

## EXTRAÇÃO DE BIFENILAS POLICLORADAS DE AMOSTRAS DE LEITE MATERNO: OTIMIZAÇÃO UNIVARIADA *VERSUS* PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Cláudia Hoffmann Kowalski\* e Fabio Augusto

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas – SP, Brasil

Helena Teixeira Godoy

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, 13083-862 Campinas – SP, Brasil

Recebido em 1/6/12; aceito em 10/9/12; publicado na web em 6/2/13

EXTRACTION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN BREAST MILK SAMPLES: UNIVARIATED OPTIMIZATION *VERSUS* EXPERIMENTAL DESIGN. The convenience of the multivariate optimization of SPME procedures through ANOVA calculated using Doehlert designs has been demonstrated for twelve PCBs in the complex matrix of milk. For this study, the main parameters of the extraction were selected and valued through univariate and multivariate optimization. In addition, the analysis of variance allowed identification of the statistically significant variables in this model: high temperature (95 °C) and ionic strength (36% m/v) proved significant for all the PCBs while intermediate time (70 min) and low methanol concentration (5% v/v) also contributed to the extraction of the majority of these PCBs.

Keywords: PCBs; SPME; Doehlert design.

### INTRODUÇÃO

As bifenilas policloradas (PCBs) constituem um grupo de contaminantes altamente tóxicos classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Tal atribuição deve-se a três características básicas: persistência ambiental, bioacumulação e alta toxicidade.<sup>1</sup> A persistência desses compostos ocorre em função de sua baixa degradação por processos bióticos e abióticos, acarretando em elevada meia-vida no ambiente, que pode chegar a anos ou décadas.<sup>2</sup>

Os PCBs são absorvidos pelos organismos através da alimentação, respiração e pele. Alimentos como leite e derivados, carne e peixe têm sido identificados como a principal rota de entrada dos PCBs e pesticidas nos organismos humanos.<sup>3-5</sup> Essas substâncias, depois de absorvidas, são distribuídas através da corrente sanguínea para os vários tecidos e órgãos do corpo, sendo armazenadas principalmente nos tecidos ricos em gordura. No caso das mulheres, ocorre um grande acúmulo desses compostos no leite e, conseqüentemente, nos recém-nascidos por elas amamentados.<sup>6</sup> A contaminação do leite materno por PCBs é de grande impacto, pois é o primeiro alimento do recém-nascido, constituindo um grande problema para sua saúde. Um estudo publicado recentemente no Brasil mostrou que a contaminação do leite materno com PCBs está altamente relacionada com o grau de industrialização da região, sendo que na quatro capitais brasileiras estudadas (São Paulo, Vitória, Florianópolis e Rio Branco) as porcentagem de amostras contaminadas foram de 100, 80, 60 e 0%, respectivamente.<sup>7</sup>

Dentre as técnicas de extração de contaminantes mais utilizadas na atualidade, a microextração em fase sólida (SPME) é bastante pertinente para os casos onde se dispõe de pequenas quantidades de amostra, como é o caso dos fluídos biológicos. De forma a maximizar a eficiência de extração dos compostos de interesse, vários parâmetros extrativos podem ser otimizados como o tipo de fibra, a concentração e o volume da amostra, a temperatura e o tempo de extração e a adição de reagentes e solutos.

Duas abordagens podem ser empregadas para realizar essa otimização: univariada e multivariada. Na primeira, cada variável é estudada separadamente, enquanto que na segunda, as variáveis são

estudadas simultaneamente, tornando possível distinguir interações entre elas que não seriam detectadas na abordagem tradicional.<sup>8-10</sup>

Uma abordagem muito conveniente de otimização multivariada foi proposta por Doehlert, em 1970,<sup>11</sup> pois permite o estudo de um número grande de variáveis utilizando um número reduzido de experimentos, tornando-o mais eficiente quando comparado a outros planejamentos.<sup>10,12-14</sup> Outra vantagem deste planejamento é que o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Essa propriedade permite a livre escolha de quais fatores serão avaliados em um número maior ou menor de níveis, conforme sua importância no sistema ou de forma a obter maiores informações sobre o comportamento de uma ou outra variável naquele sistema.<sup>9,15</sup> Essas características o tornam muito útil na otimização de experimentos nas mais variadas áreas da química analítica,<sup>16</sup> considerando diferentes técnicas instrumentais de preparo e análise bem como diferentes tipos de amostras e analitos.<sup>7,16-20</sup>

Neste trabalho foi proposta a otimização das condições experimentais para a extração de PCBs de amostras de leite materno utilizando a técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). Para isso, utilizou-se tanto a abordagem univariada como a multivariada, sendo possível comparar os resultados obtidos em cada estudo e identificar as vantagens e desvantagens de cada tratamento. Além disso, a qualidade do ajuste dos modelos individuais obtidos de cada resposta foi estimada através da análise de variância (ANOVA), possibilitando identificar quais as variáveis que influenciam na extração dos PCBs bem como os melhores valores experimentais para cada uma delas.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reagentes e materiais

