado álcoois com até três carbonos, e efeito oposto na presença de butanol e pentanol. Resultados similares foram obtidos previamente por Gu e Galera-Gómez (1999), utilizando o OPEO9.5.

Dentre os álcoois utilizados neste estudo, o pentanol acarretou redução mais acentuada da TPN dos surfactantes utilizados. De acordo com Wang e Dai (2010), álcoois de cadeia longa são parcialmente solúveis em água, dessa maneira suas moléculas podem ser solubilizadas nas micelas e absorvidas na interface micela-água, acarretando crescimento da micela e diminuição da temperatura de ponto nuvem do surfactante.

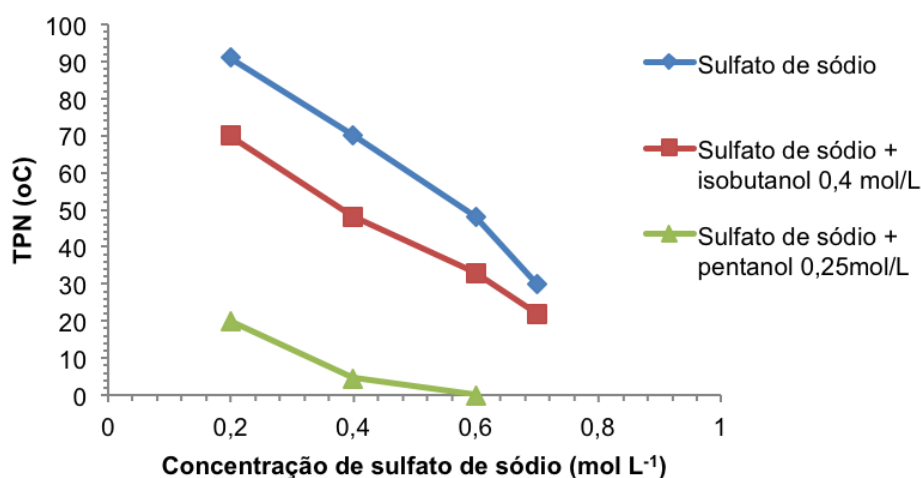
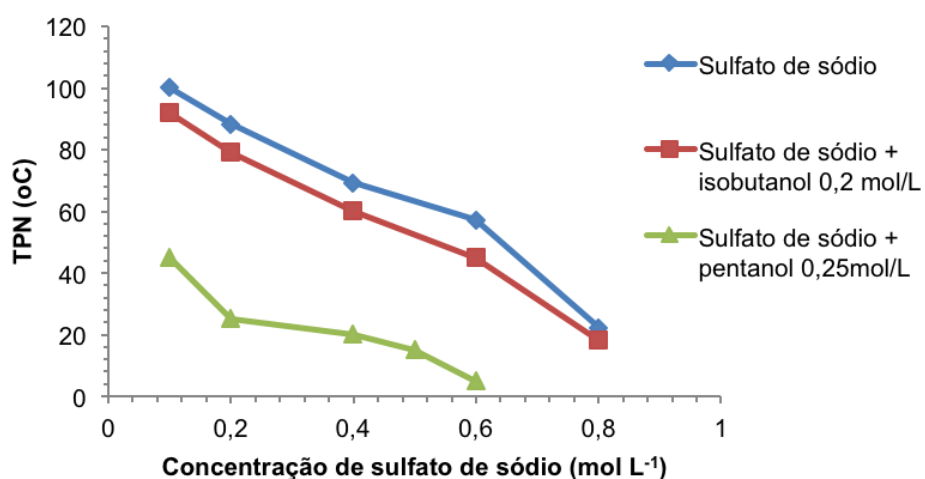
4.2.4. Efeito da adição da mistura de álcoois e sulfato de sódio

A combinação de aditivos adequados, como a mistura de sais inorgânicos e pentanol, podem produzir um efeito sinérgico na redução da TPN de surfactantes em aplicações que requerem baixas temperaturas de ponto nuvem. Em casos em que TPN do surfactante utilizado é muito alta, a adição

de sais não é suficiente para ocasionar uma redução na TPN, possibilitando que o procedimento seja realizado nas condições ambiente.

Neste trabalho, foram realizados experimentos misturando-se diferentes concentrações de sulfato de sódio a uma solução de isobutanol $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e de pentanol $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de OPEO30 $0,9\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$, e diferentes concentrações de sulfato de sódio a uma solução de pentanol $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e a uma solução de isobutanol $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ em presença de OPEO35 $0,9\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$ (**Figura 13**). Foi adicionada maior concentração de isobutanol devido ao menor efeito na diminuição da TPN do OPEO30.

Figura 13: Efeito da diminuição da TPN da solução de surfactante $0,9 \text{ \% (m v}^{-1}\text{)}$ através da adição da mistura de diferentes concentrações de sulfato de sódio e pentanol ou isobutanol. a) OPEO30 e b) OPEO35.



Os resultados ilustrados na **Figura 13** mostram que a adição de pentanol potencializa a diminuição da TPN ocasionada pela adição de sulfato de sódio a uma solução dos surfactantes utilizados. Isso ocorre porque o sulfato atua possibilitando a formação das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e competindo com o surfactante pela água de hidratação, ao mesmo tempo em que o pentanol se solubiliza nas micelas, fazendo com que estas cresçam, facilitando a separação de fases. Essa mistura indica uma alternativa para a realização de experimentos em condições ambiente.

4.3. Otimização multivariada do procedimento derivatização

O procedimento utilizado para a extração em ponto nuvem dos HPA foi adaptada do método proposto por Takagai e Hinze (2009), onde a EPN de alguns dos analitos foi estudada utilizando-se o surfactante OPEO7.5. Como os surfactantes utilizados neste trabalho possuem TPN superior à temperatura ambiente, fez-se necessária a adição de eletrólito com o intuito de reduzir essa temperatura próxima às condições ambiente.

O OPEO30 foi o surfactante escolhido para o desenvolvimento e validação do método de EPN por possuir menor número de unidades de óxido de etileno quando comparado com o OPEO35 e por não existirem na literatura resultados sobre os aspectos abordados neste trabalho.

Dentre os sais estudados, o sulfato de sódio proporcionou maior redução da TPN de uma solução de surfactante 0,9 % (m v⁻¹), sendo necessária a adição de 0,8 mol L⁻¹ do sal (concentração final) para a TPN do OPEO30 ser reduzida para 22 °C. Além da diminuição da TPN, a adição de sulfato de sódio diminui o teor de água dentro da micela devido à sua característica dessecante, fazendo com que o volume de fase rica seja menor e, conseqüentemente, seja obtido um maior fator de pré-concentração. Esse foi o fator determinante para a escolha desse sal já que após a EPN o coacervato será derivatizado e a presença de água nesse não permite que a reação de derivatização ocorra. De acordo com Li e colaboradores (2009), a adição de altas concentrações de sulfato de sódio nem sempre é favorável, devido à formação de fase rica em surfactante muito viscosa, sendo difícil a separação com a fase aquosa (pobre

em surfactante). Embora a temperatura de ponto nuvem da solução de surfactante com a adição de sulfato de sódio tenha sido reduzida à temperatura ambiente, fez-se necessário aquecimento da mistura em banho de água à 60 °C para acelerar a eliminação da água presente no interior da micela.

A adição de sulfato de sódio à mistura da amostra acarretou o aumento da densidade da fase aquosa, fazendo com que a fase rica em surfactante ficasse no topo do tubo de ensaio e não no fundo, dificultando assim a retirada da fase aquosa. Diante disso, avaliou-se qual procedimento reduziria a perda e / ou contaminação da amostra: retirada da fase rica em surfactante ou retirada da fase aquosa. Com a retirada da fase rica do tubo, observou-se perda dessa nas paredes da pipeta de Pasteur, acarretando diminuição do volume e não reprodutibilidade dos volumes finais, o que interfere no fator de pré-concentração. Retirando-se a fase aquosa, observou-se que não havia perda de fase rica, e conseqüentemente de analito, além do reduzido número de etapas de aquecimento / centrifugação / retirada da fase aquosa requeridas.

Após a etapa de extração e / ou pré-concentração dos analitos, foi realizada a derivatização da fase rica em surfactante resultante da EPN. Os reagentes de derivatização do tipo silil são sensíveis à umidade, dessa forma deve-se assegurar que a amostra e os solventes estejam em condições anidras. Se houver água na fase rica em surfactante, o reagente de trimetilsililação será hidrolisado, ocorrendo a formação de duas fases e a reação de derivatização não ocorrerá (KNAPP, 1979; TAKAGAI e HINZE, 2009).

Foram realizados vários testes, utilizando-se diferentes tempos e temperaturas de aquecimento da mistura da amostra, e diferentes velocidades e tempos de centrifugação, objetivando-se eliminação da água do coacervato. A cada teste realizado eram retiradas alíquotas de 30 µL da fase rica e em seguida realizada a adição de reagente de derivatização. No caso de formação de uma única fase, a amostra foi encaminhada para a injeção do CG-EM.

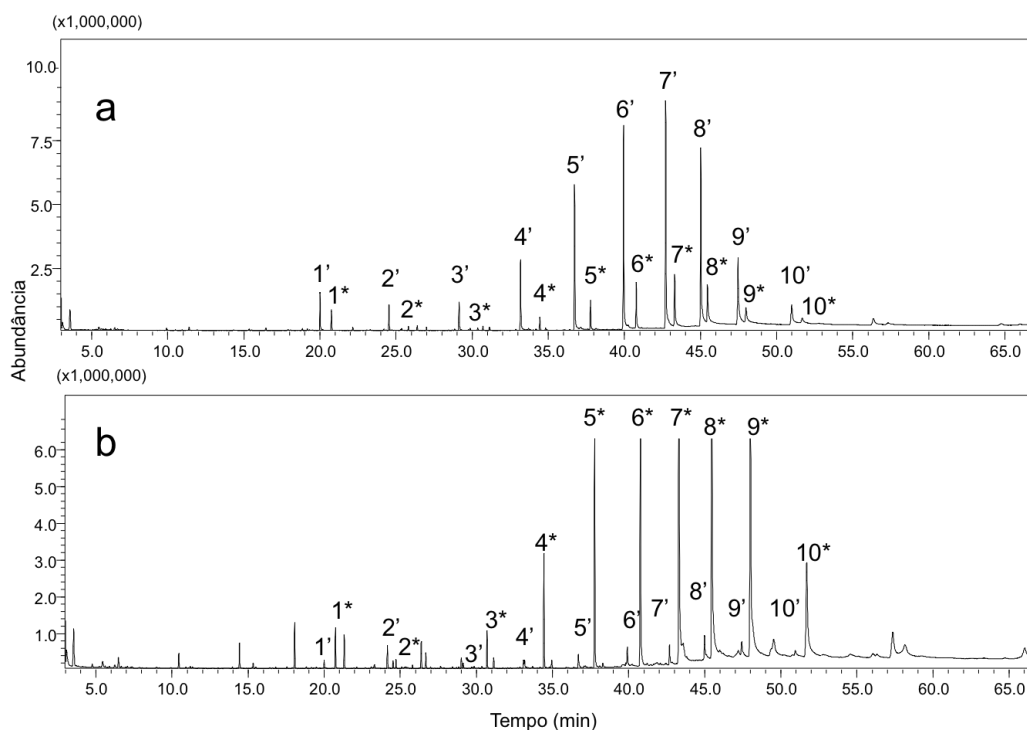
Durante os testes foram observadas diversas características após a adição do reagente de derivatização que indicaram a presença de água na fase rica em surfactante, como a formação de duas fases transparentes, formação de duas fases sendo uma transparente e outra leitosa e formação de precipitado.

