



Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD



Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência
Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos
Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas**

Mestrando

Jônatan Moreira Rodrigues

Orientador

Eriton Rodrigo Botero

Co-orientador

Anderson Rodrigues Lima Caires

**DOURADOS - MS
2013**



Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD



Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia

**Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência
Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos
Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas**

Mestrando

Jônatan Moreira Rodrigues

Orientador

Eriton Rodrigo Botero

Co-orientador

Anderson Rodrigues Lima Caires

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área de Concentração – Ciência Ambiental

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

535.35 Rodrigues, Jônatan Moreira.
R696e Estudo de viabilidade da técnica de espectroscopia
de fluorescência sincronizada para identificação
simultânea de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
(HPAs) em matrizes líquidas / Jônatan Moreira
Rodrigues. – Dourados, MS : UFGD, 2013.
66 f.

Orientador: Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia
Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Fluorescência sincronizada. 2. Espectroscopia. I.
Título.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas”**, de autoria de Jônatan Moreira Rodrigues, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
(Orientador - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Etenaldo Felipe Santiago
Membro Examinador (UEMS)

Prof. Dr. Heberth Juliano Vieira
Membro Examinador (UFGD)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado a DEUS primeiramente, pois caso contrário nada seria possível e não faria sentido em minha vida.....

É preciso Força, Coragem e Fé Decidida para a conquista e graças a ti mais um objetivo foi concluído.....

Este trabalho é dedicado também a minha Mãe, a maravilhosa Dona Ana, que mesmo não sabendo tecnicamente nada que eu faço, ela acredita, apoia, incentiva, me das forças e entende que gosto do que faço.....

Também dedico este trabalho ao meu, Pai José Rodrigues, que sempre se importou e se preocupou durante minha ausência nestes anos de mestrado.....

E por fim ofereço este trabalho aos meus irmãos Nivair, Lucilena, Aparecido, Devanir e Valter, que estiveram juntos comigo durante mais esta etapa.....

Agradecimentos

Sou inteiramente grato a DEUS por me presentear com mais esta experiência maravilhosa em minha vida, por me atender em todos os momentos, e pelos recursos que fizeram com que sempre me mantivesse de Pé nesta estrada.

Agradeço aos meus pais Ana Moreira Rodrigues e José Rodrigues por todo apoio e amor oferecidos a mim. Aos meus irmãos e toda minha família por todo apoio, incentivo e estrutura durante este curso.

Agradeço também ao Professor Eriton Rodrigo Botero pela amizade, orientação, apoio, paciência, respeito, e por aceitar o desafio de orientar um biólogo sem experiências e conhecimentos na área e no grupo de pesquisa.

Agradeço ao Professor Anderson Rodrigues Lima Caires pela amizade, companheirismo, orientação, respeito e conhecimento, e que sempre esteve disposto para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos também aos Professores do GOA (Grupo de Óptica Aplicada (UFGD), Professor Evaristo Falcão, Professora Seila Rojas e Professor José Ezequiel.

Aos meus amigos de longa data Antonio de Souza Silva e Kleber Alvaro Miyabara Marques pela força e o curto tempo aqui em Dourados, e a Professora Emilia Maria Silva pela amizade, pelo apoio e orientação.

Meus agradecimentos também aos meus grandes amigos e companheiros William e Sthefany Falco, Gustavo Ruivo, Ivan Pires e Carol Hoinaser. Também aos meus amigos do grupo de pesquisa Douglas, Kéurison, Joelson, Vanessa Dotto, André Hortelã, Abdmar Moreno, Gustavo Kern, Antonio Valle, Franciele Crivelaro, Dyane Reis, Lais Weber, Fabiano, Rafael Araújo.

Aos meus amigos e parceiros do laboratório LECA, Professor Heberth, Cássia, Geny, Hebert Lee pela amizade, confiança, conhecimento e apoio. Agradeço também aos amigos laboratório de Físico-Química, Patrícia Teston e Professor Ivan.

E por fim agradeço a todo Batalhão de Polícia militar Ambiental de Dourados em nome do Capitão Carlos Magno por nos dar suporte para coleta em águas da sub-bacia do Rio Ivinhema, foco inicial do trabalho. E também as pessoas que alguma forma colaborou para realização deste trabalho. Obrigado a todos!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Sumário

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS – HPAS.....	3
2.2 DISPERSÃO DOS HPAS NO MEIO AMBIENTE.....	5
2.3 TOXICIDADES DOS HPAS	6
2.4 NORMATIVAS AMBIENTAIS PARA HPAS	10
2.5 TÉCNICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE HPAS	11
2.5.1 Técnicas Cromatográficas para Identificação dos HPAs	11
2.5.2 Técnica Espectrofluorimétrica para Identificação de HPAs.....	12
2.5.3 Utilização da Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação de HPAs ...	13
3 OBJETIVO GERAL	15
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 REAGENTES:	16
4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	18
4.3 AMOSTRAGEM DE ÁGUA	19
4.4 ETAPAS PARA A VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	22
4.4.1 Curva de Calibração e Linearidade	22
4.4.2 Limites de Detecção e Quantificação do Equipamento	23
4.4.3 Precisão.....	23
4.4.4 Procedimento de Recuperação dos HPAs.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 ESTUDOS PARA IDENTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE HPAS EM DIFERENTES MISTURAS DE ÁGUA E METANOL.....	25
5.2 VALIDAÇÃO ESTATÍSTICAS DO MÉTODO.....	35
5.3 ANÁLISES DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO EM MATRIZES AQUOSAS	41
5.4 APLICAÇÕES PRÁTICA DA TÉCNICA DE EFS.....	47
6 CONCLUSÃO	51
7 TRABALHOS FUTUROS	52
8 REFERÊNCIAS	53

Lista de Tabelas

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos HPAs. Estrutura Molecular; PM, peso molecular (g.mol^{-1}); S, Solubilidade (mg.L^{-1}); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); Log de Koa, coeficiente de partição (octanol/água); Nd, não determinado.....	4
Tabela 2: Teste de genotoxicidade e carcinogenicidade para HPAs. (+) Genotóxico/Cancerígeno; (-) Não Genotóxico/Cancerígeno; (?) Resultado questionável – Pesquisa em pequeno banco de dados.....	9
Tabela 3: Volume em porcentagem (%) das misturas de metanol e água.....	16
Tabela 4: $\Delta\lambda$'s utilizados no processo de determinação dos HPAs.	17
Tabela 5: Valores obtidos da curva de calibração: Linearidade (R), Limite de Detecção (L.D.), Limite de Quantificação (L.Q.) e Precisão.	37
Tabela 6: Valores para Linearidade e Limite de Detecção para diferentes técnicas analíticas para determinação de HPAs (Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P) em soluções aquosas.	39
Tabela 7: Valor de recuperação para os diferentes HPAs em amostras com 50% de metanol e 50% de amostra de água coletada no Parque Arnulpho Fioravante.	40
Tabela 8: Valor de Eficiência (%) após a extração líquido-líquido para os diferentes HPAs em amostras de água destilada.....	43
Tabela 9: Valor de Eficiência (%) após a extração líquido-líquido para os diferentes HPAs em amostras de água destilada.....	44
Tabela 10: Valor médio de eficiência obtidos após o processo de extração líquido-líquido em água destilada e os valores referentes de Eficiência obtidos do processo de pré-concentração realizado em amostras reais.	46

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema representativo do processo de extração líquido-líquido utilizado nesse trabalho.	19
Figura 2: Parque Arnulpho Fioravante localizado na região central do município de Dourados, MS. (Imagem: Google Mapas).	20
Figura 3: Pontos de amostragem escolhidos no interior do Parque Arnulpho Fioravante. (Imagem: Google Mapas).	20
Figura 4: Ponto 01 - Nascente. (Imagens: RODRIGUES, J. M.).	21
Figura 5: Ponto 02 - Possível descarga de efluentes. (Imagens: RODRIGUES, J. M.).	21
Figura 6: Ponto 03 - Encontro entre o lago e a galeria. (Imagens: RODRIGUES, J.M.).	22
Figura 7: Espectros do Pyr (A) e do B[a]P (B) em diferentes misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 40 nm . A concentração dos HPAs foram de 15 ng . ml ⁻¹	26
Figura 8: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 40 nm.	27
Figura 9: Espectros do Phe (A), Chy (B), B[a]A (C), D[a,h]A (D) e o B[k]F (E) em diferentes misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 100 nm . A concentração de HPAs foi de 15 ng . ml ⁻¹	29
Figura 10: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 100 nm.	30
Figura 11: Espectros do Ant (A) em diferentes misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 160 nm . A concentração do Ant foi de 15 ng . ml ⁻¹	33
Figura 12: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 160 nm.	34
Figura 13: Curva de calibração para os oitos HPAs.	36
Figura 14: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 01 de amostragem e em água destilada pura.	48
Figura 15: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 02 de amostragem e em água destilada pura.	49
Figura 16: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 03 de amostragem e em água destilada pura.	50

Resumo

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos que contêm dois ou mais anéis aromáticos fundidos, constituídos de átomos de carbono e hidrogênio. Em meios aquáticos estes compostos podem ser distribuídos por deposição seca e/ou úmida. Os HPAs estão associados à manifestação de doenças, o que justifica a maior preocupação com o efeito carcinogênico dessas substâncias. Assim, diferentes métodos analíticos são desenvolvidos para identificação de HPAs em amostras ambientais, e neste contexto este trabalho objetivou-se a realizar um estudo da viabilidade para quantificação simultânea de diferentes HPAs em soluções metanólicas, por meio da técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS) após realizar um processo de extração líquido-líquido. Após as análises observou-se que o limite de detecção do método foi inferior ao que regulamenta a Portaria Nº 2914 de dezembro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, como pode ser observado para os diferentes HPAs determinados neste trabalho, principalmente para o Benzo[a]pireno que apresenta um potencial elevado de risco a saúde. Logo após o processo de extração líquido-líquido, resultados ainda mais satisfatórios foram observados, principalmente para os Pireno, Benzo[a]pireno e Antraceno que apresentaram limite de detecção do procedimento ainda menores, com uma capacidade de extração para estes HPAs em águas com concentrações inferiores a $0,041 \text{ ng.ml}^{-1}$. Este procedimento para a análise de HPAs apresentou resultados com maior precisão comparados a alguns procedimentos analíticos convencionais para análise de HPAs, como Cromatógrafo líquido e Cromatógrafo gasoso. Com isso verificou-se que o procedimento utilizando a técnica de EFS além de satisfazer as regulamentações impostas por diferentes agências de proteção a saúde e ao meio ambiente, é uma técnica eficiente tão quanto às técnicas cromatográficas, porém com menor custo e tempo para as análises.

Abstract

The Polycyclic Aromatics Hydrocarbons (PAHs) are organic compounds that present two or more fused aromatic rings, composed of carbon atoms and hydrogen. In aquatic environment these compounds can be distributed by humid and dry deposition. The PAHs are associated with the appearance of diseases, which justified the preoccupation with the carcinogenic effect of these substances. Different analytical methods are developed for the identification of PAHs in environmental samples, and in this context the objective of this work is to realize a study for analysis of the efficiency in the simultaneous quantification of different PAHs in methanolic solutions using the technique Synchronous Fluorescence Spectroscopy (SFS) after liquid-liquid extraction process. After the analysis, it was verified in this work that the detection limit of the method was less than that recommended by the National Agency for Sanitary Vigilance in Brazil, mainly for Benzo[a]pyrene, which presents a high risk to health. After the liquid-liquid extraction process, the best results were observed for Pyrene, Benzo[a]pyrene and Anthracene in water with a concentration of $0,041 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ PAHs. This procedure for analysis of PAHs presents results with higher accuracy compared to conventional analytical procedures for PAH analysis as liquid chromatography and gas chromatography. The technique of SFS satisfied the recommendations by different agencies to protect health and the environment, and was efficient such as chromatographic techniques, but with less cost and time for analysis.

1 Introdução

O meio ambiente muda continuamente devido a inúmeras transformações de origem natural. Porém, com o aumento populacional e conseqüentemente o aumento no consumo de energia, as modificações de origem antropogênicas do meio são motivos de preocupação dada à velocidade e intensidade que se processam. Esta relação entre energia e meio ambiente tem sido objeto de muitos estudos, sendo possível, em muitos casos, estabelecer uma conexão direta de “causa e efeito” entre o uso da energia e os danos ao meio ambiente [1].

Esta problemática, atualmente, é fonte de interesse e discussões entre as maiores lideranças mundiais em eventos realizados em uma variedade de países em busca dos mesmos objetivos: a conscientização sócio-político-ambiental e o desenvolvimento sustentável. Porém, atingir metas para melhorar a qualidade de vida do planeta, aliado ao desenvolvimento econômico tem sido um dos principais entraves de países conscientes em desenvolvimento.

Em se tratando de Brasil, como afirmam MOZETO & JARDIM [2], muitos aspectos positivos em termos ambientais foram alcançados. Nos últimos anos houve um aumento de conscientização entre as pessoas, responsabilidade assumida por empresas e indústrias, e uma valorização do bem estar com o meio ambiente, quer nas atividades mais elementares em seus lares, ou mesmo público. Mesmo assim, ainda é grande o número de atividades geradoras de efluentes e resíduos (sólidos, líquidos e gasosos) que acabam no meio ambiente como destino final. Esses efluentes contaminam a atmosfera, solos, corpos d'água lóticos e lênticos, naturais e artificiais, continentais, costeiros ou nos oceanos. Em geral, grande parte destes resíduos constitui-se de demandas severas de nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, contaminantes orgânicos e inorgânicos [2].

Entre os inúmeros compostos orgânicos causadores de problemas ambientais, estão os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Estes compostos estão presentes na atmosfera tanto como um resultado da atividade humana quanto de fontes naturais, e podem ser encontrados junto a superfícies foliares de plantas, alimentos, sedimentos, pele e em água. Os compostos orgânicos voláteis são todas substâncias orgânicas formadas por carbono presentes na atmosfera no estado gasoso. Exclui-se deste grupo o monóxido de carbono, dióxido de carbono e o carbono elementar. Os COVs podem ser

encontrados em inúmeros ambientes, desde áreas industriais, urbanas, rurais, em concentrações e “tipos” bem diversificados. Sua concentração pode ser estimada em faixas correspondentes a partes por bilhão (ppb) à partes por trilhão (ppt), e os riscos a saúde depende do tipo de composto em que se está exposto [3].

Dentro desta classe de compostos orgânicos, estão os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs), originados principalmente da queima de combustíveis fósseis. Estes compostos são precursores de processos mutagênicos e carcinogênicos, sendo assim considerados problemas de saúde pública [4].

Atualmente, a detecção de HPAs no meio ambiente é utilizada como indicador de poluição ambiental. Entre as técnicas instrumentais convencionais utilizadas para a determinação destes compostos destacam-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção fluorimétrica [4,5]. Entretanto, estas técnicas espectroscópicas convencionais envolvem elevados custos e tempo no processo de análise das amostras. Técnicas menos onerosas como Espectroscopia de Fluorescência Molecular demonstrou também ser uma forma eficiente para análise de poluentes químicos em amostras ambientais [6].

Assim, a procura por métodos e técnicas versáteis para identificação de HPAs torna-se algo de importância ambiental e de preocupação quanto à saúde, pois poderiam apresentar maior sensibilidade, menor custo ou mesmo uma forma alternativa para trabalhar o problema. Nesse sentido, este estudo foi direcionado a trabalhar a eficiência da técnica de Espectroscopia por Fluorescência Sincronizada como forma de monitorar a presença de HPAs em matrizes líquidas.

2 Revisão da Literatura

2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs

Os HPAs constituem uma classe de mais de 100 compostos orgânicos que contêm dois ou mais anéis aromáticos fundidos, constituídos de átomos de carbono e hidrogênio, como representados na Tabela 1 [7, 8].

A emissão destes compostos para o ambiente acontece de várias formas. Podem ser de origem natural, como vulcões; e antropogênicas, por meio de processos industriais, como a produção de alumínio, coque, eletrodos de carbono, produção e fundição de ferro e aço. Outras fontes características de HPAs podem ser verificadas, como a queima do diesel e da gasolina, queimas de florestas ou carvão, incineradores de rejeitos, a fumaça do cigarro, entre outras formas. Se comparados com os fatores antropogênicos, as emissões por fontes naturais são muito limitadas, contribuindo com pequenas quantidades de HPAs [8, 9].

Em geral, os HPAs são originados por diferentes processos, podendo ser por processos diagênicos, petrogênicos e pirolítico. Os HPAs diagênicos consistem das mudanças ou transformações químicas, físicas e biológicas ocorridas na matéria orgânica encontrada no solo ou sedimento sob condições relativas de baixa temperatura e pressão, em geral este processo ocorre em condições subaquáticas. Os HPAs petrogênicos são formados em pressões elevadas dentro de camadas profundas da superfície terrestre, por meio do material orgânico retido nos sedimentos, convertendo-se no final em petróleo. E a pirólise é um processo onde a matéria orgânica é decomposta por meio da queima incompleta (baixa concentração de oxigênio) deste material sob condições de elevada temperatura, baixa pressão e curto tempo formando como produtos os HPAs [10].

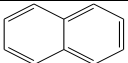
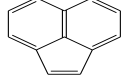
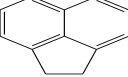
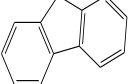
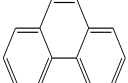
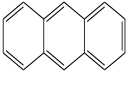
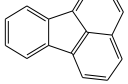
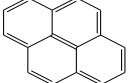
As diferentes complexidades estruturais apresentadas por estes compostos estão associados as suas fontes emissoras, e conseqüentemente às condições de reação, temperatura e quantidade de oxigênio envolvido nas reações. Os HPAs que apresentam de 2 a 3 anéis aromáticos tem origem principalmente em processos degradativos os quais envolvem os resíduos que apresentam petróleo. Entre os compostos originados neste processo estão os Naftaleno, Fluoreno e Fenantreno. Já os processos que originam HPAs com 4 ou mais anéis aromáticos estão relacionados com a pirogênese, e entre

estes estão os Fluoranteno, Pireno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno e Benzo[g,h,i]perileno [7, 10].

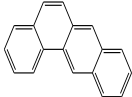
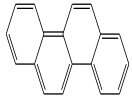
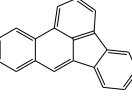
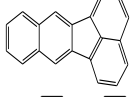
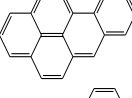
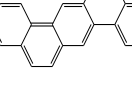
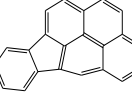

Quanto às propriedades físicas e químicas, os fatores que caracterizam os HPAs estão diretamente relacionados ao tipo de ligação apresentada nestes compostos (duplas conjugadas). Em temperatura ambiente os HPAs são sólidos e apresentam pontos de fusão e ebulição elevados. No entanto apresentam baixa solubilidade em água que varia entre os altamente insolúveis (Benzo[g,h,i]perileno: $2,6 \cdot 10^{-4} \text{ mg.L}^{-1}$) a pouco solúveis em água (Naftaleno: 31 mg.L^{-1}), como pode ser observado na Tabela 1, juntamente com outras propriedades físico-químicas [7, 10, 11].