As soluções padrão de bifenilas policloradas foram adquiridas da AccuStandard (New Haven, CT), com concentração de 3,5 µg mL<sup>-1</sup> de cada PCB. Os isômeros estudados neste trabalho foram o PCB 28 (2,4,4'-triclorobifenil), PCB 52 (2,2',5,5'-tetraclorobifenil), PCB 74 (2,4,4',5-tetraclorobifenil), PCB 101 (2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil), PCB 118 (2,3',4,4',5-pentaclorobifenil), PCB 128 (2,2',3,3',4,4'-hexaclorobifenil), PCB 138 (2,2',3,4,4',5-hexaclorobifenil), PCB 153

\*e-mail: claukowalski@gmail.com

(2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil), PCB 156 (2,3,3',4,4',5-hexaclorobifenil), PCB 170 (2,2',3,3',4,4',5-heptaclorobifenil), PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil) e PCB 187 (2,2',3,4',5,5',6-octaclorobifenil). Metanol grau HPLC, tolueno grau HPLC e NaOH P.A. foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), o NaCl P.A. da Ecibra (São Paulo, Brasil) e o *iso*-octano grau HPLC da Mallinckrodt (Kentucky, PA). Água deionizada purificada através de um sistema Millipore Milli-Q (Bedford, MA) também foi utilizada. As fibras utilizadas foram a de polidimetilsiloxano (PDMS) com espessura de recobrimento de 100 µm e de polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) com espessura de 65 µm, adaptadas em um aplicador apropriado, sendo esse conjunto fornecido pela Supelco (Bellefonte, PA).

### Amostras

Vinte amostras de leite materno foram obtidas de um banco de leite da cidade de São Paulo, sendo mantidas congeladas da coleta até o preparo das amostras. Para os estudos de otimização, as amostras foram descongeladas e misturadas de forma a obter um *pool* com volume suficiente para todos os testes. Esse *pool* foi contaminado com uma solução de trabalho contendo todos os PCBs, obtendo-se amostras contaminadas com 9,25 µg L<sup>-1</sup> de cada PCB. Elas foram mantidas de 2 a 4 °C por 24 h para permitir o equilíbrio entre os compostos biológicos ativos do leite e os compostos organoclorados adicionados.<sup>21</sup> Após esse período, realizou-se a extração dos compostos.

### Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo AutoSystemXL GC-ECD (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) com uma coluna HP-1MS (100% polidietilsiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm. O injetor foi operado no modo *splitless*. A programação de temperatura do forno foi: 40 °C por 2 min, rampa de 20 °C min<sup>-1</sup> até 190 °C, mantido por 5 min, rampa de 5 °C min<sup>-1</sup> até 220 °C, mantido por 5 min, rampa de 20 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C, mantido por 1 min. As temperaturas do injetor e detector foram 280 e 320 °C, respectivamente. O gás de arraste foi hélio com pureza de 99,999% (White Martins) e vazão de 1,3 mL min<sup>-1</sup>. O gás *makeup* utilizado foi o nitrogênio com pureza de 99,999% (White Martins).

### Otimização univariada

Foram estudados o efeito da presença da matriz (água e leite), o tipo de recobrimento da fibra (PDMS 100 µm e PDMS-DVB), o tempo de extração (20 a 90 min), a temperatura de extração (de 27 até 80 °C), a adição de NaCl (0 a 36%), a adição de reagente (metanol e tolueno) e a saponificação da gordura com NaOH (0 e 20%). Para todos os experimentos, foram colocadas alíquotas de 5 mL de amostra em frascos e termostatizados em banho de água (Cole-Parmer – Vernon Hills, IL) sob agitação magnética (1200 rpm) por 10 min para o equilíbrio amostral/*headspace*. Então, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra por tempo pré-definido, sendo posteriormente recolhida e exposta ao injetor do cromatógrafo a 280 °C por 5 min. Os resultados obtidos foram transferidos e tratados no programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA).

### Planejamento experimental

Foi utilizada somente a fibra de PDMS 100 µm, e o procedimento genérico foi similar ao descrito no item anterior. A adição de NaCl (para ajuste da força iônica) ( $C_{NaCl}$ ), a temperatura de extração (T), o tempo de extração (t) e a adição do cossolvente metanol ( $C_{MeOH}$ ) foram os quatro parâmetros da HS-SPME otimizados. As faixas de trabalho,