Nos casos em que não ocorreu a formação de duas fases prosseguiu-se com a amostra para injeção em sistema cromatográfico, sendo o procedimento repetido várias vezes. Utilizou-se o BSTFA, já que esse reagente é o mais utilizado em reações de trimetilsililação (KNAPP, 1979; LOPES, 2011; OLIVEIRA, 2012).

Na **Figura 14** pode-se observar um cromatograma de uma amostra de laboratório, em que a extração em ponto nuvem foi realizada utilizando-se OPEO30, aquecida em banho de água à 60 °C por 10 min, e centrifugada à 3000 rpm por cinco min. Foram realizados três ciclos de centrifugação/ retirada de coacervato, seguido de derivatização utilizando 100 µL de piridina, como catalisador, com reação em banho de água à 80 °C por uma hora, utilizando-se 50 µL de BSTFA. Os picos marcados com um apóstrofe (') na Figura 14A, sempre estão seguidos por picos menores, marcados com asterisco (*), sendo os números que os acompanham referentes ao número de grupos oxietileno. De acordo com Takagai e Hinze (2009), os picos marcados com apóstrofe são referentes ao surfactante não derivatizado, e os picos marcados com asterisco, referem-se ao surfactante derivatizado. Sendo assim, fez-se necessária reação de derivatização sob novas condições experimentais. A reação foi realizada adicionando-se 100 µL de BSTFA.

Observa-se na Figura 14B, que houve inversão das intensidades dos picos ficando os picos com apóstrofe, que se referem ao surfactante não derivatizado, com menor intensidade e os picos com asterisco, referentes ao surfactante derivatizado, maiores, indicando que a eficiência da reação de derivatização melhorou de maneira apreciável. Porém ainda observou-se a presença de surfactante não derivatizado, indicado pelos picos com apóstrofe, que pode ficar retido na coluna, e danificar sua fase estacionária e, ainda, interferir na determinação dos analitos.

Figura 14: Cromatograma da fase rica em surfactante após a derivatização com BSTFA e piridina como catalisador antes da otimização das condições da reação de derivatização. a) com 50 μL de BSTFA e b) com 100 μL de BSTFA.



Com o objetivo de obter as condições em que a reação de derivatização se processa com eficiência adequada, mas sem interferir na determinação dos HPA, fez-se uma otimização multivariada, utilizando-se um planejamento fatorial completo em dois níveis com três variáveis (2^3), com triplicata do ponto central, gerando onze experimentos, visando avaliar a influência dos fatores na resposta. Como há uma relação direta entre a massa extraída e a resposta do detector utilizado neste trabalho, a resposta otimizada foi a área de pico para os compostos em estudo. Foram estudadas as variáveis que influenciam na área do pico, como o volume de reagente de derivatização, a temperatura e o tempo de reação, sendo o volume de piridina fixo em 100 μL .

Na **Tabela 4** está apresentada a matriz de planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central proposto. As replicatas dos pontos centrais foram usadas para estimar o erro experimental para o nível de confiança de 95%. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória.

Tabela 4: Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central para otimização da reação de derivatização da fase rica em surfactante resultante da extração em ponto nuvem de HPA.

Experimento	Níveis Codificados			Valores Reais		
	Volume BSTFA (μL)	Temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de reação (min)	Volume BSTFA (μL)	Temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de reação (min)
1	+	+	+	150	80	60
2	+	+	-	150	80	30
3	+	-	+	150	60	60
4	+	-	-	150	60	30
5	-	+	+	100	80	60
6	-	+	-	100	80	30
7	-	-	+	100	60	60
8	-	-	-	100	60	30
9 (PC)	0	0	0	125	70	45
10 (PC)	0	0	0	125	70	45
11 (PC)	0	0	0	125	70	45

Neste trabalho foi investigada a determinação de dezesseis HPA, sendo que, para cada corrida cromatográfica dezesseis respostas foram obtidas. Determinar um conjunto de níveis dos fatores ótimos para várias respostas, não é uma tarefa trivial, pois dificilmente os níveis dos fatores que são ótimos para uma determinada resposta, serão ótimos para as outras. Por esse motivo é importante considerar, de forma conjunta, o efeito dos fatores na resposta. Logo, a resposta dos experimentos foi avaliada em termos da soma das áreas de pico normalizadas dos analitos, ou seja, foi aplicado o conceito de resposta global (BEZERRA *et. al.*, 2006a).

A codificação dos resultados encontrados foi feita baseada no procedimento matemático conhecido como otimização de múltiplas respostas (*Multiple Response Optimization*), em que, a resposta global foi resultante da combinação das respostas individuais normalizadas, de acordo com a sensibilidade de cada analito, ou seja, a maior resposta encontrada no planejamento fatorial proposto (Equação 14) (BEZERRA *et. al.*, 2006a; ESCALEIRA, 2005). A escala adimensional foi feita para cada HPA separadamente e depois foram somados os valores apresentados por todos os HPA, em cada análise. Dessa forma, a otimização simultânea das várias respostas contemplará as condições ótimas em que a recuperação dos analitos em estudo tenderá ao máximo.

$$Resposta\ Global = \sum \left(\frac{\text{área do HPA}}{\text{área máx do HPA obtida no planejamento}} \right) \quad (14)$$

Na **Tabela 5** têm-se as áreas dos picos obtidas para cada HPA e a resposta global de cada experimento. Os dados experimentais foram processados utilizando o programa Statistica[®].

A partir da resposta global obtida para cada experimento do planejamento fatorial 2³ com triplicata do ponto central, foi plotado o diagrama de Pareto com o objetivo de avaliar se as variáveis estudadas, bem como suas interações, influenciam na resposta. Os dados mostraram que os três fatores estudados, no domínio experimental avaliado, são estatisticamente significativos para nível de confiança de 95% na determinação de HPA, sendo a resposta maximizada

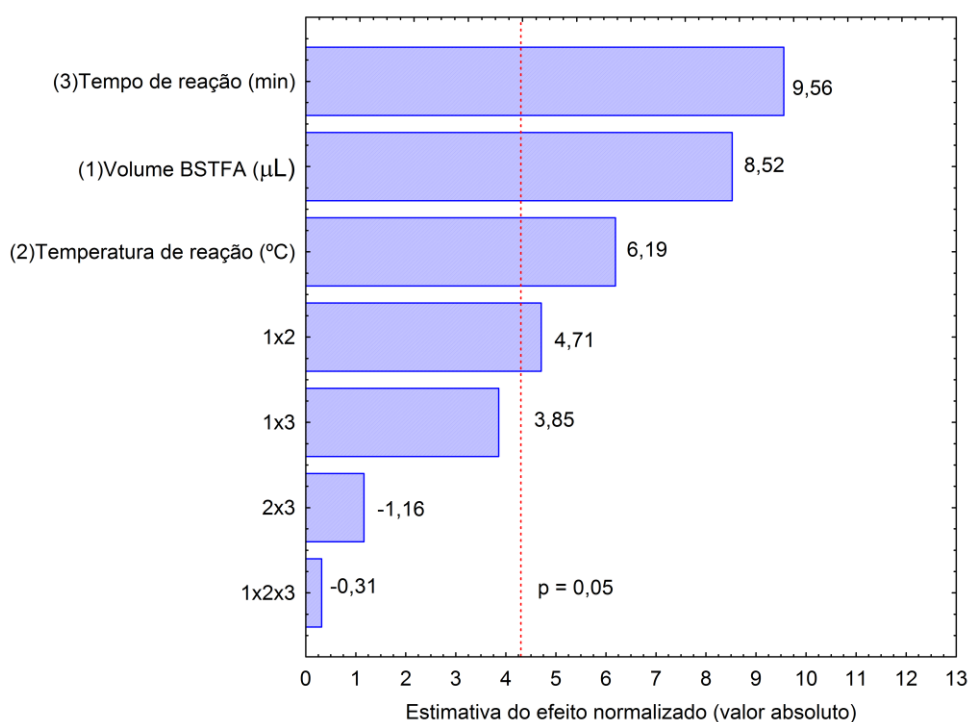
à medida que as condições tendem para o nível superior do planejamento, como pode ser visto na **Figura 15**.

O teste de curvatura (FERREIRA *et. al.*, 2011), também foi aplicado, com o valor calculado a partir da Equação 15.

$$\text{Curvatura} = A_{\text{Exp}} - A_{\text{PC}} \quad (15)$$

em que, A_{Exp} é a média das áreas obtidas através dos experimentos especificados no planejamento proposto, e A_{PC} , a média das respostas obtidas para o ponto central.

Figura 15: Diagrama de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 para otimização da reação de derivatização da fase rica em surfactante resultante da extração em ponto nuvem de HPA.



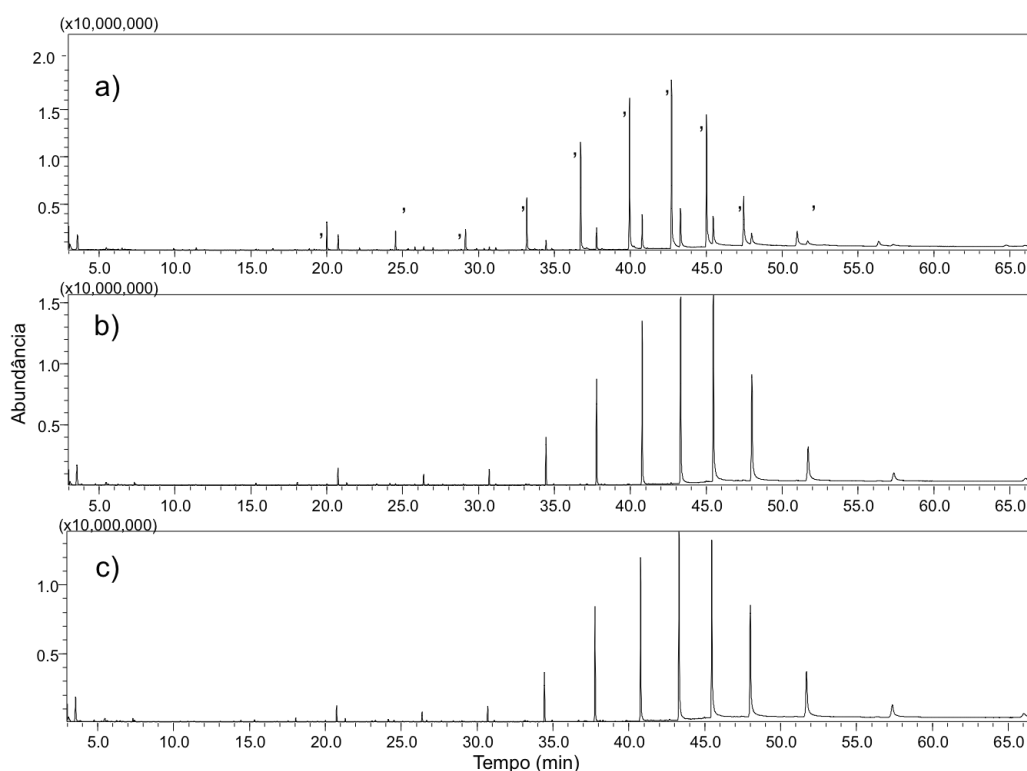
A diferença das médias obtidas, $A_{\text{Exp}} = 8,668$ e $A_{\text{PC}} = 14,977$, sugere uma curvatura negativa, o que significa que existe uma condição de máximo na região do ponto central do domínio experimental estabelecido no planejamento fatorial proposto.

Tabela 5: Respostas, em área de pico, para analitos em estudo, obtidas a partir da matriz de planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central para otimização da reação de derivatização da fase rica em surfactante resultante da extração em ponto nuvem de HPA.

