



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE BENZENO EM BEBIDAS COMERCIAIS

André Brunelli Sanchez

Orientador: Prof^o Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Co-orientadores: Ms. Dilma Budziak
Ms. Edmar Martendal

Florianópolis, junho de 2008

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Química, por oferecer um curso de graduação de alto nível.

Aos professores do Departamento de Química, pelo conhecimento adquirido e contribuição para a minha formação como profissional em química.

Ao Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha, pela orientação e oportunidade de realização deste trabalho.

Aos doutorandos Edmar Martendal e Dilma Budziak e demais colegas do laboratório 209, pela orientação, paciência e amizade, fundamentais para a realização deste trabalho.

À todos os amigos e colegas de curso, pelo apoio nos momentos onde o desejo de desistir se fez presente.

À minha namorada Luana e aos amigos Gabriela, Thiago e Matheus, pelo carinho, companheirismo e por permitir que eu fizesse parte de sua família.

Em especial aos meus pais, Elisabete e José, e irmãos, Léa e Ivan, pelo amor, apoio e confiança que depositaram em mim.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABELAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO	7
1. Introdução.....	8
1.1. Benzeno	8
1.2. Cromatografia gasosa e microextração em fase sólida.....	10
1.3. Planejamento fatorial.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Instrumentação	16
3.2. Reagentes.....	16
3.3. Procedimento experimental	17
3.4. Otimização do método.....	17
3.5. Validação do método	17
3.6. Aplicação do método	18
4. Resultados e discussão	19
4.1. Otimização do método.....	19
4.1.1. Escolha da fibra de SPME.....	19
4.1.2. Planejamento fatorial.....	20
4.1.3. Planejamento Doehlert	22
4.2 Validação do método	24
4.3 Aplicação do método	25
5. Conclusão	28
Referências	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1– Fibra de SPME (a) e suporte para a fibra (b).	11
Figura 2 – Procedimento de extração e dessorção utilizando HS-SPME; (a) perfuração do septo do frasco que contém a amostra; (b) exposição da fibra; (c) retração da fibra e retirada; (d) inserção da fibra no injetor do CG; (e) exposição da fibra e dessorção dos analitos dentro do injetor; (f) retração da fibra e retirada.....	12
Figura 3 – Desempenho das fibras na extração do benzeno.....	19
Figura 4 – Gráfico de Pareto obtido através de um planejamento fatorial completo $2^3 + 3$	21
Figura 5 – Superfície de resposta obtida através dos experimentos do planejamento Doehlert.	23
Figura 6 – Cromatogramas sobrepostos, analisado após 30 minutos de reação (em vermelho) e 45 dias (em preto).....	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos níveis das variáveis nos experimentos do planejamento fatorial completo.....	20
Tabela 2 - Distribuição dos níveis das variáveis nos experimentos do planejamento Doehlert.....	23
Tabela 3 – Parâmetros de mérito determinados.....	24
Tabela 4 – Concentrações encontradas e recuperações obtidas para as amostras avaliadas.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

GC	Cromatografia gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
MS	Espectrômetro de massas
FID	Detector por ionização em chama
CAR	Carboxen
DVB	Divinilbenzeno
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
HS	Headspace
SPME	Microextração em fase sólida
SPE	Extração em fase sólida
INS	Sistema de numeração internacional
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EPA	Agência de Proteção Ambiental
OMS	Organização Mundial da Saúde

RESUMO

Neste trabalho é apresentado o desenvolvimento de um método para a análise de benzeno em bebidas comerciais. A extração do analito da amostra foi realizada por meio de microextração em fase sólida, seguido de análise por cromatografia gasosa e sistema de detecção por ionização em chama. Inicialmente a fibra foi escolhida através de ensaios univariados. Os parâmetros que afetam a eficiência da extração do analito na microextração foram otimizados com o auxílio de ferramentas estatísticas. As variáveis força iônica, tempo e temperatura de extração foram avaliadas através de um planejamento fatorial completo em dois níveis com inclusão de ponto central, o que forneceu a informação de que a força iônica e a temperatura de extração influenciam significativamente sobre a resposta obtida nos intervalos avaliados. Assim, essas variáveis foram otimizadas simultaneamente pela análise de uma superfície de resposta obtida através de um planejamento Doehlert. As condições ótimas obtidas foram: 15 minutos de extração a 0°C com fibra CAR/PDMS, 10 mL de amostra em um frasco de 20 mL adicionado de 3,0 g de NaCl. O método foi validado com a determinação de parâmetros de mérito para a faixa linear de 2 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Um baixo limite de detecção de 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ e excelente precisão ($\text{RSD} < 10\%$, $n=5$), mesmo a baixas concentrações, foram obtidos. A calibração externa com padrões aquosos foi realizada com sucesso, e recuperações na faixa de 73 a 99% foram obtidas. Nove amostras foram estudadas, incluindo refrigerantes, sucos e chás prontos para consumo e sucos concentrados. Benzeno pôde ser quantificado em sete amostras, com concentrações na faixa de 0,8 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quatro dessas amostras apresentaram concentração de benzeno acima do limite máximo estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Palavras-chave: benzeno, planejamento fatorial, matriz Doehlert, SPME, GC-FID.

1. Introdução

A identificação de contaminação proposital ou acidental em bebidas é um interesse crescente tanto para as indústrias de alimentos quanto para os próprios consumidores¹. Durante o processo de fabricação das bebidas são adicionadas substâncias conhecidas como aditivos alimentares que desempenham diferentes funções: corantes que conferem apelo visual, espessantes e aromatizantes que melhoram as propriedades sensoriais e conservantes que retardam a degeneração dos produtos são apenas alguns exemplos das muitas funções exercidas pelos aditivos alimentares. Entretanto, alguns princípios fundamentais referentes ao emprego de aditivos alimentares devem ser seguidos para garantir a segurança dos consumidores: verificar se existem estudos toxicológicos, avaliar a necessidade e determinar a quantidade mínima da substância a ser adicionada para que se alcance determinada função são alguns exemplos².

Atualmente a procura, por parte dos consumidores, por novos alimentos funcionais incluindo alimentos enriquecidos com vitaminas, está se elevando claramente³. A interação entre os diferentes aditivos que compõe uma fórmula, a fim de verificar sua compatibilidade química, é outra questão a ser analisada. O ácido ascórbico (vitamina C) é um componente natural de muitos alimentos sendo também adicionado como suplemento vitamínico e antioxidante; o ácido benzóico é utilizado como conservante devido à sua propriedade antimicrobiana⁴. Porém a combinação entre esses dois aditivos pode levar à formação de benzeno, composto orgânico nocivo à saúde. Ele foi obtido experimentalmente através da descarboxilação de ácido benzóico pelo ataque de um radical hidroxila gerado *in situ*⁵, o que sugere que o benzeno pode também ser gerado em bebidas contendo esta combinação de aditivos.

1.1. Benzeno

A presença de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo benzeno, em alimentos é devida a várias fontes, como a transferência por embalagens de armazenamento e estocagem, conservantes, calor, processos de cocção e técnicas de irradiação usadas para esterilização⁶.