**Tabela 1.** Condições operacionais segundo distribuição de Doehlert para as quatro variáveis HS-SPME estudadas

Ensaio experimental	$C_{NaCl}$ (% m/v) 5 níveis	T (°C) 7 níveis	t (min) 7 níveis	$C_{MeOH}$ (% v/v) 3 níveis
1 <sup>a</sup>	0 (18) <sup>b</sup>	0 (70)	0 (70)	0 (5)
2	1 (36)	0 (70)	0 (70)	0 (5)
3	0,5 (27)	0,866 (95)	0 (70)	0 (5)
4	0,5 (27)	0,289 (78,3)	0,817 (100)	0 (5)
5	0,5 (27)	0,289 (78,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10)
6	-1 (0)	0 (70)	0 (70)	0 (5)
7	-0,5 (9)	-0,866 (45)	0 (70)	0 (5)
8	-0,5 (9)	-0,289 (61,7)	-0,817 (40)	0 (5)
9	-0,5 (9)	-0,289 (61,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0)
10	0,5 (27)	-0,866 (45)	0 (70)	0 (5)
11	0,5 (27)	-0,289 (61,7)	-0,817 (40)	0 (5)
12	0,5 (27)	-0,289 (61,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0)
13	-0,5 (9)	0,866 (95)	0 (70)	0 (5)
14	0 (0)	0,577 (86,7)	-0,817 (40)	0 (5)
15	0 (0)	0,577 (86,7)	-0,204 (62,5)	-0,791 (0)
16	-0,5 (9)	0,289 (78,3)	0,817 (100)	0 (5)
17	0 (18)	-0,577 (53,3)	0,817 (100)	0 (5)
18	0 (18)	0 (70)	0,613 (92,5)	-0,791 (0)
19	-0,5 (9)	0,289 (78,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10)
20	0 (18)	-0,577 (53,3)	0,204 (77,5)	0,791 (10)
21	0 (18)	0 (70)	-0,613 (47,5)	0,791 (10)

<sup>a</sup> Ponto central com três repetições. <sup>b</sup> Fora do parêntese: valor codificado; dentro do parêntese: valor real.

calculadas de acordo com a Equação 1, estão demonstradas na Tabela 1.

$$C_i = \left\{ \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right\} \alpha \quad (1)$$

onde  $C_i$  é o valor codificado para o nível do fator  $i$ ,  $X_i$  é o valor experimental,  $X_i^0$  é o valor experimental no ponto central,  $\Delta X_i$  é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior e  $\alpha$  é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator.

A regressão linear múltipla (MLR) foi utilizada para encontrar um modelo matemático (Equação 2) apropriado para cada PCB estudado, a fim de descrever o comportamento de cada composto em função das variáveis experimentais de extração avaliadas.

$$z = b_0 + b_1 C_{NaCl} + b_2 T + b_3 t + b_4 C_{MeOH} + b_{11} C_{NaCl}^2 + b_{22} T^2 + b_{33} t^2 + b_{44} C_{MeOH}^2 + b_{12} C_{NaCl} T + b_{13} C_{NaCl} t + b_{14} C_{NaCl} C_{MeOH} + b_{23} T t + b_{24} T C_{MeOH} + b_{34} t C_{MeOH} \quad (2)$$

onde  $z$  é área de pico do PCB e  $b$  corresponde aos coeficientes da regressão.

Cada PCB apresentará uma equação de regressão com seus respectivos coeficientes, ao nível de significância de 0,05.

A qualidade dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA). Os cálculos dos modelos de regressão e das análises de variância foram feitos através de planilhas eletrônicas elaboradas no software Excel 2003<sup>15</sup> e no Statistica 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização univariada

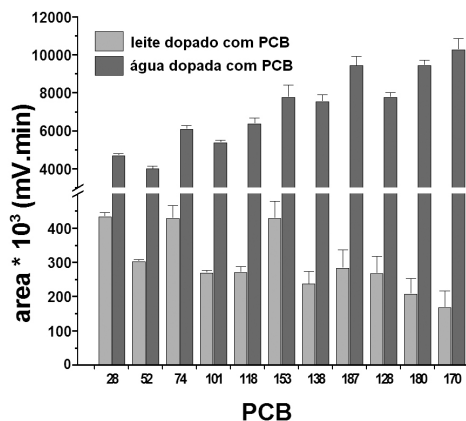
Os parâmetros estudados experimentalmente foram os seguintes:

### Efeito da matriz

A Figura 1 mostra as áreas dos picos dos PCBs após a contaminação de uma amostra de água deionizada e de leite com PCBs. Conforme esperado, a influência da matriz foi grande, observando-se uma redução de aproximadamente 90% na área dos picos.