Analito	Experimento										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Naftaleno	160113	120188	131225	93325	100709	94784	91464	86481	196634	173136	177607
Acenaftileno	68148	44436	50220	32968	37806	34447	35235	30793	74192	63049	68949
Acenafteno	52228	31008	38107	22269	25923	23996	24264	21758	54296	47010	46332
Fluoreno	36521	24595	27146	17692	19845	19195	19459	16783	41134	38111	36966
Fenantreno	21620	18072	17800	12393	13825	12963	13161	11771	25367	28731	23678
Antraceno	25345	19690	20311	12473	15554	14567	14803	12225	29053	30616	27262
Fluoranteno	10712	15300	12343	11376	11655	10704	11186	10421	16954	16983	17677
Pireno	10270	13818	11815	11122	11452	11328	10910	10188	16501	16686	17146
Benzo (a) antraceno	6272	5318	5270	3551	4764	3984	4636	3718	7833	7092	7380
Criseno	7487	6870	6483	4162	5785	5183	5478	4455	9703	9435	9328
Benzo(k) fluoranteno	5791	3736	4554	2335	3849	2669	3697	2563	6456	6097	5761
Benzo (b) fluoranteno	7590	4519	5916	3063	5061	3867	4962	3352	8647	8577	8002
Benzo (a) pireno	5318	3617	4283	2138	3315	2252	3353	2095	6004	5501	5535
Benzo (g,h,i) pirileno	4763	2788	3342	1476	2782	1762	2596	1774	4854	4606	4384
Indeno (1,2,3-cd) pireno	1932	943	1257	576	909	829	1404	675	2033	2044	2261
Dibenzo(a,h) antraceno	6586	5046	5204	2329	4141	2905	3766	3195	7012	7149	7630
RESPOSTA GLOBAL	13,300	10,066	10,747	6,709	8,754	7,437	8,581	6,806	15,572	14,977	14,845

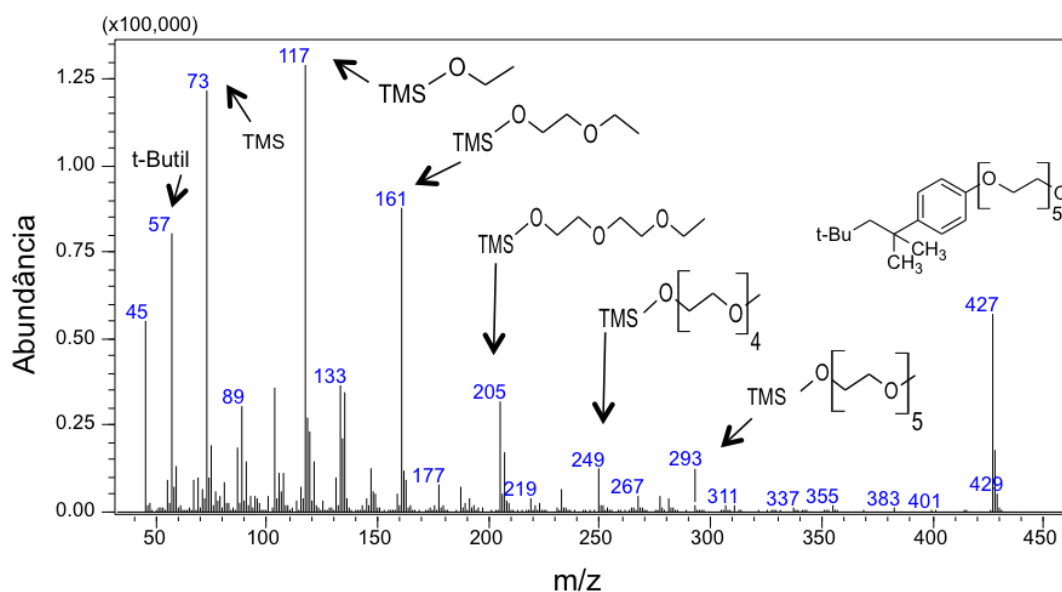
Uma outra etapa de avaliação dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial foi realizada através da análise do cromatograma obtido no modo *scan* para observação da ausência de picos cromatográficos referentes ao surfactante não derivatizado. A **Figura 16a** representa o cromatograma de uma reação de derivatização incompleta em que os picos marcados com apóstrofo (') representam picos de surfactante não derivatizado. Observa-se que, do ponto de vista da eficiência da reação de derivatização, podem ser utilizadas tanto as condições do experimento 1 (**Figura 16b**), quanto do experimento do ponto central (**Figura 16c**), onde não são observados picos de surfactante não derivatizado. Porém, do ponto de vista da determinação dos analitos, as condições dos experimentos do ponto central, como por exemplo, a temperatura de reação, diminuem os riscos de perda de analito por evaporação, como pode ser observado na **Tabela 5**.

Figura 16: Cromatogramas da fase rica em surfactante após a derivatização com BSTFA e piridina como catalisador, obtidos a partir do planejamento fatorial 2^3 realizado para a otimização da reação de derivatização da fase rica em surfactante resultante da extração em ponto nuvem de HPA. a) antes da otimização, b) condições experimentais do experimento 1 e c) condições experimentais do ponto central.



Na **Figura 17** está representado o espectro de massa do pico cromatográfico da **Figura 16c** no tempo de retenção 40,74 min para o TMS-OPEO30 ($n=6$), utilizando-se o BSTFA como reagente de silição. Durante a reação de derivatização, o hidrogênio ativo da hidroxila presente na molécula do surfactante não iônico foi substituído pelo grupo TMS, o que aumenta a sua volatilidade. Os fragmentos em $m/z = 117, 161, 205, 249$ e 293 , são resultantes das espécies TMS-polioxi-etileno, as quais diferem em número de unidades de óxido de etileno presente, cuja massa molecular é 44 u.m.a. Os picos em m/z iguais a 57 e 73 indicam a presença de fragmentos de terc-butil e TMS, respectivamente. O pico com m/z igual a 427, corresponde ao fragmento remanescente depois da dissociação do TMS das moléculas do OPEO30.

Figura 17: Espectro de massa do pico em 40,74 min do OPEO30 derivatizado, referente ao cromatograma c) da Figura 16, para $n = 6$ utilizando BSTFA, com o equipamento operando em modo de varredura (*scan*).



Não foi possível a visualização de todos os íons referentes à silição do OPEO30, como, por exemplo, o pico do íon molecular e as unidades de óxido de etileno maiores que dez. Como descrito anteriormente, o OPEO30 possui em média 30 unidades de óxido de etileno, sendo o pico do íon molecular $m/z > 700$, faixa não alcançada pelo detector de massa utilizado. Porém, os resultados obtidos, tanto no cromatograma, quanto no espectro de massa, indicam que a reação entre surfactantes OPEO30 e BSTFA foi essencialmente completa. Caso a reação não tivesse sido completa não haveria a presença do pico m/z

igual a 73. Não foi feita a identificação dos picos cromatográficos do TMS-OPEO30, devido à ausência de padrões e também por não ser objetivo do trabalho.

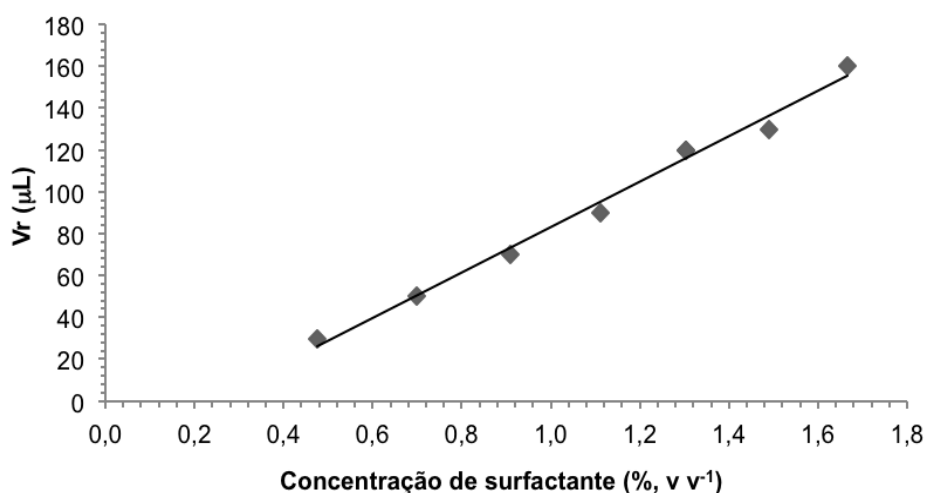
Com base na análise do diagrama de Pareto, no teste de curvatura e nos dados cromatográficos, pode-se concluir que, embora os fatores estudados influenciem na resposta com os níveis estudados tendendo ao máximo, as condições do ponto central representam uma situação em que a resposta analítica tende a ser maximizada, mantendo um compromisso na recuperação dos HPA, e, portanto, serão utilizadas no procedimento de derivatização. Dessa forma, a reação de derivatização de 30 μL de fase rica resultante da EPN será conduzida mediante adição de 125 μL de BSTFA, 100 μL de piridina e banho de água à 70°C por 45 minutos.

4.4 Otimização do procedimento de pré-concentração com EPN

Após a otimização do procedimento de derivatização, alguns aspectos referentes à EPN foram avaliados no intuito de obtenção de melhores recuperações. Foram avaliados o fator de pré-concentração, concentração de surfactante, temperatura e tempo de banho de água. As variáveis foram avaliadas de forma univariada. Em alguns casos, a faixa de estudo foi bastante reduzida para evitar a eliminação incompleta da água presente na fase rica em surfactante, o que impossibilita a reação de derivatização como descrito anteriormente.

As medidas de razão de volume de fases entre a fase aquosa (V_a) e a fase rica em surfactante (V_r), foram realizadas. Foram obtidos V_r entre 30 e 160 μL com concentração total de surfactante variando de 0,5 a 1,7 % ($v v^{-1}$). Na **Figura 18** está representada a relação entre V_r e a concentração de surfactante. Observa-se que há uma relação linear entre as variáveis em estudo, com $R^2 = 0,989$.

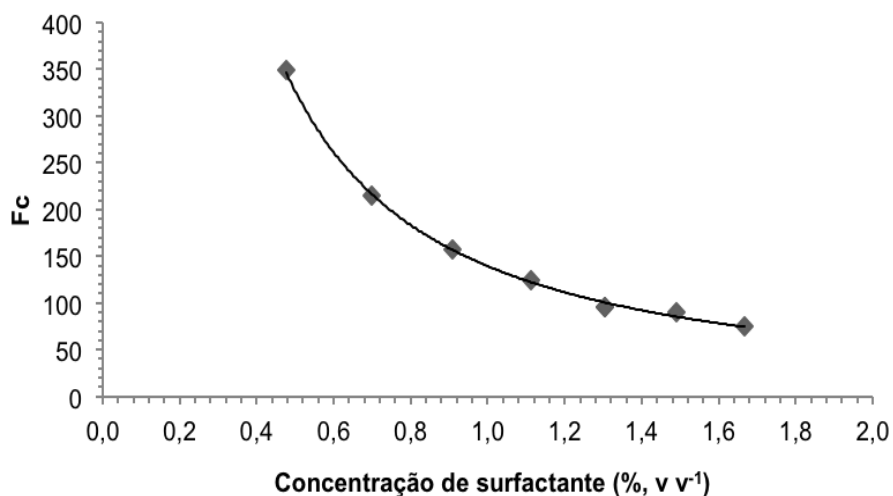
Figura 18: Volume de fase rica em surfactante (V_r) em função da concentração total de OPEO30 adicionado ao procedimento de EPN de HPA.



O fator de pré-concentração (F_c) foi obtido através da relação entre o volume de fase aquosa antes da EPN, e o volume de fase rica em surfactante após a EPN, ou seja, $F_c = V_{aq} / V_r$. O F_c depende do volume de fase rica em surfactante, e ao mesmo tempo varia com a concentração de surfactante na solução. Quanto maior a concentração de surfactante, maiores serão os volumes de fase rica em surfactante, resultando na diminuição do fator de pré-concentração (F_c).

