



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS



ROSEMEIRE APARECIDA NUNES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PIRENO E
BENZO[A]PIRENO EM AMOSTRAS DE ÁGUA COM
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA
DE FLUORESCÊNCIA SINCRONIZADA COM
DIFERENTES EXTRAÇÕES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

Dourados/MS

Abril - 2015



ROSEMEIRE APARECIDA NUNES OLIVEIRA



**DETERMINAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PIRENO E
BENZO[A]PIRENO EM AMOSTRAS DE ÁGUA COM
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ESPECTROSCOPIA
DE FLUORESCÊNCIA SINCRONIZADA COM
DIFERENTES EXTRAÇÕES**

ORIENTADOR: PROF. Dr. ERITON RODRIGO BOTERO

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Ciência Ambiental.

Dourados - MS

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

O482d	<p>Oliveira, Rosemeire Aparecida Nunes.</p> <p>Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pireno e benzo[a]pireno em amostras de água com aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada com diferentes extrações. / Rosimeire Aparecida Nunes Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2015.</p> <p>73f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. 2. Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada. 3. Monitoramento Ambiental. 4. Extração líquido-líquido. 5. Filtragem. I. Título.</p> <p>CDD – 544.6</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Determinação dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Pireno e Benzo(a)pireno em amostras de água com Aplicação de Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada com diferentes Extrações”**, de autoria de **Rosemeire Aparecida Nunes Oliveria**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Eriton Rodrigo Botero

Prof. Dr. Eriton Rodrigo Botero
Presidente da banca examinadora

Márcio da Silva Figueiredo

Prof. Dr. Márcio da Silva Figueiredo
Membro Examinador (UFGD)

Heberth Júliaño Vieira

Dr. Heberth Júliaño Vieira
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 25 de Março de 2015.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado inteiramente a DEUS, pois caso contrário nada seria possível e não faria sentido em minha vida se não fosse DEUS com seu imenso poder em me ajudar nos momentos difíceis o senhor estava ali pronto pra me ajudar.

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

Também dedico este trabalho a minha família em especial ao meu esposo Ademar Alves de Oliveira, as minhas filhas Glauce e Gabrielly, a minha neta Sophie e ao meu genro Luis Fernando. Essas pessoas foram quem me apoiaram, sem elas nada disso seria possível, pela compreensão e dedicação a nossa família em acreditar em nossos sonhos, obrigada por vocês fazerem parte desta importante etapa da minha vida.

Ao meu filho João Lucas Nunes Oliveira (in memoriam), é por você que estou na atividade acadêmica!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus que é AMOR, pois ele é o grande responsável e autor por todas as maravilhas que aconteceram, acontece e que acontecerão em minha vida. Glórias a Ti ó Pai Celeste!

Em especial ao meu querido esposo Ademar Alves de Oliveira, pelo amor, carinho, confiança e apoio a mim depositada. Nos momentos de estudos incansáveis você estava ao meu lado. Obrigada Amor Te Amo!

As minhas filhas Glauce e Gabrielly. A minha querida netinha Sophie. Ao meu genro Luís Fernando. Quero imensamente agradecer pela compreensão, paciência e todo apoio e incentivo durante esta jornada. Vocês são/é a melhor família que alguém pode ter!

A minha sogra Catarina e minha amiga/comadre Gildete, pelas vezes que me acompanharão até o córrego na realização das coletas.

Em especial ao Professor Dr. Eriton Rodrigo Botero, pela orientação, incentivo, apoio, conselhos, amizade e principalmente pela paciência nos momentos de orientação.

A minha querida afilhada Sandra Ribeiro, pelo incentivo, conselhos e ajuda na escrita do texto.

Aos meus amigos do grupo GOA, Flavio Michels (RUSSO), Carlos Fabiano Capato (BACTÉRIA), Danilo Figueiredo, Cícera Silva, Eliene, Poliana, Willian Falco, Deluana, Martins Alesandra Ramos (lê), Marileide Soares Silva e principalmente ao Jonatan Moreira Rodrigues. Obrigada amigos pelas ajudas diretas e indiretas que me deram na realização deste trabalho.

E finalmente, a FUNDECT pela bolsa de mestrado concedida (FUNDECT/CAPES nº 010/2013 – Mestrado em MS), pelo suporte financeiro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos HPAs.....	2
Tabela 2. Classificação dos HPAs quanto a sua carcinogenicidade, sendo a numeração indicativa do grupo de risco, partindo do grupo 1 o de mais alto risco.....	8
Tabela 3. Estrutura molecular e característica do HPA Pireno	9
Tabela 4. Estrutura molecular e característica do HPA Benzo(a)pireno	10
Tabela 5. Representação do ambiente de coletas e as suas respectivas coordenadas.....	26
Tabela 6. Condições meteorológicas nos respectivos dias Horário de coleta.	26
Tabela 7. Valores do comprimento de onda e intensidade relativa dos Pyr e BaP obtidos pela medida de EFS da amostra padrão.....	36
Tabela 8. Coeficientes de ajuste e índices de concordância das curvas analíticas do Pyr e do BaP.	37
Tabela 9. Valores obtidos da curva analítica para os HPAs pelo método ELL referente ao ponto 3.....	41
Tabela 10. Valores obtidos da curva analítica para os HPAs pelo método FIL referente ao ponto 3.....	42
Tabela 11. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA Pyr (C_{Pyr}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de ELL.....	44
Tabela 12. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA BaP (C_{BaP}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de ELL.	44
Tabela 13. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA Pyr (C_{Pyr}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de FIL.....	44
Tabela 14. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA BaP (C_{BaP}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de FIL	45
Tabela 15. Resultado do descarte da solução com suas respectivas quantidades de HPAs obtidos pelo método FIL e ELL do FIL.	50
Tabela 16. Valores obtidos a partir das médias das concentrações determinadas e o desvio padrão relativo.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da formação, distribuição e destino dos HPAs por meio da atmosfera. Adaptado em português. Dados obtidos da referência [8].	5
Figura 2. Esquema representativo da inserção de agentes causadores de câncer, através do DNA. Adaptado em português. Dados obtidos da referência [31].	7
Figura 3(a). Representação de uma onda no plano-polarizada propagando-se ao longo do eixo x. Figura 3 (b). Aspecto da vibração de um campo elétrico em uma dada frequência e sua configuração senoidal no espaço e tempo. Fonte: SKOO (2006).	11
Figura 4. Reprodução de uma transição eletrônica com absorção de energia. Fonte: OLIVEIRA, R. A. N.	11
Figura 5. Diagrama de níveis energéticos e as mudanças que ocorrem durante a absorção da radiação nas regiões (IR), (VIS) e (UV) Dados obtidos da referência [49].	13
Figura 6. Processo de absorção da radiação eletromagnética e fotoluminescência Fonte: [51].	14
Figura 7. Diagrama de Jablonski e representação das posições relativas a absorção e os espectros de fluorescência e fosforescência. Dados obtidos da referência [52]. Adaptado em português	17
Figura 8. Definição de deslocamento de Stokes. Dados obtidos da referência [52].	18
Figura 9. Localização do perímetro urbano do município de Dourados - MS. Dados obtidos da referência [57].	22
Figura 10. Percurso do Córrego Rego D'água e os respectivos pontos de coleta. (Imagem: Google Maps).	23
Figura 11. Ponto 01 - Nascente canalizada e percurso de sua vazante. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).	23
Figura 12. Ponto 02 - Formação do lago Parque Ambiental Rego D'água e parte interna do parque. (Imagens: OLIVEIRA, R. A, N.).	24
Figura 13. Ponto 03 – Junção de um braço do córrego com a água tratada da Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim e o cano de despejo do esgoto. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).	24
Figura 14. Ponto 04 – Córrego Rego D'água no interior da Vila Cachoeirinha, residências em torno do córrego. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).	25

Figura 15. Ponto 05 – Término do Córrego Rego D'água, encontro com o Córrego Água Boa. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).	25
Figura 16. Esquema que representa o funcionamento de um fluorímetro.	30
Figura 17. Espectro de fluorescência normalizado da amostra padrão (Mix de HPA) para um $\Delta \lambda = 40$ nm, com a identificação dos picos referentes ao Pyr com a excitação $\lambda_{M\acute{a}x.} = 334$ nm e para o BaP o $\lambda_{M\acute{a}x.} = 366$ nm. Utilizando-se o metanol de grau HPLC como solvente.	35
Figura 18. Curva analítica para determinação de Pyr. A linha vermelha representa o ajuste linear realizado (n=3).	36
Figura 19. Curva analítica para determinação de BaP. A linha vermelha representa o ajuste linear realizado (n=3).	37
Figura 20. Dependência da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão da amostra sem passar pelo tratamento analítico, em que (v/v) 50% da amostra e 50% de methanol grau analítico HPLC, obtendo-se a solução.	39
Figura 21. O espectro típico das medidas de fluorescência usando o método ELL para a obtenção das amostras pré-concentradas.	40
Figura 22. O espectro típico das medidas de fluorescência usando o processo FIL para a obtenção das amostras pré-concentradas.	42
Figura 23. Dependência da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda da amostragem sem está passar pelo tratamento analítico (comparação entre os métodos). Amostra do ponto 3.	44
Figura 24. Valores das concentrações em (ng.mL ⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de extração líquido-líquido em água do córrego obtendo-se o HPA Pyr.	46
Figura 25. Valores das concentrações em (ng.mL ⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de extração líquido-líquido em água do córrego obtendo-se o HPA BaP.	47
Figura 26. Valores da concentrações em (ng.mL ⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de filtragem em água do córrego obtendo-se o HPA Pyr.	48
Figura 27. Valores das concentrações em (ng.mL ⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de filtragem em água do córrego obtendo-se o HPA BaP.	49
Figura 28. Concentração dos HPAs Pyr e BaP após o processo de ELL do descarte da solução usada no processo de FIL	50

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos presentes na poluição ambiental. São conhecidos por alguns apresentar toxicidade, podendo apresentar efeitos pré-carcinogênicos e mutagênicos para os seres vivos. Na maioria dos casos, HPAs são detectados por técnicas cromatográficas, que envolve alto custo e complexidade. Contudo, o uso da técnica de Espectroscopia e Fluorescência Sincronizada (EFS), para identificar e quantificar a presença dos HPAs, já é uma realidade, embora ainda não muito bem estabelecida. Nesse trabalho utilizou-se a EFS para detectar e quantificar dois HPAs, Pireno(Pyr) e Benzo[a]pireno (BaP), nas água do Córrego Rego D'Água, na região central de Dourados/MS. Abordamos o desenvolvimento de duas técnicas de preparo de amostras como, extração líquido-líquido e filtração, sensíveis e seletivas, para quantificar tais compostos em cinco pontos de coleta. As diferenças entre os resultados obtidos usando esses diferentes procedimentos são os objetivos desse trabalho. Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofotômetro CARY ECLIPSE (Varian). Para a quantificação dos HPAs foram obtidas curvas analíticas usando amostras padrão. Independente do preparo das amostras empregado, foi possível identificar a presença dos dois HPAs em todos os pontos de coleta. O método de filtração possui uma maior praticidade decorrente do manuseio experimental e pelo motivo do seu baixo custo econômico; já o método de extração líquido-líquido, porém, apresenta um alto custo, pela utilização de uma grande quantidade de solvente e também por sua realização exigir um tempo maior de duração do processo. Apesar de o primeiro método ser considerado rústico, apresentou ótimos resultados na quantificação em comparação com o segundo, no que se refere às concentrações quantitativas. Portanto, é considerado um método eficaz para esse tipo de análise.

Palavras-chaves: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos; Espectroscopia e Fluorescência Sincronizada; Monitoramento Ambiental; Extração Líquido-líquido; Filtração.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds present in environmental pollution. Are known to present some toxicity and may have pre-carcinogenic and mutagenic effects to living things. In most cases, PAHs are detected by chromatographic techniques, which involve high cost and complexity. However, the use of Synchronous fluorescence spectra (SFS), to identify and quantify the presence of PAHs, is already a reality, although, not well established yet. In this work we used the EFS to detect and quantify two PAHs, Pyrene (Pyr) and Benzo[a]pyrene (BaP), in the waters of RegoD'água stream, in central Dourados/MS. We approached the development of two analytical procedures, liquid-liquid extraction and filtering, sensitive and selective to quantify such compounds in five sampling points. The differences between the results obtained using these different procedures are the goals of this research. Fluorescence spectra were obtained on a CARY ECLIPSE spectrophotometer (Varian). In order to quantify PAHs, analytical curves were obtained using standard samples. Regardless of the employed analytical procedure, it was possible to identify the presence of the two PAHs in all collection points. The filtering method was more practical due to the experimental handling, besides its low economic cost; in contrast with the liquid-liquid extraction method, which is costly and its implementation requires a longer duration of the process. Even though the first method is rustic, it showed excellent results in comparison with the second, regarding the quantitative concentrations. Therefore, it is considered an effective method for this type of analysis.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Synchronous Fluorescence Spectra; Environmental Monitoring; Liquid-liquid Extraction; Filtering.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1- Origem e Aspectos Históricos dos HPAs	5
2.2 Relação dos HPAs com a saúde humana.....	6
2.3 As propriedades físico-químicas dos HPA.....	8
2.4 O Pireno e o Benzo[a]pireno	9
2.5 Metodologias analíticas aplicados na determinação de HPAs	10
2.6 Os métodos espectroscópicos de interação da radiação com a matéria	10
2.7 Espectroscopia de Fluorescência.....	15
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	21
4. 1 Reagentes.....	21
4. 2 Amostras.....	21
4. 3 Coleta e armazenamento das amostras	26
4. 4 Métodos analíticos de tratamento das amostras	27
4. 5 Método procedimento geral (PG).....	27
4. 6 Método de extração líquido-líquido (ELL)	27
4. 7 Método de filtração (FIL)	28
4. 8 A técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS).....	29
4. 9 Determinação da curva analítica para a EFS	30

4. 10 Faixa de linearidade.....	31
4. 11 Repetitividade.....	32
4. 12 Limite de detecção e quantificação	33
4. 13 Precisão.....	33
4. 14 Reprodutibilidade	34
4. 15 Teste –t	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1 Obtenção da curva analítica com a amostra padrão	35
5.2 Análises das amostras.....	38
5.3 Análise da amostra pelo procedimento geral (PG).....	38
5.4 Análise usando os métodos de pré-concentração	40
5.5 Análise estatística dos métodos empregados.....	51
6 CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

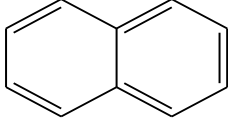
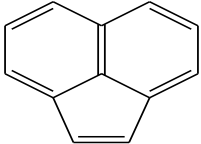
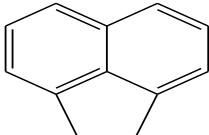
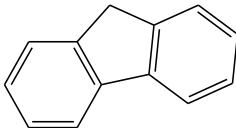
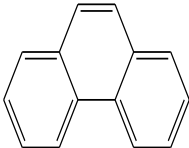
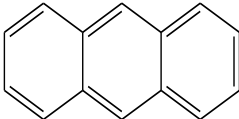
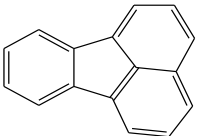
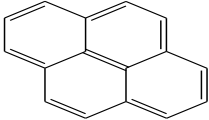
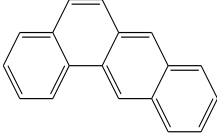
Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos, formados por dois ou mais anéis aromáticos conjugados, constituídos por átomos de carbono e hidrogênio [1], e pertencem a um grupo de mais 100 substâncias químicas diferentes. São inseridos no ambiente por várias formas como combustão incompleta do carvão, petróleo e madeira [2]. Alguns desses HPAs, por possuírem propriedades tóxicas, são motivos de preocupação para a saúde e o bem-estar dos seres vivos [2]. Eles afetam negativamente os mamíferos (incluindo os humanos), aves, peixes, anfíbios, invertebrados e plantas em geral, principalmente às que pertencem ao meio aquático [3].

A Tabela 1 traz especificadas as estruturas moleculares dos dezesseis HPAs que exigem uma maior atenção do meio científico devido a sua alta toxicidade (levando em consideração que alguns dos HPAs descritos nesta tabela geram uma grande possibilidade de incidência de tumores cancerígenos dentre outras doenças). Ainda está descrito na Tabela 1 a solubilidade (S) e a pressão de vapor (PV) nas fases solúveis e nas particuladas desses elementos. Em especial, o HPA benzo[g,h,i]perileno destaca-se por ser altamente insolúvel, já que sua solubilidade é de $2,6 \cdot 10^{-4}$ mg/L. Já o HPA naftaleno tem o valor da solubilidade em torno de 31mg/L, o que já pode ser considerado bastante solúvel. No que se trata da pressão de vapor, os valores circulam entre os compostos altamente voláteis, como o naftaleno e o comparativamente pouco volátil, como o dibenzo[a,h]antraceno [4-5]. Na Tabela 1 destaca-se também que todos os HPAs descritos constam na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) [4], órgão que visa o controle desses poluidores ambientais. Outra característica importante desses compostos altamente perigosos para a saúde humana e poluentes na atmosfera é que apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos ligados, e peso molecular (PM) variando entre 128 e 278 g/mol, também descrito na Tabela 1.