### Tipo de recobrimento da fibra

Apesar da eficiência de extração ser maior com a fibra de PDMS-DVB, observou-se maior variação entre as áreas obtidas nas replicatas (Figura 2). Além disso, a corrida de um branco entre as amostras mostrou que essa fibra apresenta efeito de memória significativo, quando comparada à PDMS. Esses resultados estão de acordo com

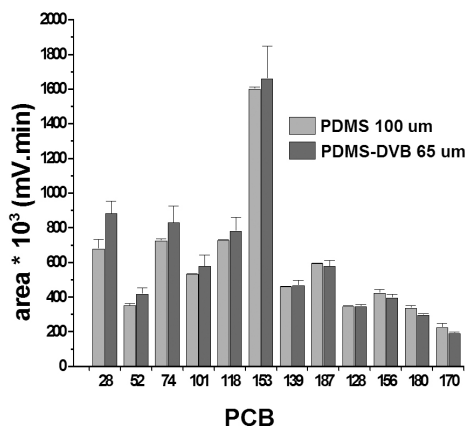


**Figura 1.** Avaliação do efeito de matriz na extração de PCB por HS-SPME-GC-ECD. Água e leite materno contaminados com  $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada PCB.  $C_{\text{NaCl}} = 360 \text{ g L}^{-1}$ ;  $T = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t = 60 \text{ min}$

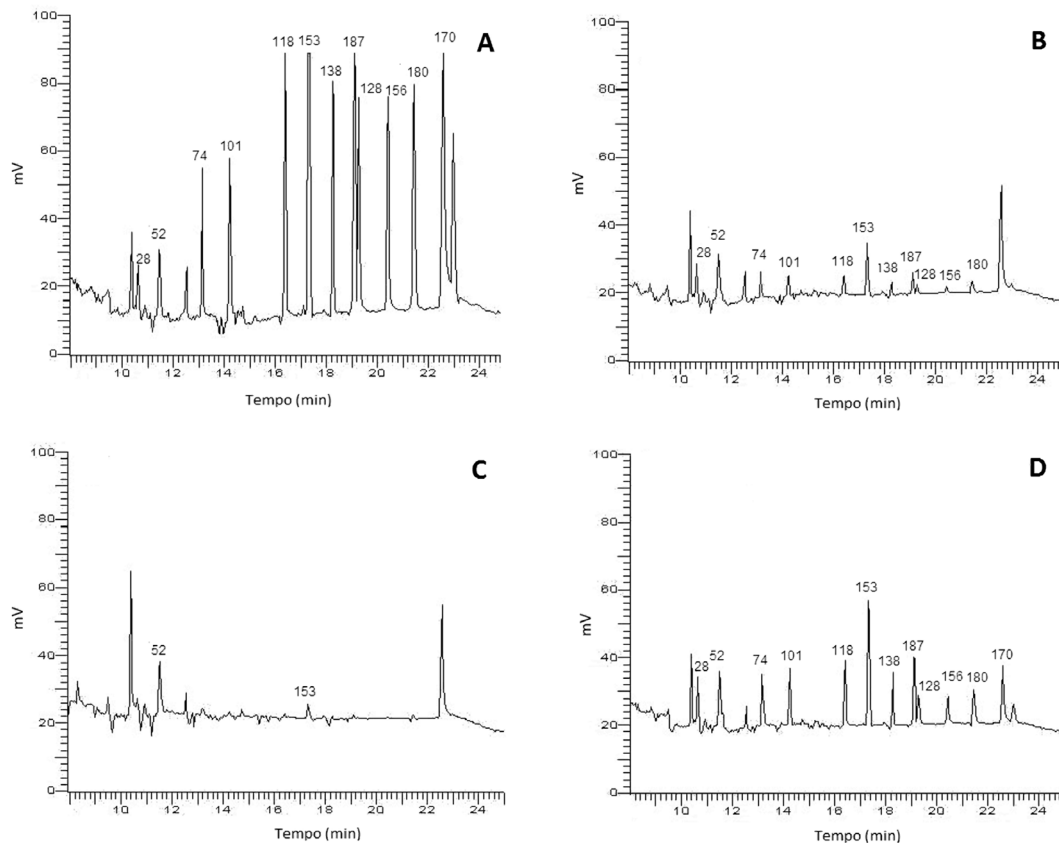
os obtidos por Montes *et al.*,<sup>22</sup> que calcularam o *carryover* para ambas as fibras para os congêneres de PCB com maior cloração, e encontraram 2 a 13% e 15 a 35% para a fibra PDMS e PDMS-DVB, respectivamente. A partir de então, todos os experimentos foram conduzidos com fibras de PDMS 100  $\mu\text{m}$ .

