



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

Extração em ponto nuvem para a determinação de benzo(a)pireno em água potável por espectrometria de fluorescência molecular

Marden Eugênio de Oliveira Silva

SAPIENTIA AEDIFICAT



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

Extração em ponto nuvem para a determinação de benzo(a)pireno em água potável por espectrometria de fluorescência molecular

Marden Eugênio de Oliveira Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Messias Bichinho

Co-orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

*Bolsista: CAPES

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Marden Eugênio de Oliveira.
Extração em ponto nuvem para a determinação de benzo(a)pireno em água potável por espectrometria de fluorescência molecular / Marden Eugênio de Oliveira Silva. - João Pessoa, 2017.
95 f. : il.

Orientadora: Dr.^a Kátia Messias Bichinho.
Co-orientador: Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Química. 2. Espectrometria - fluorescência molecular. 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. I. Bichinho, Kátia Messias. II. Araújo, Mário César Ugulino de. III. Título.


UFPB/BC

Extração em ponto nuvem para a determinação de benzo(a)pireno em água potável da cidade de João Pessoa por espectrometria de fluorescência molecular.

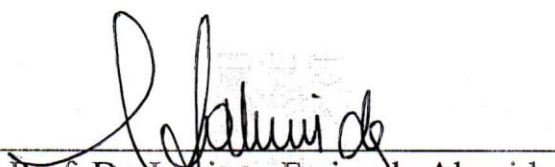
Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Marden Eugênio de Oliveira Silva e aprovada pela banca examinadora em 15 de dezembro de 2017.



Prof. Dra. Kátia Messias Bichinho
Orientadora/Presidente



Dr. Stéfani Iury Evangelista de Andrade
Examinador



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
Examinador

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Maria pela dedicação e incentivo
na minha formação.

Com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha família, pelo suporte e apoio ao longo dessa caminhada.

À Érica, pelos momentos de alegria compartilhados, carinho, companheirismo, por ser um anjo na minha vida e me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À professora Dr.^a Kátia Messias Bichinho pela orientação, dedicação, paciência e por todo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo, pelo apoio e disponibilização de todas as condições para a realização deste trabalho.

À Francisco, pela enorme contribuição ao longo da pesquisa.

À Stéfani, pela interessante contribuição no final da pesquisa.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao corpo docente da Universidade Federal da Paraíba, pela contribuição imensurável na minha formação.

Aos professores da banca de qualificação.

A CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XII
Lista de abreviaturas e siglas	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo geral	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2	5
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
2.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	6
2.1.1 <i>Estrutura química</i>	7
2.1.2 <i>Características físico-químicas dos HPAs</i>	9
2.1.3 <i>Distribuição de HPAs no ambiente aquático</i>	12
2.1.4 <i>Toxicidade</i>	12
2.1.5 <i>Benzo(a)pireno</i>	14
2.1.6 <i>Métodos analíticos para a determinação de benzo(a)pireno em águas</i>	16
2.2 Extração em ponto nuvem	19
2.2.1 <i>Surfactantes e formação micelar</i>	20
2.2.2 <i>Princípios de extração em ponto nuvem</i>	27
2.2.3 <i>Métodos analíticos para a determinação de benzo(a)pireno em águas por extração em ponto nuvem</i>	32
2.3 Espectroscopia de Fluorescência Molecular	34
2.3.1 <i>O deslocamento de Stokes</i>	37
2.3.2 <i>Transições em fluorescência</i>	38
2.3.3 <i>Fundamentos da análise quantitativa</i>	38
2.3.4 <i>Fluorescência em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos</i>	40
2.4 Calibração univariada	42
	44

CAPÍTULO 3	
3 PARTE EXPERIMENTAL	45
3.1 Reagentes e soluções	45
3.2 Limpeza de vidrarias	45
3.3 Amostras	45
3.4 Equipamentos	46
3.5 Procedimento experimental de extração em ponto nuvem e determinação fluorimétrica	47
3.6 Procedimento para construção da curva analítica	48
3.7 Procedimento para avaliar a percentagem ótima de SDS	48
3.8 Procedimento para avaliar a estabilidade da solução de benzo(a)pireno	48
3.9 Parâmetros de desempenho analítico	49
CAPÍTULO 4	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Avaliação dos comprimentos de onda de excitação	52
4.2 Avaliação da percentagem ótima de dodecil sulfato de sódio	55
4.3 Curva analítica e parâmetros de desempenho	58
4.4 Avaliação da estabilidade da solução de benzo(a)pireno	63
CAPÍTULO 5	65
5 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 – Mecanismo simplificado de síntese de HPAs a partir do etano. Fonte: MANAHAN, 1994.	6
Figura 2.2 – Estruturas de HPAs formadas a partir de diferentes tipos de fusão entre anéis aromáticos: (1) fusão linear, (2) fusão angular e (3) fusão condensada. Fonte: TEIXEIRA, 2002.	8
Figura 2.3 – Estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários. Fonte: LOCATELLI, 2010.	9
Figura 2.4 – Mecanismo de formação de B(a)P em temperaturas de 500 a 800 °C, proposto por Badger em 1962. Fonte: VASCONCELLOS, 1996.	15
Figura 2.5 – Estrutura molecular do SDS. Fonte: o autor.	21
Figura 2.6 – Variação de propriedades físico-químicas com a concentração de um surfactante iônico. Fonte: adaptado de HOLMBERG, 2002.	24
Figura 2.7 – Representação esquemática do equilíbrio dinâmico entre os monômeros em solução, monômeros na interface ar-água e micelas. Fonte: KAREL <i>et al.</i> , 2006.	25
Figura 2.8 – Algumas formas assumidas por micelas. Fonte: HOLMBERG, 2003.	26
Figura 2.9 – Representação esquemática de uma extração em ponto nuvem convencional. (1) Solução inicialmente com o analito em baixa concentração, (2) Após a adição de surfactante há a captura do analito pelo núcleo hidrofóbico das micelas e a formação das duas fases após alteração de uma das propriedades (3) Separação das fases após centrifugação. Fonte: adaptado de BEZERRA, 2006.	29