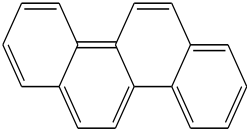
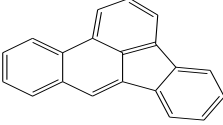
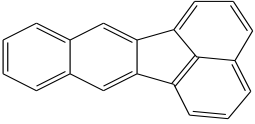
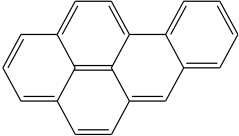
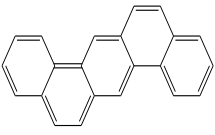
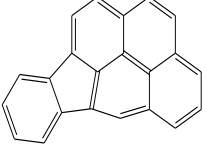
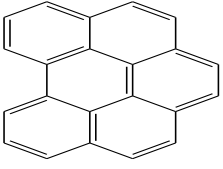
Ainda em relação ao peso molecular, observa-se na Tabela 1, que é inversamente proporcional à solubilidade dos HPAs. Em analogia às características lipofílicas dos hidrocarbonetos, seus constituintes são dispostos como moderados e altamente lipossolúveis, pois apresentam o coeficiente de partição (octanol/água) (Log.) entre 3,37

Log K_{oa} , para o naftaleno, e 6,75 Log K_{oa} , para o dibenzo[a,h]antraceno[3, 5].

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos HPAs.

<i>HPAs</i>	<i>Siglas</i>	<i>Estrutura Molecular</i>	<i>PM(g.mol⁻¹)</i>	<i>S(mg/L)</i>	<i>PV(Pa)</i>	<i>LogK_{oa}</i>
Naftaleno	Na		128	31	10,4	3,37
Acenaftileno	Acy		150	16,1	9.10 ⁻¹	4,00
Acenafteno	Ace		154	3,8	3.10 ⁻¹	3,92
Fluoreno	Fl		166	1,9	9.10 ⁻²	4,18
Fenantreno	Phe		178	1,1	2.10 ⁻²	4,57
Antraceno	Ant		178	4,5.10 ⁻²	1.10 ⁻³	4,54
Fluoranteno	Flt		202	2,6.10 ⁻¹	1,2.10 ⁻³	5,22
Pireno	Pyr		202	1,3.10 ⁻¹	6.10 ⁻⁴	5,18
Benzo[a]antraceno	B(a)A		228	11.10 ⁻²	2,8.10 ⁻⁵	5,91

Continuação da Tabela 1...

<i>HPAs</i>	<i>Siglas</i>	<i>Estrutura Molecular</i>	<i>PM(g.mol⁻¹)</i>	<i>S(mg/L)</i>	<i>PV(Pa)</i>	<i>LogK_{oa}</i>
Criseno	Chy		228	Nd	5,7.10 ⁻⁷	5,86
Benzo[b]fluoranteno	B(k)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

Nd. não determinado. Dados obtidos da referência [5].

Os HPAs tornam-se móveis nos ambientes atmosféricos, solos e principalmente em aquáticos, diante da facilidade de se deslocar [6]. Sendo assim, o contato desses compostos com os seres humanos pode ocorrer por diversas vias, como: a inalação de ar, a ingestão de águas, contato com solos, poeiras e alimentos contaminados [6-9].

A presença dos HPAs no meio ambiente é um fator que serve como indicador de poluição ambiental [6]. Sendo assim, a pesquisa voltada para a identificação dos HPAs e

suas origens vem crescendo, dando destaque às técnicas cromatográficas (gasosa e líquida) [7], e a espectroscópicas [4, 9-14], de caracterização. Embora tendo as técnicas discriminadas na literatura científica, ainda não se encontra, com clareza, métodos analíticos e protocolos de medidas que visam tais identificações.

Sendo assim, o objetivo deste estudo é utilizar um método analítico considerado o mais sensível, ágil e barato para a identificação e quantificação simultânea dos HPAs, utilizando a técnica de espectroscopia e fluorescência sincronizada (EFS) de acordo com as referências [12-13]. Serão também aplicados neste estudo metodologias de extração de solventes em água, que serão comparadas entre si. Para isso foram utilizadas amostras de água coletadas em vários pontos do córrego Rego D'Água no município de Dourados/MS.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Origem e Aspectos Históricos dos HPAs

Os HPAs são, por definição, compostos conjugados formados por hidrogênio e carbono. Sua estrutura abrange pelo menos dois anéis aromáticos condensados, como foi apresentado na Tabela 1. As configurações desses anéis denotam suas características [5]. A formação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos sobrevêm decorrente da combustão incompleta de materiais orgânicos inflamáveis como, combustíveis fósseis e outros materiais orgânicos presentes no ambiente, advindos de:

a) **fontes naturais** - queimadas florestais, originadas por causas naturais, como as atividades vulcânicas [15] e,

b) **antropogênicas** - queima do petróleo, carvão e gás natural para fins industriais e domésticos [8] e [16].

Sua origem ocorre de acordo com suas condições reacionais, como por exemplo, o tipo de biomassa presente, quantidade de oxigênio, pressão e, sobre tudo pelo calor [17]; incidindo também da decomposição das moléculas orgânicas e recombinação subsequente devido a altas temperaturas, ou ainda por longos períodos em baixa temperatura [17-20].

O esquema representado pela Figura 1 mostra como os HPAs podem ser formados, divididos e inseridos no ambiente [8].

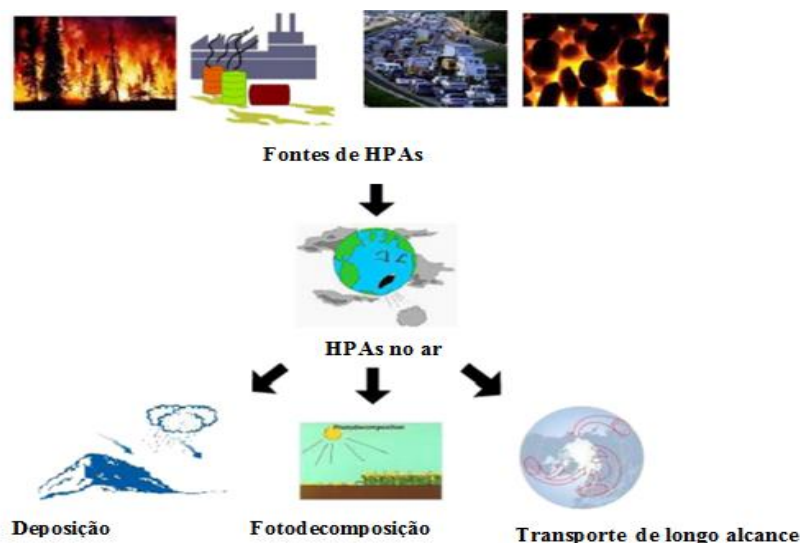


Figura 1. Esquema representativo da formação, distribuição e destino dos HPAs por meio da atmosfera. Adaptado em português. Dados obtidos da referência [8].

Por várias décadas os HPAs têm se tornado objeto de estudo, partindo da identificação dos mesmos como fonte cancerígena. A procedência de tais indagações decorre originalmente da sua relação entre o contato dos limpadores de chaminés com a fuligem e o surgimento de câncer escrotal, observado pelo cirurgião britânico Sir Percival Pott em 1775 [21-23].

Mas somente a partir de 1915, a associação do câncer e o contato com substâncias escuras começam ser investigados, e isto, fez o meio científico voltar a atenção para esses compostos orgânicos [23]. Em 1918, M. Tsutsui descreve a indução de tumores benignos e malignos na pele de ratos, por meio de exposição prolongada a certas misturas escuras que certamente continham HPAs [23-24].

Só em 1933, uma substância betuminosa, consistente, escura e de forte odor, foi obtida da destilação de certas matérias orgânicas, principalmente de carvão. Neste tipo de material que foi encontrado e identificado o HPA Benzo[a]pireno, classificando esse composto como tóxico e causador dos efeitos danosos a saúde [25-26].

Na atualidade, estudos sobre a identificação e/ou quantificação destes compostos vêm se destacando em alimentos e algumas bebidas, bem como nas possíveis consequências da inserção de HPAs no cozimento ou processamento destes alimentos, como por exemplo, nos embutidos [27-28].

Em estudo realizado no ano de 2006, os HPAs também foram encontrados no leite e na eliminação da urina de cabras [29-30]. Estando também presentes no leite materno, de acordo com estudo realizado em mulheres italianas fumantes ativas e passivas [30].

Dada à severidade dos danos que os HPAs podem causar, surgem preocupações em relação aos impactos da contaminação aquática por estes compostos, evidenciando a necessidade de monitoramento ambiental, visto que essa é uma das principais fontes de contato de seres humanos com tais poluentes [28-30].

2.2 Relação dos HPAs com a saúde humana

Os HPAs são considerados, por programas de biomonitoramento, como sendo carcinogênicos e mutagênicos [2]. Os humanos estão continuamente expostos a poluidores, contaminantes e produtos químicos que podem ser encontrados em alimentos, ar ou água, que devido ao contato prolongado pode contribuir significativamente para a incidência de

cânceres [31]. A Figura 2 representa o processo de agentes contaminantes, a sua formação, como ele chega ao DNA e suas consequências.

Nesta figura, podemos observar a formação de HPAs através do cozimento alimentar, por meio da exposição da matéria orgânica. O organismo ingere e o HPA passa pelo metabolismo e enzimas sem sofrer alterações estruturais, como são lipofílicos e também por causa da estabilidade das moléculas não sofrem degradação. Assim, atravessam as membranas celulares, podendo reagir com o DNA e consequentemente mudar a sequência do DNA, adquirindo assim, o tumor cancerígeno [31].

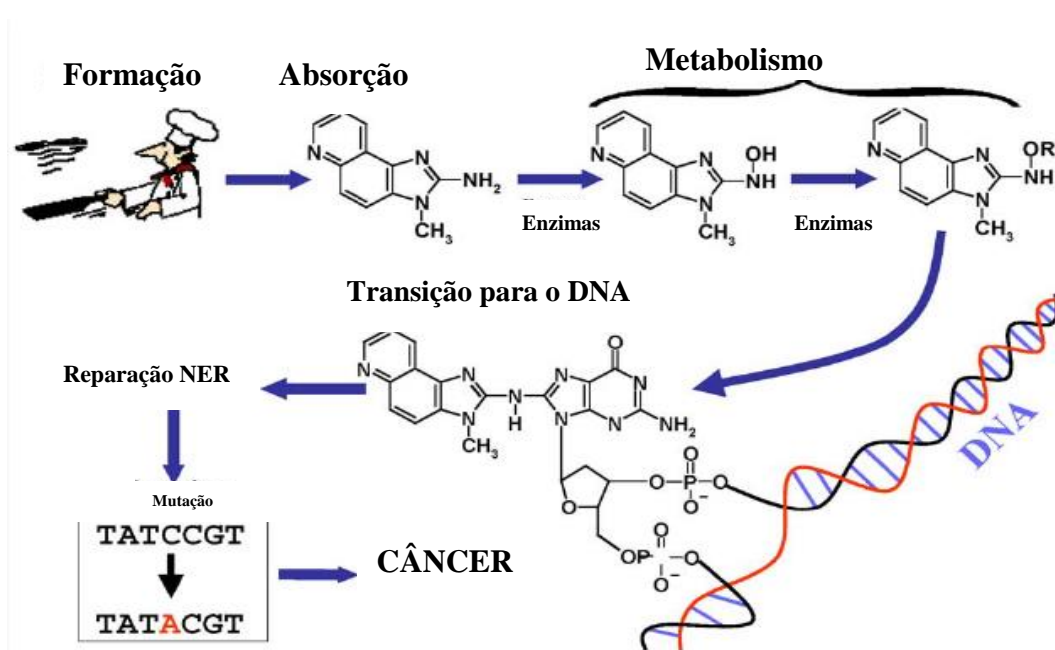


Figura 2. Esquema representativo da inserção de agentes causadores de câncer, através do DNA. Adaptado em português. Dados obtidos da referência [31].

Na referência [32], encontra-se descrito que os HPAs como benzo[a]pireno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno etc., quando presentes em resíduo são suficientes para classificá-los como resíduos perigosos [33]. A afinidade entre o mecanismo de carcinogênese e a estrutura dos HPAs são apresentados pelo o grupo da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) (IARC) [33], que está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos HPAs quanto a sua carcinogenicidade, sendo a numeração indicativa do grupo de risco, partindo do grupo 1 o de mais alto risco.

HPAs	GRUPO SEGUNDO IARC
BENZO(A)PIRENO	1
CICLOPENTA(C,D)PIRENO	2 ^a
DIBENZO(A,H)ANTRACENO	2 ^a
DIBENZO(A,L)PIRENO	2 ^a
BENZO(A)ANTRACENO	2b
BENZO(B)FLUORATENO	2b
BENZO(J)FLUORATENO	2b
BENZO(K)FLUORATENO	2b
CRISENO	2b
DIBENZO(A,H)PIRENO	2b
DIBENZO(A,I)PIRENO	2b
INDENO(1,2,3-C,D)PIRENO	2b
5-METIL-CRISENO	2b
BENZO(J)ACENTRILENO	2b
BENZO(C)FENATRENO	2b

Fonte: IARC – *International Agency for Research on Cancer* [33].

2.3 As propriedades físico-químicas dos HPA

As propriedades físico-químicas como, a pressão de vapor, solubilidade, peso molecular e o coeficiente de partição, são os elementos que caracterizam os HPAs. Nesse caso, são determinadas pela quantidade de anéis aromáticos, condensados ou fundidos, que estão interligados pelo menos em duas estruturas formadas por átomos de carbono e hidrogênio, conhecida como duplas conjugadas [9]. De acordo com a quantidade de anéis aromáticos, esse composto pode ser denominado de baixo ou alto peso molecular. Para ser considerado de baixo peso é necessário que contenha no máximo quatro anéis aromáticos. Nesse caso, apresentam maior volatibilidade e são sujeitos a transformação ou remoção por degradação fotoquímica ao entrar em contato com a luz [20]. Apesar de serem

considerados menos tóxicos existe a tendência a reagirem com outros poluentes, o que os tornam de alta toxicidade [9, 27].

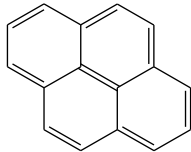
É considerado de alto peso molecular os HPAs que contêm acima de quatro anéis aromáticos e os que estão associados, principalmente, com partículas no meio [34]. Neste caso, é possível observar a diminuição da sua solubilidade, especialmente na água, apresentando grande resistência e menor degradação no contato ao ambiente. Assim, tornam-se inalteráveis em especial em sedimentos anaeróbicos com tendência em acumular-se em concentrações elevadas [9, 22, 34-35].

2.4 O Pireno e o Benzo[a]pireno

Dentre os dezesseis contaminantes prioritários descrito na lista da USEPA, e mostrado na Tabela 1, destacam-se o pireno e o benzo[a]pireno, por apresentarem, segundo alguns autores [9, 36-38] uma toxicidade elevada e uma grande presença no meio ambiente [38-39].

O pireno (Pyr) contém quatro anéis aromáticos conjugados e sua massa molecular é de 202 g.mol^{-1} , considerado, portanto, de baixo peso molecular. Sua solubilidade é de $1,3 \cdot 10^{-1} \text{ mg.L}^{-1}$ e sua fórmula química é $(\text{C}_{16}\text{H}_{10})$. Este composto é um poliaromático apolar e consequentemente hidrofílico, interagindo-se com a fase aquosa. A descrição deste composto esta representada na Tabela 3 [5].

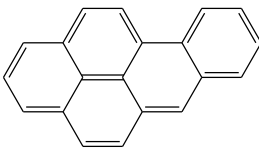
Tabela 3. Estrutura molecular e característica do HPA Pireno

Fórmula estrutural	
Abreviatura	Pyr
Fórmula molecular	$(\text{C}_{16}\text{H}_{10})$
λ_{max} - 334 nm ^(a)	Ref. [5]
Classe química	Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos
Número de anéis aromáticos conjugados	– (4)

(a) Comprimento de onda onde ocorre o máximo de emissão deste HPA em um $\Delta\lambda=40 \text{ nm}$

O benzo[a]pireno (BaP), possui massa molecular de 252 g.mol^{-1} , baixa solubilidade em água $3,8.10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$, desta forma, é praticamente insolúvel. Sua fórmula química é $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$. Por apresentar estas características é considerado menos volátil. No meio ambiente este composto é persistente e, quando inserido na água, adsorve densamente nos fragmentos ou na matéria orgânica [40- 41], sendo, portanto, um dos compostos mais analisados e conhecido. Destaca-se também sua presença em alimentos embutidos, já que sua permanência também é persistente em ambientes com mais alta temperatura. Suas principais características estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Estrutura molecular e característica do HPA Benzo[a]pireno

Fórmula estrutural	
Abreviatura	BaP
Fórmula molecular	$(\text{C}_{20}\text{H}_{12})$
λ_{max} - 366 nm ^(b)	Ref. [5]
Classe química	Hidrocarbonetos Policíclico Aromáticos
Número de anéis aromáticos conjugados	- (5)

(b) Comprimento de onda onde ocorre o máximo de emissão deste HPA em um $\Delta\lambda=40 \text{ nm}$

Devido a essas peculiaridades desses HPAs, eles serão o foco de estudo nesse trabalho, não que os outros quatorze HPAs descritos na Tabela 1 não tenham a devida importância.