### Tempo de extração

Para os PCB de menor peso molecular (PCB 28, 52, 74, 101 e 118), 50 min foi suficiente para atingir o equilíbrio. Já para os PCB com maior cloração (PCB 180 e 170), mesmo após 90 min o equilíbrio não foi alcançado conforme observado na Figura 1S. Entretanto, para análises de rotina, 90 min ou mais de extração seria



**Figura 2.** Perfis de extração dos PCB para as fibras PDMS 100  $\mu\text{m}$  e PDMS-DVB 65  $\mu\text{m}$ . Leite materno contaminado com  $9,25 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada PCB.  $C_{\text{NaCl}} = 360 \text{ g L}^{-1}$ ;  $T = 85 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $t = 60 \text{ min}$



**Figura 3.** Cromatogramas obtidos no planejamento experimental. (A)  $C_{\text{NaCl}}: 27\%$ ,  $T: 95 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t: 70 \text{ min}$  e  $C_{\text{MeOH}}: 5\%$ ; (B)  $C_{\text{NaCl}}: 9\%$ ,  $T: 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t: 70 \text{ min}$  e  $C_{\text{MeOH}}: 5\%$ ; (C)  $C_{\text{NaCl}}: 18\%$ ,  $T: 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t: 92,5 \text{ min}$  e  $C_{\text{MeOH}}: 0\%$ ; (D)  $C_{\text{NaCl}}: 18\%$ ,  $T: 70 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t: 70 \text{ min}$  e  $C_{\text{MeOH}}: 5\%$

muito tempo, mostrando a necessidade de otimizar outros parâmetros que possibilitem ao sistema alcançar o equilíbrio com menos tempo.

#### Temperatura de extração

A Figura 2S, material suplementar, mostra a grande influência deste parâmetro na eficiência de extração. O aumento da temperatura durante a extração aumenta a difusão do analito ao redor da fibra. Contudo, no modo de extração utilizando o *headspace* da amostra, a temperatura ajuda na transferência dos analitos da matriz da amostra para o seu *headspace*.<sup>23</sup> Esse fenômeno é observado em todos os PCBs analisados e existe uma correlação direta entre o peso molecular e a temperatura necessária para que o equilíbrio entre as fases (amostra/*headspace*/fibra) seja obtido. Por isso, verifica-se a necessidade de testar temperaturas de extração ainda mais altas para os PCBs de maior peso molecular.

#### Adição de NaCl

Na Figura 3S, material suplementar, é possível verificar o aumento da quantidade de PCBs extraída quando da adição de 0,9 g de NaCl em 5 mL da matriz, principalmente para os PCBs de maior peso molecular. A presença de eletrólitos fortes, como NaCl, aumenta a atividade dos analitos, levando à redução na solubilidade dos mesmos, que são mais facilmente retidos pela fibra, deslocando o equilíbrio de extração. Mas, segundo Penalver,<sup>23</sup> esse processo não é válido em todos os casos, sendo que esse efeito de aumento da extração depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz na qual o analito se encontra.

#### Adição de um ou mais cossolventes

Na mesma Figura 3S, material suplementar, vê-se que o tolueno (baixa polaridade) diminuiu drasticamente a extração dos PCBs da matriz; já a adição de metanol (média polaridade) em uma solução saturada de NaCl proporcionou um ligeiro aumento da extração, quando comparada a uma solução somente saturada. Estudos demonstram que amostras aquosas adicionadas de pequenas quantidades de solventes orgânicos miscíveis em água, tais como metanol ou acetonitrila, podem ter ampliada a eficiência de extração de compostos altamente hidrofóbicos.<sup>24</sup> Entretanto, esse efeito é devido ao aumento na solubilidade dos analitos no meio. Um aumento excessivo de cossolvente pode mudar as constantes de equilíbrio amostra/*headspace*

e amostra/fibra para os analitos, reduzindo as quantidades extraídas na condição de equilíbrio.

#### Saponificação da gordura

Segundo Llompert,<sup>25</sup> a saponificação da gordura do leite ajuda na transferência dos PCBs da matriz para a fibra, além de atuar como um *clean up* e, assim, aumentar a seletividade e confiança na identificação dos picos cromatográficos. Isso ocorre porque a saponificação da gordura em seus correspondentes gliceróis e ácidos graxos facilita a liberação dos PCBs da matriz. Esse procedimento pode ser de grande importância principalmente para amostras com grandes quantidades de gordura (leite maduro), nas quais os PCBs estarão mais fortemente ligados. No entanto, diferentemente dos resultados obtidos naquele estudo,<sup>25</sup> observa-se na Figura 4S, material suplementar, que com a adição de 20% de NaOH na amostra a área extraída foi muito pequena. Além disso, a presença de NaOH suprimiu o efeito da força iônica exercida pela adição de NaCl. Ambos os resultados podem ser comparados aos obtidos quando a extração foi feita sem NaOH e NaCl. Sendo assim, essa variável foi descartada do planejamento experimental.

#### Planejamento Doehlert

Os cromatogramas da Figura 3 mostram quatro condições distintas obtidas do planejamento: a maior soma de áreas (A), a menor soma de áreas (B), o ponto central do experimento (C) e a condição mais uniforme (D). De forma geral, o cromatograma A dessa figura apresentou áreas cromatográficas bastante expressivas, principalmente para os PCBs de maior peso molecular. Comparando o cromatograma A (extração a 95 °C) com os demais cromatogramas (extração a 45, 70 e 70 °C, respectivamente), observa-se uma correlação direta entre a temperatura e a eficiência da extração. O mesmo pode ser observado para a adição de NaCl, já que a solução a 27% (cromatograma A) foi bem mais eficiente que as demais (9, 18 e 18%).