- Figura 2.10** – Representação esquemática da distribuição eletrônica de moléculas no estado fundamental singlete e estado excitado singlete. Fonte: SKOOG, 2008. 35
- Figura 2.11** – Diagrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente. Fonte: SKOOG, 2008. 36
- Figura 2.12** – Representação do deslocamento de Stokes. Fonte: ARAÚJO, 2010. 38
- Figura 3.1** – Locais de coleta de amostras indicados no mapa da cidade de João Pessoa. Fonte: GOOGLE MAPS, 2017. 46
- Figura 3.2** – Procedimento de extração em ponto nuvem para o método proposto. 47
- Figura 4.1** – Espectro típico de absorção molecular para uma solução $110 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P em acetonitrila. 52
- Figura 4.2** – Espectros de fluorescência para uma solução de B(a)P $20 \mu\text{g L}^{-1}$ com comprimento de onda de excitação variando de 280 a 380 nm. 53
- Figura 4.3** – Intensidade máxima de emissão de fluorescência em 405 nm de uma solução de B(a)P com concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para diferentes comprimentos de onda de excitação. 54
- Figura 4.4** – Espectros de fluorescência molecular de brancos analíticos com concentrações de SDS de 1,0 e 4,3 % (m v^{-1}); $\lambda_{\text{excitação}}=286 \text{ nm}$. 55
- Figura 4.5** – Espectros de fluorescência de uma solução $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P na presença de diferentes concentrações de SDS: 0,0 %; 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 %; 3,5 % e 4,5 % (m v^{-1}); $\lambda_{\text{excitação}} = 286 \text{ nm}$. 56
- Figura 4.6** – (a) Espectros de emissão normalizados de uma solução $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P na presença de diferentes concentrações de SDS: 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 57

%; 3,5 % e 4,5 % (m v-1); $\lambda_{\text{excitação}} = 286 \text{ nm}$. (b) intensidades de emissão de fluorescência (405 nm) em função da concentração de SDS.

Figura 4.7 – Curva analítica ($y = 7,1627x + 4,8644$) construída para o B(a)P com concentrações de 1 a $110 \mu\text{g L}^{-1}$ e triplicata em cada ponto. 59

Figura 4.8 – Comparação entre as curvas analíticas geradas para o B(a)P empregando-se o método proposto, a diluição com acetonitrila e com água. 61

Figura 4.9 – Intensidades de emissão obtidas para uma solução $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P medida semanalmente, ao longo de nove semanas. 63

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas dos 16 HPAs definidos como prioritários. Fonte: IPCS, 1998.	10
Tabela 2.2 – Classificação da IARC dos 16 HPAs, com relação a evidência de carcinogenicidade. Fonte: PISSINATTI, 2013; IARC, 2012.	13
Tabela 2.3 – Legislações e limites de benzo(a)pireno em água potável. Fonte: adaptado de PAVEI, 2007.	16
Tabela 2.4 – Classes de tensoativos e suas estruturas. Fonte: adaptado de MANIASSO, 2001.	23
Tabela 2.5 – Comparação das características de diferentes tipos de agregados formados com surfactantes. Fonte: BEZERRA, 2006; adaptado de MANIASSO, 2001.	27
Tabela 2.6 – Influência da concentração de ácido na separação de fases de uma solução aquosa dodecil sulfato de sódio (SDS). Fonte: NASCENTES, 2002.	30
Tabela 2.7 – Temperatura de ponto nuvem e CMC de algumas soluções aquosas de surfactantes empregados em CPE. Fonte: adaptado de QUINA, 1999.	31
Tabela 2.8 – Equações para ANOVA. Adaptado de PIMENTEL e BARROS, 1996.	42
Tabela 4.1 – Comprimentos de onda de excitação e emissão para determinação fluorimétrica de B(a)P encontrados na literatura.	54
Tabela 4.2 – Tabela de ANOVA para a avaliação do modelo univariado.	60
Tabela 4.3 – Resultados de significância da regressão e de falta de ajuste do modelo obtidos a partir da ANOVA.	60

Tabela 4.4 – Resultados para os testes de recuperação do B(a)P realizados para três níveis de concentração, baixo, médio e alto, da faixa linear. 61

Tabela 4.5 – LOD e LOQ para métodos de extração e determinação de B(a)P em água. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

B(a)P – Benzo(a)pireno

CMC – Concentração micelar crítica

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPE – Extração em ponto nuvem (do inglês, *cloud point extraction*)

CV – Coeficiente de variação

GC-FID – Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama (do inglês, *gas chromatography with flame ionization detection*)

GC-MS – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*)

HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC – Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

UV/Vis – Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

IARC – Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)

IPCS – Programa Internacional de Segurança Química (do inglês, *International Programme on Chemical Safety*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, *International Union Pure and Applied Chemistry*)

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LLE – Extrações líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*)

LOD – Limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification*)

MS – Ministério da Saúde

PONPE 7,5 – Éter polioxietileno (7,5) nonilfenil (do inglês, *polyoxyethylene 7.5 nonylphenyl ether*)

PONPE 10 – Éter polioxietileno (10) nonilfenil (do inglês, *polyoxyethylene 10 nonylphenyl ether*)

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *sodium dodecyl sulfate*)

SPE – Extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*)

US-EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, *United States Environmental Protection Agency*)

$\lambda_{\text{excitação}}$ – Comprimento de onda de excitação

$\lambda_{\text{emissão}}$ – Comprimento de onda de emissão

μ -SPE – Micro-extração em fase sólida (do inglês, *micro-solid phase extraction*)

RESUMO

SILVA, M. E. O. **Extração em ponto nuvem para a determinação de benzo(a)pireno em água potável por espectrometria de fluorescência molecular.** 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2017.

O benzo(a)pireno, B(a)P, faz parte do grupo de compostos poluentes conhecidos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Este composto apresenta grande interesse ambiental por ser o mais potente carcinógeno dentre os 16 HPAs considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA). Neste trabalho, é proposto um método para determinação de B(a)P em água potável pela técnica de extração em ponto nuvem baseada em ambiente micelar formado através do dodecil sulfato de sódio (SDS) como processo prévio à espectrometria de fluorescência molecular. As condições de excitação do B(a)P foram previamente avaliadas para obtenção de espectros de fluorescência, com o máximo de intensidade possível. O efeito da quantidade de SDS na emissão de fluorescência do B(a)P foi estudado. Outro estudo realizado foi o de estabilidade do B(a)P ao longo de nove semanas consecutivas, sendo observado que este composto mostrou-se estável, uma vez que não houve variações significativas de sinal analítico no intervalo de tempo estudado. O comprimento de onda de 286 nm para a excitação do analito foi escolhido, registrando-se um sinal de emissão máximo em 405 nm, enquanto que, dentre as concentrações de SDS para o procedimento de ponto nuvem avaliadas (0,5 % a 4,3 %), a de 1% $m v^{-1}$ correspondeu ao maior sinal de emissão do analito. A faixa de resposta linear estudada está entre 1 e 110 $\mu g L^{-1}$ com LOD e LOQ de 0,12 $\mu g L^{-1}$ e 0,37 $\mu g L^{-1}$, respectivamente. Os valores obtidos pela análise de variância mostraram que o modelo linear construído apresenta significância de regressão e é bem ajustado. Para os testes de recuperação, foram utilizados três níveis de concentrações da curva analítica, sendo obtido recuperações de 80 a 123% e o fator de melhoramento apresentou valor de 21. Por fim, o método proposto foi utilizado para a determinação de B(a)P em 10 amostras de água potável de diferentes bairros da cidade de João Pessoa. A presença de B(a)P não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, estando em conformidade com a legislação vigente, que determina um valor máximo permitido de 0,7 $\mu g L^{-1}$.