2.5 Metodologias analíticas aplicados na determinação de HPAs

De acordo com as referências [7, 9, 12, 41, 42], os métodos analíticos empregados na determinação dos HPAs em matrizes líquidas, como pretendemos neste trabalho são na sua maioria baseados em técnicas de cromatografia (líquidas e gasosas). Porém, tais técnicas apresentam elevados custos e tempos de preparação se comparadas a outras técnicas, por exemplo, as que envolvem métodos óticos [38, 43].

Neste trabalho, usaremos a técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS) para tais análises (descrita com mais detalhes no item 4.4). Mesmo empregando uma técnica com relativo baixo custo e facilidade de preparação de amostra, alguns protocolos de pré-concentração, ou separação, dos analitos devem ser empregados.

O método de extração consiste em separar um ou vários componentes de interesse de uma matriz (amostra). Esta técnica torna-se útil, pois, as amostras ficam livres de prováveis constituintes que possam interferir nas medidas e caracterização.

O método que frequentemente é utilizado em extrações de matrizes líquidas é a extração líquido-líquido (ELL), como proposto pela US-EPA [43] ou *Standard Methods* [44]. Neste método, separa-se um elemento ou elementos específicos de uma determinada mistura, fundamentado em suas diferentes solubilidades [45]. Esta metodologia é normalmente usada após uma reação química, em que faz uma transferência de solutos de uma fase líquida para um solvente líquido [46]. Diante deste contexto, o método de ELL, pode ser utilizado para a extração de diversos solventes, para comparação e identificação de compostos orgânicos, ou outros analitos de interesse [47].

Outro método interessante, o qual envolve um baixo custo de preparação é conhecido como método de filtragem. Este método é utilizado para separar um sólido de líquido ou de outro líquido que esteja em suspensão. A passagem do líquido ou fluido, acontece por meio permeável que possui uma porosidade adequada e que seja capaz de reter as partículas sólidas, em que essas serão na sequência analisadas [48].

2.6 Métodos espectroscópicos de interação da radiação com a matéria

Métodos baseados em espectroscopia são largamente aplicados em química analítica. Tais medidas são fundamentadas nas interações da radiação eletromagnética com a matéria. Através de tais interações das radiações com a matéria pode-se obter dados valiosos sobre a estrutura e quantidade de átomos e/ou moléculas [49].

A radiação eletromagnética é caracterizada por campos magnéticos e elétricos temporariamente e espacialmente variáveis e perpendiculares entre si, como visto na Figura 3(a). A propagação de uma onda eletromagnética não necessita de um meio físico como no caso de ondas mecânicas. No vácuo, a velocidade da onda eletromagnética é bem determinada e possui valor aproximado de $3,0 \times 10^8$ m/s. Além disso, a radiação

eletromagnética conta com algumas propriedades como: comprimento de onda (λ), frequência (ν) e amplitude (A), como representado na Figura 3(b).

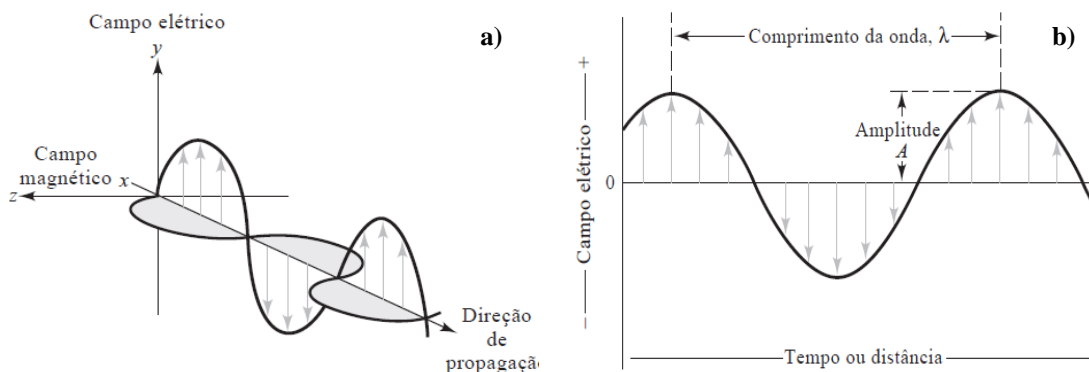


Figura 3(a). Representação de uma onda no plano-polarizada propagando-se ao longo do eixo x. **Figura 3(b).** Aspecto da vibração de um campo elétrico em uma dada frequência e sua configuração senoidal no espaço e tempo. Dados obtidos da referência [49]

A radiação eletromagnética é comumente representada pelo espectro eletromagnético que abrange radiações nas regiões desde as ondas de rádio, com comprimentos da ordem de centenas de metros até os raios gamas com comprimento de onda na escala do núcleo atômico passando por toda região do espectro visível.

Sob o ponto de vista corpuscular podemos tratar a radiação eletromagnética como partículas chamada de fótons. O fóton é a partícula elementar mediadora da força eletromagnética, denominada por Einstein como fótons de energia radiante, que se encontra quantizada em pacotes de energia [50].

Quando a radiação eletromagnética atinge um elétron de um átomo qualquer, no estado fundamental, a interação do fóton, ou radiação eletromagnética, pode promover uma transferência de energia correspondente exatamente a uma diferença de energia entre dois estados da molécula (o fundamental e um outro chamado de excitado). Nesse caso, há o que chamamos de promoção de excitação para um estado superior, como é mostrado na Figura 4. Vale ressaltar que a interação da radiação com os elétrons da molécula nem sempre resulta nesse tipo de transferência de energia. Outras formas, como a transição vibracional e rotacional podem existir.

A influência mútua da radiação eletromagnética com a matéria apresenta um comportamento individualizado para cada tipo de substância molecular observada, onde a amostra em estudo é estimulada por meio de uma oscilação em fase dos campos elétricos e

magnéticos, que por sua vez apresenta disparidade em seu estado de excitação. Observa-se, também que após o contato de um analito com a radiação eletromagnética haverá algum tipo de alteração na espécie de interesse [49].

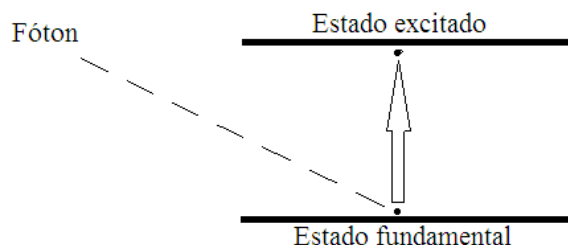


Figura 4. Reprodução de uma transição eletrônica com absorção de energia. Fonte: OLIVEIRA, R. A. N.

Uma espécie poliatômica ao absorver radiação eletromagnética ocorre mudanças dos níveis de energia, como podemos observar na Figura 5. Nesta figura a energia E_0 , representa o estado fundamental, e E_1 e E_2 pertencem o estado eletrônico excitado de uma molécula. Cada tipo de radiação, aqui representada por Infra-vermelho (IR), visível (VIS) e ultra-violeta (UV), promovem essa alteração do estado de energia de uma maneira distinta, de acordo com a energia da radiação [49].

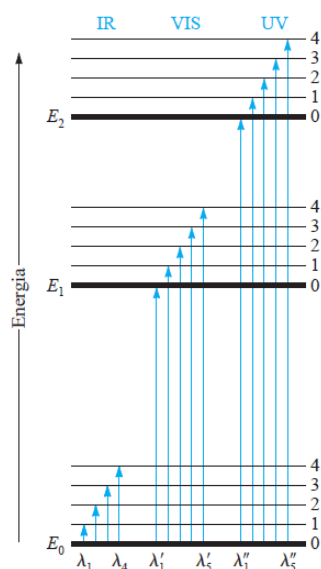


Figura 5. Diagrama de níveis energéticos e as mudanças que ocorrem durante a absorção da radiação nas regiões (IR), (VIS) e (UV). Dados obtidos da referência [49].

As energias presentes nos estados vibracionais quando associadas em cada estado eletrônico da molécula, tem sua determinação por meio das linhas horizontais, que são indicadas nomeadamente por 1, 2, 3 e 4, onde o nível de menor vibração é indicado por 0, como é visto na Figura 5. Já o estado rotacional é associado ao movimento que a molécula realiza ao redor do seu centro de gravidade. Os estados rotacionais são superpostos a cada condição vibracional.

Assim, a energia total E associada com uma molécula é dada por:

$$E = E_{\text{eletrônica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde:

$E_{\text{eletrônica}}$ é a energia associada com os elétrons nos vários orbitais externos da molécula; $E_{\text{vibracional}}$ é a energia da molécula devido às vibrações interatômicas; $E_{\text{rotacional}}$ é a energia associada com a rotação da molécula em torno do seu centro de gravidade.

Alguns elementos, quando são expostos à radiação eletromagnética, seus elétrons passam para o estado de excitação, contudo durante o processo de relaxamento liberam parte da energia na forma de fótons. Nesse caso são conhecidos como emissores da fotoluminescente [49]. O mecanismo de produção da fotoluminescência é representado na Figura 6.

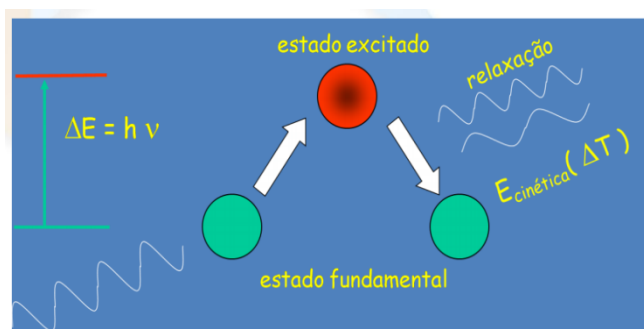


Figura 6. Processo de absorção da radiação eletromagnética e fotoluminescência. Dados obtidos da referência [51].

Como é perceptível pela Figura 6, para que ocorra a absorção do fóton excitador deve-se considerar um valor de energia apropriada representada pela Equação 2:

$$h\nu = \Delta E, \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

h = constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s)

$h\nu$ = energia do fóton;

ΔE = é diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado.

Ainda, a fluorescência é caracterizada por um tempo de emissão do elétron excitado muito curto, da ordem de 10^{-8} s

A interação da radiação com a matéria também pode ocorrer de maneiras mais diretas, como é o caso da absorção, espalhamento e transmissão.

A absorção das radiações ocorre em frequências características para cada espécie molecular. Esta absorção é aplicada pela lei de Beer-Lambert, mais conhecida como lei de Berr. Tal lei, mostra quantitativamente como a energia de um feixe de radiação reduz por área unitária ao atravessar uma amostra. Esse processo depende do tipo e da concentração das moléculas absorventes, além da distância do caminho por onde ocorre a absorção [49].

Desta forma, a lei de Beer estabelece que absorbância de uma substância em solução é diretamente proporcional a sua concentração (c , α) e a espessura (l). Nesse fenômeno o resultado da redução da intensidade de luz é representado por uma equação que envolve a razão entre a intensidade de incidência (I_0) e a intensidade transmitida pelo material (I_1). Essa razão é comumente expressa por porcentagem de transmitância do material, de acordo com a Equação 3:

$$\% T = I_1 / I_0 \quad (\text{Equação 3})$$

A transmitância e a absorbância são ajustadas logaritmicamente, de tal forma que ao passo que a absorbância de uma solução aumenta, a transmitância diminui, que é expressa pela equação 4:

$$A = \log I_0 / I_1 \quad (\text{Equação 4})$$

Assim, podemos definir o processo de absorção para determinar um analito em uma determinada amostra [49].

No espalhamento da radiação, a energia que incide em uma direção pode ser espalhada ou desviada para outras direções, produzindo-se radiação difusa, sendo que

algumas vezes o comprimento de onda da radiação espalhada é diferente do comprimento de onda decorrente do elemento dispersante [49].

2.7 Espectroscopia de Fluorescência

Na técnica de espectroscopia de fluorescência utiliza-se como fonte de excitação radiações eletromagnéticas que correspondem às regiões do espectro eletromagnético entre ultravioleta próximo (UV), o visível (VIS) e o infra-vermelho (IR), como visto na Figura 5 e que na região UV-Vis os espectros acontecem nos comprimentos de onda que vão de 180 nm a 780 nm.

Diante deste contexto, os métodos espectroscópicos de fluorescência são fundamentados na medida e interpretação da quantidade de radiação produzida, absorvida ou emitida pelas moléculas, íons ou espécies atômicas de interesse, também conhecidas como fluoróforos [52].

Quando os fluoróforos são excitados, eles são distinguidos por meio das bandas de radiação eletromagnética de absorção e emissão. Uma banda pode ser descrita como uma faixa de comprimento de onda, onde estes níveis vibracionais são permitidos pela molécula.

A espectroscopia de fluorescência é amplamente empregada na indústria de petróleo para análises e classificação de diversas amostras. A literatura apresenta uma série de apontamentos sobre as vantagens e desvantagens inerentes à técnica [53-54]. Também é aplicada em análises clínica, agricultura, engenharia, ciências forenses, biologia e química entre outros [49].

Como já mencionado, o processo de fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, onde este elétron se desloca do estado inicial e vai para um estado estimulado; este elétron ao retornar ao estado de início é acompanhado pela liberação de energia em acesso por meio da emissão de radiação. O processo total desta ação é muito curto, ou seja, acontece em milionésimo de segundos, 10^{-9} s para moléculas diatômicas. São moléculas formadas por dois ou mais átomos [52].

Este fenômeno é demonstrado graficamente pelo diagrama de Jablonski Figura 7, como um complemento da Figura 5.

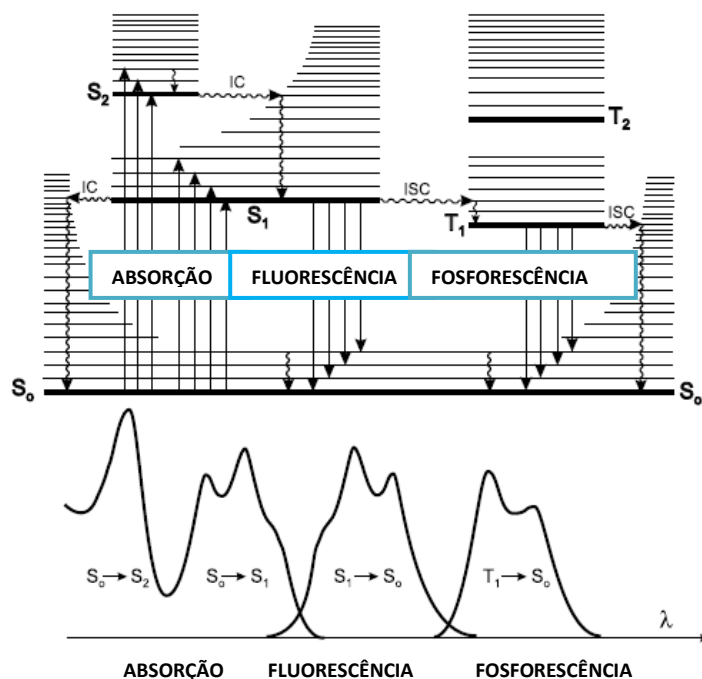


Figura 7. Diagrama de Jablonski e representação das posições relativas a absorção e os espectros de fluorescência e fosforescência. Dados obtidos da referência [52]. Adaptado em português.

É importante ressaltar que o diagrama de Jablonski é uma ferramenta importante para descrever os processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão da luz. Pois, o estado estimulado de uma molécula, originado pela absorção de luz, é um estado energeticamente maior que o respectivo estado fundamental. A dispersão do excesso de energia pode acontecer por meio de processos não radiativos ou processos radiativos, onde no primeiro caso acontece pela dissipação ocorrida pela perda de calor e no segundo evento acontece pela emissão de luz, como já descrito.

A conversão interna (IC) de energia é uma transição não radiativa é intrínseca entre um estado excitado e um estado de menor energia de mesma propriedade. A diferença de energia $S_2 - S_1$ nesses níveis vibracionais se sobrepõe entre os dois estados. Mas, as reações fotoquímicas acontecem a partir de S_1 . É perceptível que na conversão interna a relação entre $S_1 \rightarrow S_0$ é mais lenta, aqui acontece à fluorescência, sua velocidade entre o tripleto é da mesma ordem de grandeza da transição singleto. O tempo de 10^{-13} s a 10^{-11} é o período que acontece a conversão interna, esse tempo pode ser menor ainda e o tempo de vida da fluorescência é da ordem de 10^{-9} s [52].

No cruzamento intersistemas (ISC) acontece o acoplamento spin decorrente da existência de uma pequena diferença energética entre os estados singleto e tripleto, que se chama acoplamento vibracional como, por exemplo, moléculas que estão no estado S_1 é

submetida à conversão de spin para o primeiro estado de tripleto T_1 . Então o cruzamento intersistema reverso de $T_1 \rightarrow S_1$, podem acontecer quando a diferença de energia entre os estados T_1 e S_1 for pequena e quando o tempo de vida T_1 for maior suficiente para esse evento acontecer. Esse processo gera a fluorescência atrasada, nesta ação o espectro de fluorescência é comum, entretanto o tempo de vida de decaimento de fluorescência é maior, isto acontece pela razão da estabilidade da molécula estar no estado tripleto T_1 , este evento acontece antes da molécula emitir no S_1 [52].