Apesar dessa análise simples e pontual, deve-se considerar que as interações de 2ª e 3ª ordens são tão importantes quanto a de 1ª ordem, necessitando de uma abordagem bem embasada estatisticamente.

A Tabela 2 mostra os coeficientes polinomiais *b* obtidos para cada PCB, ao nível de significância de 0,05, definidos de acordo com o modelo quadrático da Equação 1.

**Tabela 2.** Coeficientes dos modelos polinomiais determinados por MLR para os PCBs individuais

Coeficientes	PCB #											
	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
$b_0$	345	505	161	245	222	643	215	222	97	113	210	76
Coeficientes de 1ª ordem												
$b_1$	117	114	134	206	234	738	240	327	46	143	173	129
$b_2$	196	248	607	736	1188	3338	1217	1856	963	1016	1220	878
$b_3$	61	148	-3	-52	-69	-139	<u>-70</u>	<u>-117</u>	<u>-47</u>	<u>-46</u>	<u>-37</u>	<u>-45</u>
$b_4$	-58	-19	<u>-133</u>	<u>-237</u>	<u>-293</u>	<u>-619</u>	<u>-255</u>	<u>-390</u>	<u>-168</u>	<u>-200</u>	<u>-237</u>	<u>-124</u>
Coeficientes de 2ª ordem												
$b_{11}$	76	270	81	159	189	391	133	196	108	119	109	79
$b_{22}$	-12	-60	567	578	1264	4106	1539	2416	1349	1405	1637	1349
$b_{33}$	190	202	-28	-8	-66	<u>-456</u>	<u>-129</u>	<u>-324</u>	<u>-202</u>	<u>-227</u>	<u>-289</u>	<u>-248</u>
$b_{44}$	104	76	81	130	129	58	71	16	-18	-10	9	-81
Coeficientes de interação												
$b_{12}$	116	363	576	695	980	3770	1035	1643	151	699	933	695
$b_{13}$	-109	-137	-297	<u>-377</u>	<u>-536</u>	<u>-1659</u>	<u>-518</u>	<u>-794</u>	<u>-151</u>	<u>-343</u>	<u>-395</u>	<u>-337</u>
$b_{14}$	-164	-126	-143	-184	<u>-236</u>	<u>-968</u>	<u>-282</u>	<u>-383</u>	-15	<u>-165</u>	<u>-267</u>	<u>-180</u>
$b_{23}$	-436	-437	-131	<u>-350</u>	<u>-270</u>	-93	-84	-50	79	80	151	160
$b_{24}$	-102	-407	-69	<u>-336</u>	<u>-319</u>	-466	<u>-236</u>	<u>-310</u>	<u>-73</u>	<u>-146</u>	<u>-273</u>	75
$b_{34}$	88	87	-98	-244	<u>-423</u>	<u>-1580</u>	<u>-496</u>	<u>-908</u>	<u>-501</u>	<u>-577</u>	<u>-699</u>	<u>-555</u>

Valores sublinhados indicam valores de  $F_{cal}$  significativos em relação aos valores da distribuição de F tabelado.

A observação dos efeitos significativos dos modelos individuais evidenciou a relação não linear entre as áreas cromatográficas obtidas para cada conjunto experimental SPME, devido à presença de vários efeitos significativos de 2ª ordem. Além disso, podem-se notar, também, muitos efeitos significativos de interação entre as variáveis. Sendo assim, fica evidente que a otimização univariada não é a melhor opção, já que não considera as interações e por isso pode conduzir à seleção de variáveis operacionais distantes do ótimo.

Verifica-se que, para as variáveis  $C_{NaCl}$  e T, a maioria dos coeficientes se apresentaram positivos, indicando que a adição de NaCl e o aumento na temperatura de extração aumentam a eficiência de extração dos PCBs. Do contrário, para as variáveis t e  $C_{MeOH}$  os coeficientes se mostraram em grande parte negativos, ou seja, períodos intermediários de tempo e baixas concentrações de metanol ampliam a eficiência de extração na região experimental avaliada.

A qualidade do ajuste dos modelos individuais foi estimada através da análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 3.

De acordo com a Tabela 3, as regressões para todos os PCBs estudados foram estatisticamente válidas, considerando-se 95% de confiabilidade. Entretanto, ocorreu falta de ajuste dos modelos para a maioria dos analitos ao mesmo nível de confiança. Além disso, pelos coeficientes significativos das interações entre as variáveis ( $p$  menor que o nível de significância  $\alpha = 0,05$ ) pode-se estimar que o efeito das variações dos parâmetros operacionais na eficiência de extração não é independente.