O benzeno é um líquido incolor à temperatura ambiente e de aroma característico. Tem ponto de ebulição relativamente baixo e alta pressão de vapor sendo, portanto, bastante volátil. É pouco solúvel em água e miscível na maioria dos solventes orgânicos. Ocorre naturalmente no petróleo, além de ser encontrado em outras fontes menos conhecidas como vulcões, queimadas e fumaça de cigarro. Atualmente sua presença no ar é devida principalmente às emissões veiculares e processos industriais. Estruturalmente, o benzeno compreende seis átomos de carbono unidos por ligações eqüidistantes em um arranjo cíclico planar; apresenta uma deslocalização de elétrons conhecida como aromaticidade, o que confere à molécula uma estabilidade superior à esperada para um hipotético ciclo-hexatrieno. É muito utilizado na produção de outros compostos devido às suas propriedades reacionais; é passível de halogenação, nitração, sulfonação, alquilação e acilação⁷.

A toxicidade do benzeno é consequência de sua estabilidade e reatividade. Uma vez dentro do organismo, ele é metabolizado pelo fígado produzindo compostos que incluem fenol, catecol e hidroquinona, e um metabolismo secundário ocorre na medula óssea. Associado à produção de metabólitos tóxicos ocorre ainda a formação de radicais livres e acredita-se que eles contribuem para a toxicidade direta do benzeno⁸.

A primeira associação entre a ocorrência de leucemia e a exposição prolongada ao benzeno foi sugerida em 1928, quando foi observada a ocorrência da doença em um trabalhador que havia sido exposto ao benzeno durante cinco anos em seu ambiente de trabalho. Durante as décadas seguintes mais casos similares foram relatados até que em 1979 surgiram provas experimentais do potencial cancerígeno do benzeno⁹. Estudos mais recentes de potencial toxicológico mostram que o benzeno é na verdade menos tóxico que os seus metabólitos, e que a combinação de hidroquinona e muconaldeído, outro metabólito do benzeno, tem o maior potencial tóxico⁸.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um nível máximo de benzeno de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para água potável¹⁰. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite máximo¹¹ de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, o mesmo valor estipulado nos Estados Unidos pela Agência de Proteção Ambiental (EPA)¹². Na União Européia esse valor é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ¹³. Como as autoridades sanitárias estrangeiras e nacionais não estabelecem um limite máximo de benzeno específico para refrigerantes e sucos industrializados, o padrão de qualidade adotado é o mesmo que para a água potável.

1.2. Cromatografia gasosa e microextração em fase sólida

A cromatografia gasosa (GC) é geralmente o método escolhido para a análise de benzeno em matrizes aquosas^{14, 15}. É um método clássico que consiste no fluxo de um gás inerte que conduz a amostra através da coluna cromatográfica onde ocorre a separação dos componentes da amostra como consequência das diferentes afinidades dos mesmos com a fase estacionária da coluna. Após a separação, os componentes da amostra passam por um sistema de detecção apropriado para que possam ser determinados. Os detectores mais utilizados atualmente são o espectrômetro de massas (MS) e o detector por ionização em chama (FID)¹⁶.

O FID é normalmente aplicado na análise de compostos orgânicos. Em um queimador, o efluente da coluna cromatográfica é misturado a hidrogênio e ar e é então queimado, liberando íons e elétrons que conduzem eletricidade através da chama. Com um potencial de algumas centenas de volts sendo aplicado entre o bico do queimador e um eletrodo coletor localizado logo acima, a corrente resultante é direcionada para leitura por um dispositivo eletrônico. Algumas vantagens do FID são a alta sensibilidade ($\sim 10^{-13}$ g s⁻¹) e o baixo ruído. Tem como desvantagem a total destruição da amostra¹⁶.

Entretanto, a injeção direta de amostras aquosas no aparelho de GC não é desejável, pois tanto a coluna cromatográfica quanto o sistema de detecção FID não são compatíveis com a presença de água. Para a análise de bebidas, além desta questão, ainda devem ser consideradas a complexidade da matriz e a baixa concentração do analito. Desta forma é necessário alguma técnica que permita extrair o analito da amostra. Alguns exemplos incluem a clássica extração líquido-líquido (LLE) e métodos mais recentes como a extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME).

A SPE foi desenvolvida nos anos 80 para a análise de compostos orgânicos em matrizes aquosas. Assim como a SPME, a SPE emprega materiais adsorventes como fase extratora. Na SPE a amostra é eluída através de um cartucho plástico contendo o material adsorvente que retém o analito. Geralmente esta etapa é seguida pela eluição de um solvente seletivo para retirada de interferentes que ficam retidos juntamente com o analito, e ainda de outro solvente para retirar o próprio analito da fase extratora. Outro inconveniente deste método é o entupimento do cartucho extrator que pode ocorrer se a

amostra contiver sólidos ou materiais oleosos. Para superar essas limitações, uma quantidade mínima de material adsorvente pode ser aplicada a um fino bastão de sílica fundida ou outro material apropriado, dando origem às fibras utilizadas na SPME¹⁷.

A SPME é uma técnica rápida, sensível e dispensa totalmente o uso de solventes para a extração, podendo ser utilizada em conjunto com GC, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e eletroforese capilar (CE). Atualmente esta técnica é aplicada na análise de diversas amostras como água, ar, solo e materiais biológicos¹⁸⁻²², inclusive in vivo. A técnica foi desenvolvida no início dos anos 90 pelo grupo de pesquisa do professor Janusz Pawliszyn, da Universidade de Waterloo, Canadá, que inicialmente estudou a aplicação de diferentes fases poliméricas depositadas sobre uma fibra de sílica fundida para a extração de analitos em uma amostra líquida¹⁷. Com o passar do tempo o aparato foi sendo aperfeiçoado, resultando nas fibras disponíveis comercialmente (Figura 1).



Figura 1– Fibra de SPME (a) e suporte para a fibra (b).

Os recobrimentos, outro termo usado para se referir às fases extratoras em SPME, presentes nas fibras comerciais são constituídos de diferentes materiais. Os recobrimentos mais utilizados são polidimetilsiloxano (PDMS), para análise de compostos apolares, e poliacrilato (PA), para compostos polares. As fibras contendo somente uma fase polimérica são chamadas de homogêneas. Existem ainda as fibras heterogêneas ou mistas, nas quais a fase polimérica é adicionada de partículas porosas como o carboxen (CAR) e o divinilbenzeno (DVB), aumentando a seletividade e a sensibilidade da fibra, pois os poros retêm fisicamente o analito. O CAR e o DVB são materiais de carbono produzidos sinteticamente e desta forma o volume dos poros e o tamanho das partículas produzidas são cuidadosamente controlados²³.