Nas soluções concentradas, o choque entre duas moléculas que estão no estado T_1 poderá proporcionar energia suficiente, em que permitirá que uma delas retorne ao estado S_1 . Esse processo é nomeado de aniquilação tripleto-tripletto. Assim, pelo motivo da molécula ser excitada e atingir o estado T_1 , esta poderá absorver fótons em outros comprimentos de onda, visto que esta transição é permitida.

Portanto, a fluorescência advém das energias menores ou por comprimentos de ondas maiores. Este fenômeno foi observado por G. G. Stokes, então o deslocamento acontece nos comprimentos de ondas maiores do que o comprimento de onda empregada na excitação da fluorescência, essa condução é conhecido como deslocamento de Stokes [52]. Um exemplo desse deslocamento é visualizado pela Figura 6, que difere os comprimentos de onda da radiação incidente, emitida ou espalhada.

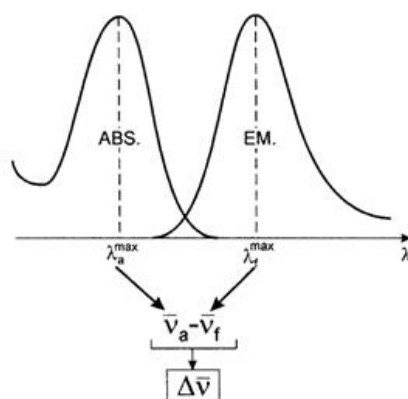


Figura 8. Definição de deslocamento de Stokes. Dados obtidos da referência [52].

Esta figura trás informações sobre o desvio de Stokes sendo a diferença entre o valor a absorção e a emissão, os comprimentos de onda são máximos, na primeira o λ_a e no segundo o λ_f resultando em $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$.

O desvio de Stokes é a diferença entre os valores máximos da primeira banda de absorção e do espectro de fluorescência (expressos em números de onda), este parâmetro é

importante, pois pode fornecer informações sobre os estados excitados, exemplo, quando o momento de dipolo de uma molécula fluorescente é maior no estado excitado do que no estado fundamental.

Do ponto de vista prático, a detecção de uma espécie fluorescente é claro mais fácil quando o deslocamento Stokes é maior [52] Portanto, métodos ópticos são processos de emissão analiticamente importantes nas análises amostrais em determinado estudo. No presente estudo, é empregada a espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), para determinar e quantificar dois HPAs, Pireno e Benzo[a]pireno em amostras de água.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Utilizar a técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS) para identificar e quantificar a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e avaliar o processo de filtração como método de separação dos HPAs da água do córrego Rego D'água no município de Dourados/MS.

3.2. Objetivos específicos

-Testar a validação do método EFS para análise de HPAs nas amostras de água do córrego.

-Desenvolver/aplicar novo procedimento via Filtração para extração dos HPAs para posterior quantificação.

-Confrontar os tipos de preparação das amostras como: Filtração e Extração Líquido-líquido na eficiência do método EFS.

- Monitorar o comportamento dos HPAs pela EFS, verificando a quantidade de concentração (ng/mL) através das amostras coletadas em pontos e dias alternados.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Reagentes

Para realizar este trabalho foram empregados os seguintes reagentes:

- Solução de 1 mL com mistura de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Acetona (EPA PAH Mix-B- Aldrich). Os HPAs contidos nesta mistura em geral são as concentrações de, Pireno (Pyr), 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) e Indeno[1,2,3 - c,d]pireno (I[cd]P);
- Metanol 99,9% UV/HPLC – Espectroscópico da marca VETEC[®];
- Hexano 99,5% UV/HPLC (misturas de isômeros) – Espectroscópico marca Sigma Aldrich[®] e;
- Água ultrapura - Milli-Q.

4.2 Amostras

A área de estudo está inserida nas esferas territoriais do município de Dourados, segundo a Regionalização do IBGE¹, encontra-se localizada na Região Centro-Oeste do Brasil, situada ao sul do Estado de Mato Grosso do Sul - MS, como mostra a Figura 9. O município de Dourados encontra-se a uma altitude de 430 metros, com uma área de 4.096,9 km², e possui, atualmente, 210.218 habitantes. Localiza-se entre as coordenadas geográficas latitude 22° 13' 16" S e longitude 54° 48' 20" W, , [55-56].

¹ Os dados são obtidos da Regionalização do IBGE. Disponível em <http://www.geografos.com.br/cidades-mato-grosso-sul/dourados.php>. Acesso em 09 de novembro de 2014.



Figura 9. Localização do perímetro urbano do município de Dourados - MS. Dados obtidos da referência [57].

Na área urbana de Dourados são encontrados oito córregos: Laranja Doce, Córrego da Lagoa, Água Boa, Rego D'água, Paragem, Chico, Olho D'água e Engano, todos com nascentes no perímetro urbano [66]. Contudo, para este estudo foi focado somente o córrego Rego D'água, já que, sua maior parte está na região central do município. Com nascente provavelmente na rua Cuiabá, atravessa os bairros Vila São Pedro, Jardim Londrina, Jardim Independência, Jardim Rigotti, Vila Adelina, Jardim Itália, Vila Hilda, Jardim Água Boa, Jardim Nana, BNH 4º Plano, Canaã VI (Cachoeirinha), Cachoeirinha (onde fica a Estação de Tratamento de Esgoto Guaximim²) e Jardim Rasslem. Dentro do Parque Ambiental Rego D'água, o córrego divide-se em dois braços, um segue em linha reta passando pelo BNH 4º Plano e o outro braço passa pelo bairro Cachoeirinha, em certa altura juntam-se novamente seguindo seu curso normal para o Rio Dourados.

A Figura 10 apresenta o percurso do córrego identificando os pontos de amostragem em que foram realizadas as coletas. Foram elencados cinco pontos, a partir da percepção de contaminantes ambientais visíveis e também pelo motivo do córrego possuir uma concentração populacional em seu entorno. A Tabela 5 mostra os pontos com a descrição do local e as coordenadas geográficas de cada ponto.

² A água tratada na Estação de Tratamento de Esgoto é despejada diretamente no Córrego Rego D'água.

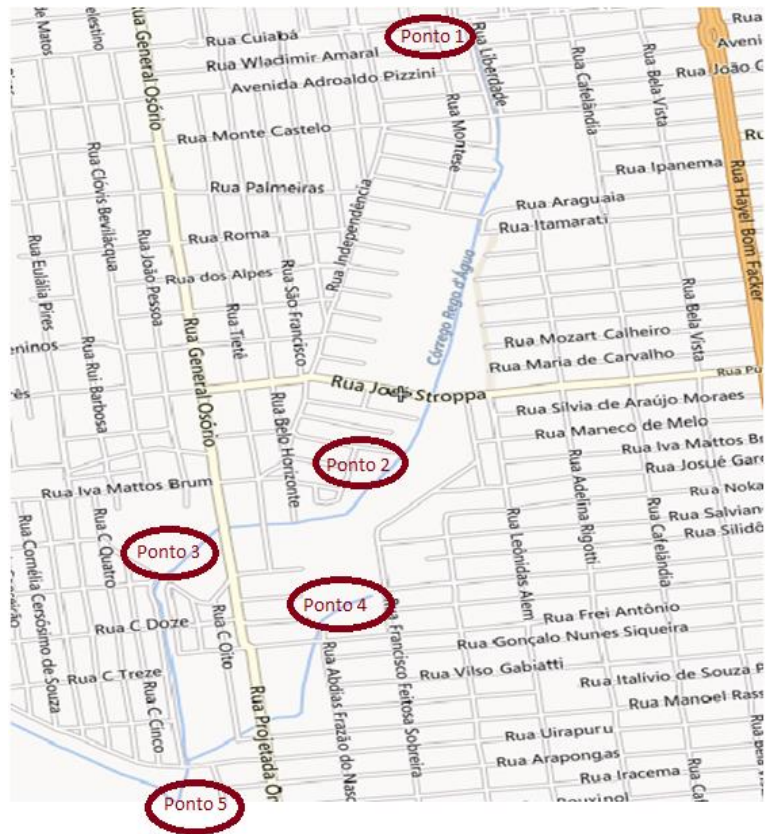


Figura 10. Percurso do Córrego Rego D'água e os respectivos pontos de coleta. (Imagem: Google Maps).

O Ponto 1, de coleta está localizado na nascente do Córrego Rego D'água, de coordenadas S 22° 13'59.0" e W 54° 48'48.4". A imagem da Figura 11, representa uma visão geral desse ponto.



Figura 11. Ponto 01 - Nascente canalizada e percurso de sua vazante. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).

O Ponto 2, de coordenadas: S 22° 15'00.2" e W 54° 48'58.4", na imagem da Figura 12, está situado no Parque Ambiental Rego D'água que está cercado por diversos bairros populacionais. Nesse local muitas pessoas versam suas atividades físicas.



Figura 12. Ponto 02 - Formação do lago Parque Ambiental Rego D'água e parte interna do parque. (Imagens: OLIVEIRA, R. A, N.).

Ponto 3, de coordenadas: S 22° 15'06.6" e W 54° 49'63.0", esta representado na imagem da Figura 13, se localiza adjacente a Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim, localizado na Vila Cachoeirinha, município de Dourados – MS.



Figura 13. Ponto 03 – Junção de um braço do córrego com a água tratada da Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim e o cano de despejo do esgoto. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).

Ponto 4, de coordenadas: S 22° 14'57.14" e W 54° 49'13.5", visualização da imagem pela Figura 14, local próximo das residências no interior da Vila Cachoeirinha, considerado um dos bairros mais populosos da cidade.



Figura 14. Ponto 04 – Córrego Rego D'água no interior da Vila Cachoeirinha, residências em torno do córrego. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).

Ponto 5, de coordenadas: S 22° 15'01.1" e W 54° 49'16.0", pela imagem da Figura 15, onde o córrego termina e a mais ou menos a 300 m renasce sua junção com o Córrego Água Boa e segue seu percurso natural até desaguar no Rio Dourados.



Figura 15. Ponto 05 – Término do Córrego Rego D'água, encontro com o Córrego Água Boa. (Imagens: OLIVEIRA, R. A.N.).

Tabela 5. Representação do ambiente de coletas e as suas respectivas coordenadas.

Pontos	Descrição	Coordenadas Geográficas
1	Nascente canalizada	S22°13'59.0" e W54° 48'48.4"
2	Parque Ambiental Rego D'água	S22°15'00.2" e W54° 48'58.4"
3	Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim	S22°15'06.6" e W54° 49'63.0"
4	Residências em torno do córrego	S22°14'57.14" e W54° 49'13.5"
5	Término do Córrego Rego D'água	S 22°15'01.1" e W54° 49'16.0"

4.3 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de água foram coletadas entre 0 a 30 cm da lâmina d'água. Em cada ponto de coleta foram recolhidas duas amostras em intervalos de tempo bem próximos, sendo que cada amostra possui o volume de 1000 mL. Cada coleta foi feita no mesmo dia e nos cinco pontos elencados. As duas primeiras coletas aconteceram em intervalos de quinze dias, na sequência foram realizadas mais duas coletas em um intervalo de vinte dias.

Logo, todas as coletas foram feitas em períodos climáticos diferentes, pois as temperaturas ambientais variaram de acordo com o clima tempo, como mostra a Tabela 6.

Tabela 6. Condições meteorológicas nos respectivos dias e horário de coleta.

Dias	Horário	Chuva	Temperatura (°C)
30/08/14	7h às 12h	Não	26
15/09/14	7h 30min às 12h 10min	Pouco	32
15/12/14	6h às 11h	Não	31
05/01/15	6h às 12h 20min	Não	28

A coleta das amostras seguiu as etapas descritas na referência [58]. Imediatamente após a coleta, os vidros âmbar foram cobertos com papel alumínio e armazenadas em caixa térmica sob temperatura de 4°C, para posterior análise [59-60].

4. 4 Métodos analíticos de tratamento das amostras

4. 5 Método procedimento geral (PG)

O método descrito como procedimento geral (PG), não envolve o preparo da amostra. Consiste na retirada direta de uma alíquota de mais ou menos 3 mL da água coletada, em que esta é transferida para a cubeta onde é realizada a medida em triplicatas. Nesse caso, as medidas de espectroscopia de fluorescência sincronizada são feitas diretamente nessas amostras. O fato da água do córrego conter uma vasta gama de microrganismos, material particulado em suspensão e outros pode ser observado muitos ruídos nas medidas, o que é prejudicial às análises.

4. 6 Método de extração líquido-líquido (ELL)

No processo de extração líquido-líquido (ELL) utilizou-se a metodologia fundamentada nos trabalhos das referências [5, 36, 41]. Este processo segue uma série de protocolos que estão descritos na sequência. Retiram-se alíquotas de 100 mL das amostras. Cada alíquota é transferida para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, onde é adicionado 20 mL de hexano HPLC. Esta mistura fica por 20 minutos no agitador magnético. Devido à insolubilidade dos meios (água e hexano) uma parte do extrato de hexano pode ser retirado. Dada ao coeficiente de partição dos HPAs com o hexano, nesse processo pretende-se a transferência do HPA presente na amostra. Para uma melhor eficiência esse procedimento de lavagem foi repetido por quatro vezes.

O resultado dessa lavagem (em torno de 80 mL de hexano) por sua vez foi transferido em um balão de fundo redondo do retroevaporador (IKA-RV10), misturada com 10 mL de metanol HPLC, utilizou-se este solvente devido ao seu grau analítico e também sua polaridade. A solução, então, foi aquecida a uma temperatura próxima a 40°C e rotorevaporada, o que resultou em um extrato final de ± 2 mL.

Em seguida, esse extrato foi diluído em solução metanólica-aquosa, utilizando um balão volumétrico de 5 ml, com as respectivas medidas solução metanol-água (1:1v/v); solução metanol 50% (v/v) e na sequência a realização da análise das amostras

4.7 Método de filtração (FIL)

Observa-se que em sistemas aquáticos os compostos orgânicos poluidores são espontaneamente dissolvidos, assim, temos a matéria orgânica dissolvida (MOD) e conseqüentemente vinculada a matérias de partículas em suspensão (MPS) ambas as fases, são associadas em sedimentos.

Nos sistemas que são ricos em matéria orgânica, ocorre a interação dos HPAs com a matéria orgânica. No entanto, as matérias orgânicas em ambientes aquáticos possuem uma estrutura química complexa, esse fato deve-se, pela quantidade de porções existentes de substâncias não polares que admitem a interação com moléculas hidrofóbicas, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [45, 61].

Estudos tem demonstrado uma forte afinidade dos contaminantes hidrofóbicos com a matéria orgânica dissolvida de acordo com [46-47, 62-63]. Visto que, no ambiente aquático que contem descarte como de esgoto, ou deposito de poluição possui uma grande quantidade de material particulado. Diante desse fator, mediante a essas afirmativas foi pensado no método de filtração para este estudo.

Diante deste contexto, foi realizada a filtração de 1000 mL de água coletada nos cinco pontos elencados, essa técnica ocorreu por filtração simples. Geralmente é utilizado neste método: funil, papel de filtro, copo de bécquer e suporte. O funil auxilia as operações envolvendo líquidos e no enchimento de frascos, também como suporte para o papel. Neste processo o filtro é um instrumento proposto na filtração e que tem a função de retenção das partículas alojadas na superfície porosa, neste caso no papel-filtro. O isolamento dessas partículas acontece por meio da ação de assoreamento, em que o corpo sólido é armazenado no papel-filtro e a parte líquida escoar-se através do filtro se alojando no copo bécquer.

Para esse procedimento utilizamos um papel filtro com a espessura de 205 μm de diâmetro e porosidade de 14 μm . O resíduo aderido no papel filtro foi raspado da borda até o centro e então lavado com 10 mL de metanol de grau HPLC. Com esse extrato foi realizado as análises.

4. 8 A técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS)

A técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS) é um método, considerado eficaz, pois é definida por uma maior seletividade, decorrente do estreitamento da largura da banda espectral. Isto acontece porque essas bandas ao se definir promovem a redução da sobreposição espectral dos diferentes compostos. Essa redução espectral é importante em determinado analito, pois impede o aparecimento de espalhamento que em muitos casos é provocado pela fonte de radiação eletromagnética do equipamento [36].

Na espectroscopia de fluorescência sincronizada, nos comprimentos de onda, de excitação e de emissão é realizado, um escaneamento simultâneo durante a obtenção do espectro. Ao iniciar uma análise, os comprimentos de onda de excitação (λ_{Exc}) e emissão (λ_{Em}) são selecionados e após esta seleção, ocorre uma diferença entre esses (λ), resultando em $\Delta\lambda(\lambda_{Em} - \lambda_{Exc})$, por esse fator, ocorre o aumento da seletividade. Quando se realiza análises em solução de diferentes misturas de compostos estes fatores se tornam importantes, devido à varredura que é realizada neste procedimento. [5, 12-13, 41, 64].

A espectroscopia de fluorescência sincronizada teve seu desenvolvimento pela primeira vez por LLOYD, J.B.F (1971)[65]. Então esse método é conhecido por ser útil na determinação simultânea de compostos orgânicos. Portanto, na técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada, a seletividade e a sensibilidade aumentam, levando a redução dos erros experimentais. É uma técnica rápida, simples, e particularmente adequada na utilização de método como monitoramento para regular a emissão dos poluentes orgânicos nos ambientes. Devido a praticidade desta técnica, alguns investigadores tem utilizado nas análises de HPAs [42]. A principal vantagem desta técnica é a determinação de HPA com macromoléculas à temperatura ambiente.