Na Tabela 4 é apresentada uma comparação entre as melhores condições experimentais do estudo univariado e do planejamento condicional. Apesar de, em ambos os casos, diferentes condições serem sugeridas para diferentes PCBs, as áreas cromatográficas obtidas no planejamento foram maiores e só no planejamento foi possível identificar uma condição experimental com máxima eficiência de extração (cromatograma A) e uma condição bastante uniforme para a extração de todos os PCBs simultaneamente (cromatograma D).

**Tabela 3.** Análise de variância das regressões quadráticas dos modelos individuais dos PCBs, ao nível de significância de 0,05

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	$F_{calc}$	$p$	Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média quadrática (MQ)	$F_{calc}$	$p$
PCB 28						PCB 52					
Regressão	513325.53	14	36666	5.4472	0.0107	Regressão	893877.91	14	63848	6.05694	0.0076
Resíduos	53849.445	8	6731.2			Resíduos	84330.897	8	10541		
F. ajuste	28329.835	4	7082.5	1.11012	0.4609	F. ajuste	59470.905	4	14868	2.39223	0.2095
Erro puro	25519.61	4	6379.9			Erro puro	24859.992	4	6215		
Total	5.67E+05	22				Total	1.73E+06	22			
R <sup>2</sup>	90.5057					R <sup>2</sup>	91.379				
PCB 74						PCB 101					
Regressão	2840648.2	14	202903	6.89185	0.0079	Regressão	4428071.6	14	316291	9.58803	0.0016
Resíduos	235528.7	8	29441			Resíduos	263904.81	8	32988		
F. ajuste	229643.8	4	57411	39.0225	0.0064	F. ajuste	258780.28	4	64695	50.4983	0.0011
Erro puro	5884.9024	4	1471.2			Erro puro	5124.5352	4	1281.1		
Total	3.08E+06	22				Total	4.69E+06	22			
R <sup>2</sup>	92.3435					R <sup>2</sup>	94.3754				
PCB 118						PCB 153					
Regressão	11479535	14	819967	8.21801	0.0027	Regressão	100571003	14	7E+06	4.33857	0.0216
Resíduos	798214.76	8	99777			Resíduos	13246104	8	2E+06		
F. ajuste	795570.51	4	198893	300.868	3E-05	F. ajuste	13228883	4	3E+06	768.182	5E-06
Erro puro	2644.2526	4	661.06			Erro puro	17221.034	4	4305.3		
Total	1.23E+07	22				Total	1.14E+08	22			
R <sup>2</sup>	93.4987					R <sup>2</sup>	88.3619				
PCB 138						PCB 187					
Regressão	12974491	14	926749	5.08859	0.0189	Regressão	31056671	14	2E+06	4.95899	0.0143
Resíduos	1456983.2	8	182123			Resíduos	3578689.1	8	447336		
F. ajuste	1454734.6	4	363684	646.954	1E-04	F. ajuste	3577692.3	4	894423	3589.24	2E-07
Erro puro	2248.5906	4	562.15			Erro puro	996.78168	4	249.2		
Total	1.44E+07	22				Total	3.46E+07	22			
R <sup>2</sup>	89.9041					R <sup>2</sup>		89.6675			
PCB 128						PCB 156					
Regressão	7982986.5	14	570213	6.22663	0.0069	Regressão	9340492.4	14	667178	4.83431	0.0155
Resíduos	732612.93	8	91577			Resíduos	1104070.8	8	138009		
F. ajuste	732395.22	4	183099	3364.07	3E-07	F. ajuste	1103627.9	4	275907	2491.81	5E-07
Erro puro	217.71092	4	54.428			Erro puro	442.90189	4	110.73		
Total	8.72E+06	22				Total	1.04E+07	22			
R <sup>2</sup>	91.5942					R <sup>2</sup>	89.4292				
PCB 180						PCB 170					
Regressão	13363859	14	954561	4.5158	0.0191	Regressão	7582845.2	14	541632	3.27494	0.0484
Resíduos	1691061	8	211383			Resíduos	1323094.8	8	165387		
F. ajuste	1689474.6	4	422369	1064.94	3E-06	F. ajuste	1322867.1	4	330717	5810.2	9E-08
Erro puro	1586.4553	4	396.61			Erro puro	227.68009	4	56.92		
Total	1.51E+07	22				Total	8.91E+06	22			
R <sup>2</sup>	88.7674					R <sup>2</sup>	85.1437				



**Tabela 4.** Comparação entre as melhores condições experimentais apresentadas pelo estudo univariado e pelo planejamento experimental

Estudo univariado												
PCB	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
C <sub>NaCl</sub> (% m/v)	36	18	36	18	18	18	18	18	18	18	18	18
T (°C)	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
t (min)	50	50	75	60	75	75	75	75	75	75	90	90
C <sub>MeOH</sub> (% v/v)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Estudo multivariado												
PCB	28	52	74	101	118	153	138	187	128	156	180	170
C <sub>NaCl</sub> (% m/v)	36	36	36	36	36	36	36	36	27	27	27	27
T (°C)	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95	95
t (min)	70	100	62,5	62,5	62,5	70	70	70	70	70	70	70
C <sub>MeOH</sub> (% v/v)	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5