Na **Figura 19** pode ser observada a influência da concentração do surfactante no fator de pré-concentração teórico. Uma condição de compromisso deve ser alcançada entre a concentração de surfactante necessária para atingir um F_c máximo e, ao mesmo tempo, fornecer um V_r adequado para a manipulação de volumes subsequentes e aumentar a eficiência da extração. Foi escolhida a concentração de 0,9 % (v v⁻¹) de surfactante, com F_c de 157. Neste trabalho, o F_c não foi o maior valor obtido, porém o volume de fase rica foi o fator determinante, já que desse volume foi tomado 30 µL para prosseguir com a derivatização.

Figura 19: Fator de pré-concentração (F_c) em função da concentração total de OPEO30 adicionado ao procedimento de EPN de HPA.



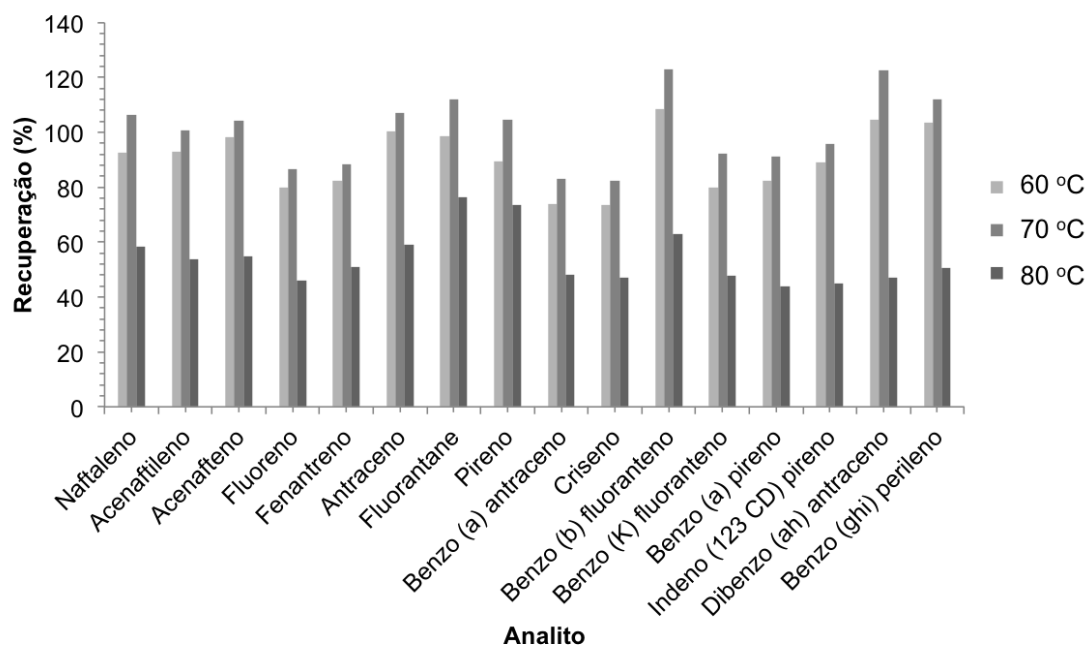
Para o cálculo das concentrações dos analitos nas amostras, deve-se levar em consideração a diluição do coacervato durante o procedimento de derivatização, já que após a EPN foi retirada uma alíquota de 30 μL e adicionada a essa 225 μL de reagentes para a derivatização (125 μL de BSTFA, 100 μL de piridina), perfazendo um total de 255 μL , ou seja, diluindo a fase rica 8,5 vezes. Desta forma o fator de pré-concentração final foi 18,5. Utilizou-se a Equação 16 para calcular a concentração real das amostras.

$$C_f = \frac{C_E \times F_D}{F_c} \quad (16)$$

em que, C_f é a concentração final da amostra; C_E , a concentração fornecida pelo CG-EM; F_D , fator de diluição (relação entre volume total da derivatização e o volume de amostra, 8,5) e F_c é o fator de pré-concentração.

Uma vez selecionada a concentração de surfactante, fez-se a avaliação da temperatura do banho de água. Os testes foram realizados em temperaturas a partir de 60 $^{\circ}\text{C}$, já que, abaixo desta, a eliminação de água na fase rica em surfactante não foi eficaz, o que inviabilizou a etapa de derivatização. Os resultados obtidos estão mostrados na **Figura 20**.

Figura 20: Efeito da temperatura do banho da EPN na recuperação dos analitos em estudo.



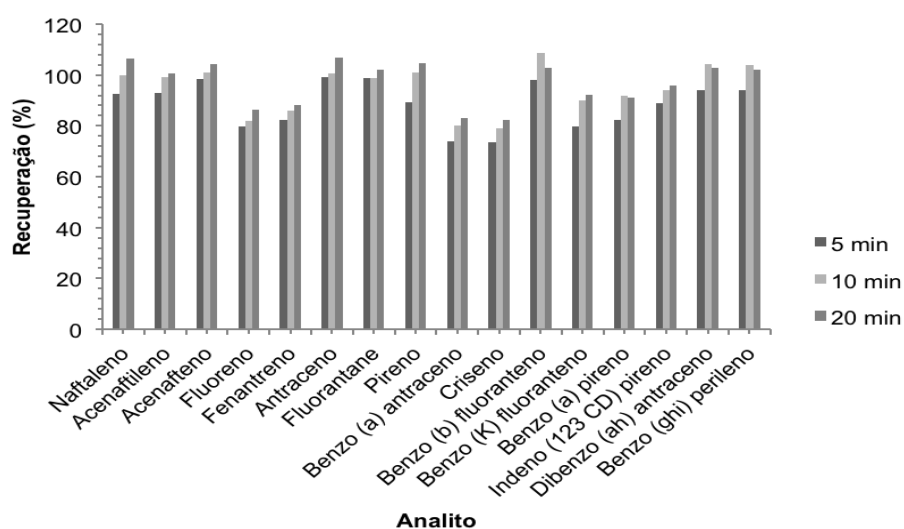
Observa-se uma evidente diminuição na recuperação dos HPA quando a temperatura do banho foi de 80 °C, possivelmente devido à perda de analito por evaporação devido à elevada temperatura. A temperatura do banho selecionada foi 70 °C, mesma temperatura em que ocorre a reação de derivatização, fazendo com que a velocidade analítica do procedimento fosse aumentada, já que não há necessidade de mudança na temperatura da placa de aquecimento utilizada durante a reação.

Delgado e colaboradores (2004) avaliaram o efeito da temperatura de banho na recuperação de 13 HPA. Foi observado que para temperaturas superiores a 80 °C, o percentual recuperação dos analitos foi inferior a 50%, e propuseram um método de EPN para determinar o HPA utilizando uma mistura de Pole / Brij 30, utilizando temperaturas de banho de 78 °C, temperatura na qual as recuperações estiveram entre 80 e 110 %.

Fixada a temperatura do banho, estudou-se a interferência do tempo de banho na recuperação dos HPA. Observa-se na **Figura 21** que, com cinco minutos as recuperações são menores do que as recuperações alcançadas

com os demais tempos estudados. Os resultados obtidos utilizando tempo de banho de 10 e 20 minutos estão próximos, devido a isso foi realizado o teste t-pareado para avaliar se há diferença entre os referidos resultados. O valor de t calculado, ao nível de significância de 5% ($p > 0,05$), foi 0,518, indicando que não há diferença no percentual de recuperação dos HPA, sugerindo que com 10 min a separação de fases já é efetiva, sendo esse tempo escolhido para o procedimento.

Figura 21: Efeito do tempo do banho de EPN na recuperação dos HPA no procedimento de EPN.



De acordo com a literatura (DELGADO *et. al.*, 2004; BEZERRA e FERREIRA, 2006b; LI *et. al.*, 2009; WANG e DAI, 2010), o tempo e a velocidade de centrifugação não são fatores críticos, porém não podem ser muito curtos. Pongpiachan (2009) pré-concentrou pireno em águas naturais utilizando EPN com tempo de centrifugação de 5 min a 3500 rpm. Bai e colaboradores (2001) determinaram alguns HPA utilizando tergitol 15-S-7 e centrifugando as amostras a 3000 rpm por 10 min. Stege e colaboradores (2009) utilizaram o procedimento otimizado de EPN para determinação de compostos fenólicos poluentes em águas naturais, centrifugando-as por 5 min a 3500 rpm. Utilizando as referências acima decidiu-se por centrifugar as amostras à 3000 rpm por 5 min e observou-se que esse tempo e a rotação utilizada foram suficientes para uma separação de fases adequada.

Após a avaliação das variáveis, foi proposto o seguinte procedimento de EPN para pré-concentração dos 16 HPA: adicionou-se 1,00 mL de OPEO30 10% (m v⁻¹), 10,00 mL de amostra, 1,25 g de sulfato de sódio anidro em um tubo cônico de vidro com tampa. Em seguida, submeteu-se a amostra a um banho à 70 °C por 10 min. A próxima etapa foi a centrifugação da amostra à 3000 rpm por cinco min. A fase aquosa, mais densa, foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e descartada. O processo de aquecimento / centrifugação / retirada de fase aquosa foi repetido por mais três vezes, quando não foi mais observada a formação de duas fases. Da fase rica em surfactante resultante, 70 µL, foi retirada uma alíquota de 30 µL, e realizada a derivatização conforme procedimento descrito no item 4.3, e posterior detecção por CG-EM.

4.5 Validação do método analítico

A validação é um processo para mostrar se o método analítico é capaz de produzir resultados confiáveis para a finalidade a que se destina. Para alcançar esse objetivo, foi necessária a verificação de alguns parâmetros de desempenho como a especificidade, seletividade, limite de detecção e de quantificação, exatidão e precisão (OLIVEIRA, 2012).

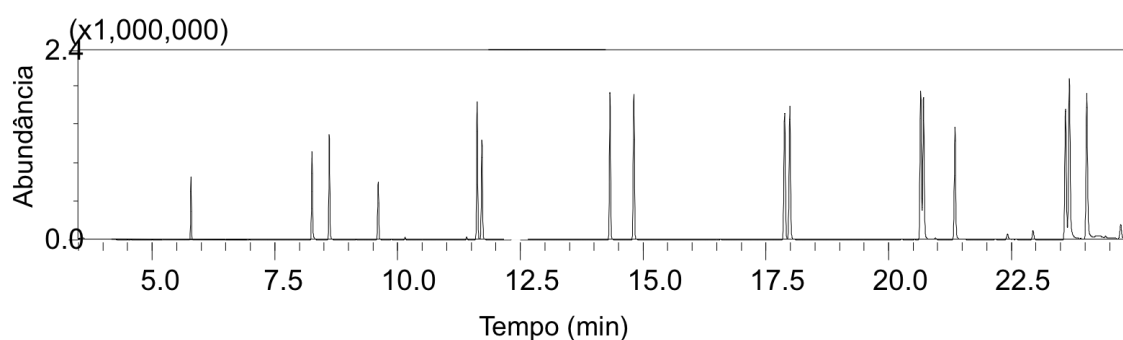
4.5.1. Especificidade e seletividade

Em virtude da ausência de um material certificado de referência, para o estudo destes parâmetros de validação, foi utilizada a matriz de água natural isenta dos analitos, fortificada com uma solução em metanol contendo os 16 analitos estudados. Estabeleceu-se a área dos picos como a medida da resposta do detector.