As medidas de EFS, nesse trabalho, foram realizadas em um espectrofluorímetro CARY ECLIPSE (Varian), acoplado a um tubo fotomultiplicador (R928), como é mostrado o esquema do equipamento na Figura 16.

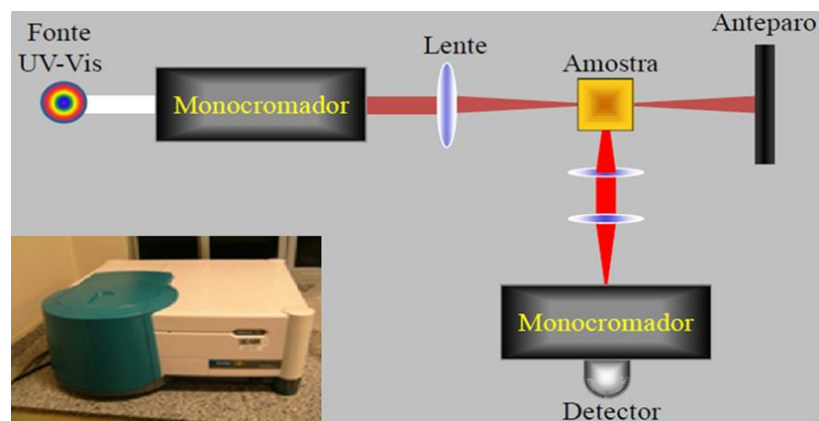


Figura 16. Esquema que representa o funcionamento de um fluorímetro, (adaptado). Dados retirados da referência [66].

O sistema experimental foi ajustado de acordo com os parâmetros utilizados, de maneira a selecionar cada HPA desejado. Para excitação de 200 a 600 nm, $\Delta\lambda$ em 40 nm, fendas: excitação em 2,5 nm e emissão em 5 nm. Para os dois HPAs de interesse neste estudo, Pyr e BaP, os parâmetros utilizados neste estudo, o $\Delta\lambda$ e as fendas foram fundamentados pelo trabalho dos autores PATRA, D.; MISHRA A.K. (2001).

4.9 Determinação da curva analítica para a EFS

A curva de calibração, ou curva analítica, consiste em uma curva baseada no sinal de resposta. Neste estudo, é utilizada a intensidade de fluorescência, em função da concentração do analito para obter a linearidade. Assim sendo, foi utilizada uma amostra padrão comercial de um "Mix" de HPAs, diluído em 50 mL de metanol HPLC. Após a diluição obteve-se a seguinte concentração de $500 \cdot 10^{-6} \text{ g} : 50 \text{ mL} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ g/mL}$. Com essa concentração foi possível identificar 04 HPAs, Pireno, Benzo[a]pireno com o parâmetro $\Delta\lambda$ em 40 nm e os HPAs Fenantreno e Criseno com o parâmetro $\Delta\lambda$ em 100 nm de acordo com PATRA, D.; MISHRA A.K. (2001).

A partir da concentração final, chamada de solução padrão, foi elaborado cinco outras concentrações: 5; 10; 15; 20 e $25 \cdot 10^{-9} \text{ g/mL}$, tais concentrações utilizadas para realização de cada curva foram variantes conforme a faixa de leitura de cada HPA. Desta forma, para o pireno foram feitas diluições com pontos de concentração variando de 5 g/mL a 10 g/mL, para o benzo[a]pireno de 10 g/mL a 15 g/mL.

Por meio da concentração elaborada, todas as medidas foram realizadas em triplicatas e em dias consecutivos utilizando-se da mesma solução [67]. Tanto a solução como também as concentrações foram armazenadas em vidro âmbar sob a temperatura de 4° C. Assim, após a obtenção das cinco concentrações realizou-se as medidas pelo método de espectroscopia de fluorescência sincronizada, obtendo-se a curva analítica.

A validação das metodologias analíticas proposta neste estudo foi pautada com base nos seguintes parâmetros estatísticos: determinação da linearidade, precisão (coeficiente de variação com base no desvio padrão, repetitividade e reprodutibilidade), limite de detecção, limite de quantificação e o teste-t.

4. 10 Faixa de linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método determinar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito das amostras, dentro de uma determinada faixa de concentração. A maioria dos instrumentos experimentais de medição que existem estabelecem a sua faixa linear, requerendo por verificações em até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa linear [68].

Deste modo, se obtêm a linearidade por uniformização interna ou externa, sendo descrita por meio da expressão matemática, que serve para calcular a concentração do analito a ser determinado amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$(Y = a . C + b) \qquad \text{(Equação 5)}$$

sendo: Y , a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.); C , a concentração; a , a inclinação da curva de calibração = sensibilidade; e b , a interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

Neste procedimento a linearidade é observada graficamente ao se obter resultados dos sinais analíticos em função da concentração do analito. Outra forma de se obter é calcular é por meio da equação da regressão linear, resolvida pelo método dos mínimos quadrado. O coeficiente de correlação linear (R) é usado com frequência na indicação o

quanto pode ser considerada adequada à reta de regressão como um modelo matemático [68 - 69].

Diante deste contexto, na realização de análises para se obter, o objetivo desejado é preciso encontrar uma função que relacione as medidas, realmente conseguidas com a concentração procurada. Logo, em qualquer análise é necessário fazer uma calibração, onde o coeficiente de correlação linear pode variar entre $0 \leq R \leq 1$, sendo que, o valor de R quanto mais próximo estiver de 1, o padrão consegue descrever a variação e isso possibilita evitar erros aleatórios estatisticamente [70].

Para a construção da curva analítica são necessários alguns níveis de concentração, com no mínimo cinco concentrações. Neste estudo, obteve-se as curvas analíticas para os dois hidrocarbonetos policíclicos aromáticos onde a resposta encontrada para (R) foram 0,9960 para o HPA Pyr e para o HPA BaP foi 0,9980, logo, esses valores encontrados foram próximo de 1, o que indica que existe uma correlação fortíssima nesta análise para o ajuste da reta [71-73].

4.11 Repetitividade

Na repetitividade as condições podem se caracterizar pelo mesmo: procedimento de medição, observador, instrumentos usados sob as mesmas condições, local e por repetições no menor espaço de tempo possível. A repetitividade é expressa quantitativamente pela característica da dispersão dos resultados e que pode ser resolvida através da análise de padrões, material de referência ou adição de analito ao branco da amostra, sobre as varias concentrações na faixa de trabalho [72].

Neste estudo, as leituras das amostras foram realizadas em triplicatas sob as mesmas condições dos parâmetros, em que para cada litro de água, independentemente de qual era o método que estava sendo aplicado no momento de execução, a repetição ocorreu da mesma forma.

4. 12 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que produz um sinal com certo nível de confiança estatística. Neste parâmetro assumiu-se o limite de detecção como a razão de três vezes o desvio padrão da medida do branco pela sensibilidade [73].

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas [74-75]. Para essa validação, utilizam-se expressões matemáticas, descritas abaixo.

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{IC} \quad (\text{Equação 6})$$

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \quad (\text{Equação 7})$$

sendo, DPa é o desvio padrão adquirido da curva de calibração procedente da análise de um número apropriado de amostras da medida do (n=10) e IC é o valor resultante da inclinação da curva de calibração conhecida como sensibilidade [5, 72-73].

4. 13 Precisão

A precisão de um método analítico é o parâmetro que avalia a proximidade efetuada na mesma amostra. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativa, variância ou coeficiente de variação (CV) de diferenças medidas.

As duas formas, mais comuns de expressar a precisão é pela repetitividade e reprodutibilidade em que ambas são dependentes da concentração do analito e, deste modo, deve ser determinada para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida, onde o coeficiente de variação (CV%) ou o desvio padrão relativo (DPR) pode ser melhor utilizado/útil, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao

longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito extensa que pode ser calculado pela Equação 8 [76-77].

$$CV = DPR\% = \frac{[DP]}{CDM} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

onde: DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada.

4. 14 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade é a precisão ou grau de concordância das medidas de um analito, realizadas sob condições variadas de determinada medições. Mesmo não sendo considerado um componente de validação de métodos executado, é considerada importante quando se busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação. A partir do desvio padrão obtido e nas condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R), o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa ou não [75-76].

4. 15 Teste –t

O teste - *t* Student é realizado por meio de uma comparação entre as médias analisadas. O teste *t* pode ser utilizado como fator decisivo para validação das amostras analisadas. Neste teste deve ser calculado e comparado com o teste *t* tabelado, caso o valor da matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível no teste de especificidade. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se o teste calculado e comparado com a matriz não tem efeito significativo sobre o ensaio, caso contrário a matriz tem efeito estatisticamente significativo sobre o resultado do ensaio. Pode-se concluir que os dados se ajustam satisfatoriamente ou insatisfatoriamente na obtenção dos resultados dos dados analisados [75].

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção da curva analítica com a amostra padrão

Para a obtenção da curva analítica que representará a concentração dos dois HPAs de interesse neste estudo, o benzo[a]pireno (BaP) e o pireno (Pyr), em função da intensidade de fluorescência obtida pela análise por espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS), realizou-se medidas utilizando a solução padrão como descrito no item 4.1 do procedimento experimental.

A Figura 17 mostra o espectro normalizado desse Mix de HPAs, para um $\Delta \lambda = 40$ nm. O espectro foi normalizado com o objetivo em reduzir a influência de variantes indesejados que poderia estar presente no conjunto de dados. Neste estudo, a normalização contou com o espectro máximo de cada HPA, em que foi possível identificar os picos máximos referentes ao Pyr e ao BaP, em 334 e 366 nm respectivamente, que esta de acordo com a referencia [5, 41]. Na Tabela 9 estão descritos os comprimentos de ondas e as intensidades relativas destes dois HPAs.

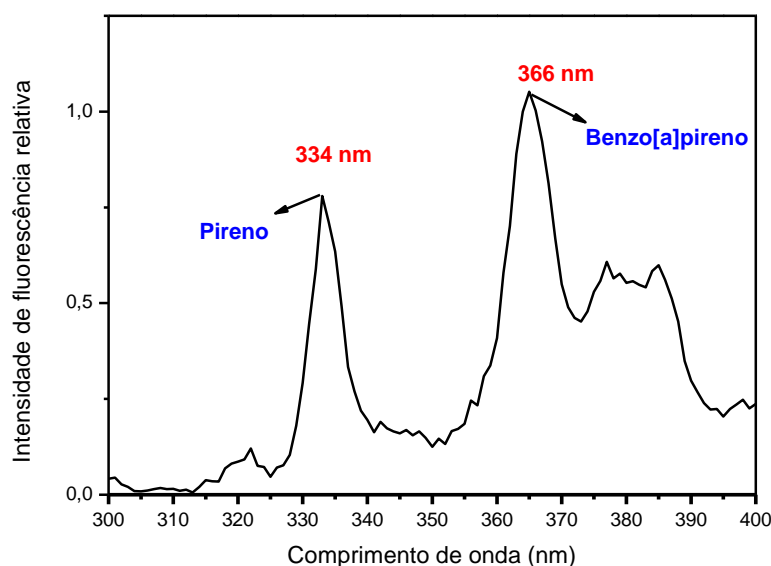


Figura 17. Espectro de fluorescência normalizado da amostra padrão (Mix de HPA) para um $\Delta \lambda = 40$ nm, com a identificação dos picos referentes ao Pyr com a excitação $\lambda_{M\acute{a}x.} = 334$ nm e para o BaP o $\lambda_{M\acute{a}x.} = 366$ nm. Utilizando-se o metanol de grau HPLC como solvente.

Tabela 7. Valores do comprimento de onda e intensidade relativa dos Pyr e BaP obtidos pela medida de EFS da amostra padrão.

	Pyr	BaP
Intensidade relativa	0,7	1
Comprimento de onda (nm)	334	366

Usando diferentes concentrações em metanol realizou-se as medidas de EFS com os mesmos padrões descritos na Figura 17. Sendo assim, obteve-se uma relação entre a intensidade de fluorescência e a concentração de cada HPA de interesse. Ainda, vale ressaltar que cada ponto é uma média de três medidas, e o desvio padrão é também representado na curva pela barra de erros em cada ponto. As Figuras 18 e 19 representam essa dependência para o Pyr e BaP, respectivamente.

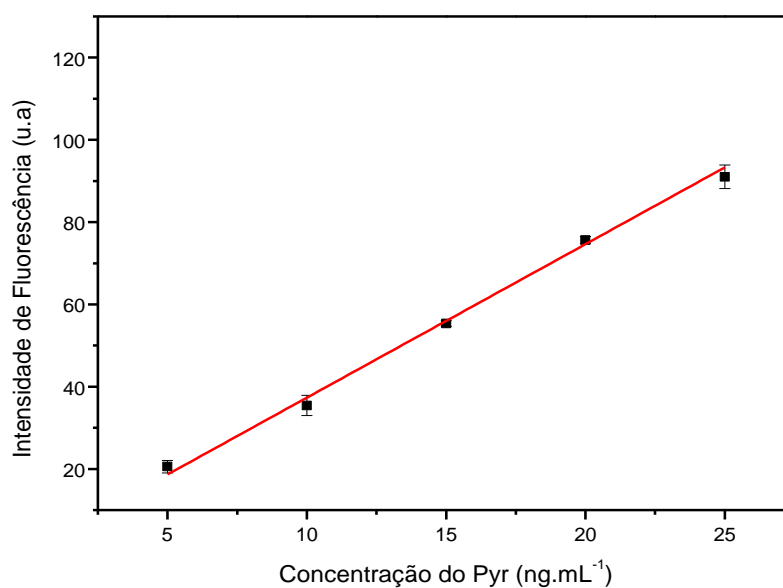


Figura 18. Curva analítica para determinação de Pyr. A linha vermelha representa o ajuste linear realizado (n=3).

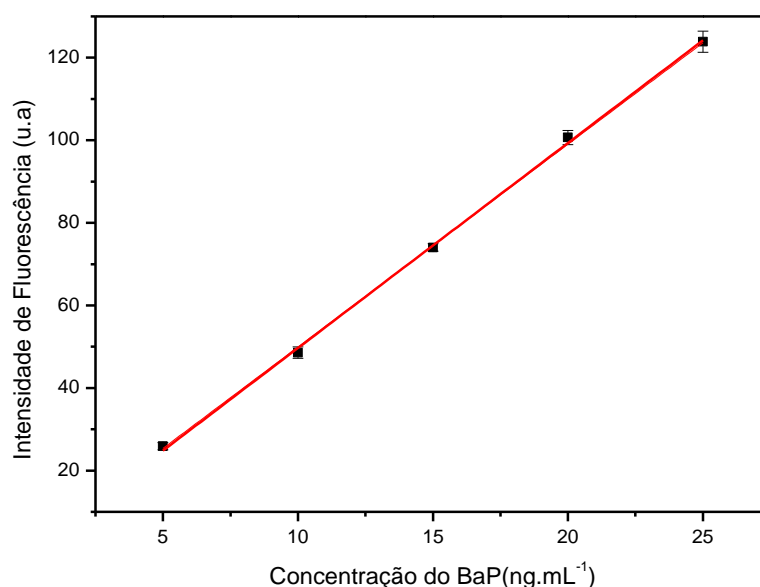


Figura 19. Curva analítica para determinação de BaP. A linha vermelha representa o ajuste linear realizado (n=3).

Pelas Figuras 18 e 19 observa-se que a dependência entre a intensidade fluorescência e a concentração de cada HPA é aparentemente linear. Sendo assim, utilizou-se a equação da reta, para verificação desta linearidade. Os resultados dos ajustes lineares, bem como os índices de concordância estão representados na Tabela 8. Também os valores dos limites LD e LQ dos autores: MOLINA, J. R. *et al.*, (2013) [78], SÁNCHEZ, C. F. J. *et al.* (2012) [79], GONZÁLEZ, F. V. *et al.* (2007) [80], OZCAN, S. TOR, A. AYDIN, M. E. (2010) [81] e FERRETTO, N. *et al.* (2014) [82]. Esses valores estão próximos dos valores encontrados neste trabalho.

Tabela 8. Coeficientes de ajuste e índices de concordância das curvas analíticas do Pyr e do BaP.

HPA	<i>a</i> (u. a.)	<i>b</i> (u. a.)	R ²	LD (ng.mL ⁻¹)	LQ (ng.mL ⁻¹)	Referência
Pyr	3,73	0,00	0,99	0,11	0,36	Neste estudo
BaP	4,96	0,00	0,99	0,05	0,17	Neste estudo
Pyr	----	----	----	0,13	0,45	Ref. [78]
				0,09	0,34	Ref. [79-80]
BaP	----	----	----	0,06	0,20	Ref. [78]
				0,03	----	Ref. [81]
				0,06	0,19	Ref. [82]

Os resultados obtidos para cada coeficiente de correlação linear, ou índices de concordância dos ajustes, foram próximos de 1, o que mostra que a escolha da equação esta adequada. De acordo com as referências [67-68] ao obter um valor para o coeficiente entre $0,91 < R < 0,99$ pode-se afirmar que a correlação é fortíssima. Nessa situação, o modelo estatístico linear é confiável para a verificação [71-75].