Os HPAs listados na Tabela 1 são os compostos encontrados na lista de prioridade da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). Os 16 HPAs relacionados são os mais comuns encontrados na literatura, seja pelo fato de apresentarem maiores suspeitas de serem prejudiciais à saúde; por haver uma chance maior de exposição; e de todos os HPAs analisados, estes foram os compostos identificados em maiores concentrações em diferentes tipos de ambientes [12].

Tabela 1: Propriedades físico-químicas dos HPAs.

HPAs	Siglas	Estrutura	PM	S	PV	Log
		Molecular	(g.mol ⁻¹)	(mgL ⁻¹)	(Pa)	K _{oa}
Naftaleno	Na		128	31	10,4	3,37
Acenaftileno	Acy		150	16,1	$9 \cdot 10^{-1}$	4,00
Acenafteno	Ace		154	3,8	$3 \cdot 10^{-1}$	3,92
Fluoreno	Fl		166	1,9	$9 \cdot 10^{-2}$	4,18
Fenantreno	Phe		178	1,1	$2 \cdot 10^{-2}$	4,57
Antraceno	Ant		178	$4,5 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	4,54
Fluoranteno	Flt		202	$2,6 \cdot 10^{-1}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	5,22
Pireno	Pyr		202	$1,3 \cdot 10^{-1}$	$6 \cdot 10^{-4}$	5,18

Continuação da Tabela 1...

HPAs	Siglas	Estrutura Molecular	PM (g.mol ⁻¹)	S (mgL ⁻¹)	PV (Pa)	Log K _{oa}
Benzo[a]antraceno	B[a]A		228	1,1×10 ⁻²	2,8×10 ⁻⁵	5,91
Criseno	Chy		228	Nd	5,7×10 ⁻⁷	5,86
Benzo[b]fluoranteno	B[b]F		252	1,5×10 ⁻³	Nd	5,80
Benzo[k]fluoranteno	B[k]F		252	8×10 ⁻⁴	5,2×10 ⁻⁸	6,00
Benzo[a]pireno	B[a]P		252	3,8×10 ⁻³	7×10 ⁻⁷	6,04
Dibenzo[a,h]antraceno	D[a,h]A		278	6×10 ⁻⁴	3,7×10 ⁻¹⁰	6,75
Indeno[1,2,3-cd]pireno	I[cd]P		278	Nd	Nd	Nd
Benzo[g,h,i]perileno	B[g,h,i]P		268	2,6×10 ⁻⁴	Nd	6,50

Estrutura Molecular; PM, peso molecular (g.mol⁻¹); S, Solubilidade (mg.L⁻¹); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal); Log de K_{oa}, coeficiente de partição (octanol/água); Nd, não determinado. Dados obtidos da referência [10].

2.2 Dispersão dos HPAs no Meio Ambiente

Quanto ao comportamento no ambiente, estes compostos podem percorrer longas distâncias quando encontrados em estado de vapor (2 ou 3 anéis aromáticos) ou mesmo adsorvidos em materiais particulados (5 anéis aromáticos). Os HPAs com 4 anéis aromáticos podem ser encontrados tanto em estado de vapor ou estado sólido adsorvidos no material particulado, como fuligens ou cinzas encontradas na atmosfera. Devido à alta afinidade por tecidos lipossolúveis, os HPAs também podem ser encontrados em tecidos vegetais (superfície foliar) e animais (tecido epitelial) [7].

Apesar da baixa solubilidade em meios aquáticos, estes poluentes podem ser transportados por estes ambientes através da deposição direta nas superfícies de rios,

lagos, ou adsorvidos em partículas em suspensão, ou mesmo por meio dos organismos encontrados nestes ambientes. A alta concentração dos HPAs nos sistemas aquáticos ocorre devido a processos como de deposição seca e/ou úmida, o qual estes compostos são aderidos às partículas orgânicas atmosféricas ou águas pluviais e conseqüentemente precipitam nos corpos d'água. Outros processos como derramamento de combustíveis; arraste de sedimentos das crostas próximos a estes sistemas, vazamentos industriais e através do esgoto doméstico podem carrear HPAs para o meio aquático [7, 9].

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003) listou alguns dos HPAs encontrados em meio aquoso levando em consideração a sua solubilidade, sua presença neste sistema e sua classificação quanto ao seu suspeito potencial carcinogênico. Entre os HPAs documentados estão os Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[j]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno, Benzo[ghi]perileno e Indeno[1,2,3-cd]pireno, listados na Tabela 1. No entanto, em alguns estudos anteriores a este já haviam detectado em água potável, concentrações elevadas do Fluoranteno, Fenantreno, Pireno e Antraceno, entre outros HPAs que foram encontrados em concentrações relativamente baixas [9].

Além disso, levantamento também realizado pela OMS, verificou-se que em águas pluviais elevada concentração de HPAs como o Fluoranteno, Fenantreno, Benzo[b]fluoranteno, Pireno e Indeno[1,2,3-cd]pireno foram identificados. Este é provavelmente um resultado da adsorção destes compostos em partículas atmosféricas, que é finamente dispersa na água durante a deposição úmida [7].

2.3 Toxicidades dos HPAs

O estudo sobre a influência de diferentes agentes químicos na qualidade da saúde humana e animal é motivo de muita preocupação. Os riscos da exposição aos poluentes envolvem diferentes fatores: como a concentração de substâncias químicas, o tempo do indivíduo exposto a estas substâncias ou mesmo o tipo de agente químico em contato com o organismo [13,14].

A exposição humana aos HPAs ocorre através do ar, da água, do solo e fontes de alimentos. As vias de exposição incluem a ingestão, inalação e o contato com a pele. Algumas exposições podem envolver mais de uma rota simultânea, afetando a dose total absorvida (como exposições dérmicas e inalação de ar contaminado). Todas as fontes de exposição encontradas, tais como alimentos, tabagismo, queima de carvão e madeiras

também devem ser levadas em consideração. A exposição a estes poluentes motivou diversos órgãos a se preocupar com a identificação e principalmente nas consequências oriundas dos efeitos fisiológicos provocados na saúde humana [8, 13, 15].

A contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pode ser a grande causa de sintomas e doenças: como anemias agudas, náuseas, vômitos, convulsões, distúrbios de consciência, letargias e dermatites. Porém, a maior preocupação resultante da exposição a estes compostos está relacionada ao efeito carcinogênico apresentado pelos HPAs [15].

Entre os HPAs o Benzo[a]pireno é o mais estudado e tem sido utilizado durante muitos anos como um composto modelo em uma variedade de bioensaios de diferentes carcinogenicidades. Este HPA é considerado um potencial causador de tumores pulmonares. Porém, estudos em laboratório revelam que o Dibenzo[a,h]antraceno também oferece preocupação, pois apresentou um potencial de risco a saúde 10 vezes maior em animais de laboratório do que o Benzo[a]pireno e, portanto, representa um composto de alta importância para estudo [16 - 18].

Estudos empregando os Benzo[b]fluoranteno, Benzo[j]fluoranteno também constataram efeitos carcinogênicos causados por estes compostos, após a aparição de tumores hepáticos e câncer de pulmão em experimentos laboratoriais. Já o Benzo[k]Fluoranteno provocou tumores relacionados apenas ao câncer de pulmão [18].

Para o Pireno e o Benzo[a]antraceno os principais efeitos percebidos foram em relação a tumores na pele por meio de experimentos com dosagens controladas destes compostos. Enquanto que o Fenantreno, Antraceno e o Benzo[g,h,i]perileno apresentaram respostas negativas para este mesmo tipo de tumor [12].

Pesquisas induzidas, também, com o Fluoranteno e o Indeno[1,2,3-c,d]pireno demonstraram que os efeitos provocados por este contaminantes são nocivos apenas em concentrações muito altas. Por exemplo, em água potável para representar algum perigo, o Fluoranteno deve apresentar concentração superior a 4 mg.L^{-1} , valor este que normalmente não é encontrado nestes ambientes. Sob condições normais, por conseguinte, a presença de Fluoranteno em água potável não representa um perigo para a saúde humana. Por esta razão, órgãos responsáveis não determinaram um valor específico de referência para a presença de Fluoranteno nos diferentes ambientes [12, 13].

Em suma todos estes estudos em laboratório mostraram que os efeitos podem ser variados e influenciados principalmente pela dosagem absorvida pelo organismo, pelo tipo de HPA em exposição e pelo tipo de exposição em contato com o composto, já que se perceberam efeitos letais, no sistema respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, hematológicos, hepáticos, renal, endócrino, dérmicos entre outros [13].

Estudos realizados com pessoas mostram que indivíduos expostos aos HPAs por longos períodos também podem desenvolver câncer. Em algumas pesquisas já foram detectados a presença do Benzo[a]pireno e seus metabólitos em urina de mulheres grávidas e crianças. O Benzo[a]pireno tem sido detectado também no sangue da placenta, do cordão umbilical, sangue materno, e leite materno humano [13, 19].

No organismo, estas substâncias são geralmente transportadas por difusão através das membranas formadas por lipídios/lipoproteína, o que facilita a sua absorção pelo trato respiratório, trato gastrointestinal e pele. Os HPAs que apresentam dois ou três anéis aromáticos são absorvidos mais rápida e extensivamente do que aqueles que têm cinco ou seis anéis [20].

Nos tecidos adiposos os HPAs são rapidamente metabolizados se tornando em metabólitos ainda mais solúveis (fenóis, epóxidos, dihidrodíols, quinonas). A ligação covalente encontrada entre os metabólitos reativos e as moléculas de DNA pode formar adutos (HPA-DNA). Este processo pode representar um evento chave na formação das alterações provocadas na molécula de DNA por agentes químicos, dando origem às mutações e o início de cancro. Os HPAs são eliminados do corpo, principalmente como metabólitos conjugados nas fezes, por excreção biliar, e na urina [20].

No entanto, alguns tipos de HPAs são fracos como agentes cancerígenos, e desta forma exige uma transformação metabólica para se tornar um potencial agente causador de câncer. Já os metabólitos, como o epóxidos diol, são extremamente mutagênicos e afetam a replicação de células normais quando eles reagem com o DNA para formar adutos. Este aduto induz ao início da carcinogênese através do funcionamento irregular do processo de crescimento e diferenciação celular. Se esta falha persistir durante a replicação celular, ocorre a mutação celular. As células afetadas mais significativamente pela alta exposição de HPAs parecem ser aquelas que apresentam um processo de replicação celular mais rápido, tais como as da medula óssea, a pele e tecido pulmonar. Tecidos com taxas mais lentas de replicação, tais como tecido do fígado, são menos susceptíveis a este tipo alterações [13].

Pesquisas relacionadas ao Benzo[a]pireno e seus metabólitos verificaram que este composto pode quimicamente se ligar ao DNA para formar adutos do tipo BaP-DNA (compostos mutagênicos/carcinogênicos e proteínas). Esta nova molécula que está ligada covalentemente interfere na replicação do DNA. O BaP-DNA tem sido detectado em órgãos reprodutivos de pessoas adultas de ambos os sexos [19,21].

Diversos trabalhos são realizados com a finalidade de desenvolver um índice preciso para definir o potencial carcinogênico dos HPAs, porém o complexo perfil das misturas destas substâncias no ambiente e nos locais de trabalho, a contribuição para os efeitos carcinogênicos e mutagênicos para os componentes individuais ou/e em conjunto (misturas) e a forma de exposição humana a estes poluentes dificultam a obtenção de dados mais precisos e completos [16, 22].

A Tabela 2 mostra de forma resumida um levantamento realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com resultados para testes de genotoxicidade e de carcinogenicidade para os 16 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos [22].

Tabela 2: Teste de genotoxicidade e carcinogenicidade para HPAs. (+) Genotóxico/Cancerígeno; (-) Não Genotóxico/Cancerígeno; (?) Resultado questionável – Pesquisa em pequeno banco de dados.

Compostos	Siglas	Genotoxicidade	Carcinogenicidade
Acenafteno	Ace	(?)	(?)
Acenaftileno	Acy	(?)	Não Estudado
Antraceno	Ant	-	-
Benzo[a]antraceno	B[a]A	+	+
Benzo[b]fluoranteno	B[b]F	+	+
Benzo[k]Fluoranteno	B[k]F	+	+
Benzo[ghi]perileno	B[g,h,i]P	+	-

Continuação da Tabela 2...

Compostos	Siglas	Genotoxicidade	Carcinogenicidade
Benzo[a]pireno	B[a]P	+	+
Criseno	Chy	+	+
Dibenzo[a,h]antraceno	D[a,h]A	+	+
Fluoreno	Fl	-	-
Indeno[1,2,3-cd]pireno	I[c,d]P	+	+
Naftaleno	Na	-	(?)
Perileno	Per	+	(-)
Fenantreno	Phe	(?)	(?)
Pireno	Pyr	(?)	(?)

Dados obtidos da referencia [22].

2.4 Normativas Ambientais para HPAs

A regulamentação para água potável é rigorosamente necessária e legalmente obrigatória para os sistemas públicos e privados de distribuição de água. Atualmente, as normativas relacionando valores para contaminantes encontrados no ambiente seguem recomendações de órgãos voltados à qualidade da saúde e do meio ambiente de seus respectivos países. No entanto, muitos seguem como referência os valores recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).

Para os HPAs, a USEPA apresenta como valor limite $0,2 \text{ ng.ml}^{-1}$ de Benzo[a]pireno em água potável. Este HPA é visto como o de maior importância, por isso é considerado o de referência a ser estimado para os outros HPAs [23].

No Brasil, a Portaria N° 2914 de dezembro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina valores limites em água para consumo também apenas para o Benzo[a]pireno, mas com um valor limite superior de $0,7 \text{ ng.ml}^{-1}$. Esta portaria tem por finalidade dar subsídio aos órgãos responsáveis pela distribuição e monitoramento da água para consumo humano [24].

Entretanto, no país o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que representa o órgão responsável por estabelecer políticas de interesse público relacionado ao meio ambiente, incluindo os valores limites para HPAs em água potável, na resolução N° 357 de março de 2005 são encontrados determinações para sete diferentes HPAs com um valor limite abaixo do listado pela USEPA. O CONAMA estipula um valor máximo de $0,05 \text{ ng.ml}^{-1}$ para os Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Criseno, Dibenzo[a,h]antraceno, Indeno[1,2,3-cd]pireno e também para o Benzo[a]pireno [25].

2.5 Técnicas Para Quantificação de HPAs

2.5.1 Técnicas Cromatográficas para Identificação dos HPAs

Diferentes métodos analíticos são desenvolvidos para determinação de HPAs em amostras ambientais. Porém, alguns problemas podem prejudicar as análises de identificação destes compostos em amostra real. Dentre os problemas mais rotineiros estão às perdas devido à forma de armazenamento, a necessidade de pré-concentrar o analito de interesse e a necessidade de procedimentos de separação seletiva e técnicas com alta eficiência de detecção [26].

Para buscar minimizar estes problemas muitas técnicas para determinação de HPAs são desenvolvidas por meio dos métodos cromatográficos. Esta técnica apresenta boa seletividade e detecção para os HPAs, embora a necessidade de um pré-preparo da amostra ainda é necessária.

Entre os métodos qualitativos e quantitativos mais usuais, estão as técnicas como cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização com chama (DIC) ou acoplado a espectrometria de massas (MS), ou cromatografia líquida de alta performance (CLAE) com detector de fluorescência ou acoplado a espectrometria de massas [21, 26].

As primeiras análises de HPAs por técnica cromatográfica tiveram início na década de 70, o qual se utilizava a cromatografia gasosa com detector de ionização por chama. Apenas no final desta década houve resultados expressivos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. Atualmente, também é muito utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas [19].

A técnica de cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização por chama (DIC) é descrito e proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

como método usual para a determinação de HPAs, porém para determinação destes compostos em água e resíduos a USEPA descreve outros métodos mais específicos, o qual é utilizado a cromatografia líquida de alta performance (CLAE) com detector de fluorescência [27].

Embora os métodos cromatográficos sejam os mais usuais para determinação dos HPAs, estes métodos apresentam algumas desvantagens: como o elevado tempo consumido durante o processo de análise de diferentes substâncias e um alto custo e manutenção da técnica [28].

2.5.2 Técnica Espectrofluorimétrica para Identificação de HPAs

A Espectroscopia de Luminescência é um método simples de análise com capacidade de detectar diferentes compostos no nível de $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Novas abordagens com a finalidade de melhorar a análise de compostos em baixas concentrações resultaram no aumento da sensibilidade e seletividade do método, sejam por meio do uso de novas fontes de excitação e sistemas dispersivos, detectores mais sofisticados, até de manipulação de dados em sistemas automáticos [5, 29].

No espectrofotômetro a amostra pode ser excitada com radiações eletromagnéticas desde o ultravioleta até a região do visível. O comprimento de onda de excitação é selecionado por meio do monocromador de excitação. O sistema de detecção consiste de um monocromador de emissão, que seleciona a luminescência na região de comprimento de onda de interesse. O fotodetector, geralmente um fotomultiplicador, converte o fluxo de radiação luminescente para um sinal elétrico, e o sistema de leitura do amplificador, amplifica e processa o sinal, e exibe de forma conveniente.

A natureza altamente fluorescente dos HPAs fez a espectroscopia de fluorescência molecular se tornar uma técnica popular para análise desses compostos. Esta técnica apresenta custo relativamente baixo, alta sensibilidade e simplicidade, embora a vasta gama de amostras e impurezas fluorescentes encontradas em amostras biológicas e ambientais tornem as análises complexas. No entanto, a técnica de fluorescência proporciona ainda maior seletividade em relação a outras técnicas, como espectrofotometria de absorção molecular, principalmente quando duas moléculas, como as de HPAs, apresentam espectros de absorção semelhantes [5, 30].

Na análise de compostos, como os HPAs, empregando o método fluorimétrico convencional dois tipos de espectros são conhecidos: os espectros de emissão e de excitação. A fim de registrar um espectro de emissão, o composto é excitado com um comprimento de onda fixo, ao passo que a intensidade de fluorescência é medida como uma função do comprimento de onda de emissão. Porém, esta análise para moléculas similares pode representar uma seletividade limitada devido à ampla sobreposição de espectros, interferindo no processo de caracterização dos componentes individuais [29, 31, 32]. Muitos HPAs apresentam luminescência em regiões muito próximas, processo que ocorre com moléculas como o Antraceno, Benzo[k]fluoranteno e Benzo[a]pireno que fluorescem em torno de 399, 402 e 403 nm respectivamente. Outros HPAs como Criseno e Pireno também apresentam emissões próximas (381 e 383 nm respectivamente) [33]. Desta forma o método convencional torna-se limitado na identificação destes componentes, devido à sobreposição das bandas correspondentes aos HPAs, podendo assim formar apenas uma única banda, dificultando as análises. Porém este problema pode ser minimizado utilizando-se uma técnica variante a esta, o qual é denominado por técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada.