Para métodos cromatográficos, a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico), seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (OLIVEIRA, 2012). Para este teste, os compostos foram avaliados, de acordo com a sensibilidade, na concentração 500 µg L⁻¹. Foi injetado o padrão diluído em diclorometano e

adicionado na amostra após a EPN e derivatização, para que fosse possível a comparação das intensidades dos sinais, na presença e na ausência da matriz derivatizada. Os resultados foram obtidos no modo de aquisição SIM (**Figura 22**).

Figura 22: Cromatograma da matriz de água natural na presença de HPA na concentração final $500 \mu\text{g L}^{-1}$, após EPN utilizando o OPEO30, seguido de derivatização, obtido no modo SIM.



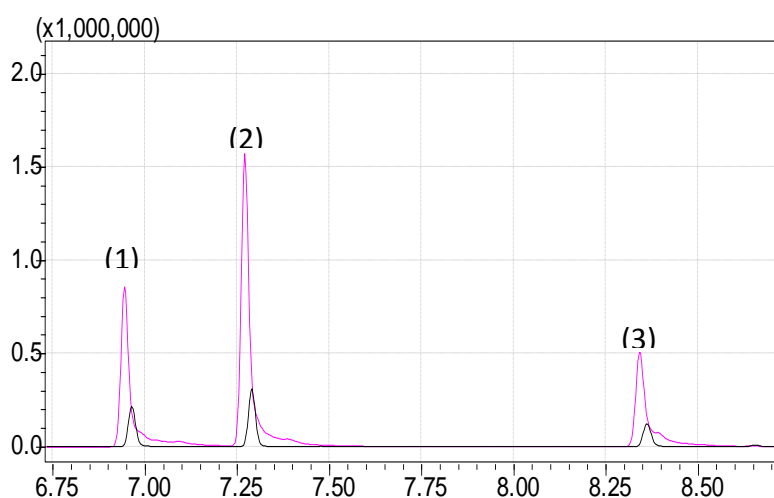
Analisando o cromatograma da **Figura 22**, observou-se a separação de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método analítico proposto, além da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção específicos dos analitos, ou seja não há co-eluição dos picos referentes ao surfactante derivatizado em tempos de retenção próximos aos dos HPA determinados desse trabalho.

A comparação do cromatograma de um padrão de HPA isento da matriz derivatizada (cromatograma em preto, **Figura 23**) com o cromatograma de um padrão de HPA misturado aos derivados trimetilsilil do OPEO30 – BSTFA (cromatograma em rosa, **Figura 23**), indica que não houve mudança nos tempos de retenção dos analitos, quando a fase rica em surfactante derivatizada contendo os HPA foi injetada.

Uma maneira de avaliar o efeito da matriz da amostra na determinação do analito é preparar duas curvas analíticas dos padrões dos analitos, sendo uma em solvente puro e outra no extrato da matriz, ou seja, na fase rica em surfactante derivatizada, chamado de método da superposição de matriz. A partir das diferenças entre os parâmetros da análise de regressão linear (coeficientes angular e linear) de ambas as curvas, uma função de correção é

determinada e validada por tratamento estatístico (ESCALEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

Figura 23: Cromatograma CG-EM dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (1) acenaftileno, (2) acenafteno e (3) floureno. (-) representa o cromatograma obtido após a injeção de uma solução padrão desses analitos. (-) representa o cromatograma observado após injeção da fase rica em surfactante do OPEO30 derivatizada.



Cardoso (2008) realizou a avaliação do efeito matriz por comparação da resposta do detector (áreas dos picos) das soluções padrão dos agrotóxicos em solvente (isooctano) com aquelas preparadas com o extrato branco da polpa de tomate em isooctano, em todos níveis de concentração estudados. Quando a média das respostas das soluções preparada na matriz for $\geq 20\%$ das médias das respostas das soluções preparadas em solvente, este efeito pode ser considerado significativo nos resultados analíticos quantitativos da amostra.

Pinho e colaboradores (2010) observou para quatro agrotóxicos que as curvas de calibrações se diferenciam tanto pelo coeficiente angular quanto linear. Foram calculadas as razões entre os coeficientes angulares das curvas de calibração obtidas em extratos da matriz e em solvente. Quando a razão foi superior a $1,0 \pm 0,2$ o efeito de matriz foi considerado positivo, enquanto que valor inferior a $1,0 \pm 0,2$ indicou um efeito de matriz negativo.

Na **Tabela 6** são apresentados os efeitos na matriz resultante da EPN após a derivatização do coacervato observados de acordo com as indicações de Pinho e colaboradores (2010) e Cardoso (2008). É mostradas também a razão entres os coeficientes angulares (RCA), descrita pela Equação 17:

$$RCA = CA_{CM} / CA_{SM} \quad (17)$$

em que CA_{CM} é o coeficiente angular da curva com matriz e CA_{SM} , o coeficiente angular da curva sem matriz.

Observa-se que as inclinações das curvas de calibração com e sem matriz para os analitos, são muito diferentes. O efeito da matriz, avaliado por ambos modelos propostos, foi observado para todos os dezesseis HPA, sendo necessária a preparação de uma curva de calibração na presença da matriz, a qual tem a vantagem de incorporar uma correção na recuperação nos resultados obtidos, e assim mostrar um valor mais próximo do real.

O efeito matriz na resposta cromatográfica observado pode causar um aumento ou diminuição da resposta do detector a um analito, presente no extrato da amostra quando comparado ao mesmo analito presente em solvente orgânico. A razão obtida entre os coeficientes angulares - RCA (matriz derivatizada e solvente) indicou o erro associado ao efeito de matriz para cada HPA, sendo todas as razões determinadas maiores do que a unidade, indicando que a presença da matriz acarreta um aumento do sinal analítico, superestimando a concentração do analito na amostra, sendo que essa razão foi maior para os compostos com maior massa molecular.

De acordo com Pinho e colaboradores (2009), quando a curva de calibração é preparada em solvente puro e analisada por cromatografia à gás, os sítios ativos do *liner* do injetor estão disponíveis para a retenção dos analitos e, assim, menor quantidade é transferida para a coluna e conseqüentemente detectada. Porém, na análise do extrato da matriz contendo os analitos, ocorre uma competição entre os componentes da matriz e os analitos pelos sítios ativos do injetor.

Tabela 6: Efeito da resposta cromatográfica induzida pela presença da matriz resultante da EPN após a derivatização do coacervato.

Analito	Curva com matriz	Curva sem matriz	Varição ≥ 20% da resposta (área medida)	RCA
Naftaleno	Área = 805,4 C + 26446 R ² = 0,9902	Área = 440,4 C + 27848 R ² = 0,9974	Curva com matriz > Curva sem matriz	1,83
Acenaftileno	Área = 1214,5 C + 5882 R ² = 0,9938	Área = 444,5 C – 1862 R ² = 0,9971	Curva com matriz > Curva sem matriz	2,73
Acenafteno	Área = 746,5 C + 14024 R ² = 0,9928	Área = 299,4 C – 3305 R ² = 0,9974	Curva com matriz > Curva sem matriz	2,49
Fluoreno	Área = 1051,6 C – 1968 R ² = 0,9954	Área = 329,2 C – 13630 R ² = 0,9916	Curva com matriz > Curva sem matriz	3,19
Fenantreno	Área = 1997,8 C – 45774 R ² = 0,9954	Área = 451,9 C – 15706 R ² = 0,9900	Curva com matriz > Curva sem matriz	4,42
Antraceno	Área = 1699,9 C – 119066 R ² = 0,9952	Área = 467,3 C – 29341 R ² = 0,9911	Curva com matriz > Curva sem matriz	3,63
Fluoranteno	Área = 2057,5 C – 87838 R ² = 0,9925	Área = 459,4 C – 33368 R ² = 0,9925	Curva com matriz > Curva sem matriz	4,47
Pireno	Área = 2049,7 C – 99795 R ² = 0,9922	Área = 443 C – 23213 R ² = 0,9964	Curva com matriz > Curva sem matriz	4,62
Benzo (a) antraceno	Área = 2046,3 C – 141666 R ² = 0,9905	Área = 313,4 C – 18766 R ² = 0,9917	Curva com matriz > Curva sem matriz	6,52
Criseno	Área = 2119,3 C – 149846 R ² = 0,9910	Área = 275,7 C – 14547 R ² = 0,9932	Curva com matriz > Curva sem matriz	7,68
Benzo(k) fluoranteno	Área = 2386,8 C – 95441 R ² = 0,9915	Área = 371,2 C – 11989 R ² = 0,9972	Curva com matriz > Curva sem matriz	6,42
Benzo (b) fluoranteno	Área = 2379,1 C – 147876 R ² = 0,9905	Área = 336,4 C – 15730 R ² = 0,9956	Curva com matriz > Curva sem matriz	7,07
Benzo (a) pireno	Área = 2022,5 C – 115862 R ² = 0,9905	Área = 328,8 C – 15038 R ² = 0,9957	Curva com matriz > Curva sem matriz	6,15
Benzo (g,h,i) pirileno	Área = 2578,6 C – 36725 R ² = 0,9931	Área = 416,9 C – 19508 R ² = 0,9927	Curva com matriz > Curva sem matriz	6,18
Indeno (1,2,3-cd) pireno	Área = 2022,5 C – 98326 R ² = 0,9902	Área = 346,6 C – 21684 R ² = 0,9928	Curva com matriz > Curva sem matriz	5,83
Dibenzo(a,h) antraceno	Área = 667,7 C + 25501 R ² = 0,9930	Área = 124,5 C – 3492 R ² = 0,9966	Curva com matriz > Curva sem matriz	5,36

RCA = razão entre os coeficientes angulares da curva com matriz e da curva sem matriz

Devido ao acentuado efeito de matriz, as curvas de calibração, para a determinação da concentração dos dezesseis HPA das amostras, foram construídas na presença da matriz de surfactante derivatizado, isento dos analitos em estudo, ou seja, a partir do branco do procedimento proposto. Dessa forma, os próprios componentes da matriz ocupam os sítios ativos durante a análise do padrão, assim como ocorre nas análises da matriz derivatizada. Essa é uma metodologia muito utilizada nas análises interlaboratoriais, a fim de minimizar a diferença entre os resultados, associada ao efeito de matriz (PINHO *et. al.*, 2010).

4.5.2. Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção do método (LDM) e de quantificação do método (LQM) foram estabelecidos com base no método da relação sinal / ruído (S/R) onde se aceita a estimativa de 3:1, ou seja, o sinal produzido através da resposta da injeção de uma amostra com concentração conhecida do analito de interesse proporciona um sinal 3 vezes maior do que o sinal do ruído da linha de base do cromatograma de um branco (RIBANI *et. al.*, 2004; CARDOSO, 2008). Esta relação (S/R) foi calculada pelo software CGMSsolution do cromatógrafo Shimadzu GC2010 acoplado ao espectrômetro de massa Shimadzu QP 2010 *Plus*.

Para o cálculo do LDM e do LQM, seis replicatas genuínas, de uma amostra de água subterrânea foram fortificadas numa concentração conhecida de 1 µg L⁻¹ e pré-concentradas por EPN. Os resultados analíticos da fase rica em surfactante derivatizada dessas amostras foram utilizados para estabelecer a relação sinal/ruído (S/R). Em seguida, foram determinadas as médias e os desvios padrão das respostas obtidas das injeções realizadas das replicatas de cada concentração e os valores dos limites calculados. Foram utilizadas as equações abaixo:

$$LDM = \frac{Conc. S/R \ 3:1 \times 3 \times S}{\bar{X}} \quad (18)$$

$$LQM = \frac{Conc. S/R 3:1 \times 10 \times S}{\bar{X}} \quad (19)$$

em que concentração S/R 3:1 = concentração injetada que produziu uma resposta na razão sinal/ruído (S/R) de aproximadamente 3 x sobre o ruído da linha base do branco; S = desvio padrão das respostas medidas (áreas) e X corresponde à média das respostas medidas (áreas) (CARDOSO, 2008). Os limites calculados (**Tabela 7**) levam em consideração o fator de pré-concentração da EPN.