Em uma extração por SPME, conforme procedimento ilustrado pela Figura 2, a amostra é colocada em um frasco e fechado com uma tampa dotada de septo; em seguida, o septo é perfurado pela agulha da fibra e a mesma é exposta no interior do

frasco, o que pode ser realizado de duas maneiras: uma direta, com a fase extratora da fibra em contato com a amostra, e outra indireta, expondo a fase extratora somente à região gasosa acima do líquido, conhecido como headspace (HS). Este último modo é conhecido como HS-SPME e é especialmente útil, pois prolonga a vida útil da fibra e diminui a co-adsorção de interferentes. Após um determinado tempo para a concentração dos analitos no recobrimento, a fibra é levada ao injetor do GC onde os analitos são dessorvidos termicamente e seguem para a coluna cromatográfica. Uma vantagem da SPME reside na reutilização das fibras que, diferentemente dos cartuchos de SPE, podem ser utilizadas para muitas análises.

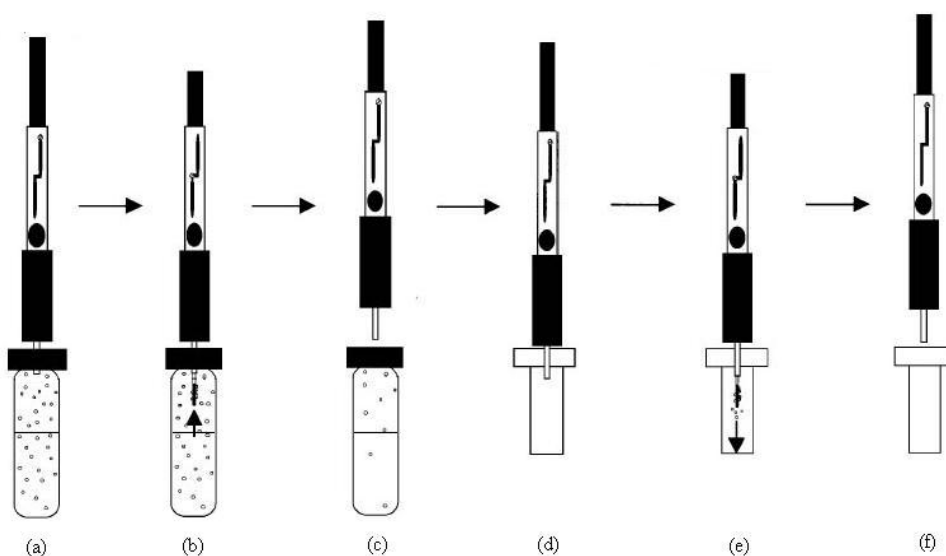


Figura 2 – Procedimento de extração e dessorção utilizando HS-SPME; (a) perfuração do septo do frasco que contém a amostra; (b) exposição da fibra; (c) retração da fibra e retirada; (d) inserção da fibra no injetor do CG; (e) exposição da fibra e dessorção dos analitos dentro do injetor; (f) retração da fibra e retirada.

1.3. Planejamento fatorial

Geralmente os métodos de otimização utilizados em química se baseiam em métodos univariados. Nessa metodologia, todas as variáveis são fixadas com exceção de uma, que é variada até se encontrar um valor ótimo. Esse valor ótimo é então fixado e outra variável é otimizada, esse procedimento é repetido até que todas as variáveis sejam otimizadas. Os métodos de otimização univariados possuem como principal vantagem a facilidade de interpretação dos resultados, uma vez que somente um gráfico

no plano (em duas dimensões) é obtido. Entretanto, uma desvantagem é o número relativamente grande de experimentos necessário para otimização de todas as variáveis, e principalmente o fato desse procedimento não levar em conta a interação entre as variáveis²⁴.

Otimizações multivariadas têm se mostrado mais efetivas que as clássicas otimizações univariadas²⁵. Geralmente uma otimização multivariada é realizada em duas etapas: um planejamento fatorial em dois níveis, onde se obtém o efeito de cada variável e da interação entre as mesmas na resposta analítica. O número de experimentos em um planejamento fatorial em dois níveis é dado por $N = 2^{k-p} + C$, onde k é o número de variáveis, p é um número inteiro que denota se haverá ou não fracionamento do planejamento e C é o número de replicatas do ponto central. Planejamentos fatoriais fracionados são geralmente utilizados para se fazer uma triagem das variáveis, quando há um número grande dessas a serem estudadas e não se tem idéia quais são as mais importantes. Para um pequeno número de variáveis utiliza-se o planejamento fatorial completo, onde $p = 0$. Realizam-se também experimentos no ponto central (média aritmética entre os dois níveis escolhidos para cada variável). Esses experimentos são realizados para estimar a perda de linearidade da resposta entre os níveis mínimos e máximos escolhidos e para aumentar o número de graus de liberdade do modelo. Os resultados do planejamento fatorial são geralmente apresentados na forma de um gráfico de Pareto, um gráfico de barras horizontais que denotam o efeito na resposta de cada variável e interação. Uma linha vertical corta as barras, e denota a partir de que valor de efeito a variável ou interação em questão é estatisticamente significativa²⁶.

Com a devida interpretação dos resultados do planejamento fatorial, a segunda etapa é geralmente realizada com o auxílio de uma metodologia de superfície de resposta, onde as variáveis significativas apontadas pelo gráfico de Pareto são otimizadas em pelo menos três níveis. Uma metodologia muito utilizada para duas ou três variáveis pela sua alta eficiência é a matriz Doehlert²⁵. Como o nome sugere, uma superfície de resposta é obtida, e os dados experimentais são ajustados geralmente a um polinômio de segundo grau, a partir do qual se podem estimar os pontos críticos da função (máximo, mínimo ou ponto de sela). Alternativamente, o ponto ótimo para cada variável pode ser inspecionado visualmente.

O método de otimização multivariado tem então como vantagens o reduzido número de experimentos para se alcançar as condições ótimas das variáveis e a

avaliação simultânea das mesmas, o que permite que um ótimo verdadeiro seja encontrado. Como desvantagem está a dificuldade de interpretação dos resultados, que exige um pouco de familiarização com as etapas e com a matemática envolvida. Outra desvantagem é a necessidade de um conhecimento prévio do sistema em estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver um método analítico que permita a detecção e quantificação de benzeno em amostras de sucos e refrigerantes comerciais, utilizando uma otimização multivariada e a técnica de microextração em fase sólida para o preparo da amostra.

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar as variáveis que influenciam a extração de benzeno pela fibra de SPME através de ferramentas multivariadas, tais como planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta.

- Validar a metodologia, através da obtenção dos parâmetros analíticos de mérito como limite de detecção e quantificação, coeficiente de correlação, faixa linear de trabalho, precisão e exatidão.

- Aplicar o método desenvolvido em amostras de sucos e refrigerantes comerciais.

3. Materiais e métodos

3.1. Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-14B (Kyoto, Japão), equipado com detector de ionização por chama (FID). A separação cromatográfica deu-se em uma coluna capilar OV-5 (30 mm x 0,25 mm, filme de 0,25 μm de espessura; OV Specialty Chemical, Marietta, OH, USA). A programação de temperatura da coluna foi 40°C (1 min), 10°C min^{-1} até 100°C, 15°C min^{-1} até 180°C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 300 e 280°C, respectivamente. Nitrogênio ultra-puro 5.0 (AGA, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado tanto como gás carreador quanto gás auxiliar (make-up), a 1.0 e 35 mL min^{-1} respectivamente. Ar sintético e hidrogênio 5.0 (White Martins, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados no sistema FID.