2.5.3 Utilização da Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação de HPAs

A Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada (EFS) é uma variação da técnica de fluorescência convencional, e proporciona maior seletividade através do estreitamento de largura da banda espectral, definição dos espectros por meio da diminuição da sobreposição dos espectros de diferentes compostos, redução da gama espectral para um dado analito e evita o surgimento de espalhamento principalmente provocado pela fonte de radiação eletromagnética do equipamento. Estes fatores são muito importantes quando a análise é realizada em solução onde se encontra misturas de diferentes compostos [29, 34, 35].

Este método fluorimétrico tem sido muito útil na detecção e quantificação de fluoróforos que possuem estruturas e luminescência semelhantes como os HPAs, pois a técnica apresenta alta capacidade para sensibilidade e seletividade, esta é uma característica muito importante para uma ferramenta analítica [34, 36].

O espectro sincronizado é adquirido por movimento simultâneo dos monocromadores de excitação e emissão, mantendo constante ou sistematicamente

variando os comprimentos de onda de excitação e emissão. Na técnica sincronizada a diferença constante de comprimento de onda entre os comprimentos de onda de excitação e de emissão é denominado Delta Lambda ($\Delta\lambda$), e cada $\Delta\lambda$, é ajustado para uma melhor visualização e identificação do composto a ser analisado [35, 36].

Esta constante é simples de ser implementada, pois a maioria dos monocromadores nos fluorímetros são digitalizados, e respondem a uma velocidade de nm.s^{-1} . Assim, esta constante depende dos parâmetros do instrumento, concentração do fluoróforo, rendimento quântico e da energia de emissão usada durante a varredura de excitação. Com esta técnica é possível obter espectros mais simples e específicos para cada HPA estudado em concentrações próximas ao limite de detecção do instrumento utilizado, do que os espectros obtidos por meio das análises por excitação e análises por emissão no método convencional [35, 36].

A aplicação da técnica de EFS é capaz de resolver diferentes problemas nas análises com misturas de vários fluoróforos, além de identificar um composto em particular em uma mistura, quantificar vários compostos em uma mesma solução, reduzir o número de interferências, entre outros fatores [32].

No entanto, um dos fatores mais importantes está relacionado à praticidade, agilidade e eficiência na identificação simultânea de diferentes HPAs em solução em apenas uma rápida análise. Até o presente momento pode ser verificada na literatura a identificação de até sete diferentes tipos de HPAs, como o Fenantreno, Criseno, Benzo[a]antraceno, Dibenzo[a,h]antraceno, Benzo[k]fluoranteno, Trifenileno e o Benzo[b]antraceno, utilizando o mesmo $\Delta\lambda$ [37].

Esta é uma técnica eficiente para determinação de compostos em um meio complexo como as estruturas similares dos HPAs, ou mesmo em amostras o qual o teor de impurezas é desconhecido, sem necessitar de um procedimento prévio de separação antes das análises [30].

3 Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi realizar um estudo de identificação e quantificação simultânea de diferentes HPAs em solução aquosa por meio da técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada. Ademais, objetivou-se investigar a eficiência do processo de extração líquido-líquido dos HPAs como etapa prévia ao processo de análise de fluorescência, como forma de contribuir com uma ferramenta de alta aplicabilidade para investigação e monitoramento ambiental.

3.1 Objetivos Específicos

1. Realizar um estudo de detecção e quantificação simultânea em misturas de HPAs utilizando a Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada;
2. Aplicar o processo de extração líquido-líquido em matrizes líquidas para avaliar a recuperação de HPAs em baixas concentrações;
3. Avaliar a aplicabilidade da Espectroscopia por Fluorescência Sincronizada para investigação simultânea de HPAs em amostra aquosas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Reagentes:

Para realização deste trabalho utilizou-se os seguintes reagentes: Solução de 1 ml com mistura de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em acetona (EPA 525 PAH Mix-B). Entre os HPAs estão o Pireno (Pyr) e Benzo[a]pireno (B[a]P), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Antraceno (Ant), Benzo[k]fluoranteno (B[k]F), Dibenzo[a,h]antraceno (DBA) Fenantreno (Phe), Criseno (Chy), Acenaftileno (Ace), Benzo[b]fluoranteno (B[b]F), Benzo[g,h,i]perileno (B[g,h,i]P), Fluoreno (Flu), Indeno[1,2,3 - c,d]pireno (I[cd]P), obtido da Sigma Aldrich[®] com 98% de pureza, Metanol 99,9% UV/HPLC – Espectroscópico marca VETEC[®], Hexano 65% UV/HPLC (mistura de isômeros) – Espectroscópico marca VETEC[®] e água deionizada.

Para análise dos HPAs por Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada, a solução de HPAs, na concentração de $500 \times 10^{-6} \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, foi diluída em 50 ml de metanol, obtendo-se uma concentração de $1 \times 10^{-5} \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (solução trabalho)¹. Esta concentração foi utilizada para realizar uma série de experimentos em diferentes misturas de água e metanol com o intuito de encontrar uma condição ideal para análise dos HPAs. Para esse procedimento, a Tabela 3 indica os valores das diluições usadas nesse trabalho.

Tabela 3: Volume em porcentagem (%) das misturas de metanol e água.

Diluição	Metanol (%) v	Água Deionizada (%) v
1 ^a	0,15	99,85
2 ^a	10,15	89,85
3 ^a	30,15	69,85
4 ^a	50,15	46,85
5 ^a	80,15	19,85
Metanol Puro	100	-

¹ A partir desta solução foi preparado para análise soluções com uma concentração final dos fluoróforos de $15 \times 10^{-9} \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Os espectros de fluorescência sincronizados foram obtidos em temperatura ambiente utilizando um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). O espectrofluorímetro possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 μ s e potência de pico equivalente a 75 kW; dois monocromadores, um para a seleção do comprimento de onda de excitação e outro para a seleção do comprimento de onda emitido pela amostra. A detecção da radiação emitida é realizada por um tubo fotomultiplicador (R928). Para a realização das Medidas por EFS foi utilizado os seguintes parâmetros: varredura de excitação de 200 a 600 nm com um $\Delta\lambda$ ajustado de 10 a 200 nm, com intervalo de 5 nm. As fendas de excitação e emissão foram de 2,5 e 5 nm, respectivamente, e a voltagem do detector manteve fixa em 700 V.

A configuração do valor da fenda de excitação do espectrofluorímetro para a passagem de radiação eletromagnética foi ajustada para um de intervalo de 2,5 nm. Esta diminuição na largura da fenda faz com que o valor de absorção se torne mais específico para cada tipo de molécula aromática, diminuindo também a intensidade de luminescência e contribuição conjunta da fluorescência dos HPAs, o que resultaria em uma banda mais alargada.

Para cada HPA existe um valor de $\Delta\lambda$ específico que possibilita uma separação das emissões máximas. A Tabela 4 a seguir mostra o $\Delta\lambda$'s utilizados no processo de detecção dos HPAs, como descritos na referência [37].

Tabela 4: $\Delta\lambda$'s utilizados no processo de determinação dos HPAs.

HPAs	$\Delta\lambda$s utilizados (nm)¹	λ Max. EFS (nm)²
Pyr	40	335,6
BaP	40	366,4
Phe	100	248,2
Chy	100	265,4
BaA	100	289,2
DBA	100	297,6
BkF	100	308,4
Ant	160	245,6

¹As constantes ($\Delta\lambda$'s) utilizadas para determinação dos diferentes HPAs são estabelecidas na literatura para identificação simultânea destes compostos [37].

² Comprimento de onda máximo para o espectro de fluorescência sincronizado.

4.2 Processo de Extração Líquido-Líquido

Para a realização do processo de extração dois tipos de amostras foram utilizadas: amostras constituídas de água destilada contaminadas com padrões com diferentes HPAs e amostras ambientais também contaminadas com estes HPAs. Para ambas, três concentrações, 0,166; 0,083 e 0,041 ng.ml⁻¹ foram usadas. Destas amostras contaminadas, alíquotas de 300 ml foram transferidas para frasco Erlenmeyer. Posteriormente porções com 20 ml de hexano foram adicionadas às alíquotas, as quais foram colocadas sob agitação magnética por 20 minutos (este processo se repetiu por quatro vezes).

Devido à menor densidade do hexano e à forma do frasco de extração, a porção da solução que continha hexano foi extraída e transferida para um balão de fundo redondo de um rotoevaporador. A solução extraída foi misturada com aproximadamente 20 ml de metanol, e evaporada sob condições de temperatura abaixo de 40°C, obtendo-se um extrato final de ± 2 ml. Este extrato, por sua vez, foi diluído em solução metanólica-aquosa em balão volumétrico de 5 ml (1/1 – metanol/água), e levado para aquisição do espectro de emissão. A concentração final do analito na solução não poderia ultrapassar a 10; 5 e 2,5 ng.ml⁻¹, para alíquotas de 0,166; 0,083 e 0,041 ng.ml⁻¹ de HPAs, respectivamente. Os valores obtidos após o processo de pré-concentração foram expressos em porcentagem.

Este processo para extração líquido-líquido foi adaptado do procedimento proposto por Brum et al. [38, 39], o qual foi desenvolvido para ser empregado por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detector por UV (CLAE-UV). A figura 1 mostra um esquema representativo do processo de extração líquido-líquido utilizado nesse trabalho e descrito anteriormente.

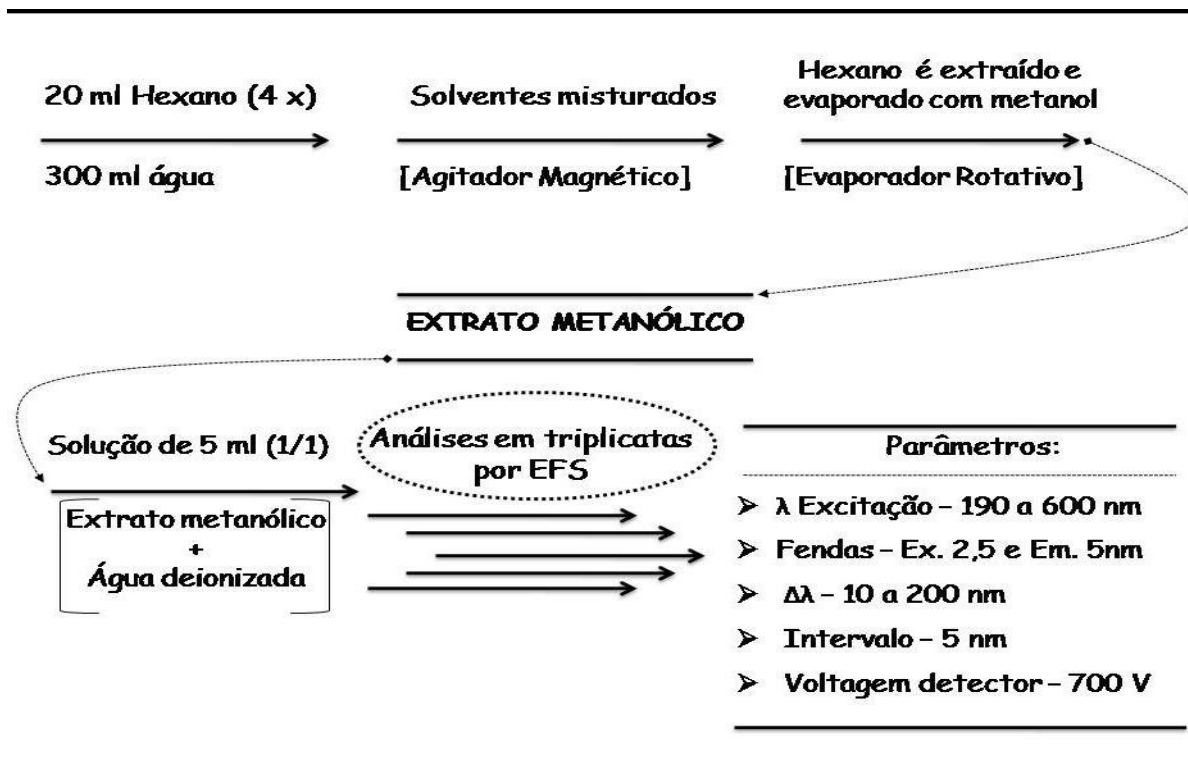


Figura 1: Esquema representativo do processo de extração líquido-líquido utilizado nesse trabalho.

4.3 Amostragem de água

Para a realização deste trabalho, amostras de água foram coletadas em trechos que correspondem ao Córrego Paragem localizadas dentro do Parque Arnulpho Fioravante, no perímetro urbano do município de Dourados, na região central. Neste parque, águas são captadas por várias nascentes formando um lago artificial que deságua posteriormente no Córrego Paragem [40].

No entanto, antes de formar o lago, em muitos pontos estas águas se misturam a águas pluviais e efluentes oriundos de diferentes locais do centro do município, a águas de galerias e de áreas impermeabilizadas, ou mesmo pontos irregulares onde há a liberação de resíduos que também são acumuladas no parque. Devido sua localização e exposição aos mais diferentes impactos ambientais, acredita-se que contaminantes como óleos, sedimentos e inúmeros outros poluentes podem ser facilmente observados, já que o Parque Arnulpho Fioravante está envolto por diferentes tipos de construções na região central de Dourados. Entre estas construções podem ser encontradas residências, empresas de transporte público, automóveis, clubes, casas de entretenimento e lazer, de produtos alimentícios entre outros, e também as principais vias públicas do município (Figura 2).



Figura 2: Parque Arnulpho Fioravante localizado na região central do município de Dourados, MS. (Imagem: Google Maps).

Amostras de água foram coletadas em três pontos específicos do parque Arnulpho Fioravante, visualizados na Figura 3.



Figura 3: Pontos de amostragem escolhidos no interior do Parque Arnulpho Fioravante. (Imagem: Google Maps).

O Ponto 01 de coordenadas S 22° 03'02.0" e W 54° 04'04.1", na Figura 4, é representado por uma nascente do Córrego Paragem, que antes de desaguar no Córrego Paragem, forma um lago localizado no interior do parque.

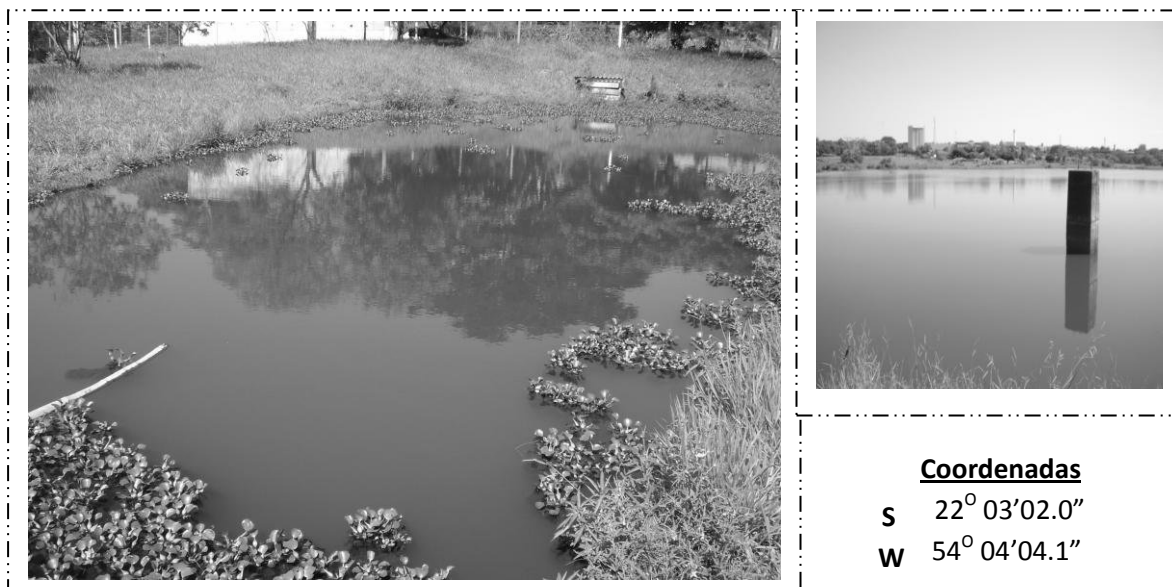


Figura 4: Ponto 01 - Nascente. (Imagens: RODRIGUES, J. M.).

O Ponto 02 de coordenadas S 22° 13'38.6" e W 54° 47'39.3", na Figura 5, está localizado em um setor onde possivelmente ocorrem descargas de efluentes, que posteriormente seguem em direção ao lago.



Figura 5: Ponto 02 - Possível descarga de efluentes. (Imagens: RODRIGUES, J. M.).

O Ponto 03 de coordenadas S 22° 13'51.9"e W 54° 47'41.8", na Figura 6, foi escolhido em uma área do lago onde há um encontro de águas oriundas de galeria, que deságuam também no lago.

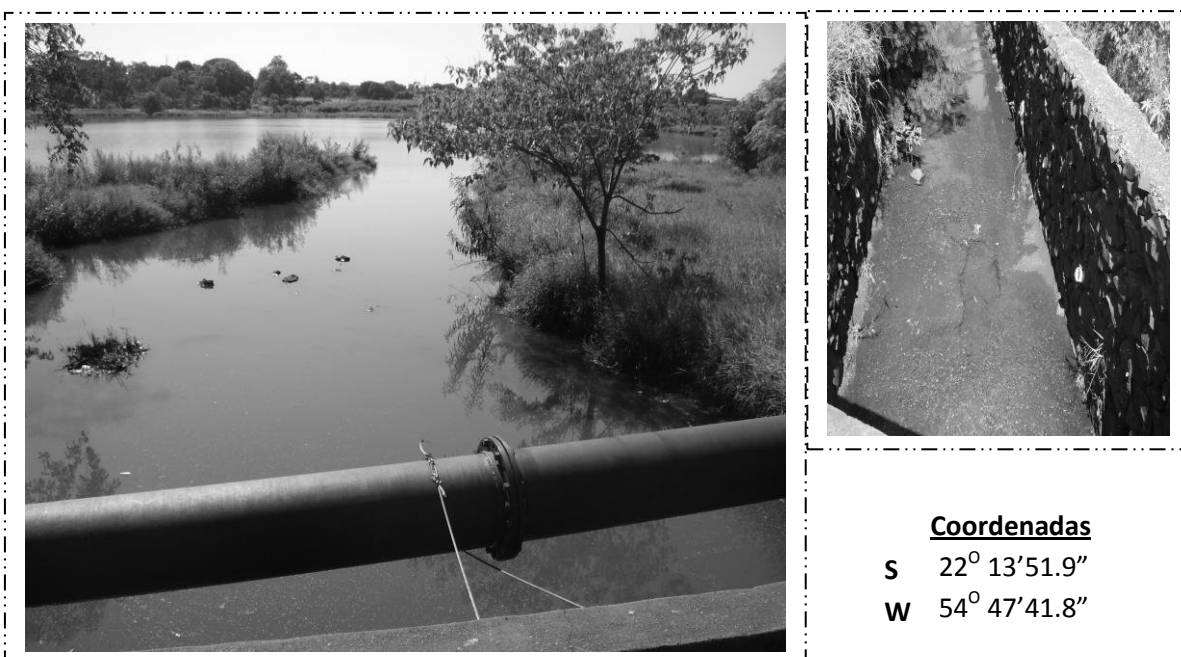


Figura 6: Ponto 03 - Encontro entre o lago e a galeria. (Imagens: RODRIGUES, J.M.).