Tendo esses valores dos ajustes lineares propõe-se uma equação que correlaciona a intensidade de fluorescência (I_F), em medidas de EFS, com a concentração de cada HPA estudado (C_{HPA}), tendo por base sempre os mesmos procedimentos e parâmetros nas medidas. Por meio da equação da reta descrita no item anterior, temos o coeficiente angular da reta (a), cujo valor esta descrito na Tabela 8. Tais relações estão representadas nas Equações 10 e 11, para o Pyr e o BaP respectivamente:

$$C_{Pyr} = 0,26. I_F \quad \text{(Equação 10)}$$

$$C_{BaP} = 0,20. I_F \quad \text{(Equação 11)}$$

Após realizar as medidas de fluorescência das amostras coletadas, obtivemos valores das concentrações em ($ng.mL^{-1}$) para os respectivos compostos Pyr e BaP. Para tais medidas usamos rotas para a concentração dos analitos de interesse para melhorar a relação entre o sinal de medida e a quantidade de ruídos, que por ventura surgirem. Os métodos de pré-concentração já foram descritos nos procedimentos experimentais como: método de extração líquido-líquido (ELL) e pelo método de filtragem (FIL).

5. 2 Análises das amostras

5. 3 Análise da amostra pelo procedimento geral (PG)

Após realizar as coletas foi observada uma grande quantidade de matéria orgânica, que é um composto formado por restos dos seres vivos (plantas, animais e outros), esses resíduos e partículas como foi chamado neste estudo, estavam contidas nas amostras, além dos resíduos também foi verificado que a amostra era de cor escura. Por esse motivo, pensou-se, neste estudo em realizar uma medida direta da amostra, para verificar se após a medida iríamos determinar e quantificar os compostos de interesse neste estudo.

Diante deste contexto, a análise foi realizada entre a relação da intensidade de fluorescência em razão do comprimento de onda, esse processo aconteceu através da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada. Essa metodologia empregada foi para verificar se com as respostas dos sinais obtidos seria possível observar os analitos de interesse, assim, observou-se que os contaminantes exibiram um pico de intensidade tanto para o Pyr como também para o BaP.

Diante deste pressuposto, a amostra em princípio de análise, não poderia passar por processos analíticos (tratamento da amostra). Com ajuda de uma micropipeta a amostra foi colocada diretamente na cubeta e na sequência foi realizada a medida pela técnica EFS. Pensou-se neste tipo de análise, pois ao utilizar a técnica descrita e os parâmetros aplicados os mesmos obteriam as respostas de interesse neste estudo. Pois, a faixa da região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região visível entre 400 a 750 nm, como descrito no item 2.7. O resultado desta primeira análise esta representada na Figura 20.

Diante disto, a região aplicada na espectroscopia de absorção das moléculas na região ultravioleta para determinação quantitativa de composto pertencente ao grupo absorvente, também é de interesse da espectroscopia de fluorescência sincronizada.

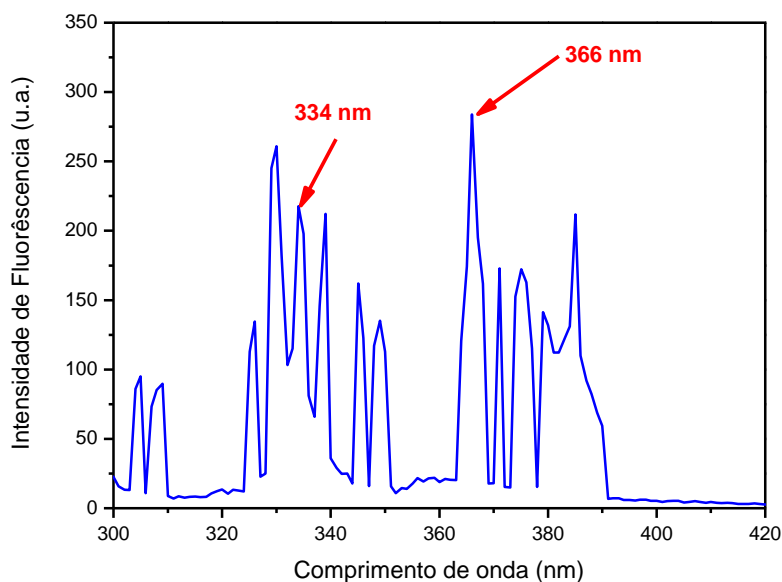


Figura 20. Dependência da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão da amostra sem passar pelo tratamento analítico, em que (v/v) 50% da amostra e 50% de metanol grau analítico HPLC, obtendo-se a solução.

Na Figura 20 é apresentado a quantidade de ruídos contido na amostra de água do córrego, entre os picos observados podemos elencar os prováveis compostos orgânicos Pyr e BaP. Foi observado os picos nas regiões dos comprimentos de onda de 334 nm e 366 nm respectivamente aos contaminantes em estudo. Como não foi possível separar esses compostos dos demais ruídos, pelo motivo da quantidade encontrada de resíduos/partículas em suspensão aderente à amostra e também na certeza de uma precisão analítica, quando se fala a respeito de HPAs, pois, alguns compostos tem a capacidade de adsorver a matéria orgânica como, o composto BaP.

O HPA BaP é pouco solúvel em corpos d'água e também são lipofílico, por isso, tende a acumular-se na matéria orgânica que é constituídas por lipídios, carboidratos, proteínas e outras substancias bioquímicas contidos em tecidos vivos (microrganismos), em que esses contribuem com detritos a partir de organismos que vivem em ambientes aquáticos [23, 77]. Assim, foi proposto o método de filtragem, uma nova abordagem neste estudo.

5. 4 Análise usando os métodos de pré-concentração

A Figura 21 apresenta um espectro típico das medidas de fluorescência usando o processo ELL para a obtenção das amostras pré-concentradas, os sinais que foram observados na amostra coletadas no Ponto 3, utilizando-se dos parâmetros otimizados para a quantificação dos HPAs descritos na figura e também a leitura do branco, por meio da amostra de metanol HPLC.

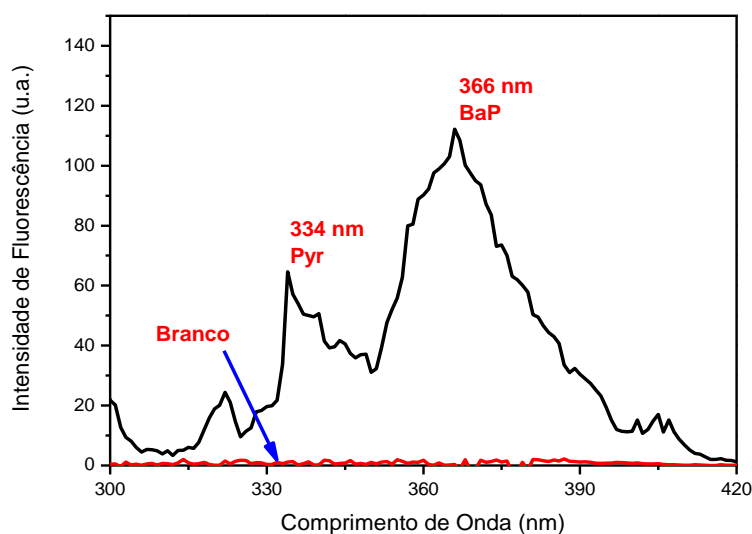


Figura 21 O espectro típico das medidas de fluorescência usando o método ELL para a obtenção das amostras pré-concentradas.

Após, a realização da análise pelo método de extração líquido-líquido e obter os valores dos sinais submetido, através da intensidade de fluorescência e do comprimento de onda, obtivemos os valores para a I_F , e com o valor do coeficiente angular da reta, calculamos a concentração calculada ($C_{calculada}$) dos dois HPAs de interesse neste estudo, o Pyr e o BaP, como podemos verificar na Tabela 9.

Tabela 9. Valores obtidos da curva analítica para os HPAs pelo método ELL, referente ao ponto 3.

HPA	IF	α	$C_{calculada}$ (ng.mL ⁻¹)
Pyr	64,61	3,73	17,89
BaP	112,20	4,96	22,60

No método de extração líquido-líquido como pode ser observado, os espectros de absorção dos HPAs Pyr e BaP apresentam picos bem definidos, com o máximo de intensidade de absorção em 334 nm e 366 nm para os respectivos compostos.

Podemos visualizar que na região de baixa energia sua banda é larga e a partir que passa para o estado de excitação seu pico torna-se mais estreito, esta característica é demonstrada com maior intensidade para o composto orgânico BaP.

E a Figura 22 apresenta um espectro típico das medidas de fluorescência usando o processo FIL para a obtenção das amostras pré-concentradas, também os sinais observados na amostra e que esta também coletada no Ponto 3, foi utilizado os mesmos parâmetros da anterior na quantificação dos HPAs apresentado na figura e novamente a leitura do branco, por meio da amostra de metanol HPLC.

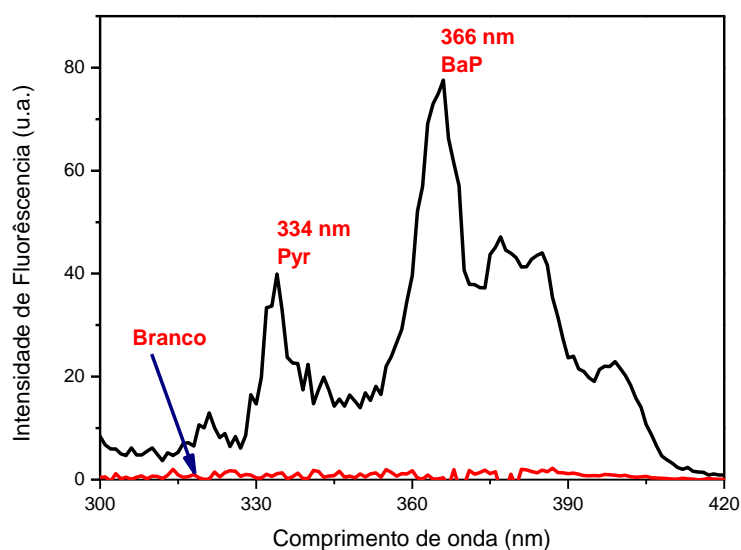


Figura 22. O espectro típico das medidas de fluorescência usando o método FIL para a obtenção das amostras pré-concentradas.

Para o método de filtragem podemos verificar que os espectros dos HPAs também foram definidos, onde os picos foram apresentados um máximo de intensidade, para o Pyr. e para o HPA BaP. Nesse método sua banda foi mais estreita do que apresentada no método de ELL. Também calculamos a concentração ($C_{calculada}$), para esse método, como podemos observar pela Tabela 10.

Tabela 10. Valores obtidos da curva analítica para os HPAs pelo método FIL, referente ao ponto.

HPA	IF	<i>a</i>	$C_{calculada}$ (ng.mL ⁻¹)
Pyr	39,90	3,73	10,69
BaP	77,58	4,96	15,64

Nos dois métodos podemos verificar que houve alguns picos de excitação, mas o de interesse neste estudo foi os dois HPAs proposto neste estudo o Pyr e o BaP. A diferença entre os dois métodos aplicado são, referente às intensidades adquiridas por cada método. Podemos verificar essa diferença como $I_{F(ELL)} - I_{F(FIL)}$, fazendo os cálculos para as intensidades de cada HPA temos: para o composto Pyr = 24,70 e para o composto B(a)P = 36,62. Esta diferença não foi uma estimativa muito distante entre os métodos aplicados. Também é verificado por meio da análise estatística teste-t, que ambos as intensidades dos

métodos ELL e FIL, ao nível de significância de 0,05 não houve diferença entre as metodologias aplicadas. Assim sendo, não há diferença significativa entre as intensidades dos HPAs, pois, (Stat $t = 0,105363103$) é menor que o valor crítico bi-caudal ($t_{\text{crítico}} = 12,70620474$), portanto, é aceita a hipótese H_0 ao nível dos valores das intensidades encontradas para cada HPA.

Ainda que, do ponto de vista da comparação entre os valores, pode-se dizer que os espectros de emissão possuem um pico de intensidade bem definido para ambos HPAs e também com os valores de (I_F) e (a) em que foram encontrados os valores das concentrações calculada, tanto no método de ELL como no método FIL, é verificado que os valores obtidos estão correlacionados com a faixa linear, pois, ambos estão entre os valores de (5; 10; 15; 20 e 25) ng.mL^{-1} .

Na Figura 23 realizamos um estudo de comparação entre os métodos aplicados: Procedimento Geral, Extração Líquido-líquido e Filtragem. Para realizar a comparação entre os métodos, adotamos um único ponto de referência, neste caso o Ponto 3, em que todas as amostras foram coletadas neste local e no mesmo dia (05-01-2015). A escolha deste ponto como sendo prioritário nesta análise foi a partir das respostas obtidas dos sinais por meio da intensidade de fluorescência versus comprimento de onda, e, também por esse local ser um receptor de descarte de efluentes do tratamento de esgoto da região urbana do município conhecido como: Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim.

O principal descarte que acontece nessa localidade refere-se à vasão doméstica, incluindo nesse descarte alguns tipos de lixos como: alimentos, animais e principalmente utensílios, tornando assim um local agregado com vários tipos de contaminantes. Como podemos observar na Figura 23, a existência de vários sinais chamado neste estudo de ruídos.

Assim, é perceptível pela Figura 23 que o método direto houve muitos ruídos, assim, conseqüentemente não se pode quantificar os analitos em estudo, pelo motivo de muita mistura. Ainda assim, dentre os vários ruídos foi possível encontrar os picos de intensidade para o Pyr e para o B(a)P. Esse foi um dos fatores relevantes para aplicar neste estudo os métodos de extração líquido-líquido e filtragem, que são explicados no procedimento experimental.

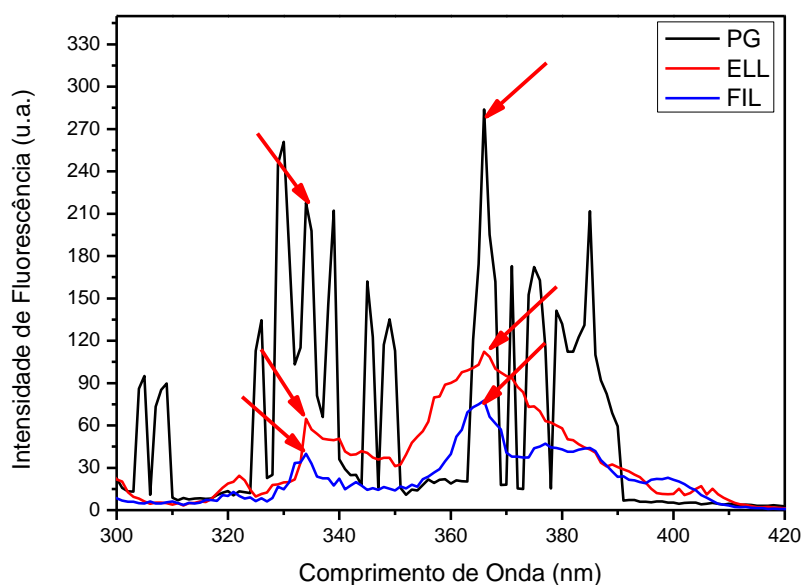


Figura 23. Dependência da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda da amostragem sem está passar pelo tratamento analítico (comparação entre os métodos). Amostra do ponto 3.

Os resultados das concentrações dos HPAs de interesse para os dois métodos de pré-concentração para todas as amostras coletadas nos respectivos pontos nas respectivas datas descritas na Tabela 6, são apresentados nas Tabelas 11 e 12, para o processo de ELL e nas Tabelas 13 e 14 para o processo de FIL.

Tabela 11. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA Pyr (C_{Pyr}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de ELL.

Pontos	Concentração Pyr ($ng.mL^{-1}$)			
	30/08/14	15/09/14	15/12/14	05/01/15
1	2,0	1,5	9,0	9,0
2	1,2	1,3	4,0	6,4
3	1,6	1,4	7,3	17,6
4	1,2	1,2	3,2	4,5
5	2,4	2,0	6,0	6,3

Tabela 12. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA BaP (C_{BaP}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de ELL.

Pontos	Concentração BaP ($ng.mL^{-1}$)			
	30/08/14	15/09/14	15/12/14	05/01/15
1	5,3	3,8	15,1	8,3
2	2,7	2,4	12,4	6,0
3	2,8	2,7	13,7	22,6
4	2,8	2,6	11,5	6,3
5	4,4	4,3	10,3	14,6

Tabela 13. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA Pyr (C_{Pyr}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de FIL.

Pontos	Concentração Pyr ($ng.mL^{-1}$)			
	30/08/14	15/09/14	15/12/14	05/01/15
1	2,0	1,6	9,6	15,8
2	2,9	2,6	5,7	11,3
3	1,7	2,6	12,6	14,3
4	0,6	0,9	3,4	9,7
5	0,4	0,9	6,9	13,9

Tabela 14. Valores da correlação da (IF) em razão das concentrações do HPA BaP (C_{BaP}), extraído dos pontos de coleta dos respectivos dias, pelo método de FIL.