Cinco tipos de fibra foram avaliados: polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μm de espessura do filme extrator), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, 65 μm), carboxenTM/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 μm), carbowax[®]/divinilbenzeno (CW/DVB, 65 μm) e divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 30 μm), todas da marca Supelco (Bellefonte, PA, USA).

A agitação das amostras foi realizada com auxílio de um agitador magnético (Speedlab, São Paulo, SP, Brasil) e a temperatura controlada por um banho termostaticado MQ-BTC (Microquímica, Florianópolis, SC, Brasil).

3.2. Reagentes

A água destilada utilizada foi purificada através de um filtro de carvão ativo e posteriormente deionizada. A solução padrão de benzeno (Sigma–Aldrich, Milwaukee, WI, USA) foi preparada com metanol grau HPLC (Tedia, Fairfield, OH, EUA). Cloreto de sódio grau P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para o estudo da influência da força iônica, também conhecido como efeito salting-out.

3.3. Procedimento experimental

Todos os experimentos, tanto na otimização quanto na validação e aplicação, foram realizados adicionando a amostra (10 mL) no frasco de SPME (20 mL) contendo determinada massa de cloreto de sódio. O frasco era então colocado em um banho térmico sob agitação magnética, onde permanecia durante cinco minutos para estabilização da temperatura e pré-equilíbrio. Após este tempo, a extração por SPME foi realizada conforme ilustrado na Figura 2.

3.4. Otimização do método

A escolha do tipo de fibra de SPME a ser utilizada no método desenvolvido foi realizada através de ensaios univariados em triplicata, testando cada uma das fibras disponíveis na extração de benzeno em suco de laranja comercial (10 mL, $50 \mu\text{g L}^{-1}$), mantendo a massa de sal (2,0 g NaCl), o tempo (10 min) e temperatura de extração (5°C) constantes. Após a escolha da fibra, um planejamento fatorial completo, envolvendo as variáveis força iônica (1,0 e 3,0 g de NaCl em 10 mL de amostra), temperatura (2 e 10°C) e tempo de extração (10 e 20 min) foi realizado para avaliar as melhores condições experimentais de extração do benzeno. Um ponto central em triplicata foi adicionado ao planejamento (2,0 g NaCl, 6°C e 15 min).

De acordo com os resultados do planejamento fatorial, a variável tempo de extração foi fixada em 15 min e as variáveis temperatura de extração (0; 2 e 4°C) e força iônica (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g) foram otimizadas simultaneamente pela metodologia de superfície de resposta através da matriz Doehlert. Todos os dados, incluindo os do planejamento fatorial completo, foram tratados com o software Statistica 6.0.

3.5. Validação do método

A validação do método foi realizada através da obtenção dos seguintes parâmetros analíticos de mérito: limite de detecção, limite de quantificação, faixa linear, coeficiente de correlação, precisão e exatidão.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados considerando três e dez vezes, respectivamente, a relação entre o desvio do coeficiente linear e o coeficiente angular da curva de calibração externa, construída com padrões aquosos nas concentrações de 0; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão foi avaliada em dois níveis de concentração (5 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) com cinco replicatas em cada nível. A quantificação das amostras foi realizada através da curva de calibração por adição de analito e a exatidão do método foi determinada através da relação entre a sensibilidade desta curva e a curva de calibração externa em água.

3.6. Aplicação do método

Amostras de bebidas industrializadas contendo ácido ascórbico (INS 300) e ácido benzóico (INS 210) foram selecionadas para estudo. O conjunto de bebidas era composto por refrigerantes, sucos e chás prontos para consumo e sucos concentrados. As amostras foram inicialmente acondicionadas em refrigerador em torno de 4°C, de onde eram retiradas imediatamente antes de cada análise, realizada conforme o procedimento experimental descrito no item 3.3 e os parâmetros experimentais resultantes da etapa de otimização. Os refrigerantes, sucos e chás prontos para consumo foram retirados diretamente da embalagem para a análise com exceção dos sucos concentrados, que foram preparados conforme as instruções contidas nos respectivos rótulos.

4. Resultados e discussão

4.1. Otimização do método

4.1.1. Escolha da fibra de SPME

Inicialmente foram avaliadas as eficiências de cinco diferentes fibras de SPME na extração de benzeno. Nesse estudo fixou-se o tempo de extração em 10 min, temperatura da amostra em 5°C, 2,0 g de cloreto de sódio e concentração de benzeno em 50 µg L⁻¹. A escolha da melhor fibra foi feita comparando as médias das áreas de pico obtidas em triplicata para cada fibra. A Figura 3 mostra o desempenho individual das fibras utilizadas.

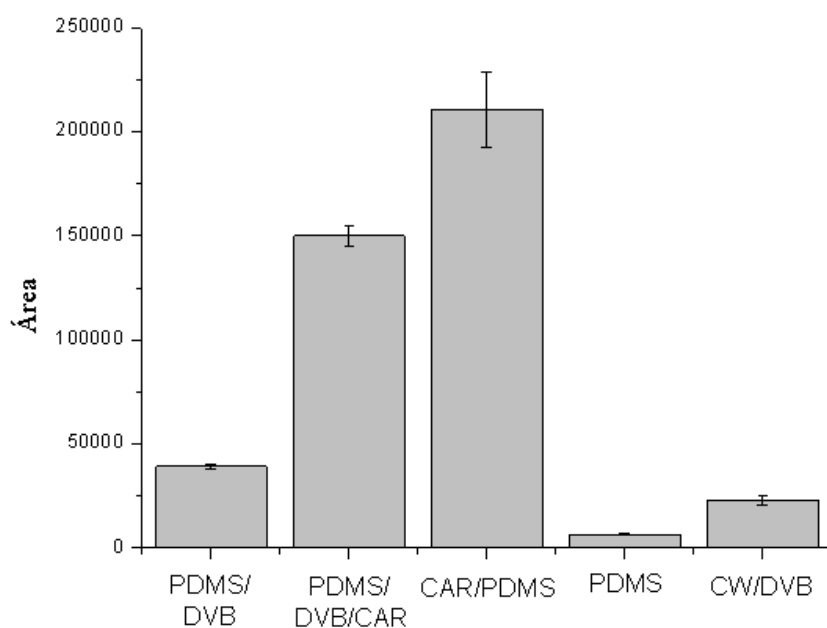


Figura 3 – Desempenho das fibras na extração do benzeno.

A fibra CAR/PDMS mostrou o maior desempenho entre as fibras testadas e foi a fibra escolhida para os estudos posteriores. Os resultados mostram que a presença de carvão ativo na fase extratora aumenta sua capacidade de extração, fenômeno devido à alta porosidade e, portanto, à alta capacidade adsorptiva do carvão ativo (carboxen). Os poros das partículas de DVB tem em média 17 Å de diâmetro, relativamente grandes quando comparados aos poros das partículas de carboxen, com em média 10 Å de

diâmetro. As fibras CAR/PDMS e PDMS/DVB são recomendadas para a análise de compostos C₂ – C₁₂ e C₆ – C₁₅, respectivamente²³.