4.4 Etapas para a validação de métodos analíticos

4.4.1 Curva de Calibração e Linearidade

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito [41-44]. Assim, para a construção da curva de calibração nesse trabalho foram usados intervalos de faixa de concentração de fluoróforos que foram de 2,5 a 130 ng.ml⁻¹ na solução.

A linearidade foi obtida em função desta curva de calibração. Este procedimento é realizado para verificar se a resposta apresentada pelo método analítico é diretamente proporcional à concentração do analito nas amostras em uma determinada faixa de concentração, através da análise do coeficiente de correlação linear (r) [41-44]. Para determinar a linearidade, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é representado por um valor igual ou superior a de 0,99, como descreve a resolução da ANVISA nº 899, de 29 de maio de 2003 [43].

4.4.2 Limites de Detecção e Quantificação do Equipamento

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado pelo equipamento, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação é necessário determinar com precisão a menor quantidade do analito presente em uma amostra [41-44]. Para isso, utilizam-se fórmulas matemáticas, descritas abaixo [43,44].

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{Eq. 1}) \qquad LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde DP_a é o desvio padrão obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco (10 amostras); IC é o valor resultante da inclinação da curva de calibração [43, 44].

4.4.3 Precisão

A precisão é um procedimento que verifica a dispersão dos sinais de uma solução contendo HPA, realizando um número de repetições das medidas durante o processo experimental. Neste processo três níveis de concentração são avaliados, baixa, média e alta, realizando dez determinações para cada concentração, contemplado o intervalo linear do método. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, como pode verificado na equação abaixo [41-44].

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração de HPA padrão na solução [42, 44]. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 20% [41].

4.4.4 Procedimento de Recuperação dos HPAs

A análise de recuperação é um procedimento aplicado com a finalidade de avaliar a eficiência do processo experimental em amostras ambientais, já que estas amostras podem apresentar respostas variadas conforme o tipo de análise de um determinado elemento em uma matriz de amostra. Desta forma, muitas técnicas analíticas podem ser prejudicadas durante o processo de identificação de determinado analito.

Para estas análises as amostras de água foram coletadas no Parque Arnulpho Fioravante. Estas amostras foram contaminadas com alíquotas dos padrões de HPAs e analisadas na proporção 1/1 de metanol e água (precisamente com 50,15% de metanol). Neste processo as análises aconteceram logo após a contaminação das amostras. Para avaliar a recuperação do Ant utilizou-se concentrações que variaram de 10 a 20 ng.ml⁻¹, e para o restante dos HPAs a concentração variou de 10 a 50 ng.ml⁻¹.

Para estimar o valor de recuperação em porcentagem para os HPAs utilizando a Técnica de Fluorescência Sincronizada, três diferentes níveis de concentração para cada HPA foi adicionadas nestas amostras e posteriormente analisadas pela técnica de EFS. A intensidade de fluorescência dessa solução descontada o sinal da solução de amostra, foram comparadas com o sinal dos padrões. A quantidade de HPAs determinadas nestas soluções foi comparada com a quantidade adicionada, e expressa em porcentagem. As concentrações utilizadas estiveram dentro da faixa de linearidade do método [42-44].

$$RECUPERAÇÃO (\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde: C₁ = concentração determinada na amostra adicionada,

C₂ = concentração determinada na amostra não adicionada,

C₃ = concentração total adicionada.

Este cálculo para recuperação também foi aplicado nas análises realizadas após processo de extração líquido-líquido também realizado em amostras ambientais.

5 Resultados e Discussão

5.1 Estudos para Identificação Simultânea de HPAs em diferentes misturas de água e Metanol

Os padrões de HPAs, chamados de mix nesse trabalho, são comumente utilizados para ensaios com determinação por análises cromatográficas. No entanto, como observado, a alta seletividade da Técnica de Fluorescência Sincronizada (ESF) é capaz de identificar e quantificar misturas com diferentes compostos.

A escolha pela utilização de padrões mix é uma opção muito rentável, devido ao baixo custo comparado aos kits de padrões para calibração com componentes individuais. A solução de HPAs, ou mix, usada nesse trabalho possui treze diferentes tipos de HPAs em solução. Para a identificação usando a EFS utilizou-se parâmetros de instrumentação já avaliados por PATRA & MISHRA (2001) [37].

Conhecendo as propriedades físico/químicas dos HPAs, sabe-se que estes compostos apresentam baixa solubilidade em água [10], impossibilitando assim uma análise eficiente diretamente nesta matriz. Porém, este problema pode ser minimizado com a adição de solventes polares que facilitam a solubilização dos HPAs em água. Entre alguns solventes, destacam o metanol, etanol, entre outros [45].

Estes tipos de solventes orgânicos agem como co-solventes na diluição de contaminantes orgânicos no meio ambiente, principalmente em meios aquosos. Denomina-se efeito co-solvência o efeito de um determinado solvente orgânico, completamente miscível em água, agir na solubilidade e sorção de compostos orgânicos hidrofóbicos [46]. Este fator é muito importante para o aumento na interação entre as moléculas de água e HPAs em solução, já que torna o sistema com características homogêneas para análise. A concentração de um co-solvente é particular para cada tipo de solução, sendo assim, necessário um estudo de proporcionalidade quanto à concentração para cada tipo de solvente utilizado [47], como apresentado na Tabela 3.

Neste estudo, escolheu-se o metanol como solvente, e uma investigação quanto uma condição adequada de co-solvência em análise de HPAs em água foi realizada. O metanol foi utilizado devido sua miscibilidade em água e alta afinidade com diferentes moléculas de HPAs.

Desta forma, como pode ser observado na Figura 7, é demonstrado os espectros do Pireno (Pyr) e do Benzo[a]pireno [B[a]P] em diferentes misturas de metanol e água.

Para a identificação destes compostos utilizou-se a constante ($\Delta\lambda$) de 40 nm após cada comprimento de onda de excitação [37]. Verificou-se que em solução de baixa concentração de metanol (0,15% de metanol), apenas o Pyr, que absorveu energia em torno de 334 nm, pode ser identificado. Porém, para este mesmo composto, com uma concentração de 10,15% de metanol a intensidade de fluorescência foi ainda maior, fato que seguido até uma concentração superior a 50,15% (Figura 7).

O B[a]P, o qual absorveu energia em torno de 366 nm, apresentou um sinal espectral somente quando as análises foram realizadas com 10,15% da solução com metanol em água. O sinal mais intenso somente ocorreu com misturas de 50,15% de cada solvente, como pode ser verificado na Figura 7. Nota-se que nesta concentração de solvente o espectro também apresentou, visualmente, uma definição maior de picos para os diferentes HPAs. Observa-se que para uma concentração superior a 80,15% de metanol, como pode ser verificada na Figura 7, a banda de fluorescência deste HPA apresenta um espectro alargado, com redução na intensidade do sinal espectral e pouca definição. Estes são fatores que dificultam a análise de identificação dos diferentes compostos em solução.

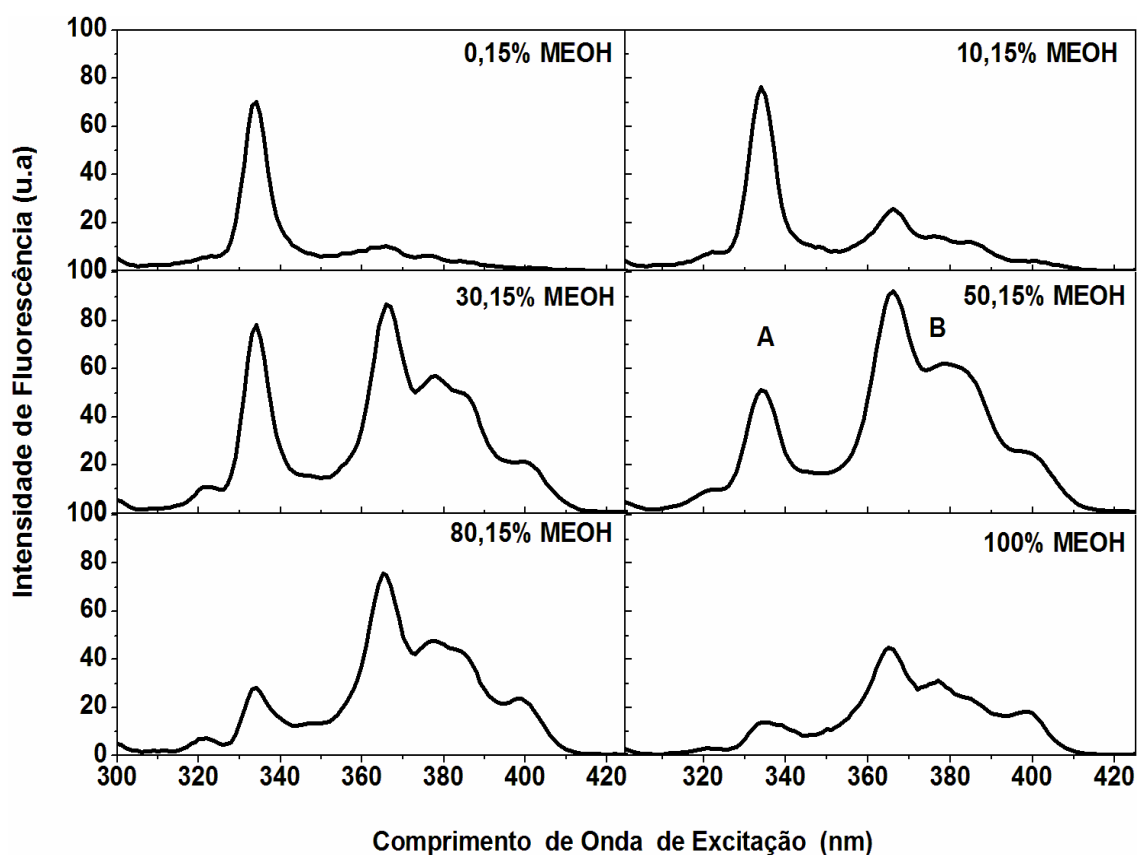


Figura 7: Espectros do Pyr (A) e do B[a]P (B) em misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 40 nm . A concentração dos HPAs foram de 15 ng . ml⁻¹.

Pela análise da Figura 7 fica mais uma vez claro que as diferentes concentrações de solventes são um fator de grande influência para o aumento ou diminuição na intensidade de fluorescência destes HPAs, além da resolução dos picos, porém de maneira distinta para cada composto. Para o Pyr há uma perda na intensidade de sinal de luminescência a partir de uma concentração superior a 10,15% de metanol em solução aquosa, e este comportamento foi similar para o B[a]P, no entanto a diminuição do sinal iniciou a partir de uma concentração de 50,15% de metanol. Um comparativo entre o sinal de fluorescência para estes compostos pode ser verificado com maior clareza na Figura 8. A intensidade de fluorescência para o Pyr foi determinado pela intensidade do pico em 334 nm e do B[a]P em 366 nm.

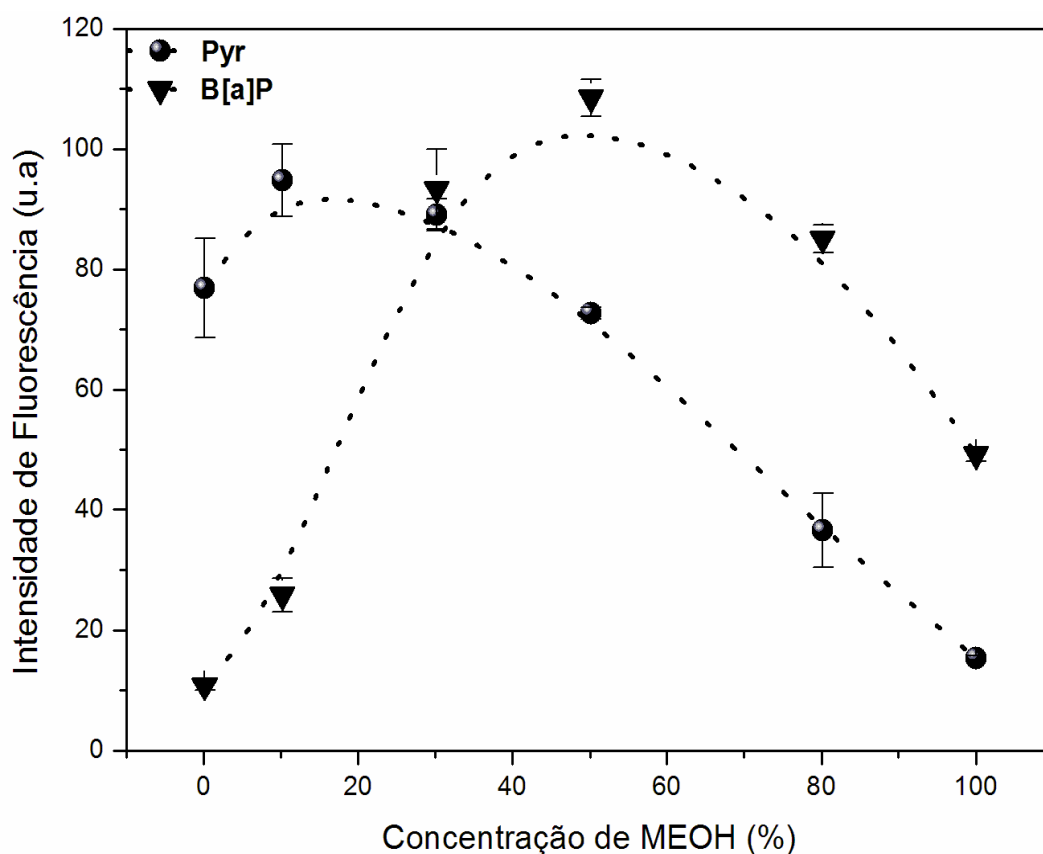


Figura 8: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 40 nm.

Nota-se que, embora o Pyr apresente maior intensidade de fluorescência em concentração de 10,15% de metanol, o aumento na intensidade de fluorescência comparado a misturas com 0,15% de metanol é relativamente baixo (19%). No entanto, houve uma diminuição considerável na intensidade do espectro quando a solução apresentou volumes com 80 e 100% de metanol (Figura 8).

Já para a mesma análise com o B[a]P, a adição de metanol apresenta grande influência na solubilização e distribuição deste composto em meio aquoso, e conseqüentemente no aumento da intensidade de fluorescência. Para o B[a]P o fator co-solvência apresentou uma condição adequada para as análises em soluções que continham aproximadamente 50% de cada solvente (Figura 7 e 8). Para uma concentração de 80,15 e 100% de metanol, também se observou uma queda na intensidade do sinal da luminescência.

Para uma análise comum desses dois HPAs escolheu-se uma mistura de solventes de 50,15% de metanol em água. Vale destacar que a diminuição na intensidade do espectro do Pyr (Figura 8) corresponde a $\pm 23\%$ de seu ponto máximo para essa concentração. Mesmo ocorrendo este decréscimo na intensidade de fluorescência deste HPA, esta concentração de solvente se mostra apropriada para as análises destes compostos, isto porque a intensidade do sinal continua relativamente alta para o Pyr para a forma do pico de luminescência.

As diferentes misturas com metanol e água também foram avaliadas para a série: Fenantreno, Criseno, Benzo[a]antraceno, Dibenzo[a,h]antraceno, e Benzo[k]fluoranteno (Phe, Chy, B[a]A, D[a,h]A e B[k]F). A investigação simultânea destes compostos foi realizada monitorando as respectivas excitações moleculares correspondentes a cada HPA (247, 265, 287, 296 e 307 nm). Usou-se um $\Delta\lambda$ de 100 nm para dados os casos. Os espectros podem ser visualizados na Figura 9.

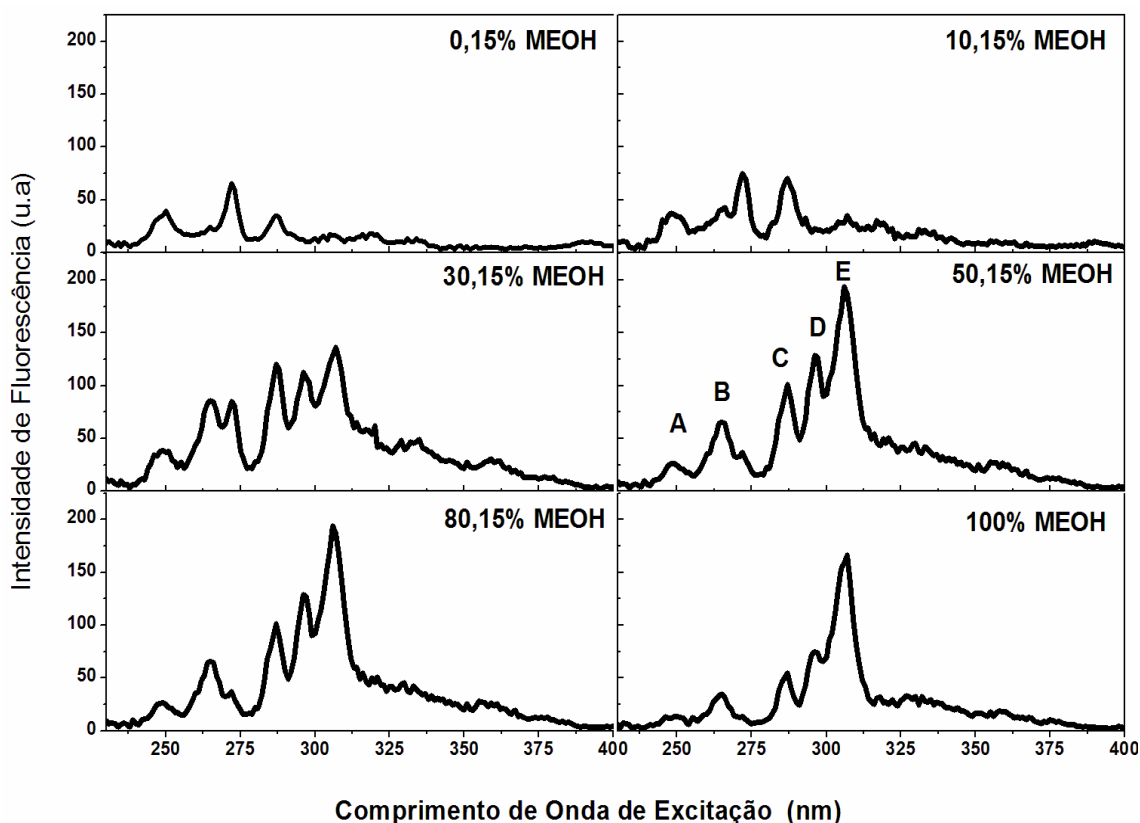


Figura 9: Espectros do Phe (A), Chy (B), B[a]A (C), D[a,h]A (D) e o B[k]F (E) em misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 100 nm . A concentração de HPAs foi de 15 ng . ml⁻¹.