Pontos	Concentração BaP ($ng.mL^{-1}$)			
	30/08/14	15/09/14	15/12/14	05/01/15
1	3,0	2,5	17,4	23,3
2	2,9	2,7	8,6	20,8
3	3,4	3,2	17,1	23,5
4	1,3	1,6	8,9	15,9
5	1,8	1,8	15,4	22,4

A Tabela 11 está os valores referente à concentração do analito Pyr, que foi analisado pelo método ELL. Esse analito também está expresso na Figura 24, representando a concentração encontrada em cada ponto de coleta. No geral foram obtidos valores inferiores, em especial para os dias 30/08 e 15/09, corresponderam entre 1,2

ng.mL⁻¹ a 4,5 ng.mL⁻¹, tais resultados não corresponderam à faixa linear do Pyr observado pela Figura 18. Enquanto que no dia 15/12 e 05/01, foi obtido valores superiores aos dias anteriores. A quantidade de concentração encontrada foi: 6,0 ng.mL⁻¹ a 17,6 ng.mL⁻¹, esses resultados estão correspondentes a faixa linear do Pyr. O que é perceptível que a concentração mais elevada refere-se ao Ponto 3. Diante deste contexto, o Ponto 3 refere-se a Figura 13, onde é a junção de um braço do córrego com a água tratada da Estação de Tratamento de Esgoto Guaxinim, que é depositada grande parte do esgoto urbano.

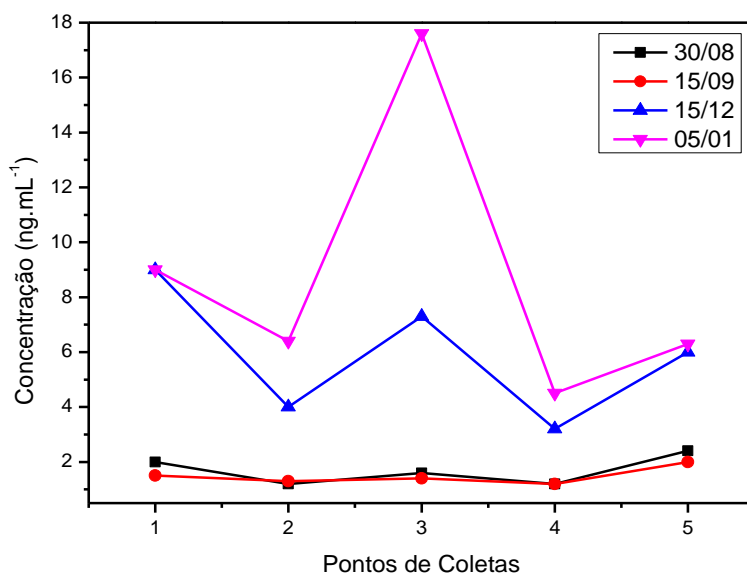


Figura 24. Valores das concentrações em (ng.mL⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de extração líquido-líquido em água do córrego obtendo-se o HPA Pyr.

Tabela 12, temos representado os valores das concentrações do composto BaP obtida pelo método de ELL. Que também pode ser visualizado pela Figura 25. Nesta figura podemos observar a correlação entre a concentração em ng.mL⁻¹ e os pontos de coleta nos referentes dias elencados. No dia 30/08 temos somente um valor de concentração que está correspondido a linearidade e este faz parte do Ponto 1, com valor de 5,3 ng.mL⁻¹ as demais concentrações estão fora da faixa linear, igualmente para o dia 15/09. Mas para os dias 15/12 e 05/01 todos os pontos foram detectados/encontrados elevadas concentrações dos analitos e que estas estão dentro da curva analítica, novamente o Ponto 3 é destacado para os dois dias, temos uma elevada quantidade de concentração com os respectivos valores: 13,7 ng.mL⁻¹ e 22,6 ng.mL⁻¹, que estão dentro da faixa linear.

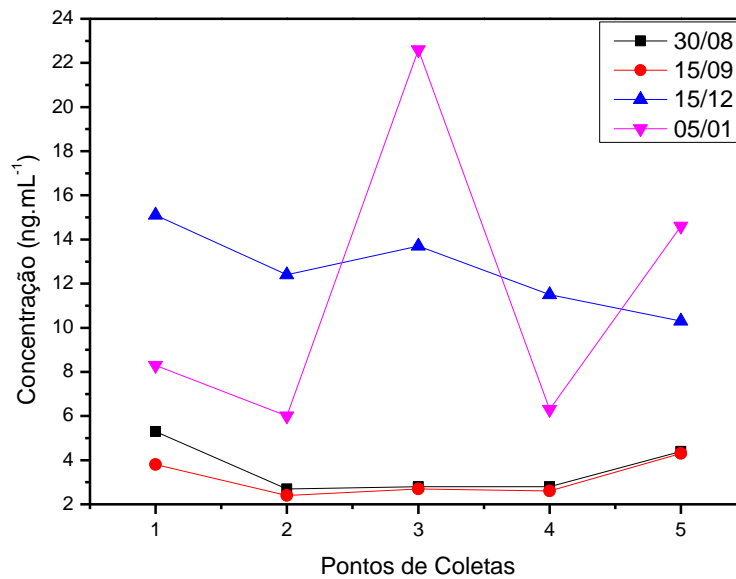


Figura 25. Valores das concentrações em (ng.mL⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de extração líquido-líquido em água do córrego obtendo-se o HPA BaP.

Na Tabela 13 esta representada a concentração do composto Pyr, que também pode ser visualizada pela Figura 26. Como já descrito anteriormente, foi possível observar a existência deste composto, por meio razão da concentração ng.mL⁻¹ e os pontos de coleta, decorrentes dos dias definido em estudo. Tais valores foram obtidos pelo método de FIL. Nos dias 30/08 e 15/09, não foram encontradas concentrações dentro da faixa linear. No dia 15/12 somente o Ponto 4 expressa valor inferior aos demais pontos. Para o dia 05/01 é encontrado quantidades de concentração que estão correlacionadas com a faixa linear.

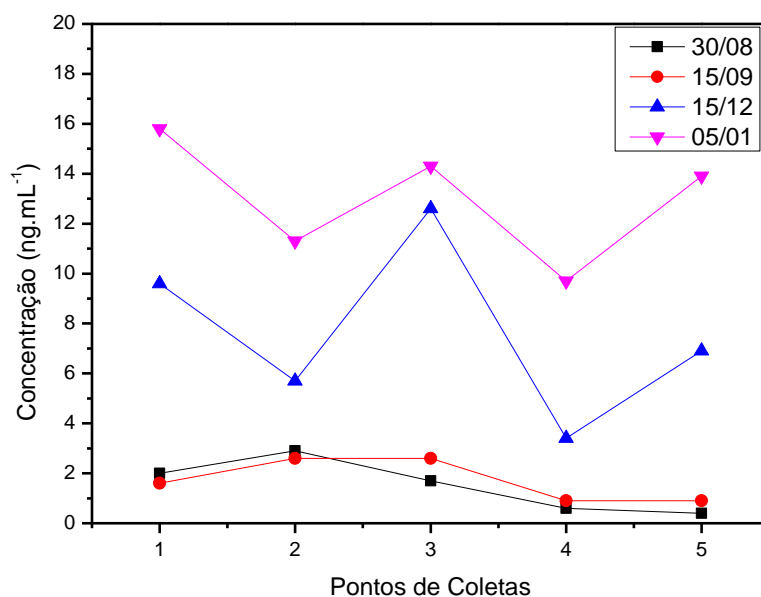


Figura 26. Valores das concentrações em (ng.mL⁻¹), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de filtragem em água do córrego obtendo-se o HPA Pyr.

Por fim a Tabela 14 representa os valores das concentrações obtidos nos pontos. Que é igualmente representado pela Figura 27. Nos dias 30/08 e 15/09 em todos os pontos não obtiveram concentrações correspondentes à faixa linear. Mas nos dias 15/12 e 05/01 em todos os pontos foram encontrados concentração do composto BaP que corresponderam a faixa linear, principalmente no Ponto 1 com o valor de 23,3 ng.mL⁻¹ neste local encontra-se uma grande concentração de veiculares, assim pode-se afirmar que existe deposito de resíduos advindos da combustão, pois muitos compostos orgânicos são formados pela combustão incompleta da combustíveis [83].

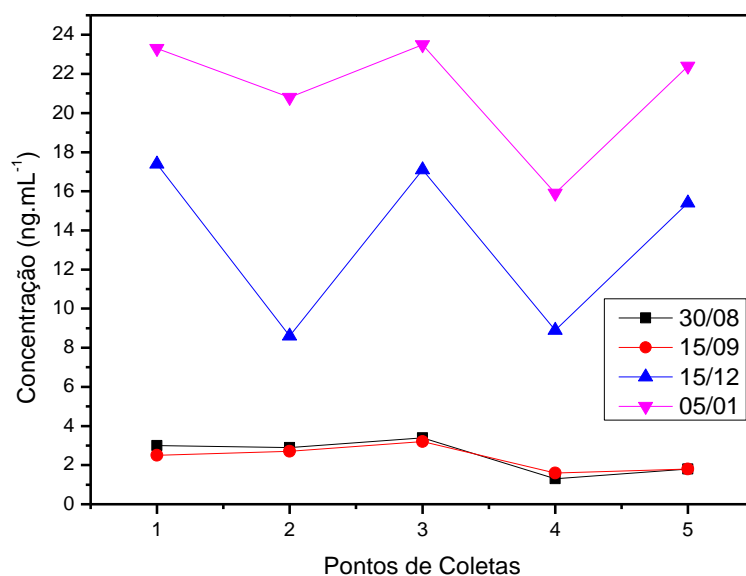


Figura 27. Valores das concentrações em (ng.mL^{-1}), pontos de coleta e os respectivos dias. Após tratamento analítico do método de filtração em água do córrego obtendo-se o HPA BaP.

Além do estudo de comparação entre os métodos aplicados também foi realizado uma nova comparação, focalizando os métodos de filtração e extração líquido-líquido. Essa nova abordagem procedeu da seguinte forma: com as amostras de cada ponto de coleta do dia 05/01/15, foi realizado o método de filtração e com a obtenção da água filtrada, foi realizado o método de extração líquido-líquido seguindo as normas estabelecidas no procedimento experimental.

Nesse contexto, essa comparação aconteceu entre os métodos citados. Essa investigação foi proposta com a intenção de averiguar se após a realização do método de filtração, se a água obtida após passar pelo processo de FIL, se na mesma iria conter os analitos Pyr e BaP e também se o papel filtro utilizado no procedimento contendo uma porosidade em (μm) é suficiente para barrar os analitos na passagem da água pelo papel filtro, ou seja, se são permeável ou impermeável. Essa constatação foi para avaliar se o método FIL, proposto neste estudo é eficiente neste tipo de análise. Diante deste contexto, a Figura 27 apresenta os resultados obtidos.

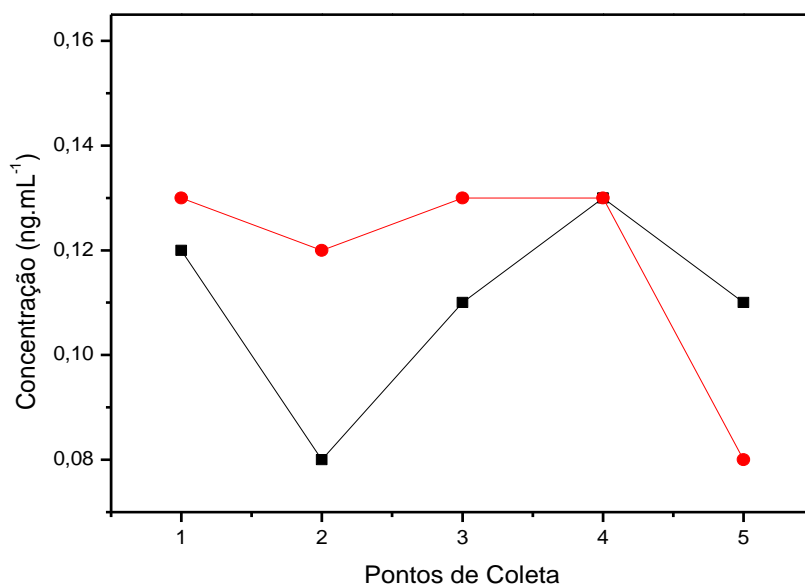


Figura 28. Concentração dos HPAs Pyr e BaP após o processo de ELL do descarte da solução usada no processo de FIL.

Os resultados obtidos, a partir dos valores das concentrações dos respectivos pontos de coleta do dia 05/01/15. Após, realizar a coleta foi realizado o método de filtragem e, em seguida, com o descarte realizou-se o método de extração líquido-líquido. Assim, podemos verificar que ao realizar essa análise, foi possível observar que a quantidade de concentrações obtidas, pelo método FIL foi maior que o método de ELL. Essa diferença é apresentada tanto na Figura 28 como também discorrida na Tabela 15.

Tabela 15. Resultado do descarte da solução com suas respectivas quantidades de HPAs obtidos pelo método FIL e ELL do FIL.

Método FIL	HPA Pyr (15,8; 11,3; 14,3; 9,7 e 13,9) ng.mL ⁻¹
	HPA BaP (23,3; 20,8; 23,5; 15,9 e 22,4) ng.mL ⁻¹
Método ELL do FIL	HPA Pyr (0,12; 0,08; 0,11; 0,13 e 0,11) ng.mL ⁻¹
	HPA BaP (0,13; 0,12; 0,13; 0,13 e 0,08) ng.mL ⁻¹

Portanto, podemos afirmar que o método de filtragem é um procedimento que pode ser aplicado neste estudo, pois em todas as respostas adquirida por esse método foram satisfatórias enquanto a quantidade visualizada dos analitos Pyr e BaP em concentração.

Logo, a quantidade dos analitos Pyr e BaP em concentração foram inferiores das obtidas no FIL.

5. 5 Analise estatística dos métodos empregados

Neste estudo os resultados são atribuídos aos dados quantitativos nas análises analíticas, após obter resultados de interesse é verificado o quanto há de confiabilidade no processo empregado como e de acordo com [72]. Os procedimentos de validação de uma metodologia empregada, no final de uma análise devem estar de acordo com as exigências das regulamentações nacionais e internacionais [72].

Sendo assim, neste estudo, a partir das informações obtidas com a mistura de solventes, foi elaborada uma curva analítica para os dois HPAs identificados de Pyr e BaP. Em seguida obteve-se um coeficiente de correlação linear entre as dependências da intensidade de fluorescência em função da concentração para cada HPA.

Através deste procedimento estima-se o limite de detecção mínimo, em que este indica a concentração mínima de cada HPA encontrado e que este pode ser conhecido/detectado pela experiência realizada. As concentrações trabalhadas para os dois HPAs foi de 5 ng.mL^{-1} a 25 ng.mL^{-1} . Nas Figuras 18 e 19 estão representadas as curvas de intensidade de fluorescência em função da concentração de cada HPA. Assim, com os coeficientes de ajuste e índices de concordância das curvas analíticas do Pyr e do BaP foi possível verificar os limites de detecção como já mencionado, o limite de quantificação, valor do R^2 , e os respectivos coeficiente angular e linear, como pode ser verificado na Tabela 8. As medidas das concentrações do Mix foram realizadas repetidas vezes para obter dados confiáveis. Também as medidas das amostras foram feitas em triplicatas sob as mesmas condições e com os mesmos parâmetros, esta repetição é importante para obter a média das concentrações e o desvio padrão como também o desvio padrão relativo.

Na análise estatística referente à precisão da amostra no dia 05/01/15, para os compostos Pyr e BaP, foi aplicado a Equação 8. Obtendo-se os valores que estão representados na Tabela 13.

Tabela 16. Valores obtidos a partir das médias das concentrações determinadas e o desvio padrão relativo.

DPR% - Método FIL	HPA Pyr (1,32; 1,64; 1,33; 2,68 e 8,00) ng.mL ⁻¹
	HPA BaP (0,91; 1,09; 0,28; 2,31 e 1,97) ng.mL ⁻¹
DPR% - Método ELL	HPA Pyr (2,31; 2,48; 1,03; 4,83 e 8,59) ng.mL ⁻¹
	HPA BaP (0,91; 2,72; 1,29; 3,79 e 1,43) ng.mL ⁻¹

A partir das médias das concentrações determinadas e o desvio padrão dos respectivos métodos de extração líquido-líquido e filtração obteve-se os resultados para o coeficiente de variação. Como podem ser verificados na Tabela 13, os resultados apresentados após o teste de precisão, apresentou para a maioria das médias das concentrações dos analitos Pyr e BaP, da amostragem dos pontos de coleta, valores menores que 5%, indicando que a precisão é adequada de acordo com o guia de validação INMETRO 2007 [84].

Através do teste-t foi possível verificar se existe diferença significativa ou não entre os dois métodos aplicados na amostragem. No processo de ELL e FIL o teste-t para o HPA Pyr ao nível de significância de 0,05, não houve diferença significativa entre as médias da concentração encontrada, pois, (Stat t = 0,708056393) é menor que o valor crítico bicaudal ($t_{\text{critico}} = 2,776445105$), então é aceita a Hipótese H_0 ao nível da concentração encontrada nas amostras logo não difere significante o método de ELL do método FIL, quando foi adotado o nível de significância ($\alpha = 0,05$) e também para um grau de liberdade ($G_L = 4$). Para os outros resultados obtivemos a mesma igualdade, em que o crítico é maior que o Stant t. Portanto, a diferença entre as médias da concentração não é significativamente diferente. Então, por meio do teste-t, podemos verificar que o método de FIL não é significativamente diferente do ELL.