Pongpiachan (2009) determinou pireno e benzo(a)pireno em águas naturais, utilizando EPN com OPEO7.5 seguido por quantificação por CLAE e detecção por fluorescência obtendo limites de detecção de 1,8 e 0,6 ng L⁻¹ para o pireno e benzo(a)pireno, respectivamente. Delgado e colaboradores (2004) utilizaram a EPN com POLE/Brij 30 seguido de quantificação por CLAE e detecção fluorimétrica para a determinação de 13 HPA e obtiveram limites de detecção entre 23 e 231 ng L⁻¹.

Tabela 7: Limites de detecção e de quantificação do método proposto.

Analito	LDM (ng L ⁻¹)	LQM (ng L ⁻¹)
Naftaleno	37	123
Acenaftileno	49	163
Acenafteno	53	176
Fluoreno	49	163
Fenantreno	12	39
Antraceno	21	70
Fluoranteno	18	59
Pireno	26	86
Benzo (a) antraceno	33	110
Criseno	21	70
Benzo(k) fluoranteno	23	77
Benzo (b) fluoranteno	24	80
Benzo (a) pireno	22	73
Benzo (g,h,i) pirileno	34	113
Indeno (1,2,3-cd) pireno	23	77
Dibenzo(a,h) antraceno	19	63

Ferrer e colaboradores (1996) determinaram 15 HPA em amostras de água utilizando EPN e OPEO7.5 seguido por quantificação por CLAE e detecção fluorimétrica, obtendo limites de detecção entre 0,3 e 11,6 ng L⁻¹. Pinto e colaboradores (1994) determinaram dez HPA em águas utilizando EPN e OPEO7.5 com posterior determinação por CLAE e detecção por fluorescência com limites de detecção variando de 0,002 a 0,12 µg L⁻¹.

Não há na literatura nenhum registro da utilização de CG-EM como etapa posterior à EPN para a determinação de HPA, não podendo os limites de detecção aqui encontrados serem comparados em sua plenitude. De qualquer maneira, os limites determinados neste trabalho estão compatíveis com os limites encontrados na literatura, quando utilizada a EPN com outras formas de detecção.

4.5.3. Precisão e exatidão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Uma das formas de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O valor aceitável do CV depende do nível de concentração analisada e da complexidade da matriz considerada. Para análise de traço ou impurezas, aceita-se um CV de até 20% (OLIVEIRA, 2012).

A realização dos experimentos de recuperação proporcionaram a verificação da exatidão do método analítico através da comparação da concentração real de cada HPA adicionado à amostra antes do procedimento de EPN, com aquela encontrada após o procedimento. O teste de adição e recuperação constitui uma das técnicas mais utilizadas para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade adicionada na amostra (TAECHEGAN *et. al.*, 2009; RIBANI *et. al.*, 2004; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

Nos ensaios de recuperação, as amostras fortificadas foram preparadas em três diferentes concentrações 50, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo seis replicatas de cada concentração ($n = 6$). O cálculo do percentual de recuperação (R, %) foi realizado utilizando-se a Equação 17 (TAECHEGAN *et. al.*, 2009):

$$R (\%) = \left(\frac{C_{surf. fase rica} \times V_{surf. fase rica}}{C_o \times V_o} \right) \times 100 \quad (20)$$

em que, C_o e V_o são concentração e volume iniciais do HPA antes da EPN e C_{surf} e V_{surf} representam a concentração e o volume do HPA na fase rica em surfactante.

Na **Tabela 8** tem-se os resultados dos testes de adição e recuperação para cada um dos HPA nos três níveis estudados. Com o intuito de avaliar a dispersão dos resultados, os coeficientes de variação (CV) das sextuplicatas, para todos os compostos, foram calculados em três níveis de concentrações. Observa-se que para todos os analitos os coeficientes de variação estão entre 1,3 e 10,3 %, portanto, dentro do limite indicado considerado ideal para a análise de traços.

Observa-se na **Tabela 8** que recuperações foram aceitáveis para todos os HPA, nos três níveis de concentração estudados, utilizando-se o OPEO30 nas condições otimizadas do procedimento. Para adição de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ os valores de recuperações obtidos variaram entre $(70,6 \pm 1,4)$ e $(90,0 \pm 10,3)$ %. Adicionando-se 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos HPA foram obtidas recuperações que oscilaram entre $(80,2 \pm 3,0)$ e $(98,0 \pm 3,3)$ %. Quando da adição de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solução de HPA, os valores de recuperações obtidos variaram entre $(72,0 \pm 2,6)$ e $(85,7 \pm 2,0)$ %.

Os resultados de recuperação encontrados para o método proposto estão de acordo com os dados disponíveis na literatura. Pongpiachan (2009) obteve entre 90 e 95% da concentração adicionada do benzo(a)pireno e pireno, respectivamente, em águas naturais, utilizando EPN com OPEO7.5, seguido por quantificação por CLAE e detecção por fluorescência. Delgado e colaboradores (2004) determinaram 13 HPA utilizando a EPN com POLE / Brij

30, seguido de quantificação por HPLC e detecção fluorimétrica, com recuperações entre 72,0 e 98,8 %. Ferrer e colaboradores (1996) determinaram 15 HPA em amostras de água utilizando EPN e OPEO7.5, seguido por quantificação por CLAE e detecção fluorimétrica, obtendo recuperações entre 80 e 100 %.

Neste trabalho, também foi utilizada a comparação de métodos como estratégia de validação e para avaliar a exatidão do método de EPN com derivatização da fase rica em surfactante OPEO30 e posterior determinação por CG-EM. Para a comparação utilizou-se o procedimento proposto pela USEPA, ou seja, a extração líquido-líquido com solventes orgânicos e determinação por CG-EM conforme o método 3510C (USEPA, 1996).

Foram avaliadas as eficiências de extração das amostras de água coletadas. O desvio padrão relativo (% RSD) foi calculado através da medida de triplicatas. A **Tabela 9** mostra a concordância obtida, quando se analisa uma amostra real de água subterrânea, com o método proposto (EPN + CG-EM) e utilizando um método USEPA 3510C (ELL + CG-EM). As amostras foram fortificadas com uma solução mista contendo os 16 HPA com concentração final de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Pode ser observado pelos dados da **Tabela 9**, que o método de extração em ponto nuvem proposto apresenta elevada eficiência de extração dos analitos em estudo, superior ao método de referência, principalmente nos quatro primeiros analitos, com recuperações variando entre 90,0 e 97,5 %. Isso é justificado pela perda destes por evaporação já que possuem elevada pressão de vapor. Além disso, o método proposto apresenta como principal vantagem frente a ELL, a não utilização de solventes tóxicos em grandes volumes e o reduzido volume de amostra, já que no método de referência foram utilizados 500 mL de amostra, e no método usando EPN, somente 10 mL.

Tabela 8: Recuperações do HPA adicionados em amostras de águas subterrâneas utilizando EPN/ CG-EM desenvolvido.

Analito	Nível baixo (50 µg L ⁻¹)		Nível médio (500 µg L ⁻¹)		Nível alto (1000 µg L ⁻¹)	
	C _{Encontrada} (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)	C _{Encontrada} (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)	C _{Encontrada} (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Naftaleno	44,98 ± 0,10	90,0 ± 10,3	415,82 ± 0,02	90,0 ± 2,1	857,12 ± 0,10	85,7 ± 2,0
Acenaftileno	43,26 ± 0,05	86,5 ± 6,0	482,16 ± 0,05	96,4 ± 4,6	810,65 ± 0,03	81,1 ± 2,8
Acenafteno	42,59 ± 0,07	85,2 ± 6,8	479,91 ± 0,04	96,0 ± 4,0	848,05 ± 0,07	84,8 ± 6,8
Fluoreno	39,99 ± 0,05	80,0 ± 4,7	454,75 ± 0,08	90,9 ± 7,7	788,62 ± 0,06	78,9 ± 5,7
Fenantreno	39,67 ± 0,03	79,3 ± 2,7	457,56 ± 0,03	91,5 ± 3,0	720,38 ± 0,03	72,0 ± 2,6
Antraceno	44,73 ± 0,03	89,5 ± 2,9	490,12 ± 0,03	98,0 ± 3,3	810,20 ± 0,07	81,0 ± 6,8
Fluoranteno	41,81 ± 0,01	83,6 ± 1,3	473,38 ± 0,03	94,7 ± 2,9	767,34 ± 0,09	76,7 ± 9,2
Pireno	43,21 ± 0,02	86,4 ± 1,8	476,77 ± 0,03	95,4 ± 2,7	775,36 ± 0,09	77,5 ± 9,2
Benzo (a) antraceno	44,14 ± 0,02	88,3 ± 1,6	482,58 ± 0,03	96,5 ± 2,8	775,00 ± 0,10	77,5 ± 9,6
Criseno	44,38 ± 0,02	88,8 ± 1,6	482,85 ± 0,03	96,6 ± 3,1	760,06 ± 0,09	76,0 ± 8,6
Benzo(k) fluoranteno	42,03 ± 0,02	84,1 ± 1,7	483,42 ± 0,03	96,7 ± 2,6	790,09 ± 0,08	79,0 ± 7,8
Benzo (b) fluoranteno	43,42 ± 0,02	86,8 ± 1,8	478,69 ± 0,02	95,7 ± 1,5	755,71 ± 0,08	75,6 ± 7,8
Benzo (a) pireno	44,95 ± 0,02	89,9 ± 1,6	455,63 ± 0,07	91,1 ± 6,7	808,05 ± 0,09	80,8 ± 9,2
Benzo (g,h,i) pirileno	37,94 ± 0,02	75,9 ± 1,9	437,00 ± 0,07	87,4 ± 7,2	723,57 ± 0,09	72,4 ± 9,4
Indeno (1,2,3-cd) pireno	40,35 ± 0,02	80,7 ± 1,8	459,18 ± 0,04	91,8 ± 3,6	744,05 ± 0,07	74,4 ± 7,1
Dibenzo(a,h) antraceno	35,32 ± 0,01	70,6 ± 1,4	401,00 ± 0,03	80,2 ± 3,0	745,84 ± 0,05	74,6 ± 5,3

Tabela 9: Comparação do método proposto (EPN) com o método de referência (CG-EM), na quantificação dos 16 HPA em uma amostra de água subterrânea.

Analito	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO		EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM	
	C ± RSD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação ± RSD (%)	C ± RSD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação ± RSD (%)
Naftaleno	0,11 ± 0,20	0,1 ± 2,5	91,60 ± 0,10	91,6 ± 9,9
Acenaftileno	não detectado	0,0	90,20 ± 0,03	90,2 ± 2,8
Acenafteno	não detectado	0,0	96,67 ± 0,01	96,7 ± 1,3
Fluoreno	0,24 ± 0,10	0,2 ± 10,1	95,05 ± 0,02	95,0 ± 1,7
Fenantreno	101,46 ± 0,06	101,3 ± 6,4	96,53 ± 0,03	96,5 ± 2,9
Antraceno	97,92 ± 0,02	97,9 ± 1,6	93,62 ± 0,05	93,2 ± 6,1
Fluoranteno	92,94 ± 0,02	92,9 ± 1,8	90,05 ± 0,01	90,0 ± 1,2
Pireno	95,23 ± 0,03	95,2 ± 2,9	93,97 ± 0,02	94,0 ± 1,8
Benzo (a) antraceno	92,65 ± 0,02	82,6 ± 1,7	94,90 ± 0,02	94,9 ± 1,6
Criseno	95,58 ± 0,05	95,6 ± 6,8	93,96 ± 0,04	94,0 ± 3,5
Benzo(k) fluoranteno	95,15 ± 0,02	95,1 ± 4,0	91,47 ± 0,07	91,5 ± 6,7
Benzo (b) fluoranteno	92,09 ± 0,04	92,1 ± 1,6	92,15 ± 0,05	92,1 ± 5,9
Benzo (a) pireno	96,65 ± 0,05	96,6 ± 2,7	93,34 ± 0,01	93,3 ± 1,3
Benzo (g,h,i) pirileno	90,98 ± 0,03	91,0 ± 7,7	92,86 ± 0,03	92,9 ± 2,7
Indeno (1,2,3-cd) pireno	101,44 ± 0,08	101,4 ± 3,6	96,55 ± 0,02	96,5 ± 1,7
Dibenzo(a,h) antraceno	90,73 ± 0,04	90,7 ± 6,0	97,52 ± 0,04	97,5 ± 3,7

Os parâmetros de validação verificados: seletividade, efeito de matriz, linearidade, limite de detecção e de quantificação, exatidão e precisão, mostraram que o método proposto atende com eficiência a extração dos 16 HPA prioritários em água subterrânea, empregando a EPN com derivatização do surfactante, e análise por cromatografia à gás. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados foram compatíveis ao do método de referência e aos reportados na literatura de extração em ponto nuvem.