Em misturas com 0,15% de metanol (Figura 9), observa-se uma baixa intensidade de fluorescência para o Phe e o B[a]A, e alguns HPAs, como D[a,h]A e B[k]F não foram possíveis ser identificados no espectro. Este fato deve estar relacionado à baixa solubilização deste composto em água, mesmo na presença de metanol [10]. Somente uma solução com uma concentração de 30,15% de metanol, como pode ser visto no gráfico da Figura 9, é possível verificar a presença dos cinco HPAs. Uma perda na intensidade e na qualidade do espectro começa a ocorrer para concentração superior a 80,15%. Desse modo, para estes HPAs, a melhor condição de concentração de solvente também foi encontrada em misturas com 50,15% de metanol.

Dos HPAs identificados na Figura 9, o B[k]F foi o composto que apresentou maior intensidade de fluorescência. Em contraposição, o Phe apresentou uma fluorescência relativamente baixa em todas as concentrações. Nas análises realizadas por PATRA & MISHRA (2001), o Phe também apresentou uma intensidade relativamente baixa na resposta de fotoluminescência, mesmo considerando que suas análises eram realizadas em soluções com surfactantes, utilizadas para solubilizar os diferentes hidrocarbonetos por micelização [37].

Nas análises com concentrações elevadas de metanol (acima de 80%), o B[k]F foi o único que não obteve diminuição considerável na intensidade do espectro, enquanto que para todos os outros HPAs identificados na Figura 9, este volume de metanol interferiu na intensidade de fluorescência, no alarguemento do espectro, e consequentemente na identificação destes compostos, como já discutido para o Pyr e B[a]P, identificados nas Figuras 7 e 8.

No caso descrito na Figura 9, vemos que, mesmo em condições otimizadas de intensidade de luminescência em função da concentração de solvente, o valor da intensidade de fluorescência entre cada HPA foi diferente. Para a maioria dos HPAs de interesse, a adição de solvente resultou em um ganho de intensidade de sinal de luminescência, porém para outros, as misturas de solventes não trouxeram nenhum ganho nas intensidades, mas podemos dizer que também não resultaram em diminuições significativas de fluorescência. Na Figura 10 é demonstrado de forma mais clara a influência da concentração do metanol na intensidade de fluorescência para os HPAs identificados na Figura 9.

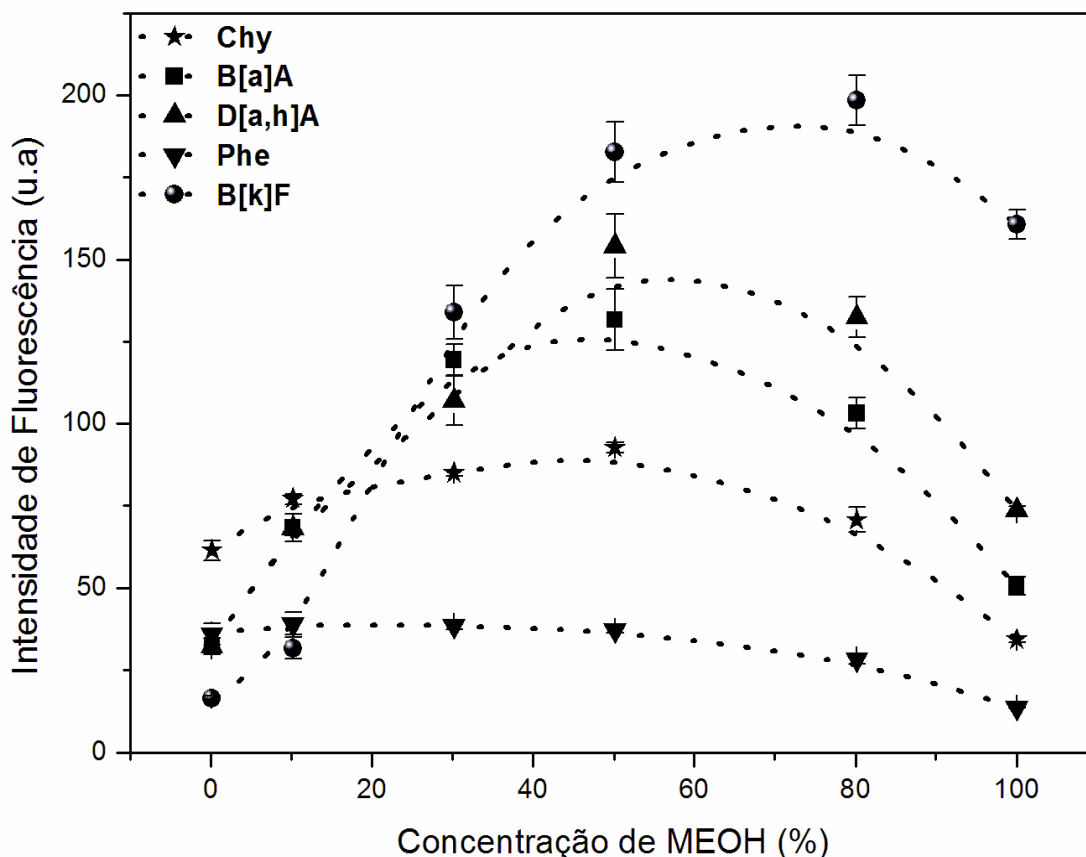


Figura 10: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 100 nm.

Pela análise da Figura 10, considerando o Chy, B[a]A e o D[a,h]A, a melhor condição para análise foi encontrada em solução com 50% metanol-água, como já visto na ocasião das análises para o B[a]P, na Figura 7. Para o Chy houve um ganho de aproximadamente 33% na intensidade do seu sinal. Já o B[a]A apresentou um ganho muito maior na intensidade do sinal, em torno de 75%. Para o D[a,h]A o aumento na intensidade de fluorescência foi ainda mais intenso, com aproximadamente 79%.²

Da mesma maneira, o aumento significativo na intensidade do sinal de HPAs como o Chy, B[a]A, D[a,h]A e o B[k]F está relacionado à fluorescência dos próprios compostos e ao aumento da solubilidade destes HPAs em água. Como pode ser observado na Tabela 1, o B[a]A e o D[a,h]A apresentam valores muito baixos de solubilização em água (0,011 e 0,0006 mg.L⁻¹, respectivamente), no entanto, com a mudança na polaridade do meio, há uma maior afinidade entre estes a HPAs e a solução de análise.

Já o Phe foi o composto que apresentou um pequeno aumento relativo da intensidade de fluorescência. Outra característica que o diferencia dos demais é que o valor máximo de fluorescência foi encontrado para concentrações de metanol em torno de 10%. Acredita-se que volumes maiores de metanol em solução provocaram uma diminuição gradativa na fluorescência em consequência da influência dos efeitos provocados por uma mudança mais brusca na polaridade do meio, devido à concentração deste solvente. Entre os HPAs investigados neste trabalho, o Phe é o que apresenta maior solubilidade em água, no entanto, também é o que apresenta menor fluorescência nas análises utilizando um $\Delta\lambda$ de 100 nm, como pode ser observado na Figura 10.

Ainda nesta Figura, vemos o caso do B[k]F, o qual apresentou um comportamento diferente ao encontrado no Phe. O aumento da intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de metanol em solução, com um máximo na concentração de 80% de metanol. Ressalta-se ainda que o ganho na intensidade do sinal foi alto, e apresentou um valor superior a 90% comparado a mistura com 0,15% apenas de metanol em solução. Acredita-se que por ser altamente insolúvel em água, a

² Estes valores foram adquiridos na comparação com os sinais de emissão dos HPAs em solução de metanol 0,15%.

presença de metanol em solução possibilita o aumento da solubilização entre a água e o B[k]F.

Mesmo assim para um $\Delta\lambda$ de 100 nm, a melhor condição para análise destes cinco compostos também foi escolhida em soluções com 50% de metanol e água, já que nestas condições, como discutido, tem-se um máximo na intensidade de fluorescência para a maioria dos HPAs de interesse.

Nota-se que estes HPAs absorvem energia em comprimento de onda muito próximo, no entanto com a alta seletividade da técnica e a mistura de solventes em proporções adequadas, as bandas resultantes da fluorescência destes HPAs estiveram localizadas em diferentes regiões do espectro eletromagnético o que possibilitou a identificação de cada HPA por meio das intensidades de máxima fluorescência.

Diferentes autores, como CAI et al. (2008) [48] e SANG et al. (2009) [49], também investigaram a identificação simultânea de diferentes HPAs em solução usando o método fluorimétrico. Em todos os trabalhos, os relatos de sucesso mostram que a técnica foi eficiente e seletiva no processo de identificação e quantificação simultânea de diferentes compostos em solução aquosa.

No entanto, como visto em todos os trabalhos, as melhores condições nas análises por EFS³, estão relacionados com os equipamentos utilizados, a quantidade de HPAs em solução, e a interação entre solvente e fluoróforo, e dentre estes fatores que podem influenciar o processo de determinação de HPAs, o meio de análise representa um dos fatores com maior importância. O tipo ou misturas de solventes podem resultar em respostas diferentes para o mesmo analito investigado, e conseqüentemente apresentar resultados mais satisfatórios ou mesmo, insatisfatórios [45]. Este fato pode ser percebido nas diferentes concentrações de metanol utilizadas para identificação do Phe, Chy, B[a]A, D[a,h]A e B[k]F, onde estes HPAs responderam de forma diferente para as mudanças ocorridas na polaridade do solução.

Diferentemente dos outros HPAs, a análise do Antraceno (Ant) foi realizada excitando suas moléculas em região em torno de 245 nm e com $\Delta\lambda$ de 160 nm [37]. A Figura 11 mostra os espectros do Ant em função da concentração de metanol e água.

³ Usaremos sempre a mesma abreviatura (EFS) para a técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada.

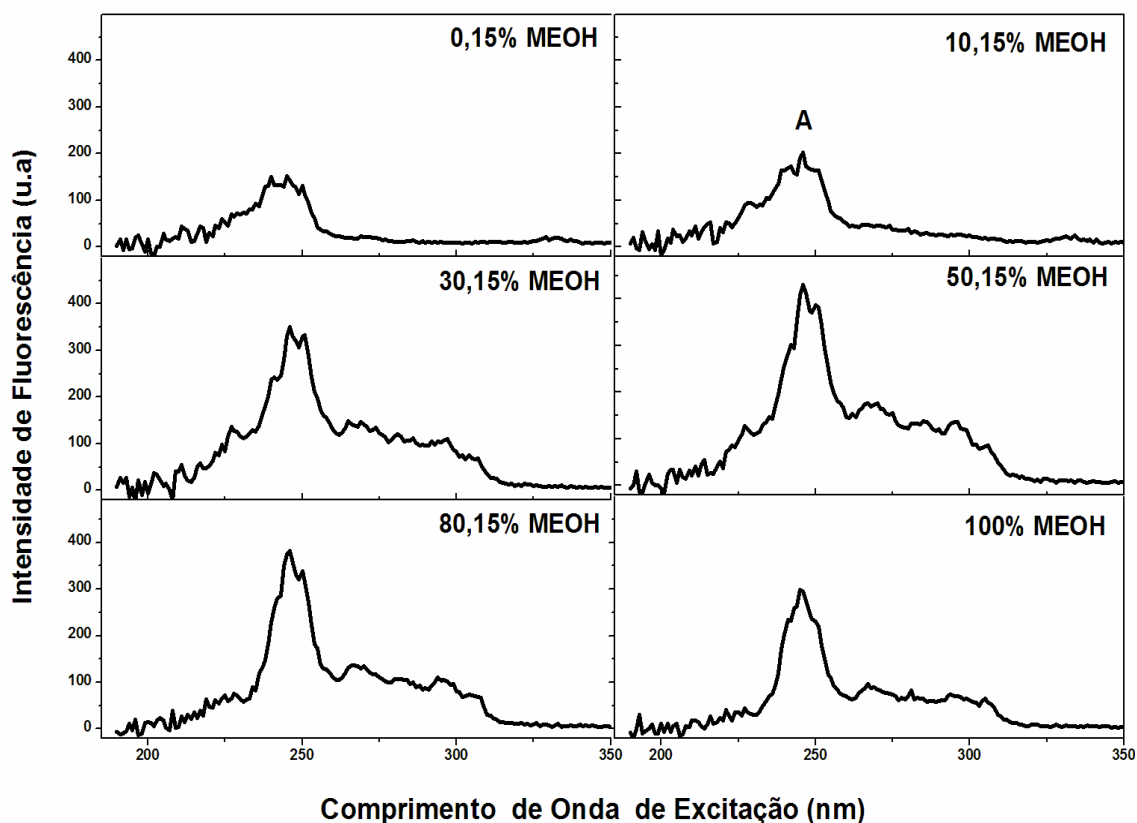


Figura 11: Espectros do Ant (A) em misturas de água e metanol (MEOH) para um $\Delta\lambda$ de 160 nm . A concentração do Ant foi de $15 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Entre todos HPAs analisados nas Figuras 7 e 9, este composto apresentou maior intensidade de fluorescência. Contudo, em se tratando da concentração de solventes, o comportamento foi semelhante à maioria dos HPAs analisados. A adição de metanol na solução causa aumento na intensidade no sinal do espectro e estreitamento do pico. A condição ótima de metanol foi de 50,15% v/v, com aumento no sinal de fluorescência de aproximadamente 65% em relação às misturas com 0,15% com metanol como visto na Figura 12, para a intensidade em 245 nm.

Na utilização dos parâmetros obtidos na referência [37], e realizando as análises com as diferentes misturas destes solventes (metanol e água) não foi possível identificar até o momento HPAs como Acenaftileno (Ace), Benzo[b]fluoranteno (B[b]F), Benzo[g,h,i]perileno (B[g,h,i]P), Fluoreno (Flu), Indeno[1,2,3 – cd]pireno, (I[1,2,3 – cd]P) que estavam presentes nos padrões mix de HPAs. Acredita-se que este fato pode estar relacionado a diferentes fatores, como a influência do efeito da polaridade, baixa fluorescência, ou mesmo aos parâmetros utilizados já que os autores PATRA & MISHRA também não realizaram a identificação destes compostos.

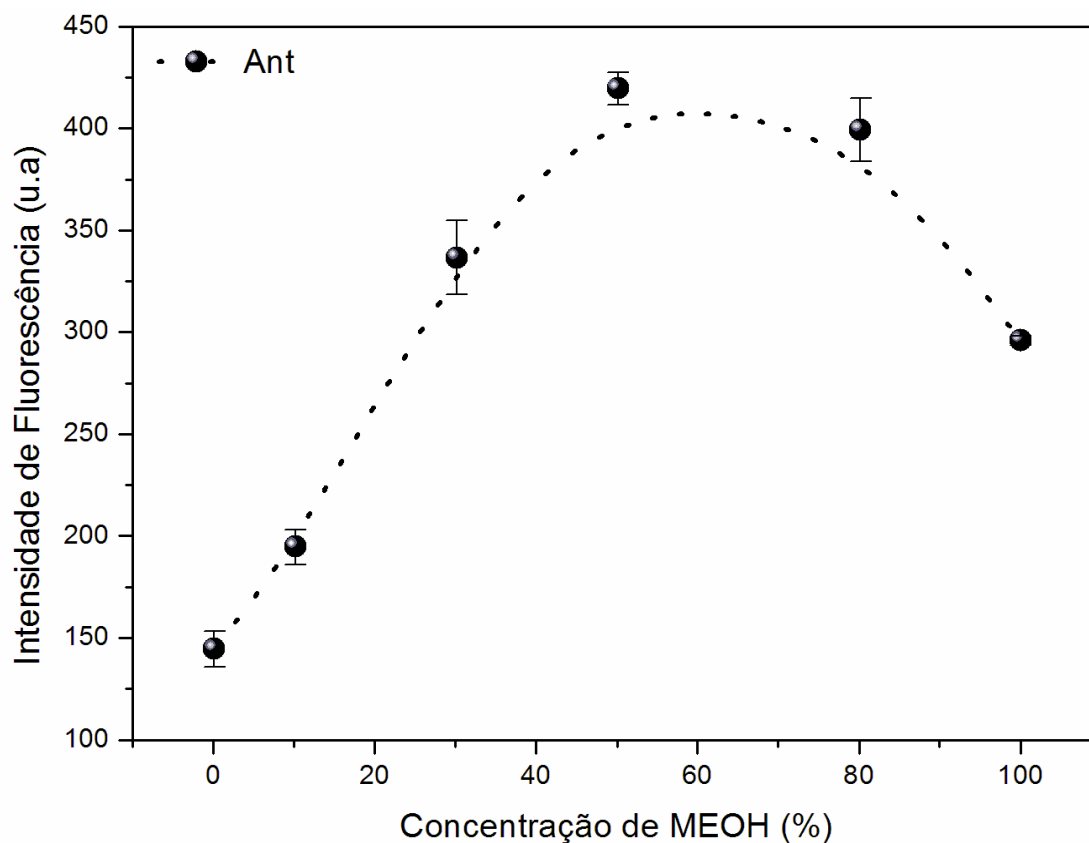


Figura 12: Médias de intensidade de fluorescência em diferentes concentrações de soluções metanólicas de HPAs utilizando um $\Delta\lambda$ 160 nm.

A partir dessas observações, conclui-se que para as análises destes oito diferentes tipos de HPAs a concentração de aproximadamente 50% v/v de metanol e água foi a condição mais apropriada, tanto porque, compostos com massa molecular maior apresentam um valor de solubilidade muito baixo, e necessitam de volumes maiores de metanol para se tornar miscíveis em água, como visto para o B[a]P, D[a,h]A e o B[k]F, enquanto que HPAs como o Phe e o Pyr apresentam afinidade maior com a água.

Outro fator a ser considerado está relacionado ao coeficiente de partição de cada HPA. O metanol apresenta uma polaridade menor que a água, possuindo assim maior afinidade com moléculas de HPAs, o que aumenta a capacidade de distribuição dos diferentes HPAs em solução aquosa, como já discutido anteriormente. Como podem ser verificados na Tabela 1, os hidrocarbonetos Pyr, Phe e Ant apresentam os menores valores quanto ao coeficiente de partição, conseqüentemente apresentam menor hidrofobicidade comparado ao restante dos HPAs, e como já percebido, são estes três hidrocarbonetos que solubilizam mais facilmente em solução aquosa.

Vale ressaltar, que todas as análises para determinação destes HPAs foram realizadas variando apenas o comprimento de onda de excitação e o $\Delta\lambda$ sem necessitar de uma prévia separação para análise de cada analito, por meio de uma rápida análise por varredura por EFS.

5.2 Validação estatísticas do método

Sendo assim, a partir das informações obtidas com a análise das misturas de solventes, foi construída uma curva de calibração para os oitos HPAs identificados (Pyr, B[a]P, Phe, Chy, B[a]A, D[a,h]A, B[k]F e o Ant. Assim, em misturas de 50,15% de metanol com água, e obteve-se um coeficiente de correlação linear entre a intensidade de luminescência e concentração de HPAs.

Com este procedimento estima-se limite de detecção mínimo, o qual indica a concentração mínima de HPA que pode ser detectado pelo experimento realizado. A faixa de concentração trabalhada para os HPAs foi de $2,5 \text{ ng.ml}^{-1}$ a 130 ng.ml^{-1} . Na Figura 13 estão as curvas de intensidade de fluorescência em função da concentração para os oito HPAs analisados sob o ponto de vista da co-solvencia.