Palavras-chave: HPAs, benzo(a)pireno, extração em ponto nuvem, espectrometria de fluorescência molecular, água.

ABSTRACT

SILVA, M. E. O. **Cloud point extraction for determination of benz(a)pyrene in drinking water by molecular fluorescence spectrometry.** 2017. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, 2017.

Benz(a)pyrene (B(a)P) is part of the group of pollutants known as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). This compound is of great environmental interest because it is the most potent carcinogen among the 16 PAHs considered as priority by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA). In this work, a method for the determination of B(a)P in drinking water by the cloud point extraction technique based on micellar medium formed by sodium dodecyl sulfate (SDS) as a process prior to molecular fluorescence spectrometry is proposed. The excitation conditions of B(a)P were previously evaluated to obtain fluorescence spectra with the highest possible intensity. The effect of the amount of SDS on the fluorescence emission of B(a)P was studied. Another study carried out was the stability of B(a)P over nine consecutive weeks, and it was observed that this compound was stable, since there were no variations of analytical signal in the time interval studied. The wavelength of 286 nm for the analyte excitation was chosen, with a maximum emission signal being recorded at 405 nm, whereas among the SDS concentrations for the cloud point procedure evaluated (0.5% to 4, 3%), that of 1% $m v^{-1}$ corresponded to the highest emission signal of the analyte. The linear response range studied was between 1 and 110 $\mu g L^{-1}$ with LOD and LOQ of 0.12 $\mu g L^{-1}$ and 0.37 $\mu g L^{-1}$, respectively. The values obtained by the analysis of variance showed that the constructed linear model presents regression significance and is well adjusted. For the recovery tests, three levels of analytical curve concentrations were used, recoveries of 80 to 123% were obtained and the improvement factor presented value of 21. Finally, the proposed method was used for the determination of B(a)P in 10 drinking water samples from different districts of the city of João Pessoa. The presence of B (a) P was not detected in any of the analyzed samples, being in compliance with the current legislation which determines a maximum allowed value of 0.7 $\mu g L^{-1}$.

Keywords: PAHs, benz(a)pyrene, cloud point extraction, molecular fluorescence spectrometry, water.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) formam um amplo grupo de compostos poluentes considerados de grande interesse ambiental, principalmente devido às propriedades mutagênicas e carcinogênicas que apresentam (SICILIA *et al.*, 1999). Essas substâncias caracterizam-se por apresentar em suas estruturas dois ou mais anéis aromáticos condensados e têm origem na combustão incompleta ou pirólise de material orgânico por dois tipos de fontes: naturais como as erupções vulcânicas e queimadas espontâneas e por efeito de atividades antropogênicas, como a combustão incompleta de combustíveis fósseis e de outros materiais orgânicos (SICILIA *et al.*, 1999; WHO, 2010).

Diferentes compartimentos ambientais como ar, águas, solos e sedimentos estão suscetíveis a contaminação por HPAs, geralmente em níveis traço, o que pode causar a exposição humana aos riscos acarretados por essa classe de contaminantes (WHO, 2010). A Comissão Europeia e o Programa Internacional de Segurança Química – IPCS (do inglês, *International Programme on Chemical Safety*) concluíram que a principal fonte de emissão de HPAs é proveniente da atividade antropogênica, uma vez que a contribuição no processo de emissão por fontes naturais é considerada limitada (IARC, 1983; COMISSÃO EUROPEIA, 2002; CARUSO *et al.*, 2008). Além disso, HPAs estão relacionados dentre os contaminantes emergentes prioritários tanto nos Estados Unidos quanto na União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2008; USEPA, 2015).

A ubiquidade* dos HPAs é evidentemente o fator primordial para a contaminação do meio ambiente, sobretudo de forma indireta. Esta característica contribui para a disseminação deste grupo de compostos tornando-os continuamente presentes no meio ambiente, portanto a exposição a esses patógenos qualifica-se como inevitável (TEIXEIRA, 2002). Com isso, pesquisas focadas em HPAs intensificaram-se nas últimas décadas com o objetivo de comprovar sua presença em águas, solos, alimentos e bebidas (CARUSO *et al.*, 2008; REVISTA ACTA, 2010).

A água, por ser uma substância indispensável à vida, presente em quase todas as atividades realizadas pelo ser humano, constitui a principal via de exposição de HPAs, seja no contato direto ou por contaminação cruzada em alimentos e bebidas (CARUSO *et al.*, 2008). À vista disso, são evidentes os motivos pelos quais é possível constatar a ampla variedade de meios capazes de disseminar HPAs na sociedade e, conseqüentemente, aumentar os riscos

*Ubiquidade: Fato de estar ou existir concomitantemente em todos os lugares.

eminentes oriundos da exposição a esses compostos (TEIXEIRA, 2002; ANTONIOLLI *et al.*, 2008; PADOVANI *et al.*, 2012; LUZ, 2013).

Dentre os diversos tipos de HPAs estudados intensivamente em águas, destaca-se o benzo(a)pireno (B(a)P) por apresentar um alto potencial carcinogênico. Por este motivo, é utilizado como indicador da presença de outros tipos de HPAs em águas (LUZ, 2013). A legislação vigente no Brasil, Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde estabelece o valor máximo permitido $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P para água potável (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Dado que a água é uma fonte capital de exposição a HPAs, especialmente o B(a)P, evidencia-se a importância da utilização de métodos analíticos para a determinação deste poluente presente em níveis traço em diferentes compartimentos ambientais, especialmente em ambientes aquosos (TEIXEIRA, 2002). Desta forma, métodos de extração e pré-concentração foram desenvolvidos nas últimas décadas com a finalidade de análises em espécies orgânicas e inorgânicas, eliminando ou minimizando o uso de solventes orgânicos, geralmente empregados em extrações líquido-líquido – LLE (do inglês, *liquid-liquid extraction*) convencionais (MERINO *et al.*, 2002).