Portanto, houve uma considerada diferença do total dos HPAs dissolvidos no meio líquido e aqueles adsorvidos na matéria orgânica particulada, pois as concentrações obtidas em diferentes valores são decorrentes dos analitos serem móvel, de ter a capacidade de adsorção em matéria orgânica [77]. Portanto, como se trata de um corpo corrente e inerente a regimes de chuvas temperatura, umidade, iluminação e outros fatores, que contribuem para as mudanças/alterações no que concerne a disparidades das quantidades de concentração encontradas em cada HPA.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível identificar e quantificar em todos os pontos de coleta os HPAs, pireno e benzo[a]pireno, através da técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada e dos métodos de extração líquido-líquido e filtração, onde após apurar os resultados e os comparar conclui-se que o método de filtração além de ser prático, rápido e de custo baixo, ainda evita a degradação dos HPAs nas amostras coletadas conforme as análises.

Os compostos orgânicos, pireno e o benzo[a]pireno, tanto no procedimento de extração líquido-líquido como também no procedimento de filtração foram observados os espectros nas regiões já descritas em referências, onde a verificação contou com a técnica de espectroscopia de fluorescência sincronizada nas análises destes fluoróforos, como a excitação acontece pela absorção da radiação eletromagnética através de suas moléculas, esse fato aconteceu quando a luz incidiu no analito. Assim, obteve-se os espectros destes HPAs quando houve uma variação na estrutura eletrônica da molécula e também quando os elétrons foram promovidos para um orbital de energia mais alta, saindo do seu estado fundamental para um estado mais excitado.

Em relação aos métodos, fica demonstrado que o método de filtração possui uma maior praticidade decorrente do manuseio experimental, e, devido ao seu baixo custo econômico, já o método de extração líquido-líquido apresenta um alto custo por conta do solvente Hexano (HPLC) e sua manutenção. A realização desta técnica exige um tempo maior de duração do processo de extração.

É importante salientar, que ambos os métodos responderam de acordo com o esperado, pois neste estudo esperava-se encontrar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pireno e benzo[a]pireno de interesse neste estudo, obtendo assim a quantificação desses compostos, pois em todas as amostras recolhidas dos pontos de coleta foram encontrados em uma quantidade de concentração com o valor de 10^{-9} g/mL.

Portanto, o método de filtração é considerado um método eficaz para esse tipo de análise e ambos os métodos extração líquido-líquido e filtração são complementares. Pelo método de ELL é possível se quantificar o total de HPAs dissolvidos na solução da amostra d'água, em contrapartida o método de FIL consegue quantificar especificamente os que estão adsorvidos na matéria orgânica particulada como, os microrganismos, restos

de algas e plantas, sendo assim, aplicando os dois métodos de extração é possível de fazer uma análise diferencial dos HPAs presentes na amostra. Pode-se primeiramente realizar uma observação da amostra como também do local de estudo, iniciando o procedimento geral em seguida aplicando o método adequado para esse tipo de estudo, se tratando de ambiente aquático, que podem ter características e condições muito variadas, dependendo do relevo, vegetação e condições climáticas.

7. REFERÊNCIAS

- [1] XU, N.; *et al.* **Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium.** BioresourceTecnologia. Vol. 149. p. 22-30. 2013.
- [2] SEMER, H., LINDEN, K.G., **Photolysis, oxidation and subsequent toxicity of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters.** Department of Civil and Environmental. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Engineering. Vol. 187, p. 186-195, 2007.
- [3] YANG Xiu-Pei; *etal.* **Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil by constant energy synchronous fluorescence detection.** Spectrochimica Acta. Vol. 69. p. 400-406. 2008.
- [4] USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Regulations.** Acessado em 05 de fevereiro de 2014. Disponível em <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>.
- [5] RODRIGUES, J. M. **Estudo de Viabilidade da Técnica de Espectroscopia de Fluorescência Sincronizada para Identificação Simultânea de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Matrizes Líquidas.** Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD. 2013.
- [6] RETNAM, A. et al. **Chemometric techniques in distribution, characterisation and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in aquaculture sediments in Malaysia.** Marine Pollution Bulletin. Vol. 69, p. 55-66, 2013.
- [7] FERRETTO N.; *etal.* **Identification and quantification of known polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in complex mixtures using fluorescence excitation–emission matrices and parallel factor analysis.** Chemosphere. Vol. p. 2014.
- [8] KIM, Ki-Hyun. *etal.* **A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects.** EnvironmentInternational. Vol. 60. p. 71-80. 2013.
- [9] NETTO, P. et al. **Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAS) e seus Derivados Nitrados (NHPAS): Uma Revisão Metodológica.** Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - Universidade Federal Fluminense .Niterói - RJ. 2000.
- [10] VALÊNCIA S.; *etal.* **Evaluation of natural organic matter changes from Lake Hohloh by three-dimensional excitationemission matrix fluorescence spectroscopy during TiO2/UV process.** Water Research. Vol. 51, p. 124-133, 2014.

- [11] HENDERSON R. K.; *etal.* **Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled watersystems: A review.** Water Research. Vol. 43, p. 863-881, 2009.
- [12] PATRA D., MISHRA, A. K., **Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, Vol. 21, p. 787-798, 2002.
- [13] PATRA D., MISHRA A. K.; **Concentration dependent red shift: qualitative and quantitative investigation of motor oils by synchronous fluorescence scan.** Talanta Vol. 53, p. 783–790, 2001.
- [14] GUITERAS, J. *etal.* **Quantitative Multicomponent Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples.** Chimica Acta. Vol. 361, p. 233-240, 1998.
- [15] HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C. P. **Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review.** Journal of Hazardous Materials. Vol. 169. Ed. 1-3. p. 1-15. 2009.
- [16] MAISTO, G. **PAHs and trace elements in volcanic urban and natural soils.** Geoderma. Vol. 136, Ed. 1-2, p. 20-27, 2006.
- [17] VIGURI J., VERDE J., IRABIEN A. **Environmental assessment of polycyclicaromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain** Chemosphere. Vol. 48, p. 157-165, 2002.
- [18] BIGUS P., TOBISZEWSKI M., NAMIEŚNIK J.; **Historical records of organic pollutants in sediment cores. Contents lists available at ScienceDirect.** Marine Pollution Bulletin. Vol. 78, p. 26–42, 2014.
- [19] COUNTWAY R. E.; DICKHUT R. M.; CANUEL E. A. **Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary.** Organic Geochemistry. Vol. 34, p. 209-224, 2003.
- [20] KIM D., YOUNG T. M., ANASTASIO C., **Phototransformation rate constants of PAHs associated with soot particles.** Science of the Total environment. Vol. 443, p. 896-903. 2013.
- [21] POTT, P. *et al.* **And Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum** From the Department of Applied Physiology, London School of Hygiene and Tropical Medicine, and the Medical College Library, St. Bartholomew's Hospital, London. 1714-1788. JR Brown, JL Thornton - British journal of industrial medicine - ncbi.nlm.nih.gov, p. 68-70, 1957.
- [22] NIKOLAOU, A. *et. al.* **Levels and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments.** Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 6, 2009.
- [23] THUENS, S. *et al.* **How suitable are peat cores to study historical deposition of PAHs.** Science of the. Total Environment. Vol. 450–451, p. 271–279. 2013.

- [24] XU F. L. et al. **Multimedia fate modeling of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Lake Small Baiyangdian**, Northern China. *Ecological Modelling*. Vol. 252, p. 246-257. 2013.
- [25] CLAXTON L. D. e WOODALL G. M. Jr. **A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air**. *Mutation Research / Avaliações em Mutation Research*. Volume 636, Edições 1-3, p. 36-94 novembro-dezembro de 2007.
- [26] RONALD, E. **Handbook of chemical risk assessment: health hazards to humans, plants, and animals**. Edição: 1. CRC Press, 2000.
- [27] ALOMIRAH, H. *et al.* **Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods**. *Food Control*, Contents lists available at ScienceDirect, Vol. 22 p. 2028-2035, 2011.
- [28] WHO (World Health Organization). **Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. WHO/SDE/WSH/03.04/59. 2003.
- [29] GROVA, N. *et al.* [¹⁴C] **Milk, urine and faeces excretion kinetics in lactating goats after an oral administration of [¹⁴C] polycyclic aromatic hydrocarbons**. *International Journal Dairy*. Vol. 12, p. 1025-1031, 2002.
- [30] ZANIERI, L. **Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area**. *ScienceDirect Chemosphere*. Vol. 67, p. 1265–1274, 2007.
- [31] WOGAN, G. N. *et al.* **Environmental and chemical carcinogenesis**. *Seminars in Cancer Biology*. vOL.14, P. 473–486 , 2004.
- [32] MARTINS, M.; COSTA, P.M.; FERREIRA, A.M.; COSTA, M.H. **Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve**. *Aquatic toxicology*. Vol. 142-143, p. 85-95, 2013.
- [33] WHO (World Health Organization). **Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. WHO/SDE/WSH/03.04/59. 2005.
- [34] YAN, J., *et al.* **Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list Mutation**. *Research / Genética Toxicologia e Mutagênese Ambiental*. Vol. 557, p. 99-108. Janeiro de 2004.
- [35] KAMEDA, T. **Atmospheric chemistry of polycyclic aromatic hydrocarbons and related compounds**. *J Health Sci*. Vol. 57. p. 504–511. 2011.
- [36] RODRIGUES, J. M. *et al.* **A espectroscopia de fluorescência sincronizada aplicada na análise qualitativa de hidrocarbonetos policíclico aromáticos em amostras d'água**. *Ciência e Natureza*, Vol. 36 Ed. Especial II, p. 782-788, 2014.

- [37] JACQUES R. J. S. **Biorremediação de Antraceno, Fenatreno e Pireno em um Argiloso**. Tese para a obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre RS. 2005.
- [38] LUTTRELL W. E., THOMAS C. J. **Toxic Tips: Benzo(a)pyrene**. *Journal of chemical Health & Safety*, November/December. 2007. Disponível em: <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-0b40683a-8546-3e8c-90fb-4685d282cdb2>. Acesso em: 05 de agosto de 2014.
- [39] RIACH, L.G. *et al.* **A review of ethyl carbamate and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination risk in cachaça and other Brazilian sugarcane spirits**. *Food chemistry*. Vol. 149. p. 159-169. 2014.
- [40] KIM D., YOUNG T. M., ANASTASIO C., **Phototransformation rate constants of PAHs associated with soot particles**. *Science of the Total environment*. Vol. 443, p. 896-903. 2013.
- [41] BRUM, D.M.; CASSELLA, R.J.; NETTO, A.D.P. **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. p. 1392-1399. 2008.
- [42] HUA, G.; KILLHAM, K.; SINGLETON, I. **Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo[a]pyrene in soil extracts**. *Environmental Pollution*. Vol. 139, p. 272-278, 2006.
- [43] USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National Primary Drinking Water Regulations**. 2006. Acessado em 05 de fevereiro de 2014. Disponível em <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>.
- [44] GORAZDA, k. *et al.* **Application of rational functions for the standard addition method**. *Talanta*. Vol. 116, p. 927-930, 2013.
- [45] XIA, G.S., Pignatello, J.J., **Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a high-organic soil**. *Environmental Science and Technology*. Vol. 35, p. 84-94, 2001.
- [46] ROCKNE, K.J., *et al.* **Distributed sequestration and release of PAHs in weathered sediment: The role of sediment structure and organic carbon properties**. *Environmental Science and Technology*. Vol. 36, p. 2636-2644, 2002.
- [47] CHIOU, C.T., *et al.* **Sorption of selected organic compounds from water to apeat soil and its humic-acid and humin fractions: potential sources of the sorption nonlinearity**. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 34, p. 1254-1258. 2000.

- [48] LUTHY, R.G., *et al.* **Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents.** Environmental. Science & Technology. Vol.31, p.3341- 3347. 1997.
- [49] SKOOG, D.A., *et al.*, **Fundamentals of Analytical Chemistry.** 8ª edição, ed. T. Learning. Belmont-USA. 91-119, 2006.
- [50] EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física Quântica**, Edit. Elsevier, Rio de Janeiro, 1979.
- [51] SILVA, J. C. J. Aula 3 – introdução a UV-VIS, QUI 070 – **Química Analítica V Análise Instrumental.** Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Instituto de Ciências Exatas Depto. de Química. Juiz de Fora - MG, 2013.
- [52] VALEUR, B; **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** p. 34-35, 2001.
- [53] RYDER, A. G. **Analysis of crude petroleum oils fluorescence spectrometry.** Ver. Fluoresc. Vol. 2, p. 169-198, 2005.
- [54] ELLINGSEN, L.; FERY-FORGUES, S.. **Application de la spectroscopie de fluorescence à l'étude du pétrole: le défi de la complexité.** Revue de l'Institut Français du pétrole. Vol. 53, p. 201-216, 1988.
- [55] GOMES S.T.; SILVA A.C., **Dourados: Urbanização e Dinâmica Climática - Eixo Temático: Climatologia: Política e Ciência.** Revista Geonorte, Edição Especial, Vol.2, Nº.4, p.844-856, 2012.
- [56] SILVA E. A. **Políticas Sócio-Ambientais: Ação do Poder Público Municipal na Cidade de Dourados-MS.** Anais XVI Encontro dos Geógrafos, Crise, práxis e autonomia: espaços de resistência e de esperanças espaço de Diálogos e Práticas. Porto Alegre - RS. 2010.
- [57] ANDRADE C. S., *et al.* **Caracterização Geofísica da Vulnerabilidade Ambiental na Cidade de Dourados.** Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais. Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD. Dourados-MS. 2012.
- [58] CETESB (Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo). **Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo.** São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, p. 540, 2008.
- [59] MOMPÉLAT S. *et al.* **Storage of natural water samples and preservation techniques for pharmaceutical quantification.** Talanta. Elsevier B.V. 2013.
- [60] BRANDÃO C. J. *et al.* **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos/** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.
- [61] XING, B.S., PIGNATELLO, J.J., **Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter.** Environmental Science and Technology. Vol. 31, p. 792- 799, 1997.

[62] HART, S. J. & JIJ, R. D. "**Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy**". Analyst. Vol. 127, p. 1693-1699, 2002.

[63] LOPES, W. A.; DE ANDRADE, J. B.; **Fontes, formação, reatividade e quantificação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) na atmosfera**. Química Nova, 19, p. 497-516. 1996.

[64] JOHN, P.; SOUTAR, I., **Identification of crude oils by synchronous excitation spectrofluorimetry**. Analytical Chemistry. Vol. 48, p. 520-524. 1976.

[65] LLOYD, J.B.F., **Synchronized excitation of fluorescence emission spectra**. Nature Vol. 231, p. 64-65, 1971.

[66] FIGUEIREDO, M. da S. **Estudo das Propriedades Ópticas e Termo - Ópticas do Biodiesel e suas Misturas**. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Física Aplicada CCET como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Centro de Ciências Exatas e Tecnologia Departamento de Física. Campo Grande/MS, 2009.

[67] BRITO, M. L., *et al.* **Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão**. Revista Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, Vol. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

[68] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, **Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Revisão 03 – FEV/2010.

[69] SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. **Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I**. Química Nova. Vol.35, nº.1, p. 223-229, 2012.

[70] PIMENTEL, M.F. and B.d.B. Neto, **Calibração: uma revisão para químicos analíticos**. Química Nova, Vol. 19, p. 268-277, 1996.

[71] RIBANI, M., *et al.* **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

[72] INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, **Normalização e Qualidade Industrial**. Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Revisão 03 – FEV/2010.

[73] ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

[74] **Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial** - INMETRO. Orientações sobre validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOC-CGCRE-008. Revisão 02. Brasília (DF): INMETRO; 2007.

[75] BRASIL, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. INMETRO: DOQ_CGCCRE-008. **Orientações sobre validação de Métodos e Ensaios Químicos**. Brasília, 2003. 35p. Revisão 03 – FEV/2010.

[76] SOKAL, R. R.; ROHLF, E. J. **The Normal Probability Distribution, Estimation and Hypothesis Testing, Introduction to the Analysis of Variance, Assumptions of Analysis of Variance, Linear Regression, Correlation in Biometry**. New York: W. H. Freeman and Company, 3ª edição, 1995.

[77] BIGUS P. *et al.* **Historical records of organic pollutants in sediment cores**. Contents lists available at ScienceDirect. Marine Pollution Bulletin Vol. 78. P. 26–42 (2014).

[78] MOLINA, R. J. *et al.* **Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plants effluents**. Talanta. Vol 111, p. 196-205, 2013.

[79] SÁNCHEZ, C. F. J. *et al.* **Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive**. Talanta, Vol. 89, p. 322-334, 2012.

[80] GONZÁLEZ, F. V. *et al.* **Solid-phase microextraction–gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons Towards the European Union water directive 2006/0129 EC**. Journal of Chromatography A. Vol. 1176, Ed. 1-2, p. 48-56, 2007.

[81] 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, p. 193-199, 2010.

[82] FERRETTO, N. *et al.* **Identification and quantification of known polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in complex mixtures using fluorescence excitation–emission matrices and parallel factor analysis**. Chemosphere. Vol. 107, p. 344-353, 2014.

[83] MADICHIE, C., GREENWAY, G.M., MCCREEDY, T. **The effects of surfactants on the analysis of organic pollutants in natural waters**. Analytica Chimica Acta. Vol. 392. p. 39-46. 1999.

[84] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre validação de Métodos de Ensaios Químicos. DOC-CGCCRE-008. Revisão N° 02. Brasília (DF): INMETRO; 2007.