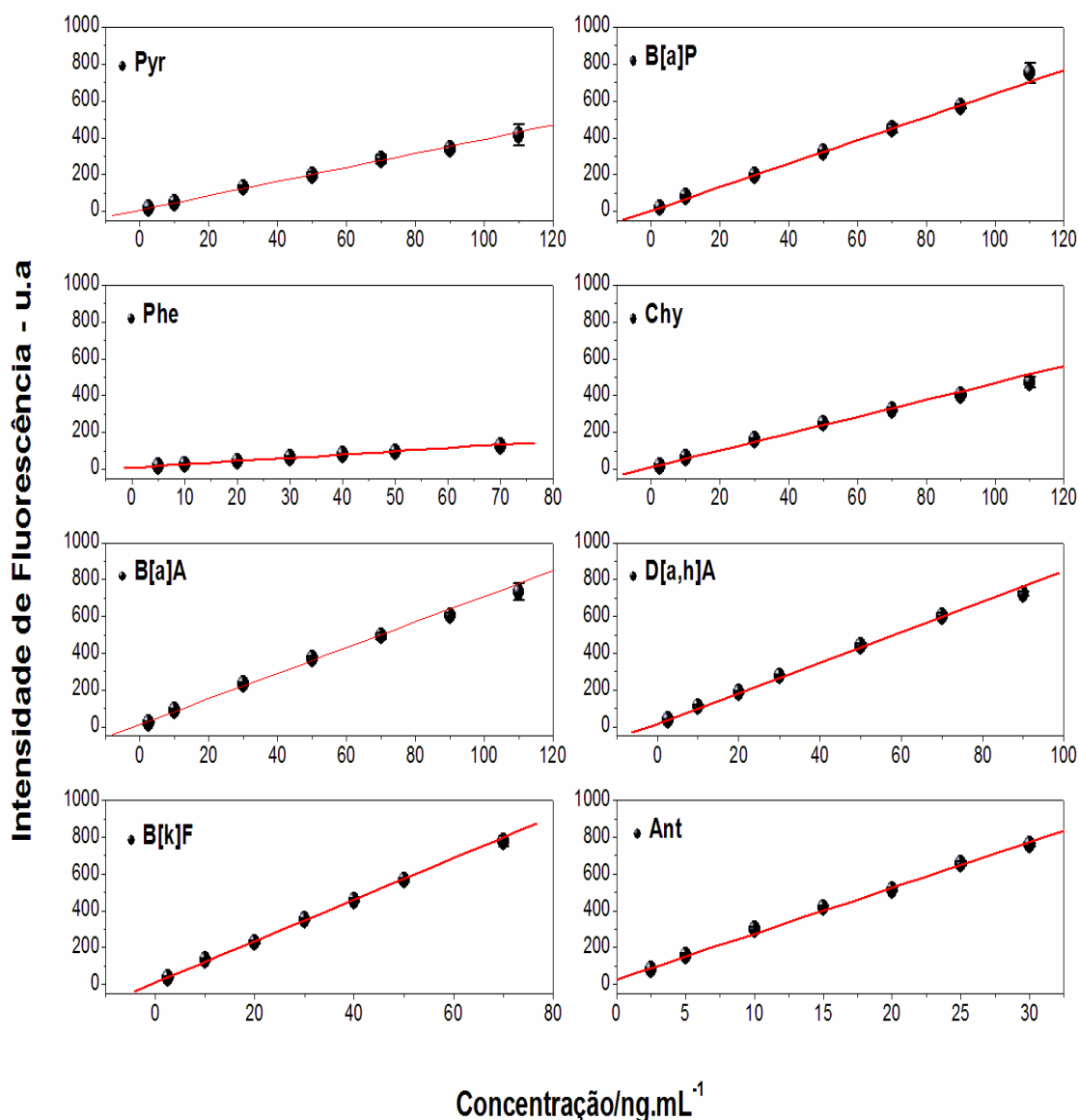


Figura 13: Curva de calibração para os oitos HPAs.

Nota-se que o Phe, foi o HPA que apresentou menor inclinação em relação aos restantes dos HPAs, quando comparado a concentração do composto em função de sua luminescência. Curiosamente o Phe é o composto, entre os analisados neste trabalho, que apresenta maior solubilidade em água e também maior capacidade de distribuição em soluções aquosas. Já o Antraceno comparado aos outros HPAs nesta curva de calibração apresentou a menor faixa de linear (de 2,5 a 30 ng.mL⁻¹), pois este é um composto que apresenta alta sensibilidade para a técnica utilizada. Contudo, em geral não se podem notar diferenças significativas na faixa de linearidade para a maioria dos HPAs (2,5 a 110 ng.mL⁻¹) como pode ser verificado na Figura 13.

Na Tabela 5 estão os valores referentes aos coeficientes de correlação linear (r), limite de detecção (L.D.), quantificação (L.Q.) e precisão obtidas utilizando as equações de 1 a 3 do item 4.4.2 e 4.4.3, para os oito HPAs identificados. Os valores quanto ao coeficiente de correlação (r) variaram de 0,9971 para o B[a]A a 0,9997 para o B[k]F. A ANVISA recomenda o valor do (r) igual ou superior a 0,98 para uma curva de calibração.

Tabela 5: Valores obtidos da curva de calibração: Linearidade (R), Limite de Detecção (L.D.), Limite de Quantificação (L.Q.) e Precisão.

HPAs	R	L.D. (ng.ml ⁻¹)	L.Q. (ng.ml ⁻¹)	Precisão (%)			
				Concentração (ng.ml ⁻¹)			
				10	15	20	50
Pyr	0,9986	0,55	1,84	4,89	6,55	4,89	6,56
B[a]P	0,9995	0,24	0,80	4,81	4,45	3,25	3,58
Chy	0,9975	0,41	1,35	4,18	4,11	2,20	3,06
B[a]A	0,9971	0,21	0,70	4,29	4,68	2,62	3,91
D[a,h]A	0,9984	0,19	0,65	4,35	4,26	2,94	2,91
Phe	0,9980	0,76	2,53	4,83	4,03	3,97	2,09
B[k]F	0,9997	0,17	0,58	3,47	4,22	2,08	3,55
Ant	0,9987	0,07	0,22	4,17	3,52	2,37	⁴

Os valores obtidos para o limite de detecção foram de 0,76 para o Phe a 0,07 ng.ml⁻¹ para o Ant. No geral, os limites de detecções apresentaram valores inferiores ao recomendado por algumas agências fiscalizadoras de substâncias nocivas a saúde humana e animal, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta agência determina uma concentração limite para o B[a]P de 0,7 ng.ml⁻¹ em água para consumo, e considera este composto como prioridade na determinação de HPAs. No

⁴ Devido a menor faixa linear do Antraceno, as medidas realizadas por fluorescência Sincronizada para as análises de precisão aconteceram em uma concentração menor para este HPA (10, 15 e 20 ng.ml⁻¹).

método que trabalhos o B[a]P apresentou um limite de detecção de $0,24 \text{ ng.ml}^{-1}$, valor este satisfatório como já discutido por meio da regulamentação da ANVISA.

Esta condição de análise estudada pela técnica de Espectroscopia por Fluorescência Sincronizada apresentou uma eficiência maior que o discutido por PATRA & MISRHA em análises com surfactantes [37]. E o que é ainda mais notável neste método, quando se utilizou esta solução metanólica também foi obtido valores potencialmente melhores quanto a capacidade de detecção em análises ambientais, que técnicas de alta sensibilidade como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa [52,54], técnicas cujos diferentes métodos para determinação de HPAs estão estabelecidos na literatura e são sugeridos para investigação ambiental por agências como a USEPA.

Na Tabela 6 foi realizado um levantamento das características analíticas para diferentes técnicas cromatográficas e espectrofluorimétricas levando em consideração os oitos HPAs (Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P) determinados neste trabalho.

Ao comparar os valores obtidos quanto ao limite de detecção apresentados neste trabalho com os dados da literatura percebemos que alguns resultados foram mais satisfatórios aos resultados obtidos por diferentes técnicas cromatográficas, como já discutidas anteriormente. Ainda na Tabela 6, analisando os limites de detecção encontrados nas técnicas espectrofluorimétricas convencionais (EFC), sincronizadas (EFS) e induzida a laser (FIL), mesmo os trabalhos, o qual se realizou processo para pré-concentrar a amostra, é possível perceber que os métodos estudados apresentam valores para os limites de detecção similares ou com menor capacidade de detecção aos apresentados na Tabela 5.

Também foi avaliada a reprodutibilidade do processo experimental realizando o teste de precisão. Utilizou-se três níveis de concentração, 10, 15 e 20 ng.ml^{-1} para o Ant que apresenta uma faixa de linearidade menor, e 10, 20 e 50 ng.ml^{-1} para os restante dos HPAs. Assim, foram realizadas dez repetições para cada concentração analisadas em solução com 50,15% de metanol. E como podem ser verificados na Tabela 5, os valores apresentados após o teste de precisão, a maioria dos HPAs apresentou valores menores que 5% indicando precisão adequada de acordo com os guias de validação para procedimentos analíticos encontrados nas referências [41,44].

Tabela 6: Valores para Linearidade e Limite de Detecção para diferentes técnicas analíticas para determinação de HPAs (Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P) em amostras de água destilada, milli-Q, de rios, chuva e efluentes.

Técnicas Cromatográficas					
HPAs	Técnica	Linearidade	L. Detecção	Preparo das amostras	Ref.
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	CG-EM ¹	0,1 – 15 ng.ml ⁻¹	2×10 ⁻³ - 1×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Micro-extração em fluxo contínuo	50
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	CG-EM	0,5 – 50 ng.ml ⁻¹	11,7×10 ⁻³ – 61,4×10 ⁻³ ng.ml ⁻¹	Micro-extração líquido-líquido	51
Phe; Ant; Pyr	CG – IPC ²	10 – 480 ng.ml ⁻¹	6 – 41 ng.ml ⁻¹	Micro-extração (Headspace)	52
Ant; Pyr	CLAE – UV ³	0,5 – 10 ng.ml ⁻¹	7×10 ⁻³ – 3×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Extração em fase sólida	53
B[k]F; B[a]P	CLAE – UV	2 – 8 ng.L ⁻¹	8×10 ⁻⁵ – 12×10 ⁻⁵ ng.ml ⁻¹	Extração em fase sólida	54
Pyr; B[k]F; B[a]P	CLAE – UV	0,1 – 65 ng.ml ⁻¹	23×10 ⁻⁴ – 42×10 ⁻⁴ ng.ml ⁻¹	Micro-extração em fase sólida	55
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	CG – IPC	0,1 – 100 ng.ml ⁻¹	8×10 ⁻² – 33×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Micro-extração em fase sólida	56
B[k]F; B[a]P	CLAE-DAD ⁴	1 – 300 ng.ml ⁻¹	1 – 5 ng.ml ⁻¹	Micro-extração em fase sólida	57
Pyr; Chy; B[k]F; B[a]P	CLAE – UV	2 – 100 ng.ml ⁻¹	40×10 ⁻² – 60×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Micro-extração em fase líquido	58
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	CLAE – UV	0,5 – 0,15 ng.ml ⁻¹	33×10 ⁻⁶ – 67×10 ⁻⁶ ng.ml ⁻¹	Extração líquido-líquido	39
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	CLAE – UV	0,02 – 40 ng.ml ⁻¹	1×10 ⁻⁴ – 5×10 ⁻⁴ ng.ml ⁻¹	Micro-extração líquido-líquido	59
Técnicas Espectrofluorimétricas					
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; D[a,h]A; B[a]P	EFS ⁵	8 – 1000 ng.ml ⁻¹	30,5×10 ⁻² – 87×10 ⁻¹ ng.ml ⁻¹	Análise indireta	37
Phe; B[a]A; Chy; D[a,h]A; B[a]P	EFC ⁶	0,4 – 1000 ng.ml ⁻¹	2×10 ⁻² – 15×10 ⁻¹ ng.ml ⁻¹	Extração em fase sólida	60
B[a]P; Pyr	EFS	0,4 – 4,5 ng.ml ⁻¹	4×10 ⁻² – 1×10 ⁻¹ ng.ml ⁻¹	Análise indireta	61
Phe; Ant; Pyr; B[a]A; Chy; B[k]F; B[a]P	EFS	0 – 250 ng.ml ⁻¹	2×10 ⁻² – 22,8×10 ⁻¹ ng.ml ⁻¹	Análise indireta	62
Pyr ; B[a]P; B[k]F	FIL ⁷	0,3 – 60 ng.ml ⁻¹	7×10 ⁻² – 9×10 ⁻¹ ng.ml ⁻¹	Análise indireta	63
B[a]P; Chy	EFC	0,32 – 1,7 ng.ml ⁻¹	5×10 ⁻³ – 10×10 ⁻³ ng.ml ⁻¹	Análise indireta	64
Phe	EFS	0,50 – 5,00 ng.ml ⁻¹	5×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Análise indireta	65
B[a]P	EFS	0 – 12 ng.ml ⁻¹	11×10 ⁻⁵ ng.ml ⁻¹	Extração líquido-líquido	66
B[a]P; Pyr	EFS	2 – 1000 ng.ml ⁻¹	63×10 ⁻² – 70×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Análise indireta	67
Phe; Pyr; B[a]A; Chy; B[a]P	EFC	0 – 100 ng.ml ⁻¹	10×10 ⁻³ – 16×10 ⁻³ ng.ml ⁻¹	Extração em fase sólida	68
Phe; Ant; B[a]P; Chy	FIL	0,02 – 25 ng.ml ⁻¹	2×10 ⁻³ – 10×10 ⁻² ng.ml ⁻¹	Extração em fase sólida	69

1- CG-MS – Cromatografia Gasosa Acoplado ao Espectrômetro de Massas

2- CG-IPC - Cromatografia Gasosa com Detector com Ionização por Chama

3- CLAE-UV – Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta

4- CLAE-DAD - Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

5- EFS – Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada

6- EFC - Espectroscopia de Fluorescência Convencional

7- FIL- Fluorescência Induzida a Laser

Nas análises de recuperação, as amostras também foram analisadas sem a adição dos padrões de HPAs. Como podem ser observados na Tabela 7, os valores de recuperação variaram de aproximadamente 88 a 99% para os diferentes HPAs avaliados.

Tabela 7: Valor de recuperação para os diferentes HPAs em amostras com 50% de metanol e 50% de amostra de água coletada no Parque Arnulpho Fioravante.

HPAs	Recuperação (%)			
	Concentração adicionada (ng.ml ⁻¹)			
	10	15	20	50
Pyr	98,44±2,76	89,73±5,19	89,42±8,21	88,87±3,51
B[a]P	99,52±1,50	97,70±0,60	93,47±0,53	95,43±0,80
Chy	97,11±3,29	93,56±1,11	91,30±3,11	96,52±1,34
B[a]A	99,58±1,90	94,97±2,25	91,37±3,99	95,65±2,55
D[a,h]A	90,40±3,97	97,59±1,34	93,84±1,94	97,35±1,31
Phe	96,12±5,02	95,17±0,25	95,80±6,52	95,33±2,10
B[k]F	93,78±4,18	96,52±1,11	96,85±0,92	96,12±0,40
Ant	93,65±2,89	96,86±0,32	96,31±1,01	⁵

Estes valores de recuperação para as amostras analisadas indica que a matriz da amostra não interfere na determinação dos HPAs. Os valores de recuperação encontrados são satisfatórios para o nível de concentração do analito presente na solução. Segundo o guia de validação para métodos analíticos citado na referência [41], para a recuperação, os valores aceitáveis depende de algum fatores como, a matriz da amostra, o procedimento de processamento das amostras e da concentração do analito. Desta forma, neste estudo os valores para recuperação de HPAs estão em um intervalo que oscila de 75 a 125%.

⁵ Devido a menor faixa linear do Antraceno, as medidas realizadas por fluorescência Sincronizada para as análises de recuperação aconteceram em uma concentração menor para este HPA (10, 15 e 20 ng.ml⁻¹).

5.3 Análises da Extração Líquido-Líquido em Matrizes Aquosas

Diferentes processos com a finalidade de pré-concentrar poluentes para uma análise mais confiável são encontrados na literatura. Dos procedimentos mais comuns, para análise por fluorimetria direta encontramos a microextração em fase sólida, a extração líquido-líquido, ou mesmo por surfactantes (ponto nuvem) [70 – 72]. Porém, nestes trabalhos o número de HPAs determinados é variável, e este é um fator relevante, pois no ambiente natural a presença e a quantidade destes compostos são desconhecidas. No entanto, cada método procura ser eficiente para as diferentes misturas, seja em uma solução conhecida ou mesmo em uma amostra natural.

No intuito de realizar um estudo direto com amostras que continham concentrações abaixo do limite de quantificação encontrado pelas condições do equipamento, procurou-se um método relativamente simples e que apresentasse compatibilidade material com o laboratório de trabalho. Assim, para realizar a pré-concentração dos analitos optou-se pelo processo de extração líquido-líquido desenvolvido para análises de Cromatografia de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência [38,39], com algumas modificações procurando melhorar ou mesmo adequar às condições para análise fluorimétrica.

Neste processo utilizou-se o solvente hexano como extrator de HPAs em superfícies aquosas. Devido sua alta afinidade com estas moléculas e baixa densidade comparada à água, propriedade esta que facilita sua retirada do frasco de enlenmeyer ao ser formado uma lâmina de hexano que fica disposta em uma camada por cima da água. Segundo a literatura este processo de extração com porções de 20 ml hexano foi dividido em quatro etapas, pois as primeiras etapas retiram em maiores quantidades apenas os hidrocarbonetos com pesos moleculares menores e, conseqüentemente os HPAs com pesos moleculares maiores são extraídos nas etapas finais, ou seja, nas últimas porções de hexano adicionadas na água [38]. O detalhamento do procedimento está descrito na seção 4.2 dos procedimentos experimentais.

Desta forma, para otimizar a metodologia, primeiro foram realizados experimentos para avaliar o nível de eficiência do processo, porém utilizando a Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para a realização das análises. Todo experimento foi desenvolvido por meio da contaminação de água destilada com alíquotas dos padrões mix de HPAs (EPA 525 PAH Mix-B - Sigma Aldrich) contendo

uma mistura com treze diferentes Hidrocarbonetos. O mix de HPAs foi adicionado em amostras de água em três concentrações (0,166, 0,083 e 0,041 ng.ml⁻¹). O processo de extração líquido-líquido para estas concentrações foram realizados sempre em triplicatas.

E após o processo de pré-concentração realizado em água destilada puderam ser recuperados os seguintes HPAs: o Pireno (Pyr), Benzo[a]pireno (B[a]P, Criseno (Chy), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Dibenzo[a,h]antraceno (D[a,h]A), Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) e o Antraceno (Ant). No entanto, em águas contaminadas com uma concentração de 0,041 ng.ml⁻¹ apenas o Pyr, B[a]P e o Ant obtiveram uma relativa eficiência no processo de extração. A incapacidade de detecção do Fenantreno (Phe) e a baixa recuperação do Criseno (Chy), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Dibenzo[a,h]antraceno (D[a,h]A) e o Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) em águas contaminadas com 0,041 ng.ml⁻¹ dos padrões de HPAs pode estar relacionado a fatores difíceis de controlar nos processos físicos durante o procedimento de extração e também a limitações oriundas de alguns solventes utilizados no processo.