Em complementação à LLE convencional, novas abordagens têm sido utilizadas como extração assistida por ultrassom ou por micro-ondas, extração líquida pressurizada ou acelerada de solvente, extração por fluido supercrítico, extração subcrítica de água e extração em ponto nuvem – CPE (do inglês, *Cloud Point Extraction*) (MERINO *et al.*, 2002; SHUNPING *et al.*, 2010). O desenvolvimento desses novos métodos leva em consideração, principalmente, algumas variáveis como recuperação de analitos, quantidade de solvente orgânico utilizado, tempo de extração, seletividade em relação aos analitos, baixa toxicidade do solvente extrator e a ausência de etapas adicionais de limpeza após a extração (MERINO *et al.*, 2002).

A extração em ponto nuvem desenvolveu-se bastante nos últimos anos por possibilitar a pré-concentração, extração e determinação de várias espécies químicas em diferentes meios (BEZERRA *et al.*, 2006). Baseia-se na separação de uma solução micelar aquosa homogênea em duas fases líquidas isotrópicas, a fase rica em surfactante e a fase aquosa. A fase rica em surfactante, onde está contido o analito, apresenta um volume pequeno e a fase aquosa de maior volume é descartada (GORYACHEVA *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2006). A CPE é uma técnica experimental relativamente fácil, de baixo custo, além de possibilitar a redução ou

eliminação de solventes tóxicos no processo de extração e pré-concentração, sendo assim, uma técnica que está de acordo com os princípios da “Química Verde” (COSTA, 2001).

Espécies orgânicas extraídas por ponto nuvem são comumente determinadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência – HPLC (do inglês, *high performance liquid chromatography*). Porém, técnicas convencionais como esta podem apresentar altos custos e tempo de processamento das amostras (BEZERRA *et al.*, 2006). Com isso, a técnica de espectrometria de fluorescência molecular proporciona uma alternativa rápida e de baixo custo para análise de HPAs em diferentes matrizes (Guiteras *et al.*, 1998), pois esses compostos químicos apresentam luminescência na região compreendida entre 310 e 541 nm (MEIRA *et al.*, 2011).

Portanto, a CPE mostra-se como uma alternativa promissora para a determinação de espécies orgânicas, como HPAs, por espectrometria de fluorescência molecular (GORYACHEVA *et al.*, 2005).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a extração de benzo(a)pireno em amostras de água potável utilizando a técnica de extração em ponto nuvem, visando a determinação fluorimétrica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar e definir as condições experimentais para extração em ponto nuvem de benzo(a)pireno.
- Avaliar a viabilidade do uso da espectrometria de fluorescência molecular como técnica analítica para a determinação de benzo(a)pireno em amostras de água potável.
- Validar o método proposto, estabelecendo parâmetros de desempenho analítico.
- Attingir limites de detecção menores do que o valor máximo permitido na legislação brasileira.
- Aplicar o método validado para a determinação de benzo(a)pireno em amostras de água para consumo humano da cidade de João Pessoa.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A combustão incompleta ou pirólise de material orgânico é o processo pelo qual são formados os HPAs (GONZÁLEZ *et al.*, 2012). A formação dos compostos deve-se a dois mecanismos que ocorrem em temperaturas elevadas: a pirólise e a pirossíntese. No processo de pirólise, o material orgânico é fragmentado originando moléculas menores, geralmente radicais. Na sequência, esses fragmentos rearranjam-se para formar HPAs estáveis, processo chamado de pirossíntese (TEIXEIRA, 2002; BERNARDO, 2014).

Hidrocarbonetos que apresentam baixa massa molecular podem formar HPAs por pirossíntese. A síntese desses compostos é favorecida em ambiente deficiente em oxigênio e temperaturas superiores a 500°C combinados com hidrocarbonetos saturados. No processo, os radicais formados sofrem desidrogenação e são capazes de formar anéis aromáticos termicamente estáveis, processo que possibilita a formação de diferentes tipos de compostos relacionados a esse grupo de contaminantes. A formação de HPAs pode ser exemplificada a partir da desidrogenação do etano (**Figura 2.1**) em condição de temperaturas elevadas, que resulta na combinação dos radicais formados para originar anéis de benzeno (MANAHAN, 1994). A posterior condensação desses anéis resulta na formação de HPAs.

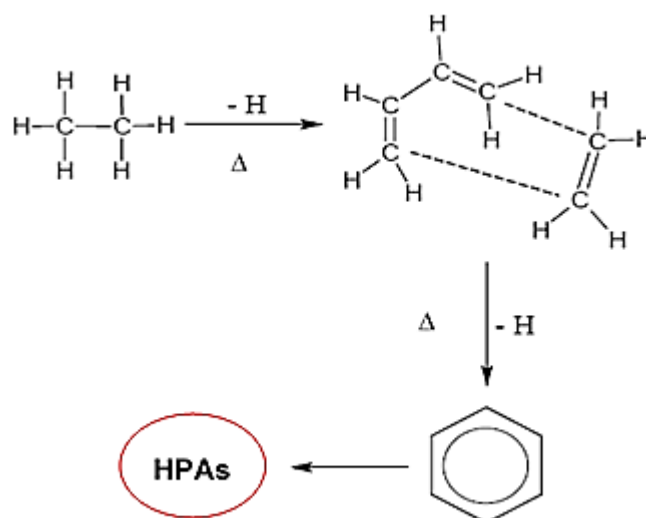


Figura 2.1 – Mecanismo simplificado de síntese de HPAs a partir do etano. Fonte: MANAHAN, 1994.

Em temperaturas entre 500°C e 900°C, a formação de HPAs é favorecida, porém é possível haver formação em temperaturas mais baixas de 100°C a 150°C, condições em que se formam compostos intermediários mais complexos e o processo é cineticamente mais lento (TEIXEIRA, 2002).

Os HPAs são introduzidos no ambiente por diferentes fontes, mas o aporte desses contaminantes é possibilitado por dois processos, o natural e o antropogênico (TEIXEIRA, 2002; BERNARDO, 2014; RUBIO-CLEMENTE *et al.*, 2014).

Naturalmente, esses poluentes são introduzidos no meio ambiente por erupções vulcânicas, incêndios florestais espontâneos, emersão de petróleo e biossíntese realizada por algas e fungos, por exemplo. Porém a contribuição natural dos poluentes é considerada ínfima quando comparada com o processo antrópico (TEIXEIRA, 2002; COSTA, 2001; CAVALCANTE, 2007; CHAVÉZ, 2015). A contribuição por efeito das atividades humanas incluiu diversos tipos de materiais, a se destacar o petróleo e derivados, produção e consumo de carvão, queima de madeira, cigarro, atividades industriais, incineração de lixo, atividades domésticas, queimadas agrícolas, processos de preparo de alimentos como defumação, frituras e torra, entre outros (CARUSO, 2008; TEIXEIRA, 2002; PONTES, 2010; COSTA, 2001; CAVALCANTE, 2007; MENICONI, 2007).