4.6 Aplicação do método analítico proposto

O método desenvolvido de extração em ponto nuvem com derivatização da fase rica em surfactante OPEO30, e detecção por CG-EM após ser validado foi aplicado em dez amostras de água subterrânea coletadas em postos de gasolina na cidade de Salvador.

As amostras foram coletadas em janeiro de 2013, sendo os pontos de coleta escolhidos com base nos resultados de concentrações de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) obtidos por Bezerra (2011) em postos de gasolina e cacimbas situados na bacia do rio Lucaia, cidade de Salvador-BA, sendo selecionados os pontos com maior concentração dos referidos analitos.

Foram também selecionados outros pontos de amostragens, sendo o principal parâmetro de seleção ser posto de revenda de combustível e ter como fonte de abastecimento de água potável (poço artesiano). Os referidos pontos de amostragem não serão aqui identificados, já que as amostras foram coletadas para aplicação do método proposto e não caracterização de área ou pluma de contaminação.

A amostragem foi realizada através da utilização de uma bomba peristáltica de baixa vazão, porém a coleta não foi padronizada, já que em alguns postos houve resistência no acesso aos poços, sendo a água coletada nas torneiras próximas às bombas de abastecimento. Foram coletadas amostras em dez pontos. Os resultados estão dispostos na **Tabela 10**, já com as referidas médias e referências normativas para águas subterrâneas.

Os resultados das análises mostraram a presença de alguns HPA nos vários pontos de coleta. Nas amostras 01 a 06, 08 e 10, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, alvo deste trabalho estavam abaixo do limite de quantificação do método. Nas amostras 07 e 09 foram quantificados no mínimo um e no máximo quatro, dos dezesseis HPA estudados. Em todas as amostras de águas subterrâneas coletadas em postos de revenda de combustíveis foi detectado algum tipo de HPA.

O pireno foi o HPA mais presente nas amostras. Ele foi detectado em todas as amostras e quantificado em duas amostras com concentração mínima de 147,65 ng L⁻¹ e máxima de 708,33 ng L⁻¹, sendo o hidrocarboneto com maior concentração detectada, porém não há valores de referência para o referido analito, recomendados pela Resolução nº 396/2008 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), (CONAMA, 2000) ou através da Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2004).

Na amostra 7 foram quantificados quatro compostos, dentre eles fluoranteno e pireno, os quais apresentam propriedades mutagênicas. Bezerra (2011), encontrou nesse poço altas concentrações de BTEX. Isso pode ser justificado pela contaminação por gasolina e óleo diesel, já que o poço é aberto, e a água utilizada para lavagem de carro de um posto de lavagem informal. Em nenhuma das amostras coletadas, as concentrações dos analitos determinadas estão acima dos limites estabelecidos pela legislação vigente brasileira.

Gebara e colaboradores (2013) determinaram 16 HPA águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis com extração e pré-concentração por microextração em fase sólida por *headspace* e determinação por CG-EM-EM. O naftaleno foi encontrado em níveis superiores aos demais com concentração variando de 1,0x10⁻¹ µg L⁻¹ a 8,5 µg L⁻¹.

Tabela 10: Resultados da análise de HPA das amostras de água subterrânea coletadas em poços de distribuição e revenda de combustíveis utilizando EPN com detecção por CG-EM, e comparação com valores de referência recomendados por órgão orientadores.

ANALITO	Concentração das amostras (ng L ⁻¹)										Referências Normativas (ng L ⁻¹)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CONAMA	MS
											396/2008	518/2004
Naftaleno	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123	< 123		
Acenaftileno	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163		
Acenafteno	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176	< 176		
Fluoreno	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163	< 163		
Fenantreno	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39	< 39		
Antraceno	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70		
Fluoranteno	< 59	< 59	< 59	< 59	< 59	< 59	211 ± 1	< 59	< 59	< 59		
Pireno	< 86	< 86	< 86	< 86	< 86	< 86	708 ± 3	< 86	148 ± 2	< 86		
Benzo (a) antraceno	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110	< 110		
Criseno	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	< 70	150	
Benzo (b) fluoranteno	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	< 80	150	
Benzo (K) fluoranteno	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	150	
Benzo (a) pireno	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	< 73	150	700
Indeno (123cd) pireno	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	< 77	150	
Dibenzo (ah) antraceno	< 63	< 63	< 63	< 63	< 63	< 63	88 ± 2	< 63	< 63	< 63	150	
Benzo (ghi) perileno	< 113	< 113	< 113	< 113	< 113	< 113	124 ± 3	< 113	< 113	< 113		

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente; MS: Ministério da Saúde.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho de pesquisa apresentou-se um estudo inédito envolvendo a utilização de surfactantes não iônicos do tipo OPE para determinação de compostos orgânicos associados à CG-EM. O método proposto apresenta como principal vantagem frente à ELL, a utilização de solventes atóxicos em volume reduzido e utilização de pequeno volume de amostra.

Em comparação com métodos alternativos envolvendo a EPN disponíveis na literatura, o procedimento proposto não requer a eliminação da fase rica em surfactante mediante re-extração ou *clean-up*, uma vez que a fase rica em surfactante contendo os analitos é injetada no sistema cromatográfico após derivatização. O procedimento proposto minimiza a possibilidade de perdas ou contaminação da amostra.

Com a aplicação do método desenvolvido e validado foi possível a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água subterrânea coletadas em postos revendedores de combustível. Os resultados mostraram que não há contaminação por HPA na água subterrânea dos locais amostrados.

O método desenvolvido pode ser empregado por laboratórios de monitoramento ambiental possibilitando trabalhos de diagnóstico de áreas contaminadas por combustíveis ou outros derivados de petróleo auxiliando no plano de gestão de recursos hídricos no que concerne em melhorias em seu gerenciamento e na revisão das leis vigentes de controle ambiental por parte dos órgãos competentes.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Nos tópicos abaixo são apresentadas sugestões para trabalhos futuros:

- Otimização e validação do método proposto utilizando-se outros reagentes do tipo OPE como, por exemplo, o OPEO9.5 e o OPEO35;
- Verificação da possibilidade utilização de outros tipos de surfactantes, como os da família do Tergitol;
- Aumento no número de pontos de coletas para posterior análise de HPA utilizando o método analítico proposto neste trabalho, para uma possível avaliação da pluma de contaminação;
- Verificação da possibilidade de determinação de outros compostos derivados do petróleo como, por exemplo, os alcanos, utilizando o método analítico proposto;
- Aplicação do método proposto em outras matrizes.

7. REFERENCIAS

Al-GHAMDI, A. M.; NASR-EL-DIN, H. A. Effect of oilfield chemicals on the cloud point of nonionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 125, p. 5-18, 1997.

ANDRADE, F. P. Determinação de constituintes inorgânicos em tabacos por espectrometria de absorção atômica com chama e com forno tubular na chama e aerosol térmico. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Analítica), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008, 105p.

ANJOS, R. B. Avaliação de HPA e BTEX no solo e água subterrânea, em postos de revenda de combustíveis: estudo de caso na cidade de Natal – RN. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia do Petróleo), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012, 106p.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Anuários Estatísticos, 2012. Disponível em:<http://www.anp.gov.br/?pg=62402&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1374674036528>. Acesso em novembro 2012.

ANVISA - Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>. Acesso em agosto 2013.

AKBAS, H.; BATIGOC, C. Spectrometric studies on the cloud points of Triton X-405. **Fluid Phase Equilibria**, V. 279, P. 115-119, 2009.

BAI-JUAN, Y.; FENG-HUA, J.; XIAO-QIN, X.; JUN-HUI, C.; LEE, F.S.C. Determination of alkylphenols in water by Solid-Phase Extraction with on-column derivatization coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.35, p.633–637, 2007.

BAI, D.; LI, J.; CHEN, S. B.; CHEN, H. A novel cloud-point extraction process for preconcentrating selected polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solution. **Environmental Science Technology**, v. 35, p. 3936-3940, 2001.

BARBOSA, L. K. L. Zoneamento de aquíferos através de perímetros de proteção de poços de abastecimento público de água: o caso da cidade de João Pessoa - PB. Dissertação (Mestrado Engenharia Urbana), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007, 87p.

BATIGOC, C.; AKBAS, H. Spectrophotometric determination of cloud point of Brij 35 nonionic surfactant. **Fluid Phase Equilibria**, v. 303, p. 91–95, 2011b.

BATIGOC, C.; AKBAS, H.; BOZ, M. Thermodynamics of non-ionic surfactant Triton X-100-cationic surfactants mixtures at the cloud point. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 43, p. 1800-1803, 2011a.

BEZERRA, M. A.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, S. L.C. Statistical design-principal component analysis optimization of a multiple response procedure using cloud point extraction and simultaneous determination of metals by ICP OES. **Analytica Chimica Acta**, v. 580, p. 251–257, 2006b.

BEZERRA, M. de A.; ARRUDA, M. A. Z.; FERREIRA, S. L. C. Cloud Point Extraction as a Procedure of Separation and Pre-Concentration for Metal Determination Using Spectroanalytical Techniques: A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 40, p. 269–299, 2005.

BEZERRA, M. de A.; FERREIRA, S. L. C. Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica, Vitória da Conquista: Edições UESB, 2006a, 165p.

BEZERRA, P. G. Contaminação de águas subterrâneas por BTEX na bacia do rio Lucaia, Salvador, Bahia. Dissertação (Mestrado em Geoquímica, área de concentração Petróleo e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011, 88p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar.2004. Seção I, p.266.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; MORENO-CORDERO, B.; PÉREZ-PAVÓN, J.L.; GARCÍA-PINTO, C.; LAESPADA, E. F. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 251–265, 2000.

CARDOSO, M. H. W. M. Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros. Tese (Doutorado em vigilância sanitária), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008, 191p.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QUI, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191–219, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2000. Resolução CONAMA nº 273. Disponível em:< www.mma.conama.gov.br/conama> Acesso em 17/05/2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2008. Resolução CONAMA nº 396. Disponível em:< www.mma.conama.gov.br/conama> Acesso em 17/05/2013.

DANIELSON, N. D.; GALLAGHER, P. A.; BAO, J. J. Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. USA: John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 36p.

DELGADO, B.; PINO, V.; AYALA, J. H.; GONZÁLEZ, V.; AFONSO, A. M. Nonionic surfactant mixtures: a new cloud-point extraction approach for the determination of PAHs in seawater using HPLC with fluorimetric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 165-172, 2004.

DROZD, J. Chemical derivatization in gas chromatography. **Journal of chromatography**, v. 113, p. 303-356, 1975.