Para água destilada que apresentava uma concentração de 0,166 ng.ml⁻¹ o processo apresentou uma eficiência de extração 87,66% para o Pyr. Já para o Chy, B[a]A e para o Ant obtiveram um eficiência de 68,93; 65,78 e 59,85%, respectivamente. O B[a]P, D[a,h]A e o B[k]F foram os HPAs que apresentam os menores índices de eficiência após a extração líquido-líquido com 51,15; 47,71 e 54,12%, respectivo a cada HPA. Estes valores podem ser verificados na Tabela 8.

Já para água destilada contaminada com 0,083 ng.ml⁻¹ destes poluentes os melhores índices de extração foram apresentados pelo Pyr (92,96%), B[a]P (66,66%), B[a]A (75,76%) e o Ant (65,29%). Outros HPAs como Chy (41,69%), D[a,h]A (48,76%) e o B[k]F (59,72%) apresentaram baixa eficiência no processo de extração realizado em água pura (Tabela 8).

Em água destilada contaminada com 0,041 ng.ml⁻¹ de HPAs, como pode ser verificado na Tabela 8, os hidrocarbonetos Pyr, B[a]A e o Ant, obtiveram um índice de eficiência de 68,02; 61,99 e 60,87%, respectivamente.

Tabela 8: Eficiência na extração líquido-líquido para os diferentes HPAs em amostras de água destilada.

HPAs	Eficiência em Água Destilada (%)		
	Concentração adicionada (ng.ml ⁻¹)		
	0,166	0,083	0,041
Pyr	87,66±2,98	92,96±3,23	68,02±7,24
B[a]P	51,15±8,77	66,66±9,91	61,99±13,95
Ant	59,85± 5,26	65,29±5,29	60,87±8,85
Chy	68,93±4,27	41,69±3,28	
B[a]A	65,78±4,98	75,76±10,21	
D[a,h]A	47,71±6,12	48,76±7,65	
B[k]F	54,12±3,03	59,72±5,11	⁶

Com a finalidade de verificar a viabilidade deste processo de extração líquido-líquido como um prévio tratamento de amostras com concentrações de HPAs muito baixas, para análise de identificação simultânea por meio da técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada, todo procedimento foi reproduzido, também, em amostras ambientais coletadas no Córrego Paragem. Nestas amostras os processos foram realizados em triplicata sem a adição de padrão de HPAs, e posteriormente estas amostras foram contaminadas também em três concentrações diferentes (0,166, 0,083 e 0,041 ng.ml⁻¹) dos padrões de HPAs e posteriormente pré-concentradas.

Os resultados de eficiência em amostras ambientais obtidos realizando o processo de extração em amostras ambientais apresentaram comportamento semelhante aos resultados de eficiência em amostras de água destilada. Como pode ser analisado na Tabela 9, entre os HPAs, o Pyr (101,30%), B[a]P (65,89%), Chy (64,99%), B[a]A (68,28%); B[k]F (61,39%) e o Ant (70,30%) obtiveram os melhores índices de de extração, já o D[a,h]A, semelhante aos resultados obtidos com o processo realizado

⁶ Os HPAs Criseno (Chy), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Dibenzo[a,h]antraceno (D[a,h]A) e o Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) não obtiveram índices de eficiência no processo de extração líquido-líquido.

com água destilada, foi o HPA que obteve um índice de eficiência menor para esta concentração, com 53,02%. A eficiência de extração do D[a,h]A pode estar relacionado ao alto peso molecular e baixa solubilidade comparado a outros HPAs, como já pode ser analisado na Tabela 1.

Já as amostras naturais contaminadas com 0,083 ng.ml⁻¹ dos padrões de HPAs apresentaram índices de eficiência menores comparados aos índices obtidos em água destilada, para esta mesma concentração. Destaca-se entre os HPAs, o Pyr e o B[a]A que obteve um valor para extração de 86,18 e 64,46%, respectivamente. Os restantes dos HPAs obtiveram um índice de eficiência inferior a 60% (Tabela 9).

E semelhante às amostras com água destilada, as amostras ambientais contaminadas com 0,041 ng.ml⁻¹ dos padrões de HPAs tiveram um índice de eficiência para o Pyr de 66,98%, porém apresentaram índices relativamente baixos para o B[a]P (44,39%) e para o Ant (49,19%) (Tabela 9).

Tabela 9: Valor de Eficiência (%) após a extração líquido-líquido para os diferentes HPAs em amostras ambientais.

HPAs	Eficiência em Amostra Ambiental (%)		
	Concentração adicionada (ng.ml ⁻¹)		
	0,166	0,083	0,041
Pyr	101,30±9,09	86,18±11,45	66,98±10,27
B[a]P	65,89±16,86	54,07±10,67	44,39±16,45
Ant	70,31±14,11	57,75±7,12	49,20±11,11
Chy	64,99±9,59	39,26±8,77	
B[a]A	68,28±13,15	64,43±8,06	
D[a,h]A	53,03±18,56	43,03±15,26	
B[k]F	61,39±12,88	54,82±10,98	⁷

⁷ Os HPAs Criseno (Chy), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Dibenzo[a,h]antraceno (D[a,h]A) e o Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) não obtiveram índices de eficiência no processo de extração líquido-líquido.

Após o processo de pré-concentração percebeu-se que HPAs como o Pyr, B[a]A e o Ant apresentaram, discretamente, uma eficiência média de extração maior que outros HPAs nos dois diferentes tipos de amostras contaminadas (água destilada e amostra ambiental). Como relatam BRUM et al. [38], isto pode estar relacionado a menor estrutura molecular apresentados por estes compostos. HPAs deste tipo apresentam maior facilidade para ser extraído já nas primeiras porções de hexano utilizado durante o processo de extração.

Portanto, como podem ser visualizados nas Tabelas 8 e 9 acima, os valores de obtidos após extração dos HPAs em amostras ambientais quando comparados aos valores obtidos por meio da avaliação da eficiência do procedimento realizado com amostras de água destilada, percebe-se que os menores índices de eficiência em amostras ambientais para HPAs, como exemplo o D[a,h]A, estão diretamente relacionados à baixa eficácia do processo de extração líquido-líquido utilizado para pré-concentrar estes analitos, e não a alguma possível limitação oriunda da Técnica de Espectroscopia Molecular Sincronizada, pois mesmo após o processo de extração a técnica possibilitou a identificação de grande parte dos HPAs.

Porém, ao analisarmos o processo de extração em amostras reais em função do limite máximo de eficiência atingido por este procedimento de extração líquido-líquido em amostras com água destilada, verificamos que os índices, em geral, apresentados para estes HPAs podem ser considerados adequados para o trabalho quantitativo de análise, pois o valor da eficiência relativa calculado em amostras ambientais variou de aproximadamente 71% a 128%, com um valor médio de $97,52 \pm 20,62\%$.

Para este processo verificou-se os valores de extração para a amostra analisada indica que a matriz da amostra não interfere na determinação dos HPAs. Os valores de recuperação encontrados são satisfatórios para o nível de concentração presente na solução de acordo com guia de validação para métodos analíticos, que recomendam valores para recuperação de HPAs em um intervalo de 75 a 125% [41].

Tabela 10: Valor médio de eficiência obtidos após o processo de extração líquido-líquido em água destilada e os valores referentes à eficiência obtidos do processo de pré-concentração realizado em amostras ambientais.

		Valor Médio de Eficiência (%)		Eficiência Relativa (%)	
		Água Destilada		Amostras Ambientais	
HPAs		0,166 ng.ml ⁻¹		0,083 ng.ml ⁻¹	
				0,041 ng.ml ⁻¹	
Pyr	82,88 ± 4,48	115,56 ± 10,37	92,71 ± 12,32	98,47 ± 15,10	
B[a]P	59,93 ± 10,88	128,82 ± 32,97	81,11 ± 16,01	71,62 ± 26,54	
Ant	62,00 ± 6,47	117,47 ± 23,58	88,45 ± 10,91	80,83 ± 18,25	
Chy	55,31 ± 3,78	94,29 ± 13,92	94,18 ± 21,05		
B[a]A	70,77 ± 7,60	103,80 ± 19,99	85,04 ± 10,64		
D[a,h]A	48,24 ± 6,89	111,15 ± 38,91	88,25 ± 31,30		
B[k]F	56,92 ± 4,07	113,44 ± 23,79	91,80 ± 18,39		⁸

Vale ressaltar que o processo de extração foi realizado com misturas de treze diferentes hidrocarbonetos, e o comportamento desta mistura dentro deste processo não pode ser controlado, visto as diferentes propriedades físico/químicas que podem resultar em diferentes interações entre a matriz, solvente (hexano), entre os próprios HPAs, ou mesmo limitações mecânicas do processo de pré-concentração, que pode influenciar de alguma forma o valor extraído durante as várias repetições.

Levando em consideração que os mais diversos tipos de HPAs entram em contato com o ambiente aquático em suas mais variadas formas, como por precipitação atmosférica, escoamento urbano, efluente industrial e domiciliar, e derramamento de óleo ou vazamentos [26]. E considerando que muitos corpos d'águas naturais são utilizados para consumo humano, a preocupação na determinação de HPAs nestes ambientes está centrada nos importantes fatores contextualizados neste trabalho, razão

⁸ Os HPAs Criseno (Chy), Benzo[a]antraceno (B[a]A), Dibenzo[a,h]antraceno (D[a,h]A) e o Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) não obtiveram índices de eficiência no processo de extração líquido-líquido.

também para que órgãos ambientais e de saúde adotem medidas legais quanto aos valores de HPAs encontrados em água potável e natural [38].

Neste contexto, como pode ser verificado na Tabela 10, o processo utilizado para pré-concentrar os HPAs apresentou uma eficiência muito alta, pois possui uma capacidade para recuperar estas substâncias a níveis rigorosamente baixos, a nível de partes por trilhão (ppt), como pode ser constatado principalmente no processo que pré-concentrou o Pireno, o Benzo[a]pireno e o Antraceno.

Nota-se também que o processo escolhido para pré-concentrar estas substâncias inicialmente foi criado para o uso em cromatógrafos, e mesmo com as alterações durante o procedimento de extração para análise pela técnica de Espectroscopia por Fluorescência Sincronizada, os resultados foram satisfatórios comparados a outros procedimentos realizados com análise por fluorescência, até mesmo por procedimentos utilizando diferentes métodos cromatográficos para as análises de determinação de HPAs.

5.4 Aplicações Prática da Técnica de EFS

Após todo delineamento experimental, a última etapa do trabalho foi aplicar o processo de extração líquido-líquido em amostras ambientais coletadas no Parque Arnulpho Fioravante para verificar uma possível contaminação por HPAs. Os pontos, o qual houve amostragem está descrito no item 4.3.

As análises realizadas em amostras coletadas no ponto 01, demonstrado na Figura 4, não detectaram a presença de nenhum dos HPAs estudados neste trabalho. No entanto, após a pré-concentração, os sinais que puderam ser observados nas amostras coletadas neste ponto utilizando os parâmetros otimizados para quantificação de HPAs foram semelhantes ao sinal apresentado em extrações em água destilada (branco).

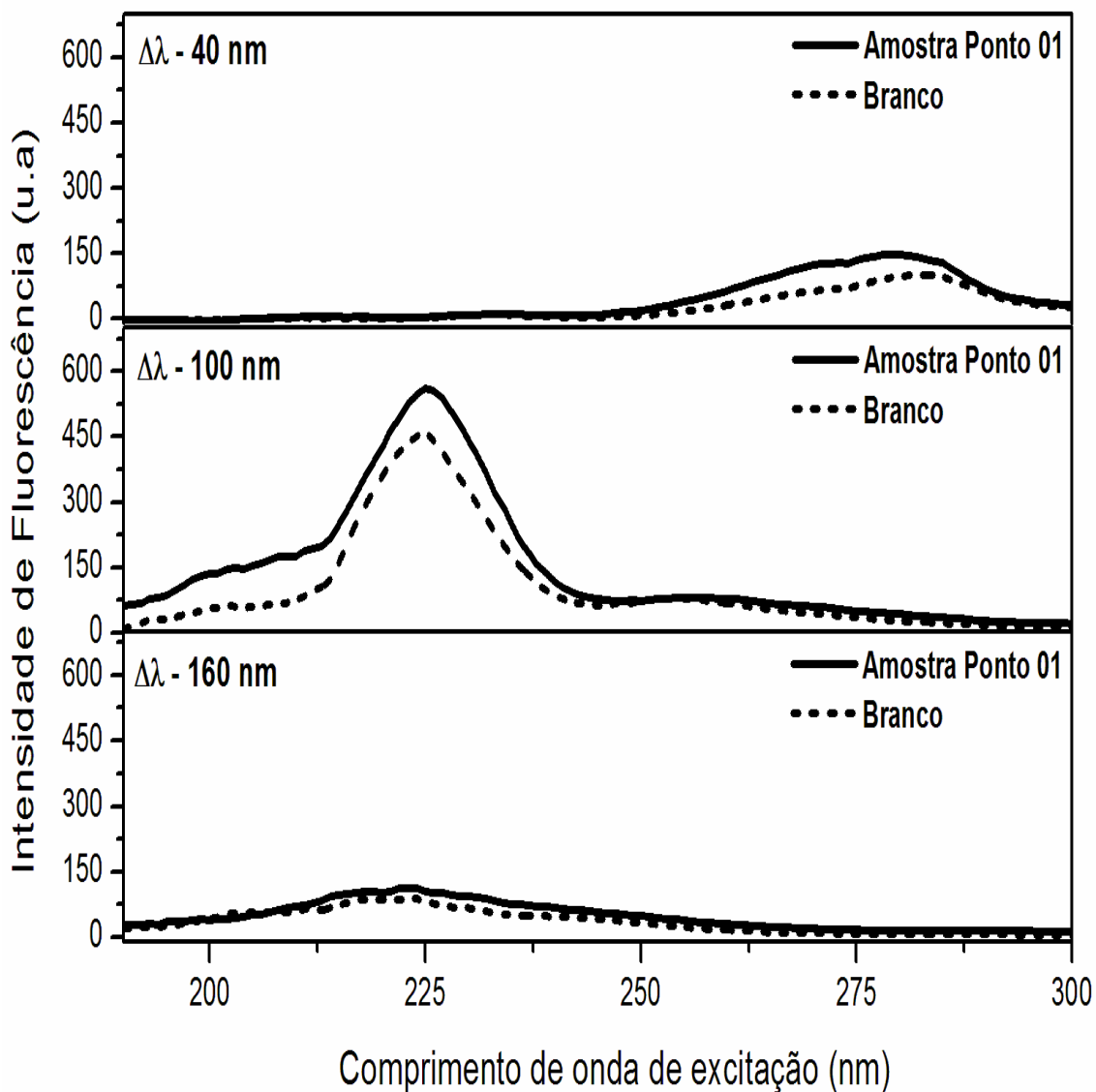


Figura 14: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 01 de amostragem e em água destilada pura.

Os pontos 02 embora seja um ponto que possivelmente receba grandes quantidades de efluentes, também não foi possível identificar qualquer HPA. Na Figura 15 é possível visualizar melhor o espectro obtido após o processo de extração líquido-líquido em amostras coletadas neste ponto.

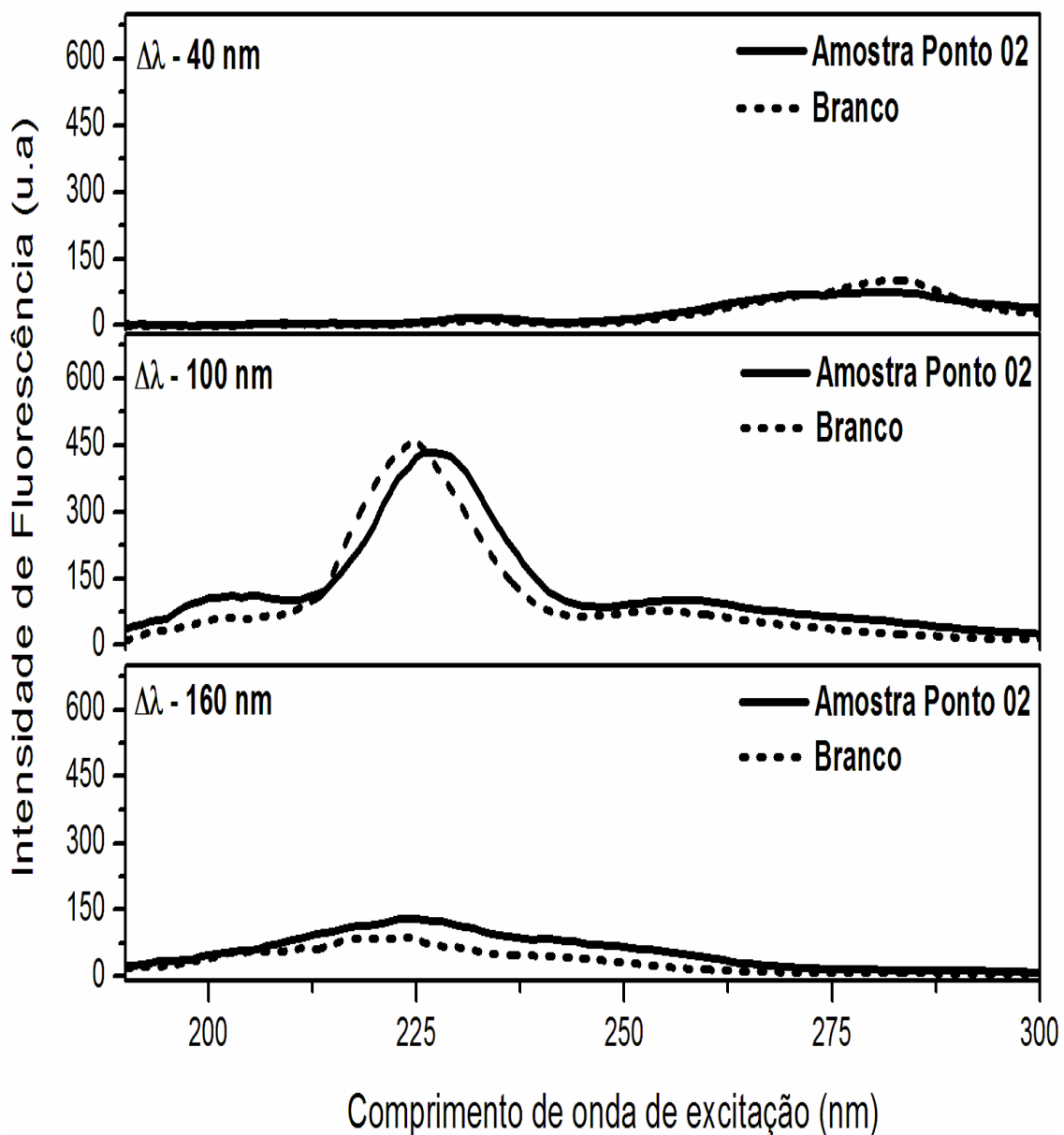


Figura 15: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 02 de amostragem e em água destilada pura.