4.1.2. Planejamento fatorial

Determinada a melhor fibra para a extração do benzeno, foi realizado um planejamento fatorial completo para verificar a influência de cada variável sobre a resposta analítica. Os níveis selecionados para cada variável foram: força iônica (1,0; 2,0 e 3,0 g de NaCl em 10 mL de amostra), temperatura (2; 6 e 10°C) e tempo de extração (10; 15 e 20 min). O número de experimentos realizados é dado por $N = 2^{k-p} + C$; o valor de p foi igual a zero, pois não houve fracionamento devido ao baixo número de variáveis, k é igual ao número de variáveis e C é o número de experimentos no ponto central, o que resultou na realização de 11 experimentos. Os níveis mínimo, central e máximo são denominados -1, 0 e +1, respectivamente, e a distribuição dos experimentos é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos níveis das variáveis nos experimentos do planejamento fatorial completo.

Experimento	Temperatura de extração	Força iônica	Tempo de extração	Resposta (área)
1	-1	-1	-1	135192
2	-1	-1	+1	172349
3	-1	+1	-1	253178
4	-1	+1	+1	279382
5	0	0	0	149565
6	0	0	0	125252
7	0	0	0	150917
8	+1	-1	-1	101959
9	+1	-1	+1	114906
10	+1	+1	-1	177506
11	+1	+1	+1	151135

Os resultados deste planejamento são apresentados através de um gráfico de barras horizontais conhecido como gráfico de Pareto (Figura 4).

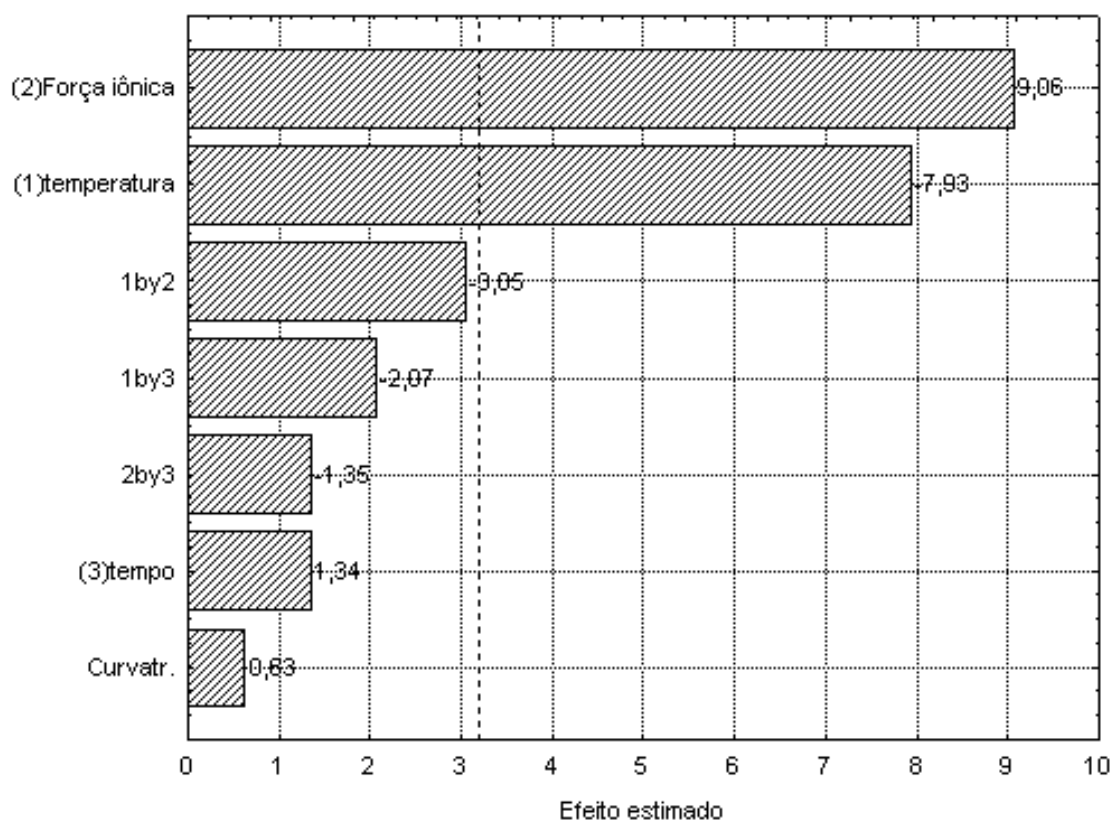


Figura 4 – Gráfico de Pareto obtido através de um planejamento fatorial completo $2^3 + 3$.

A linha vertical ($p = 0,05$) determina se a variável influencia significativamente na resposta, em um nível de confiança de 95%. Através deste gráfico se pode observar que as variáveis força iônica e temperatura apresentaram uma influência significativa sobre a resposta. Entretanto, o sinal que precede o valor do efeito orienta quanto ao sentido desta influência: a variável força iônica apresenta um valor positivo, indicando que quando se alternou para o nível superior desta variável (3,0 g de NaCl) houve uma melhora na resposta, e para a variável temperatura este efeito foi conseguido quando alternou-se para o nível mais baixo (2°C). A variável tempo de extração não influenciou significativamente na resposta obtida, sendo então fixada no seu nível central (15 min). Não foram observadas também interações significativas entre as variáveis.

A temperatura de extração é um parâmetro extremamente importante em qualquer procedimento de extração, pois afeta tanto a velocidade da transferência de massa quanto no equilíbrio de partição. Um aumento na temperatura de extração aumenta a cinética de transferência de massa, diminuindo assim o tempo necessário para que se atinja um equilíbrio de partição entre a amostra e a fase extratora. Contudo, a variação de entalpia (ΔH) associada ao processo de sorção dos analitos pela fase

extratora é negativa e desta forma um aumento na temperatura de extração leva a uma diminuição na constante de partição, diminuindo assim a massa de analito extraída no equilíbrio. Sendo o benzeno um composto bastante volátil, a diminuição da temperatura da amostra não interferiu em sua volatilidade. Assim, observou-se um aumento significativo da quantidade extraída devido ao deslocamento do equilíbrio de partição devido à baixa temperatura. Conclui-se então que o efeito do abaixamento da temperatura (efeito termodinâmico) foi superior ao efeito causado pelo aumento desta (efeito cinético).

A modificação da força iônica da amostra é um procedimento amplamente utilizado em métodos de extração. O aumento da força iônica da solução amostra (geralmente aquosa) tende a diminuir a solubilidade de analitos orgânicos nesse meio. Assim, a constante de distribuição do analito entre a fase extratora e a amostra tende a aumentar, devido ao aumento da concentração do analito no headspace da amostra causado em consequência do aumento da constante da lei de Henry para o analito, que relaciona a pressão de vapor de equilíbrio de uma substância com sua concentração na fase condensada. Os resultados obtidos concordam com este fenômeno, visto que uma maior força iônica levou a um aumento na quantidade extraída.