Assim sendo, é inevitável a exposição humana a HPAs, tendo em vista as diversas fontes pelas quais este grupo de compostos pode ser formado e facilmente distribuído no meio ambiente (TEIXEIRA, 2002).

2.1.1 Estrutura química

Os HPAs são compostos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos condensados estáveis constituídos de carbonos e hidrogênios (RUBIO-CLEMENTE *et al.*, 2014). A estrutura destes compostos a partir da fusão interanelar pode ser definida de três formas: (i) linear, todos os anéis arranjados em linha; (ii) angular, os anéis formam um ângulo e (iii) condensada, ao menos um anel fazendo fronteira em três lados (TEIXEIRA, 2002) (**Figura 2.2**).

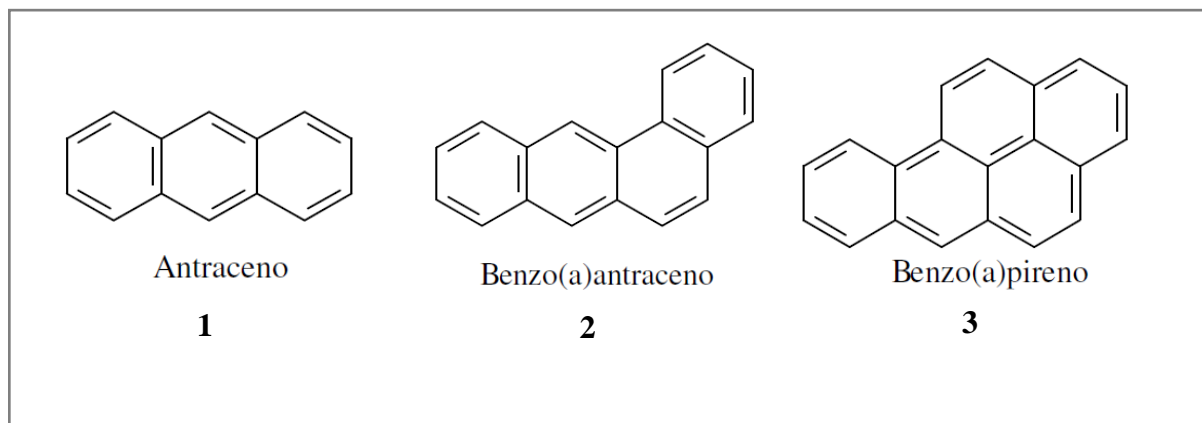


Figura 2.2 – Estruturas de HPAs formadas a partir de diferentes tipos de fusão entre anéis aromáticos: (1) fusão linear, (2) fusão angular e (3) fusão condensada. Fonte: TEIXEIRA, 2002.

Entre os mais de 500 tipos de HPAs identificados, apenas 16 são considerados poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) e indicados para a realização de extensivo monitoramento (US-EPA, 2014). As estruturas dos 16 HPAs prioritários estão representadas na **Figura 2.3**.

A estrutura química dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos os dividem em duas grandes classes, os HPAs de baixa massa molecular e os de alta massa molecular. O grupo de baixa massa molecular é formado por compostos que apresentam até quatro anéis aromáticos, enquanto que os de alta massa molecular apresentam mais de quatro anéis aromáticos. Os HPAs também podem apresentar heteroátomos em suas estruturas, podendo ser compostos derivados do nitrogênio, NHPAs, ou compostos derivados de oxigênio, OHPAs (CASTRO, 2010).