E no terceiro Ponto de coleta, onde o manancial recebe águas canalizadas em galerias do município, as análises também não identificaram a presença destes hidrocarbonetos mesmo após o processo de pré-concentração como pode verificado na Figura 16.

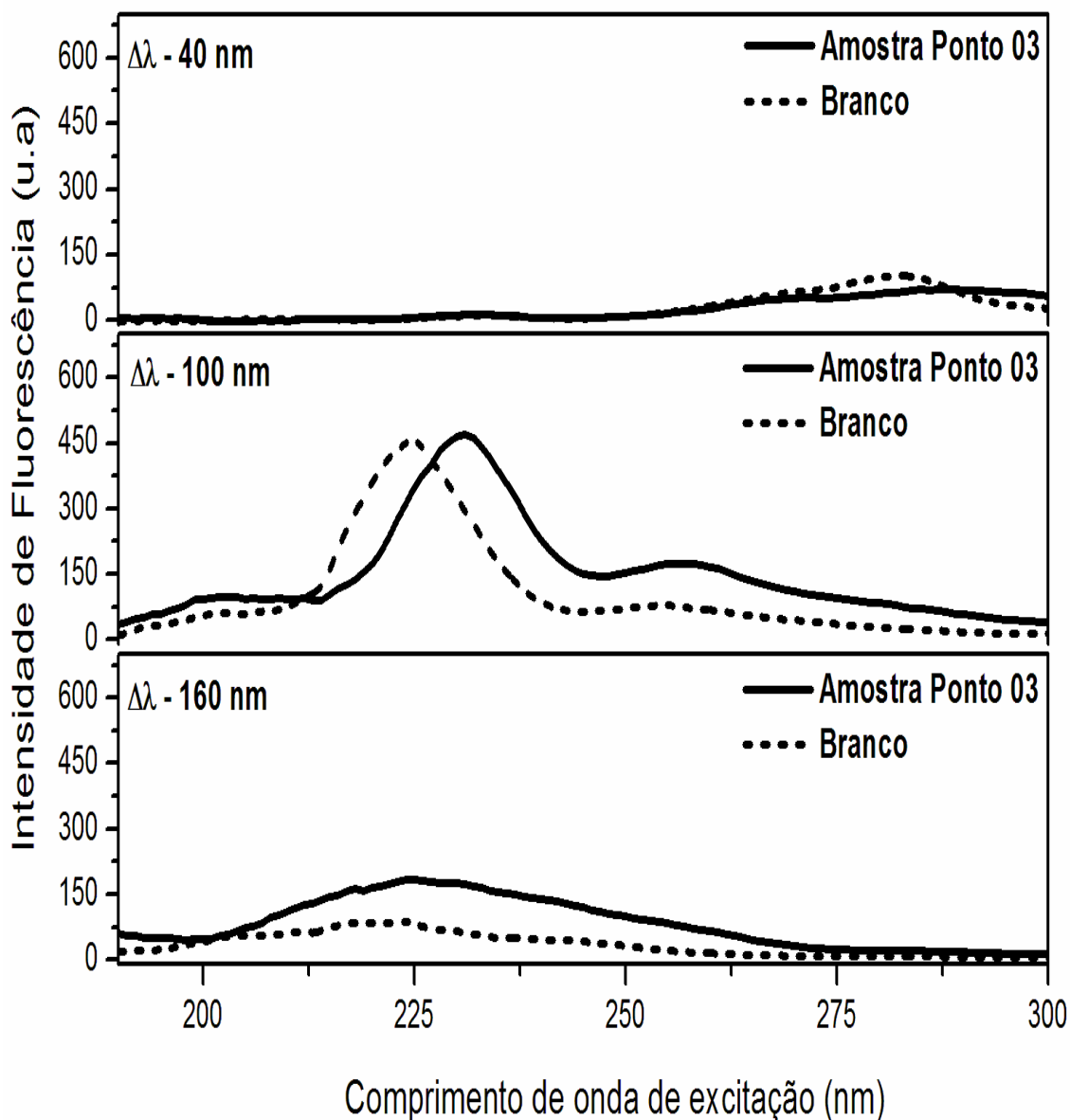


Figura 16: Médias de intensidades de fluorescência de soluções metanólicas após o processo de extração realizado no Ponto 03 de amostragem e em água destilada pura.

Embora neste primeiro momento não tenha sido encontrado algum HPA, estas análises foram realizadas com a finalidade de aplicar na prática todo o processo otimizado. No entanto, para um real monitoramento alguns fatores devem ser levados em consideração para uma investigação precisa sobre a presença destes poluentes, como a sazonalidade, número maior de amostragem, número maior de pontos de amostragem, observar os fatores relacionados aos diferentes tipos de deposição (seca e úmida), sinais de contaminação por efluentes, industriais entre outras formas. Portanto, configura-se como fator de maior importância nestas análises, à ausência da influência da matriz no processo final do procedimento experimental e estatístico.

6 Conclusão

Este trabalho desenvolvido para identificação e quantificação simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foi orientado através de muitos referenciais teóricos, mas obteve apoio principal no trabalho desenvolvido por PATRA & MISHRA (2001), principalmente nos parâmetros utilizados com o equipamento fluorimétrico, porém as condições de análises foram bem diferentes no que se refere a solventes (misturas) e a alguns HPAs trabalhados.

E considerando os valores dos limites de detecção obtidos ao utilizar estas condições de solventes para análise de identificação simultânea, nota-se que a técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada se mostrou satisfatório para a determinação dos HPAs propostos neste trabalho. Oito tipos diferentes de HPAs foram identificados em um meio com treze diferentes compostos, sendo que destes, cinco diferentes hidrocarbonetos foram determinados utilizando apenas uma constante ($\Delta\lambda$).

A utilização do metanol como um co-solvente também demonstrou ser um componente de grande aplicabilidade para o estudo simultâneo e quantitativo de HPAs, pois os limites de detecção do método, como já comentado, foram menores ao que a ANVISA regulamenta na portaria Nº 2.914, de dezembro de 2011, demonstrando a eficiência da técnica na determinação de diferentes substâncias de forma simultânea e em concentrações muito baixas. Valores apresentados também quanto à precisão do método e a recuperação do analito confirmam a eficiência da proposta investigada neste trabalho, pois estão de acordo com guias de validação de métodos analíticos.

Outro fator importante está relacionado ao procedimento de pré-concentração utilizado nesta pesquisa, pois este procedimento possibilita a determinação de sete diferentes compostos em concentrações ainda menores, a nível de ppt (partes por trilhão), indicando que processos como a extração líquido-líquido pode ser uma ferramenta de grande importância nos procedimentos que visam ações de monitoramento ambiental, principalmente onde as substâncias a serem investigadas podem estar dispersas no meio, como o que ocorre nos sistemas aquáticos.

E para finalizar, a eficiência do método apresentado neste trabalho foi melhor que valores apresentados por muitos métodos utilizando técnicas cromatográficas. Outra vantagem na técnicas de EFS está relacionado ao custo relativamente baixo, a praticidade e agilidade para as análises comparado as técnicas convencionais.

7 Trabalhos Futuros

Sobre esta temática muito ainda pode ser explorado, e entre algumas possibilidades para complementação deste trabalho ou o desenvolvimento de uma linha que se preocupe com a dispersão destes poluentes no ambiente, citaremos algumas perspectivas futuras:

- ✓ Avaliar diferentes processos para pré-concentrar HPAs, no entanto avaliado pela Técnica de Espectroscopia por Fluorescência Sincronizada;
- ✓ Desenvolver um estudo com padrões isolados contemplando um número maior de HPAs analisados por esta técnica;
- ✓ Estudar a dispersão destes poluentes em outras matrizes utilizando a EFS;
- ✓ Avaliar o comportamento de organismos vegetais em contato com HPAs com a finalidade de encontrar um bioindicador como resposta a poluição no ambiente.

8 Referências

- [1] GOLDEMBERG, J.; VILLANUEVA, L. D. Energia, Meio Ambiente e Desenvolvimento. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- [2] MOZETO, A. A., JARDIM, W. F. A Química Ambiental no Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 25 [1], 7-11, 2002.
- [3] WOOLFENDEM, E. Monitoring VOCs in air using sorbent tubes followed by thermal desorption-capillary GC analysis: summary of data and practical guidelines. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* Vol. 47, 20-36, 1997.
- [4] FUTOMA, D.J.; SMITH, S.R.; TANAKA, J.; SMITH, T.E. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Systems. CRC Press, 1981.
- [5] BARTLE, K. D.; LEE, M. L.; WISE, S.A. Modern Analytical Methods for Environmental Polycyclic Aromatic Compounds. *Chem. Soc. Rev.*, 113-158, 1981.
- [6] GUITERAS, J; BELTRÁN, J.L.; FERRER, R. Quantitative Multicomponent Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. *Chimica Acta*. Vol. 361, 233-240, 1998.
- [7] CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – Benzo[a]pireno: Uma Revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. Vol. 67 [1], 1-27, 2008.
- [8] NETTO, Annibal D. Pereira et al. Avaliação da Contaminação Humana Por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Hpas) e Seus Derivados Nitrados (Nhpas): Uma Revisão Metodológica. *Quím. Nova*. Vol. 23 [6], 765-773, 2000.
- [9] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking-Water. Background Document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. WHO. Vol 2, p. 32, 2003.
- [10] MEIRE, R. O.; AZEREDO, A. T.; MACHADO, P. M. Aspectos Ecotoxicológicos de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. *Oecol. Bras.* Vol. 11 [2], 188-201, 2007.
- [11] LOPES WA, ANDRADE JB. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Quim Nova*. Vol. 19 [5], 497-516, 1996.
- [12] U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995.
- [13] AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons (PAHs). USA, Disponível em < <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=13&po=0> > visitado em 02 de outubro de 2012.

[14] FRANCO, S.S.; NARDOCCI, A.C.; GUNTHER, W.M. Biomarcadores de HPAs na avaliação de risco à saúde humana: uma revisão do estado da arte. Cad. Saúde Pública. Vol. 24 [4], 569-580, 2008.

[15] NARDOCCI, A. C. Avaliação probabilística de riscos da exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) para a população do Estado de São Paulo. Universidade de São Paulo. Tese. Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Pública da USP. São Paulo, 2010.

[16] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - Air Quality Guidelines. WHO Regional Office for Europe. Copenhagen, p. 24, 2000.

[17] OKONA-MENSAH, K.B. et al. An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution. Food and Chemical Toxicology. Vol 43, 1103-1116, 2005.

[18] NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: 15 Listings. Report on Carcinogens. 353-360, 2011.

[19] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Benzo(a)pyrene (BaP) - TEACH Chemical Summary. U.S. EPA, 2006. Disponível em < <http://www.epa.gov/teach/>. > visitado em 10 de novembro de 2012.

[20] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. International Agency For Research On Cancer (IARC). Vol. 92, p. 868, 2010.

[21] EUROPEAN COMMISSION HEALTH and CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. Scientific Committee on Food. p. 195. 2002.

[22] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. Disponível em < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm> > visitado em 25 de setembro de 2012.

[23] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). National Primary Drinking Water Regulations. Disponível em < <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf> > visitado em 02 de outubro de 2012.

- [24] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria MS n.º 2914/2011. Legislação de Saúde, Brasília – DF, 2011.
- [25] CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Brasil. 58-63, 2005.
- [26] MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. vol. 18 [6], 417-428, 1999.
- [27] PYLE, S.M. et al. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. Vol. 8, 183-190, 1997.
- [28] PATRA, D.; A. K. MISHRA. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. vol. 21 [12], 787-798, 2002.
- [29] VO DINH, T.; FETZER, J. & CAMPIGLIA, A. D. Monitoring And Characterization Of Polyaromatic Compounds In The Environment. *Talanta*. Vol. 47, 943-969, 1998.
- [30] PATRA, D. Applications and New Developments in Fluorescence Spectroscopic Techniques for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Spectroscopy Reviews*. Vol. 38 [2], 155–185, 2003.
- [31] PATRA, D. Challenges and progress in the analysis of polycyclic aromatic compounds. *Anal Bioanal Chem*. Vol. 379, 355–357, 2004.
- [32] ARIESE, F. Shpol'skii spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy - (bio)monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons and their metabolites. *Vrije Universiteit. Academisch Proefschrift*. p. 204, 1993.
- [33] MEIRA, M. et al. Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3d e análise das componentes principais. *Quim. Nova*. Vol. 34 [4], 621-624, 2011.
- [34] EIROA, A. A. et al. Critical Approach To Synchronous Spectrofluorimetry. II. *Trends In Analytical Chemistry*. Vol. 29 [8], 902-927, 2010.
- [35] CABANISS, S. E. Theory of Variable-Angle Synchronous Fluorescence Spectra. *AMI. Chem*. Vol. 63, 1323-1327, 1991.
- [36] SIKORSKA, E. Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers. *J. Inst. Brew*. Vol. 110 [4], 267-275, 2004.

- [37] PATRA, D.; A. K. MISHRA. Investigation on simultaneous analysis of multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in water samples: a simple synchronous fluorimetric method. *Talanta*. Vol. 55, 143–153, 2001.
- [38] BRUM, D.M.; CASSELA, R. J.; ANNIBAL, D. P. N. Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*. Vol. 74, 1392–1399, 2008.
- [39] BRUM, D.M.; ANNIBAL, D. P. N. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG, Brazil. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 165, 447-453, 2009.
- [40] IMAN – Instituto do Meio Ambiente de Dourados. Parque Arnulpho Fioravante (Memorial Descritivo). Informações pessoais obtidas de Vanessa Guardachoni. Dourados, 2012.
- [41] APVMA – Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. Disponível em < <http://www.apvma.gov.au> > visitado em 08 de janeiro de 2013.
- [42] INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Validação de métodos analíticos do laboratório de aerossóis, soluções Aquosas e tecnologias – LAQUATEC. Disponível em < <http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ7P2> > visitado em 13 de outubro de 2012.
- [43] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [44] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Revisão 02, 2007.
- [45] TUCKER, S.A. et al. Spectroscopic Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Effect of Solvent Polarity on the Fluorescence Emission Behavior of Select Fluoranthene, Fluorenochrysene, Indenochrysene, and Indenopyrene Derivatives. *Applied Spectroscopy*. Vol. 45 [10], 1699-1705, 1991.
- [46] D`AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do Coeficiente de Distribuição (Kd) de Benzo[a]Pireno em Solo Por Isotermas de Sorção. *Quim. Nova*. Vol. 29 [4], 657-661, 2006.
- [47] CAVALCANTE, R.M. et al. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. *Quim. Nova*. Vol. 30 [3], 560-564, 2007.

- [48] SANG, L.Z. et al. Simultaneous fluorimetric determination of the biodegradation processes of dissolved multi-component PAHs. *Talanta*. Vol. 78, 1339–1344, 2009.
- [49] CAI, Z. Q.; ZHUB, Y. X.; ZHANG, Y. Simultaneous determination of dissolved anthracene and pyrene in aqueous solution by synchronous fluorimetry. *Spectrochimica Acta*. Vol. 69, 130–133, 2008.
- [50] LIU, Y.; HASHI, Y.; LIN, J. Continuous-flow microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in water. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 585, 294–299, 2007.
- [51] OZCAN, S.; TOR, A.; AYDIN, M.E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 665, 193–199, 2010.
- [52] FEIZABADI, S. S.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N. Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 489, 21–31, 2003.
- [53] OLIFEROVA, L. et al. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 538, 35–40, 2005.
- [54] URBE, I.; RUANA, J. Application of solid-phase extraction discs with a glass fiber matrix to fast determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*. Vol. 778, 337–345, 1997.
- [55] CHEN, H. W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction and liquid chromatography. *The Japan Society for Analytical Chemistry. Analytical Sciences*. Vol. 20, 1383–1388, 2004.
- [56] DOONGA, R.; CHANGA, S. M.; SUN, Y.C. Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*. Vol. 879, 177–188, 2000.
- [57] NEGRÃO, M. R.; ALPENDURADA, M. F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction–highperformance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*. Vol. 823, 211–218, 1998.
- [58] HOU, L.; LEE, H. K. Application of static and dynamic liquid-phase microextraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A*. Vol. 976, 377–385, 2002.

- [59] PENA, M. T. et al. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1216, 6356–6364, 2009.
- [60] WHITCOMB, J. L.; CAMPIGLIA, D. A. Screening potential of solid-phase extraction and solid surface room temperature fluorimetry for polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Talanta*. Vol. 55, 509–518, 2001.
- [61] VALLVEY, L. F. C. et al. Determination of Pyrene and Benzo[a]pyrene Residues in Water by Derivative Synchronous Solid-phase Spectrofluorimetry. *Mikrochim Acta*. Vol. 112, 55-62, 1993.
- [62] EIROA, A.A. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a complex mixture by second-derivative constant-energy synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*. Vol. 51, 677–684, 2000.
- [63] HERNÁNDEZ, J. A.; ROMERO, J. M. F.; CASTRO, M. D. L. Flow injection screening and semiquantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by laser induced spectrofluorimetry—chemometrics. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 448, 61–69, 2001.
- [64] MILLER, J. S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 388, 27-34, 1999.
- [65] VALLVEY, L. F. C. et al. Close overlapping discrimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by synchronous scanning at variable-angle solid-phase spectrofluorimetry. *Analytical Chimica Acta*. Vol. 302, 193-200, 1995.
- [66] Na ZHOUA, N. et al. Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo[α]pyrene in drinking water and in solutions leached from disposable paper cups. *Luminescence*. Vol. 26, 35–43, 2011.
- [67] HE, L. F.; LIN, D. L.; LI, Y. Q. Micelle-sensitized constant-energy synchronous Fluorescence spectrometry for the simultaneous determination of pyrene Benzo[a]pyrene and Perylene. The Japan Society for Analytical Chemistry. *Analytical Sciences*. Vol. 21, 641-645, 2005.
- [68] KRUPADAM, R. J. et al. Fluorescence Spectrophotometer Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Samples Based on Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymer. *Environ. Sci. Technol*. Vol. 43, 2871–2877, 2009.
- [69] WHITCOMB, J. L.; BYSTOL, A. J.; CAMPIGLIA, D. A., Time-resolved laser-induced fluorimetry for screening polycyclic aromatic hydrocarbons on solid-phase extraction membranes. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 464, 261–272, 2002.

[70] ALGARRRA, M. et al. Direct Fluorometric Analysis of PAHs in Water and in Urine Following Liquid Solid Extraction. *Journal of Fluorescence*. Vol. 10, [4], 355-359, 2000.

[71] BASU, D.K.; SAXENA, J. Monitoring of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Water II. Extraction and Recovery of Six Representative Compounds with Polyurethane Foams. *American Chemical Society*. Vol. 12 [7], 791-794, 1978.

[72] GORYACHEVA, I.Y. et al. Preconcentration and fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on the acid-induced cloud-point extraction with sodium dodecylsulfate. *Anal Bioanal Chem*. Vol. 382, 1413–1418, 2005.