ESCALEIRA, L. A. Extração e pré-concentração no ponto nuvem para determinação de metais em água salinas por espectrometria de emissão ótica com fonte de plasma indutivamente acoplado, Dissertação (Mestrado em Geociências, área de concentração Geoquímica Ambiental), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005, 101p.

FARIA, A. M. Dissulfoton: avaliação da mobilidade e Extração em Ponto Nuvem. Dissertação (Magister Scientiae em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003, 137p.

FARIA, A.M.; DARDENGO, R.P.; LIMA, C.F.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Determination of dissulfoton in surface water samples by cloud-point extraction and gas chromatography. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 87, p. 249-258, 2007.

FARIA, A.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A. Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, p. 29-42, 2005.

FERREIRA, S. L. C.; MACEDO, S. M.; SANTOS, D. C.; JESUS, R. M.; SANTOS, W. N. L.; QUEIROZ, A. F. DE S.; ANDRADE, J. B. Speciation

analysis of inorganic antimony in airborne particulate matter employing slurry sampling and HG QT AAS. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, p.1887-1891, 2011.

FERRER, R.; BELTRH, J. L.; GUITERAS, J. Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 199-206, 1996.

FORTE, E. J.; OLIVEIRA, R. C.; ALMEIDA, R. AZEVEDO M. S. Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos: estudo de caso na vila Tupi, Porto Velho – Rondônia. **Quimica Nova**, v. 30, p. 1539-1544, 2007.

GATIDOU, G.; THOMAIDIS, N.S.; STASINAKIS, A.S.; LEKKAS, T.D. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, p. 32–41, 2007.

GEBARA, S. S.; RÉ-POPPI, N.; NASCIMENTO, A. L. C. S. RAPOSO JUNIOR, J. L. Métodos para análises de HPA e BTEX em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: um estudo de caso em Campo Grande, MS, Brasil. **Quimica Nova**, v. 36, p. 1030–1037, 2013.

GORTZI, O.; LALAS, S.; CHATZILAZAROU, A.; KATSOYANNOS, E.; PAPACONSTANDINO, S.; DOURTOGLOU, E. Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, p. 133–140, 2008.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. Clouding of Triton X- 114: The effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X- 114 in the presence of ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 104, p. 307-312, 1995.

GU, T.; GALERA-GOMEZ, P.A. The effect of different alcohols and other polar organic additives on the cloud point of Triton X-100 in water. **Colloids and**

Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 147, p. 365-370, 1999.

HUNG, K.; CHEN, B.; YU, L.E. Cloud-point extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. **Separation and Purification Technology**, v. 57, p. 1–10, 2007.

IGLAUER, S.; WU, Y.; SHULER, P.; TANG, Y.; GODDARD, W. A. New surfactant classes for enhanced oil recovery and their tertiary oil recovery potential. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 71, p. 23-29, 2010.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008 Revisão 03. Fev. 2010. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf . Acesso em agosto 2013.

JIA, G.; LV, C.; ZHU, W.; QIU, J.; WANG, X.; ZHOU, Z. Applicability of cloud point extraction coupled with microwave-assisted back-extraction to the determination of organophosphorous pesticides in human urine by gas chromatography with flame photometry detection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, p. 300–305, 2008.

KNAPP, D. R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley & Sons: New York, 1979, 768p.

LI, J.-L.; BAI, D.-S.; CHEN, B.-H. Effects of additives on the cloud points of selected nonionic linear ethoxylated alcohol surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 346, p. 237–243, 2009.

LI, J.; CHEN, B. Equilibrium partition of polycyclic aromatic hydrocarbons in a cloud-point extraction process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 625-632, 2003.

LIANG, R.; WANG, Z.; XUB, J.; LI, W.; QI, H. Novel polyethylene glycol induced cloud point system for extraction and back-extraction of organic

compounds. **Separation and Purification Technology**, v. 66, p. 248-256, 2009.

LIMA, S.V.; OLIVEIRA, H.P. Determinação do ponto de névoa em surfactantes não iônicos por espectroscopia de impedância elétrica. **Química Nova**, v. 33, p. 1928-1932, 2010.

LOPES, A. S. Extração e fracionamento de proteínas de plasma sanguíneo baseada no procedimento do ponto nuvem. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Analítica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005, 79p.

LOPES, E. da L. Estudo e determinação das condições experimentais da reação de silição utilizada na análise multirresíduo de anti-inflamatórios não-esteróides em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa. Monografia (Bacharelado em química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011, 75p.

MAHAJAN, R. K.; VOHRA, K. K.; KAUR, N.; ASWAL, V. K. Organic additives and electrolytes as cloud point modifiers in octylphenol ethoxylate solutions. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 11, p. 243–250, 2008.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.

MINDRISZ, A. C. Avaliação da contaminação da água subterrânea de poços tubulares, por combustíveis fósseis, no município de Santo André, São Paulo: uma contribuição à gestão ambiental. Tese (Doutorado em ciências, área de concentração Tecnologia Nuclear – Materiais), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006, 231p.

MOLINA-BOLIVAR, J.A.; AGUIAR, J.; RUIZ, C.C. Growth and hydration of Triton X-100 micelles in monovalent alkali salts: A light scattering study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, p. 870–877, 2002.

MUKHERJEE, P.; PADHAN, S.K.; DASH, S.; PATEL, S.; MISHRA, B.K. Clouding behavior in surfactant systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.162, p.59–79, 2011.

OLIVEIRA, C. L. Estudo de esteróis como marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Desenvolvimento e validação da metodologia analítica. Dissertação (Mestrado em ciências, área de concentração Tecnologia Nuclear – Materiais), Universidade de São Paulo- IPEN, São Paulo, 2012, 189p.

ORATA, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Dr. Mustafa Ali Mohd (Ed.), ISBN: 978-953-51-0298-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/advanced-gaschromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-andreagents-for-gas-chromatography-analysis>.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; KARAYANNIS, M. I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p.426 -436, 2005.

PATEL, K.; BHARATIYA, B.; KADAM, Y.; BAHADUR, P. Micellization and clouding behavior of EO–PO block copolymer in aqueous salt solutions. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 13, p. 89–95, 2010.

PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913, 2010.

PINHO, G.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia à gás. **Química Nova**, v. 32, p.987-995, 2009.

PINTO, C. G.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. C. Cloud point preconcentration and high-performance liquid chromatographic determination of polycyclic

aromatic hydrocarbons with fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 874-881, 1994.

PONGPIACHAN, S. Application of cloud point extraction for the determination of pyrene in natural water. Southeast Asian. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v. 4, p. 392-400, 2009.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 4150-4168, 1999.

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

RIZZATTI, I. M.; ZANETTE, D. R.; MELLO, L. C. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. **Química Nova**, v. 32, p. 518-521, 2009.

SANDRES, G. C. Contaminação dos solos e águas subterrâneas provocada por vazamentos de gasolina nos postos de combustíveis devido à corrosão em tanques enterrados. Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas de Gestão), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004, 147p.

SCHOTT, H. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants — XVI. Limiting cloud points of highly polyoxyethylated surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 186, p.129-136, 2001.

SHARMA, K. S.; PATIL, S.; R.; RAKSHIT, A.; K. Study of the cloud point of C12En nonionic surfactants: effect of additives. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 219, p. 67-74, 2003.

SIKALOS, T. I.; PALEOLOGOS, E. K. Cloud point extraction coupled with microwave or ultrasonic assisted back extraction as a preconcentration step prior to gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2544-2549, 2005.

SILVA, M. A. O. Avaliação e caracterização de sistemas baseados em ponto nuvem visando à remoção de albumina do plasma sanguíneo. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Analítica), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2008a, 138p.

SILVA, M. F.; CERUTTI, E. S.; MARTINEZ, L.D. Coupling cloud point extraction to instrumental detection systems for metal analysis. **Microchimica Acta**, v. 155, p. 349–364, 2006.

SILVA, P. K. L. Remoção de óleo da água de produção por flotação em coluna utilizando tensoativos de origem vegetal. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008b, 105p.

SILVA, R. L. B.; BARRA, C. M.; MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, p.1599-1607, 2002.

SILVA, S. G. Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem. Dissertação (Mestrado em Química, área de concentração Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008c, 83p.

SONI, S. S.; PANJABI, S. H.; SASTRY, N. V. Effect of non-electrolyte additives on micellization and clouding behavior of silicone surfactant in aqueous solutions **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 37, p. 205–211, 2011.

STEGE, P. W.; SOMBRA, L. L.; MESSINA, G. A.; MARTINEZ, L. D.; SILVA, M. F. Environmental monitoring of phenolic pollutants in water by cloud point extraction prior to micellar electrokinetic chromatography. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p.567–573, 2009.

TAECHANGAM, P.; SACAMEHORNB, J. F.; OSUWANA, S.; RIRKSOMBOON, T. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 347, p. 200-209, 2009.

TAKAGAI, Y.; HINZE, W. L. Cloud point extraction with surfactant derivatization as an enrichment step prior to gas chromatographic or gas chromatography-mass spectrometric analysis. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7113–7122, 2009.

TALBI, Z.; HADDOU, B.; BOUBERKA, Z.; DERRICHE, Z. Simultaneous elimination of dissolved and dispersed pollutants from cutting oil wastes using two aqueous phase extraction methods. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p. 748–755, 2009.

TIVERON, A. P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010, 103p.

TOBISZEWSKI, M.; MECHLIN´SKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIES´NIK, J. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 943-951, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Method 3510c - Separatory funnel liquid-liquid extraction. 1996. 8p. Disponível em <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3510c.pdf>. Acesso em 01 de dezembro de 2011.

VALENTIN, L. A. Boas práticas de laboratório: aplicação para avaliar o impacto ambiental causado pelo derrame de derivados do petróleo. Dissertação (Mestrado em ciências, área de concentração Química Analítica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006, 111p.

WANG, Z.; DAI, Z. Extractive microbial fermentation in cloud point system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p. 407-418, 2010.

WANG, Z.; XU, J-H; ZHANG, W.; ZHUANG, H. Q. Cloud point of nonionic surfactant Triton X-45 in aqueous solution. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, p. 118–122, 2008.

WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta** **1978**, v. 25, p. 585-589, 1978, apud MANIASSO, 2001.

WEI, W.; YIN, X.; HE, X. pH-mediated dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis determination of phenol and m-nitrophenol. **Journal of Chromatography A**, v. 1202, p. 212–215, 2008.

WU, Y-W.; JIANG, Y-Y.; LIU, J-F.; XIONG, K. Cloud point extraction combined with micellar electrokinetic capillary chromatography determination of benzophenones in cosmetic matrix. **Electrophoresis**, v. 29, p. 819–826, 2008.

XIE, S.; PAAU, M. C.; LI, C. F.; XIAO, D.; CHOI, M. M. F. Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2306–2317, 2010.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Chemical reactions in liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.701–707, 2009.

YAO, B. J.; YANG, L. Ultrasonic assisted cloud point extraction of polyaromatic hydrocarbons. **Separation Science and Technology**, v. 42, p. 1843-1858, 2007.

YAO, B. J.; YANG, L. Pilot-scale ultrasonic assisted cloud point extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted water. **Separation Science and Technology**, v.4, p. 1564-1580, 2008.

YIN, X.-B. Dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis speciation analysis of Mercury. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 437–443, 2007.

YIN, X.-B.; GUO, J.-M.; WEI, W. Dual-cloud point extraction and tertiary amine labeling for selective and sensitive capillary electrophoresis-electrochemiluminescent detection of auxins. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p.1399–1406, 2010.

ZHONG, S.; TAN, S. N.; GE, L.; WANG, W.; CHEN, J. Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction. **Talanta**, v. 85, p. 488–492, 2011.