4.1.3. Planejamento Doehlert

Com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial completo, as variáveis força iônica e temperatura de extração foram selecionadas para um estudo mais detalhado através de uma metodologia de superfície de resposta, mais especificamente um planejamento Doehlert. O estudo de duas variáveis através deste planejamento é realizado em cinco níveis para uma variável enquanto a outra é estudada em três níveis, sendo que o maior número de níveis é reservado para a variável que apresenta maior influência sobre a resposta. Desta forma a força iônica foi estudada em cinco níveis (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 g de NaCl) e a temperatura de extração em três níveis (0; 2 e 4°C). Os resultados deste planejamento encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos níveis das variáveis nos experimentos do planejamento Doehlert.

Experimento	Temperatura de extração (°C)	Força iônica (g de NaCl)	Resposta (área)
1	0,0	2,0	167497
2	0,0	3,0	235655
3	2,0	1,5	111281
4	2,0	2,5	199509
5	2,0	2,5	200256
6	2,0	2,5	185324
7	2,0	3,5	231714
8	4,0	2,0	187373
9	4,0	3,0	213598

Através dos resultados obtidos (Tabela 2), foi obtida uma superfície de resposta (Figura 5) para avaliar o comportamento da resposta analítica entre os níveis estudados.

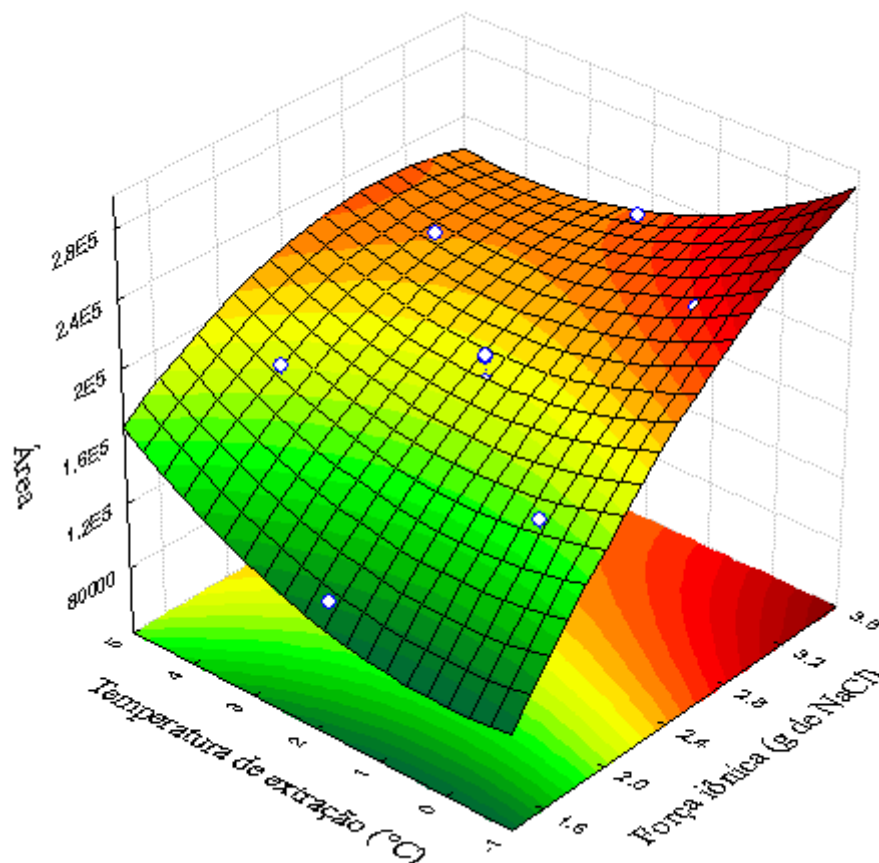


Figura 5 – Superfície de resposta obtida através dos experimentos do planejamento Doehlert.

Observa-se pela superfície de resposta obtida que ainda há um aumento na resposta analítica com o abaixamento da temperatura de extração e aumento da força

iônica, ou seja, um ponto de máximo não foi obtido dentro dos intervalos estudados. O estudo a temperaturas mais baixas que 0°C e com forças iônicas maiores não puderam ser realizadas devido a limitações experimentais: o banho termostaticado utiliza água que congelaria rapidamente se a temperatura fosse ainda mais baixa e a concentração de cloreto de sódio utilizada estava no limite de saturação. Desta forma o ponto ótimo de trabalho foi determinado visualmente na superfície de resposta, as condições ótimas experimentais do método desenvolvido são: fibra CAR/PDMS, volume de amostra de 10 mL, tempo e temperatura de extração 15 min e 0°C, respectivamente, e aumento da força iônica pela adição de 3,0 g de NaCl.

4.2 Validação do método

Depois de otimizados todos os parâmetros experimentais, procedeu-se a validação do método analítico proposto. Os parâmetros de mérito determinados e seus respectivos valores encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros de mérito determinados.

Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (RSD%)*
2 - 50	0,999	0,6	2,1	9,1 e 5,7

* – valores referentes às concentrações de 5 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

R – coeficiente de correlação.

LD – limite de detecção.

LQ – limite de quantificação.

Um excelente coeficiente de correlação foi obtido para a curva analítica na faixa de concentração estudada. O limite de quantificação (LQ) do método apresentado está abaixo do limite máximo de benzeno em água potável no Brasil determinado pela ANVISA¹¹, demonstrando que o método é apropriado para a análise a que se propõe. Mesmo em baixa concentração ($5 \mu\text{g L}^{-1}$), uma excelente precisão foi obtida, apresentando um desvio padrão relativo inferior a 10%. Outro parâmetro de mérito essencial para a validação é a exatidão, que foi obtida simultaneamente às análises das amostras selecionadas.

4.3 Aplicação do método

Após a validação, foi iniciada a aplicação método desenvolvido para a análise de nove amostras de bebidas comerciais. Foram selecionadas as bebidas contendo ácido ascórbico (INS 300) e ácido benzóico (INS 210), compondo três grupos: refrigerantes, sucos e chás prontos para consumo e sucos concentrados. Os resultados encontram-se na Tabela 4. A quantificação de benzeno em todas as amostras estudadas foi realizada através de calibração por adição de analito e a recuperação foi calculada comparando-se as inclinações entre a curva de calibração por adição de analito e a curva de calibração externa em água.

Tabela 4 – Concentrações encontradas e recuperações obtidas para as amostras avaliadas.