## CONCLUSÕES

O uso de planejamento experimental como ferramenta para otimizar a extração dos PCBs da matriz leite foi importante, pois identificou as melhores e piores condições experimentais para a extração desses analitos. Diferentes parâmetros de SPME ótimos foram obtidos para os diferentes PCBs analisados (tanto no estudo uni como multivariado), dificultando o ajuste de uma única condição para satisfazer o binômio eficiência de extração e uniformidade de extração para os 12 PCBs simultaneamente. No entanto, a análise das variâncias no estudo multivariado permitiu identificar que os parâmetros experimentais mais importantes para esse tipo de extração foram a temperatura e a força iônica do meio, sendo que o uso de altas temperaturas (95 °C) e a adição de NaCl (36% m/v) aumentaram a eficiência de extração para todos os PCBs estudados. Quando os demais parâmetros foram avaliados, observou-se um comportamento contrário, ou seja, melhores eficiências de extração foram obtidas com tempos de extração intermediários (70 min) e baixa concentração de MeOH no meio (5% v/v). O estudo permitiu verificar a contribuição de cada variável independentemente e a complexidade das interações que ocorrem entre elas, bem como a interdependência entre a eficiência de extração dos PCBs e os aspectos cinéticos e termodinâmicos da HS-SPME.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

As Figuras 1S a 4S encontram-se disponíveis, sob a forma de arquivo pdf, em <http://quimicanova.s bq.org.br>, com acesso livre.

## REFERÊNCIAS

- LeBlanc, G. A. Em *A Textbook of modern toxicology*; Hodgson, E.; Levi, P. E., eds.; Appleton & Lange: Samford, 2<sup>nd</sup> ed., 1997, p. 389.
- Jones, K. C.; Voogt, P. de; *Environ. Pollut.* **1999**, *100*, 209.
- Heck, M. C.; Santos, J. S.; Bogusz Jr., S.; Costabeber, I.; Emanuelli, T.; *Food Chem.* **2007**, *102*, 288.
- Johansen, P.; Muir, D.; Asmund, G.; Riget, F.; *Sci. Total Environ.* **2004**, *31*, 189.
- Schechter, A.; Cramer, P.; Boguess, K.; Stanley, J.; Olson, J. R.; *Chemosphere* **1997**, *34*, 1437.
- Basheer, C.; Lee, H. K.; Obbard, J. P.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1022*, 161.
- Kowalski, C. H.; Costa, J. G.; Godoy, H. T.; Augusto, F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 502.
- Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; Jong, S. de; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J.; *Handbook of chemometrics and quality metrics Part A*, Elsevier: Amsterdam, 1997.
- Araújo, P. W.; Brereton, R. G.; *Trends Anal. Chem.* **1996**, *15*, 63.
- Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abrano, L.; Thelin, B.; Nyström, A.; Pettersen, J.; Bergman, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, *42*, 3.
- Doehlert, D. H.; *Appl. Statist.* **1970**, *19*, 231.
- Silva, G. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
- Ferreira, S. L. C.; Santos, W. N. L. dos; Quintella, C. M.; Barros Neto, B.; Bosque-Sendra, J. M.; *Talanta* **2004**, *63*, 1061.
- Butine, W. L.; Weigend, A. S.; *Complex Syst.* **1991**, *5*, 603.
- Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.
- Caldas, L. F. S.; Francisco, B. B. A.; Pereira Netto, A. D.; Cassaella, R. J.; *Microchem. J.* **2011**, *99*, 118.
- Lima, K. M. G.; Raimundo Jr., I. M.; Pimentel, M. F.; *Sens. Actuators, B* **2011**, *160*, 691.
- Fabrino, H. J. F.; Silveira, J. N.; Borges Neto, W.; Silva, J. B. B. da; *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 508.
- Aragão, N. M. de; Veloso, M. C. C.; Bispo, M. S.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2482.
- Ferreira, S. L. C.; Jesus, R. M. de; Matos, G. D.; de Andrade, J. B.; Bruns, R. E.; Santos, W. N. L. dos; Cavalcante, D. D.; Vale, M. G. R.; Dessuy, M. B.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 788.
- Röhrig, L.; Meisch, H.-U.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 106.
- Montes, R.; Ramil, M.; Rodriguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1124*, 43.
- Penalver, A.; Pocurrull, E.; Borrull, F.; Marcé, R. M.; *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 557.
- García-Falcon, M. S.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gandara, J.; *Water Res.* **2004**, *38*, 1679.
- Llompert, M.; Pazos, M.; Landín, P.; Cela, R.; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5858.