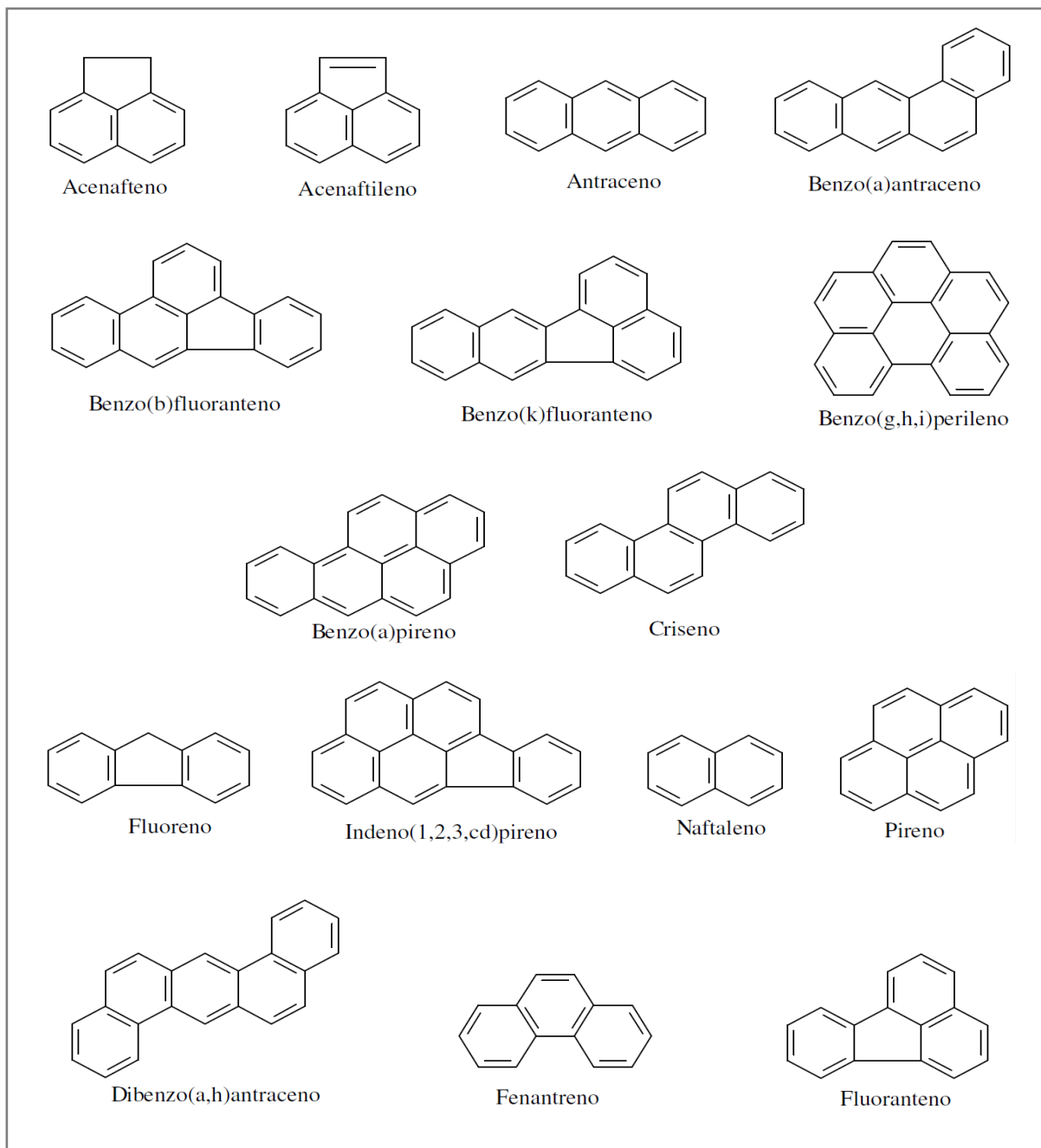


Figura 2.3 – Estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários. Fonte: LOCATELLI, 2010.

2.1.2 Características físico-químicas dos HPAs

Os HPAs são, geralmente, compostos sólidos em temperatura ambiente, de coloração pálida à amarelada, mas podem ser líquidos de cores variadas (VIEIRA, 2009; PONTES, 2010).

As massas moleculares dos HPAs apresentam valores elevados e é um dos principais fatores que determinam suas propriedades físico-químicas, que estão diretamente relacionadas às ligações duplas conjugadas que aumentam com o aumento do número de anéis aromáticos,

ou seja, são proporcionais à massa molecular (VIEIRA, 2009; TEIXEIRA, 2002). A distribuição desse tipo de composto no meio ambiente deve-se, principalmente, às suas características físico-químicas. Na **Tabela 2.1**, é possível observar algumas propriedades físico-químicas importantes dos 16 HPAs prioritários.

Tabela 2.1 – Propriedades físico-químicas dos 16 HPAs definidos como prioritários. Fonte: IPCS, 1998.

HPA	Número de anéis	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Pressão de vapor (Pa, 25°C)	Coefficiente de partição octanol/água (log K _{ow})	Solubilidade em água a 25°C (µg L ⁻¹)	Constante de Henry a 25°C (kPa)
Naftaleno	2	128,17	81	217,9	10,4	3,40	3,17 × 10 ⁴	4,89 × 10 ⁻²
Acenaftileno	3	152,20	92-93	-	8,9 × 10 ⁻¹	4,07	-	1,14 × 10 ⁻³
Acenafteno	3	154,21	95	279	2,9 × 10 ⁻¹	3,92	3,93 × 10 ³	1,48 × 10 ⁻²
Fluoreno	3	166,22	115-116	295	8,0 × 10 ⁻²	4,18	1,98 × 10 ³	1,01 × 10 ⁻²
Fenantreno	3	178,23	100,5	340	1,6 × 10 ⁻²	4,60	1,29 × 10 ³	3,98 × 10 ⁻³
Antraceno	3	178,23	216,4	342	8,0 × 10 ⁻⁴	4,50	73	7,30 × 10 ⁻²
Fluoranteno	4	202,26	108,8	375	1,2 × 10 ⁻³	5,22	260	6,50 × 10 ⁻⁴
Pireno	4	202,26	150,4	393	6,0 × 10 ⁻⁴	5,18	135	1,10 × 10 ⁻³
Benzo(a)antraceno	4	228,29	160,7	400	2,8 × 10 ⁻⁵	5,61	14	-
Criseno	4	228,29	253,8	448	8,4 × 10 ⁻⁵	5,91	2	-
Benzo(b)fluoranteno	5	252,32	168,3	481	6,7 × 10 ⁻⁵	6,12	1,2	5,10 × 10 ⁻⁵
Benzo(k)fluoranteno	5	252,32	215,7	480	1,3 × 10 ⁻⁷	6,84	0,76	4,40 × 10 ⁻⁵
Benzo(a)pireno	5	252,32	178,1	496	7,3 × 10 ⁻⁷	6,50	3,8	3,40 × 10 ⁻⁵ (20°C)
Benzo(g,h,i)perileno	6	276,34	278,3	545	1,4 × 10 ⁻⁸	7,10	0,26	2,70 × 10 ⁻⁵ (20°C)
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	6	276,34	163,6	536	1,3 × 10 ⁻⁸ (20°C)	6,58	62	2,90 × 10 ⁻⁵ (20°C)
Dibenzo(a,h)antraceno	5	278,35	266,6	524	1,3 × 10 ⁻⁸ (20°C)	6,50	0,5 (27°C)	7,00 × 10 ⁻⁶

Em águas, um dos fatores que definem a solubilidade destes compostos é a massa molecular, ou seja, a solubilidade diminui com o aumento de massa molecular (COMISSÃO EUROPEIA, 2002). No entanto, a polaridade destas espécies exerce grande influência na solubilização dos HPAs em água, ou seja, quanto maior a polaridade do composto maior é a sua solubilidade em água. Isso pode ser especialmente observado através das solubilidades do antraceno e do fenantreno, onde observa-se que ambos apresentam a mesma massa molecular,

porém o fenantreno apresenta maior solubilidade em água, já que apresenta maior polaridade (MARTINS *et al.*, 2013). Dessa forma, em geral, HPAs apresentam baixa solubilidade em água. Em contrapartida, esses compostos, por apresentarem características lipofílicas, são altamente solúveis em solventes orgânicos (TEIXEIRA, 2002). Observa-se, também, que os pontos de fusão e ebulição apresentam valores elevados como consequência do aumento da massa molecular (TEIXEIRA, 2002; PONTES, 2010).

A lipofilia em fase orgânica de HPAs é expressa e evidenciada pelo coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), que apresenta elevados valores (**Tabela 1**). Com base nos valores dos coeficientes de partição, é possível avaliar a bioacumulação dos hidrocarbonetos poliaromáticos, ou seja, a partição desses compostos entre a água e os seres vivos (PAVEI, 2007). A alta hidrofobicidade desses compostos é indicada por valores de K_{ow} elevados, entre 3,5 e 7,1, e caracteriza-os com grande capacidade de adsorção em material orgânico, assim como bioacumulação (PAVEI, 2007; CAVALCANTE, 2007). Portanto, há uma tendência desse grupo de compostos concentrarem-se em sedimentos, estarem associados à matéria orgânica em suspensão quando presentes em meio aquoso ou promoverem a bioacumulação em organismos aquáticos, justificando as baixas concentrações em águas (COSTA, 2001).