Amostra	Conc. de benzeno \pm SD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Refrigerante de cola	$0,8 \pm 0,2$	81,0
Suco de frutas cítricas	ND	82,4
Suco de limão	$0,8 \pm 0,3$	99,5
Suco isotônico	$1,2 \pm 0,7$	73,2
Chá 1	$15,2 \pm 1,1$	94,0
Chá 2	$12,6 \pm 1,5$	86,5
Chá 3	$11,4 \pm 0,5$	77,3
Suco concentrado 1*	$6,9 \pm 0,6$	92,3
Suco concentrado 2*	ND	86,6

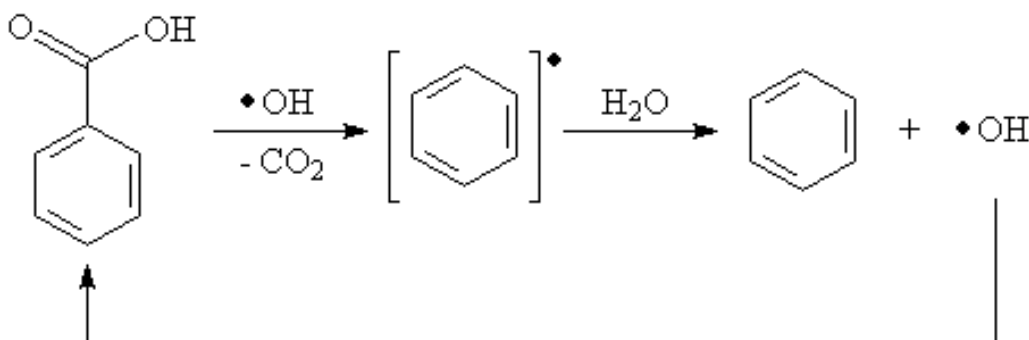
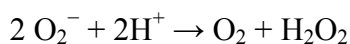
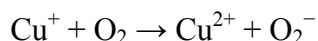
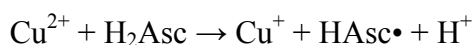
* – as concentrações se referem ao suco preparado conforme as instruções dos respectivos rótulos.
ND – abaixo do limite de detecção do método.

As recuperações ficaram dentro de um limite aceitável, entre 73 e 99%, indicando que a quantificação pode ser realizada através de uma curva de calibração externa com padrão de benzeno em água, o que simplifica o método desenvolvido uma vez que se torna desnecessário o tedioso procedimento de realização de uma curva de calibração por adição de analito para cada amostra que se deseja estudar.

Fabiatti e colaboradores⁶, em um estudo sobre os níveis de benzeno em sucos e refrigerantes, encontraram concentrações na faixa de 1,1 a 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de benzeno em refrigerantes de cola e na faixa de 2,4 a 3,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sucos, todas abaixo do limite máximo permitido para água potável no Brasil regulamentado pela ANVISA¹¹. Neste trabalho, porém, níveis acima do permitido foram encontrados em quatro das nove amostras estudadas. As maiores concentrações de benzeno encontradas foram em um dos sucos concentrados e nos três chás analisados, em um intervalo de concentrações de

7 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. As outras amostras apresentaram concentrações mais baixas de benzeno, na faixa de 0,8 a 1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Um ensaio, de caráter qualitativo, foi realizado a fim de confirmar se ocorreria a formação de benzeno em um suco de laranja natural adicionado de ácido benzóico, ácido ascórbico e Cu^{2+} . Gardner⁵ sugere que a produção de benzeno pode ocorrer através da descarboxilação do ácido benzóico pelo ataque de um radical hidroxila, formado pela seguinte reação:



As concentrações para a máxima formação de benzeno proposto por Gardner e colaboradores foi: tempo e temperatura de reação de 15 minutos e 25°C, respectivamente, pH da amostra igual a 3,0, concentração de ácido benzóico, ácido ascórbico, peróxido de hidrogênio e Cu^{2+} de 760 mg L^{-1} , 1400 mg L^{-1} , 360 mg L^{-1} e 16 mg L^{-1} , respectivamente. Nessas condições, a concentração encontrada de benzeno foi de cerca de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

De maneira a se aproximar de uma situação mais real, ou seja, com concentração de ácido benzóico e ascórbico geralmente utilizada nesse tipo de bebida, optou-se pela não adição de peróxido de hidrogênio e pela adição de concentrações mais baixas dos precursores para a formação de benzeno: 100 mg L^{-1} de ácido benzóico, 20 mg L^{-1} de ácido ascórbico e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu^{2+} . O pH da amostra após adição dos reagentes em 10 mL do suco natural preparado ficou em torno de 3,0. A análise das amostras adicionadas desses reagentes foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente, e, da mesma

maneira que Gardner, benzeno não foi detectado. Para verificar a influência do tempo de reação juntamente com a não adição de peróxido à mistura, as amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente e analisadas após 45 dias. O cromatograma obtido (Figura 6, em rosa) exibe um pico correspondente ao benzeno no tempo de retenção de 2,3 minutos, demonstrando que a reação ocorre sem aquecimento e sem adição de peróxido. A concentração de benzeno formada após esse tempo de reação foi de $7,2 \pm 0,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Desta maneira, confirma-se que benzeno pode ser formado em condições similares de concentração de ácido benzóico e ascórbico empregadas em bebidas industrializadas.

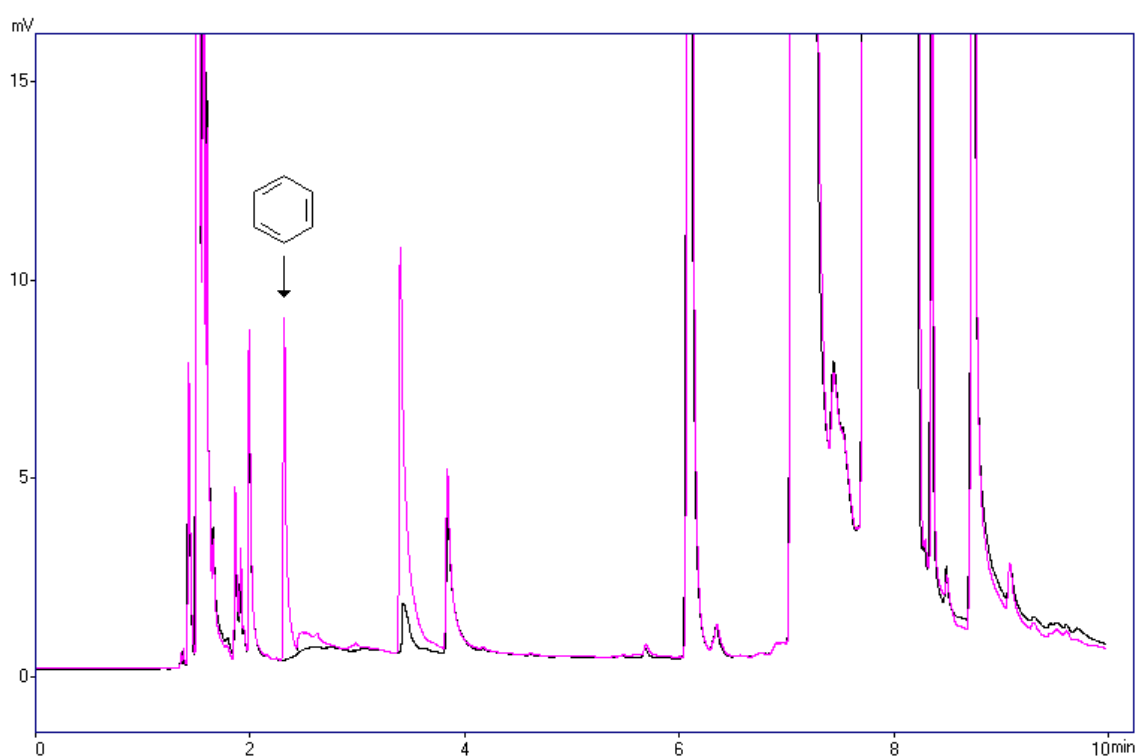


Figura 6 – Cromatogramas sobrepostos, análise após 30 minutos de reação (em preto) e 45 dias (em rosa).