As propriedades físico-químicas primordiais para o entendimento de como os HPAs são distribuídos no meio ambiente são as pressões de vapor e as constantes de Henry. A pressão de vapor define a volatilidade dos HPAs, ou seja, uma baixa pressão de vapor significa baixa volatilidade. A pressão de vapor e, por consequência, a volatilidade desses poluentes estão inversamente relacionadas às suas massas moleculares, isso quer dizer que massas moleculares baixas acarretam em pressões de vapor e volatilidades altas, como se pode observar na **Tabela 2.1**. A solubilidade de HPAs no estado gasoso em água é determinada pela constante de Henry (BRITO, 2009). Na **Tabela 2.1**, observa-se que compostos com baixa massa molecular apresentam constantes de Henry maiores que compostos com alta massa molecular.

Essas propriedades justificam que HPAs com baixa massa molecular distribuam-se no meio ambiente através da atmosfera, por serem mais voláteis. No entanto, os hidrocarbonetos poliaromáticos com alta massa molecular são adsorvidos pelo material particulado atmosférico. Os efeitos da pressão de vapor e da constante de Henry explicam a presença considerável de HPAs em regiões sem indícios de capacidade de formação desses poluentes, pois são propriedades físico-químicas que justificam a distribuição e o transporte na atmosfera (CAVALCANTE, 2007).

2.1.3 Distribuição de HPAs no ambiente aquático

Diariamente, HPAs provenientes das mais diversas fontes são liberados no ambiente aquático. As contribuições antropogênicas de HPAs em águas são dominantes, pois a contaminação do ambiente aquático deve-se majoritariamente aos resíduos e substâncias químicas provenientes da atividade humana (POLAKIEWICZ, 2008; ARAÚJO, 2010). Entre as principais fontes, destacam-se os efluentes industriais, lançamentos de esgotos domésticos, incineração de lixo, despejos de óleo e produção de asfalto (ARAÚJO, 2010). Esses compostos caracterizam-se por distribuírem-se por toda a coluna d'água e nos sedimentos (BARROSO, 2010).

As propriedades físico-químicas dos HPAs definem o comportamento desse grupo de compostos no ambiente aquático. Em águas, são encontrados em concentrações muito baixas, pois apresentam baixas solubilidades nesse meio (LIMA, 2008). Além disso, em termos de distribuição, apresentam a característica de permanecerem relativamente próximos às suas fontes, pois as concentrações diminuem consideravelmente à medida que é maior a distância da origem. Por esse motivo, os maiores teores de HPAs nos ambientes aquáticos são encontrados em rios, estuários e águas costeiras, próximos a fonte de geração desses contaminantes (ARAÚJO, 2010).

Os destinos majoritários dos HPAs após o aporte no ambiente aquático são materiais orgânicos e inorgânicos presentes no meio, por adsorção à superfície desses materiais, logo tendendo a se depositarem no sedimento. Como consequência, a concentração desses poluentes nos ecossistemas aquáticos é maior nos sedimentos (ARAÚJO, 2010). Especificamente, o B(a)P caracteriza-se por adsorção aos sedimentos e à matéria orgânica de forma eficaz e tende à bioacumulação em organismos que habitam o ambiente aquático contaminado (DIAS, 2008).

2.1.4 Toxicidade

A ubiquidade e a comprovada toxicidade dos HPAs evidenciam as causas pelas quais este grupo de contaminantes tem recebido especial atenção pelos pesquisadores ao longo dos anos (VEIGA, 2003; ATSDR, 1995; KLEINE 2013). Estudos feitos em animais de laboratório demonstraram o surgimento de tumor a partir da inalação de ar contaminado com HPAs, através da ingestão e por meio de longo período de contato dessas substâncias com a pele dos animais. Em pessoas, o risco maior de contaminação por essas substâncias está relacionado a grupos que

trabalham ou residem em áreas diretamente ligadas a fontes de geração desses contaminantes (ATSDR, 1995; KLEINE 2013).

O grau de toxicidade dos HPAs está relacionado às suas massas moleculares. A toxicidade aguda deve-se aos compostos que apresentam baixa massa molecular (2 e 3 anéis), atinge principalmente o rim, fígado, causando inflamações cutâneas, hiperqueratose e ulcerações. Já os contaminantes que apresentam alta massa molecular (4 a 6 anéis), são responsáveis pelos efeitos carcinogênicos e mutagênicos (CAVALCANTE, 2007; VEIGA, 2003; PISSINATTI, 2013; POLAKIEWICZ, 2008). O B(a)P foi considerado o HPA mais potente pela International Agency for Research on Cancer (IARC) após a atualização da classificação toxicológica realizada em 2012 (PISSINATTI, 2013; IARC, 2012). Na **Tabela 2.2**, encontra-se a classificação da IARC dos 16 HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade.

Tabela 2.2 – Classificação da IARC dos 16 HPAs, com relação a evidência de carcinogenicidade. Fonte: PISSINATTI, 2013; IARC, 2012.

HPAs	Grupo IARC ^a
Naftaleno	2B
Acenaftileno	não classificado
Acenafteno	3
Fluoreno	3
Fenantreno	3
Antraceno	3
Fluoranteno	3
Pireno	3
Benzo(a)antraceno	2B
Criseno	2B
Benzo(b)fluoranteno	2B
Benzo(k)fluoranteno	2B
Benzo(a)pireno	1
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	2B
Dibenzo(a,h)antraceno	2A
Benzo(g,h,i)perileno	3

^aGrupo 1: carcinogênico para humanos; Grupo 2A: provável carcinogênico para humanos; Grupo 2B: possível carcinogênico para humanos; Grupo 3: falta evidências quanto à carcinogenicidade para humanos.

É importante salientar que o benzo(a)pireno destaca-se dos demais, pois é o único composto classificado como carcinogênico para humanos.

A exposição humana aos HPAs pode ocorrer por inalação, contato com a pele ou pela ingestão. Estes compostos não apresentam atividade carcinogênica ou mutagênica, porém, podem exercer estes efeitos em organismos vivos através da ativação metabólica que ocorre por processos químicos ou bioquímicos (CAVALCANTE, 2007; MENICONI, 2007; PISSINATTI, 2013). O mecanismo mais aceito de ativação metabólica de HPAs é a oxidação dos anéis aromáticos por enzimas catalisadas pelo citocromo P450 formando compostos eletrofílicos passíveis de ligações covalentes com o DNA, assim gerando células com uma nova mensagem genética. Por esta característica, esse grupo de compostos é mais adequadamente caracterizado como pró-carcinogênicos, isto é, a sua atividade tóxica depende da sua transformação metabólica específica (CAVALCANTE, 2007).