O cromatograma acima mostra uma ótima separação do pico correspondente ao benzeno dos demais componentes da amostra, fato que permite que o analito possa ser identificado inequivocamente, ou seja, o método desenvolvido apresenta uma adequada seletividade.

5. Conclusão

O número reduzido de experimentos realizados na etapa de otimização dos parâmetros experimentais, a facilidade na interpretação e os bons resultados obtidos demonstram as principais vantagens dos planejamentos multivariados, como o planejamento fatorial e o planejamento Doehlert, sobre outros tipos de planejamento que estudam a influência de cada variável experimental separadamente.

As ferramentas analíticas e estatísticas utilizadas neste trabalho se mostraram eficientes, tornando possível o desenvolvimento de um método que permite determinar traços de benzeno em bebidas comerciais utilizando HS-SPME e GC/FID. Os baixos LD e LQ, de 0,6 e 2,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e a exatidão de no mínimo 73% demonstram que o método desenvolvido é apropriado para a análise deste tipo de amostra utilizando uma curva de calibração externa em água. Desta forma a determinação de benzeno em uma série de amostras pode ser realizada em um tempo reduzido, pois não é necessária a construção de uma curva de calibração para cada amostra.

O método desenvolvido foi empregado na análise de nove bebidas industrializadas, entre refrigerantes, sucos e chás prontos para consumo e sucos concentrados, todos contendo a combinação dos aditivos ácido benzóico e ácido ascórbico e, portanto, com potencial para a formação in situ de benzeno conforme sugerido por Gardner e também este trabalho. Em quatro amostras, sendo os três chás e um dos sucos concentrados, foram detectados níveis de benzeno até três vezes acima do limite máximo permitido para água potável no Brasil. Embora a principal via de exposição ao benzeno seja pela inalação²⁷, este resultado demonstra a necessidade de um monitoramento contínuo dos alimentos para este composto devido ao seu potencial cancerígeno mesmo a baixos níveis de exposição²⁸.

Referências

- 1 - Charlton, A. J.; Robb, P.; Donarski, J. A.; Godward, J. *Non-targeted detection of chemical contamination in carbonated soft drinks using NMR spectroscopy, variable selection and chemometrics*. Analytica Chimica Acta, In Press, 2008.
- 2 - Portaria nº 540. ANVISA, 27 de outubro de 1997. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=88>> Acesso em : 04/06/2008
- 3 - Mendiola, J. A.; Marin, F. R.; Señoráns, F. J.; Reglero, G.; Martín, P. J.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. *Profiling of different bioactive compounds in functional drinks by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1188, 234-241, 2008.
- 4 - Brul, S.; Coote, P. *Preservatives agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms*. International Journal of Food Microbiology, 50, 1 – 17, 1999.
- 5 - Gardner, L. K.; Lawrence, G.D. *Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition metal catalyst*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 693-695, 1993.
- 6 - Fabietti, F.; Delise, M.; Bocca, A. P. *Investigation into the benzene and toluene content of soft drinks*. Food Control, 12, 505-509, 2001.
- 7 - McMurry, J. *Química orgânica: combo*. 6 ed. Rio de Janeiro: Thomson Learning, 1006p., 2005. ISBN 8522104298
- 8 – Atkinson, T. J. *A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: Summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, In Press, Corrected Proof, 2008.

9 - Maltoni, C.; Scarnato, C. *First experimental demonstration of the carcinogenic effects of benzene; long-term bioassays on Sprague-Dawley rats by oral administration.* Med Lav, 70 (5), 352–357, 1979.

10 - WHO Guidelines for drinking-water quality, Third Edition, 2006. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf> Acesso em: 04/06/2008

11 - Resolução RDC nº 173. ANVISA, 13 de setembro de 2006. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=23915&word=274>> Acesso em: 04/06/2008

12 - Consumer Factsheet on: BENZENE. EPA. Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/dwh/c-voc/benzene.html>> Acesso em: 04/06/2008

13 - Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Disponível em: <http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/1998/l_330/l_33019981205en00320054.pdf> Acesso em: 04/06/2008

14 - Sieg, K.; Fries, E.; Püttmann, W. *Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and n-aldehydes in melted snow water via solid-phase dynamic extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1178 (1-2), 178-186, 2008.

15 - Demeestere, K.; Dewulf, J.; Witte, B.; Langenhove, H. V. *Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices.* Journal of Chromatography A, 1153 (1-2), 130-144, 2007.

16 - Skoog, D. A.; Leary, J. J. *Principles of instrumental analysis.* 4.ed. Philadelphia: Saunders, 700p., 1992. ISBN 0030233437

17 - Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction- Theory and Practice.* New York: Wiley-VCH, 247p., 1997. ISBN 0471190349

- 18 - Budziak, D.; Martendal, E.; Carasek, E. *Application of NiTi alloy coated with ZrO₂ as a new fiber for solid-phase microextraction for determination of halophenols in water samples*. *Analytica Chimica Acta*, 598 (2), 254-260, 2007.
- 19 - Amorim, L. A.; Carneiro, J. P.; Cardeal, Z. L. *An optimized method for determination of benzene in exhaled air by gas chromatography–mass spectrometry using solid phase microextraction as a sampling technique*. *Journal of Chromatography B*, 865 (1-2), 141-146, 2008.
- 20 - Alvarez, M. F.; Llompart, M.; Lamas, J. P.; Lores, M.; Jares, C. G.; Cela, R.; Dagnac, T. *Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1188 (2), 154-163, 2008.
- 21 - Aresta, C.D.; Calvano, F.; Palmisano, C.G. *Determination of clenbuterol in human urine and serum by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (3), 641-645, 2008.
- 22 - Musteata, F. M.; Lannoy, I.; Gien, B.; Pawliszyn, J. *Blood sampling without blood draws for in vivo pharmacokinetic studies in rats*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, In Press, Corrected Proof, 2008.
- 23 - Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Hertfordshire: The Royal Society of Chemistry, 655p., 1999. ISBN 0854045252
- 24 - Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. 2. ed. Campinas: Editora UNICAMP, 299p., 1996. ISBN 8526803360
- 25 - Ferreira, S. C.; Santos, W. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. *Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review*. *Talanta*, 63 (4), 1061-1067, 2004.

26 - Montgomery, D. C. *Design and analysis of experiments*. 4. ed. New York: J. Wiley, 704p., 1997. ISBN 0471157465

27 - Environmental Health Perspectives - Vol 104, suplemento 6, dezembro de 1996.
Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=9118882>> Acesso em: 04/06/2008

28 - Holgate, S. T. *Air pollution and health*. San Diego: Academic Press, 1068p., 1999.
ISBN 0123523354