2.1.5 Benzo(a)pireno

Por seu alto potencial carcinogênico e mutagênico, o B(a)P é utilizado como marcador da presença de outros HPAs em amostras ambientais, alimentos e bebidas (LUZ, 2013; KAZEROUNI, 2001; VAN DER WIELEN, 2006; TORRE, 2014).

O B(a)P contém em sua estrutura química cinco anéis aromáticos condensados. Apresenta aparência de cristais amarelo-pálidos em forma de agulhas, é muito pouco volátil e inodor, é pouco solúvel em água, mas é solúvel em solventes orgânicos, apresenta pontos de fusão e ebulição elevados, baixas pressões de vapor, é um composto pró-cancerígeno (DIAS, 2008).

Assim como os demais HPAs, o B(a)P é formado a partir da combustão incompleta ou pirólise de material orgânico por atividades naturais e antropogênica (IARC, 2012) (**Figura 2.4**). No entanto, esse poluente apresenta maior índice de formação por atividades humanas. Entre as principais fontes antropogênicas pode-se destacar a indústria de ferro, emissão de veículos a diesel, e a gasolina, partículas sólidas perto da estrada, fontes de combustão, queima industrial de petróleo, queima de madeira, queima de incenso e óleo de cozinha (DIAS, 2008).

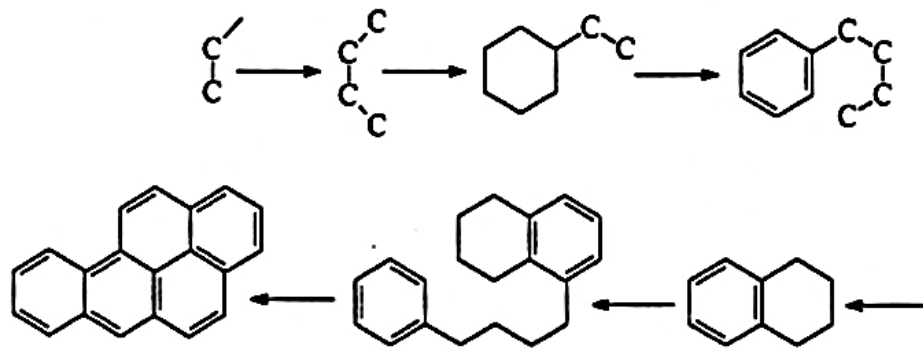


Figura 2.4 – Mecanismo de formação de B(a)P em temperaturas de 500 a 800 °C, proposto por Badger em 1962. Fonte: VASCONCELLOS, 1996.

A toxicidade do B(a)P foi evidenciada a partir de experimentos em animais de laboratório, onde se observou a formação de compostos intermediários carcinogênicos passíveis de realizarem ligações com proteínas, DNA e RNA. Diferentes vias de exposição humana ao benzo(a)pireno são possíveis, dentre elas a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou água contaminada. A exposição ao B(a)P também pode acontecer pelo hábito de fumar e a exposição ocupacional em ambientes propícios a formação deste composto (DIAS, 2008).

A bioacumulação de B(a)P no organismo humano é favorecida por sua característica lipofílica, conferindo-lhe facilidade de penetrar nas membranas celulares e permanecer no organismo indefinidamente (REVISTA ACTA, 2010; BARROSO, 2010).

Por ser um dos poluentes prioritários, apresentar propriedades carcinogênicas e mutagênicas e possibilidade de bioacumulação, há necessidade de monitorar a concentração de B(a)P em alimentos, assim como no ar, água e solo (DIAS, 2008; ALMEIDA, 2010). Algumas legislações foram criadas referentes aos limites de B(a)P em águas destinadas ao consumo humano. Tanto órgãos internacionais quanto brasileiros demonstram preocupação em relação a este tipo de poluente, uma vez que se nota rigidez em legislações que regulamentam as concentrações de B(a)P em águas superficiais e para consumo humano (LUZ, 2013; PAVEI, 2007; ALMEIDA, 2010) (**Tabela 2.3**).

Tabela 2.3 – Legislações e limites de benzo(a)pireno em água potável. Fonte: adaptado de PAVEI, 2007.

Órgão/Legislação	Tipo	Limite máximo permitido, $\mu\text{g L}^{-1}$
CONAMA ¹ / Resolução nº 357/2005	Águas superficiais	0,05
MS ² / Portaria nº 2914/11	Água potável	0,7
US EPA ³	Água potável	0,2

1 - Conselho Nacional do Meio Ambiente; 2 - Ministério da Saúde; 3 - Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana.

A maior rigidez em relação a concentração máxima de B(a)P para águas superficiais deve-se à preocupação relacionada ao lançamento deste poluente em níveis nocivos ou perigosos tanto para seres humanos quanto para outras formas de vida, buscando por meio desta legislação manter o equilíbrio ecológico aquático, a saúde e o bem-estar humano (CONAMA, 2005)

2.1.6 Métodos analíticos para a determinação de benzo(a)pireno em águas

O desenvolvimento de metodologias analíticas para identificação e determinação de B(a)P tem recebido atenção especial por pesquisadores e autoridades públicas, uma vez que as evidências de ameaças desse composto a saúde humana são altamente contundentes. Ressalta-se que a contaminação ambiental é o principal meio pelo qual há a exposição humana a esse contaminante, sendo possível encontrá-lo em matrizes ambientais complexas e na maioria das vezes em concentrações muito baixas, com isso, expõe-se a necessidade de utilização de métodos analíticos cada vez mais seletivos e que apresentem alta sensibilidade (DIAS, 2008).

López-López e colaboradores (2017) propuseram pela primeira vez a aplicação da microextração em fase líquida suportada com fibra na configuração de microextração com barra sortiva para a extração dos 16 HPAs prioritários em água do mar. A separação, identificação e quantificação dos compostos foram realizadas usando a cromatografia gasosa acoplada com um espectrômetro de massas. Para esse método, foram obtidos limites de detecção no intervalo de 0,21 a 0,82 ng L^{-1} e faixa linear até 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação média de HPAs em amostras de água do mar foi de 99% (LÓPEZ-LÓPEZ *et al.*, 2017).

Villar-Navarro e colaboradores (2017) propuseram um método de análise baseado em polímeros magnéticos molecularmente impressos para a determinação dos 16 HPAs prioritários e determinação por HPLC. O método validado foi utilizado em água de torneira, águas de rios, lagos e água mineral. Os limites de detecção para os analitos investigados variaram de 1,3 a 969 ng L^{-1} . Os testes de recuperação apresentaram variações de

46 a 100 %, com RSDs menores que 10% para todos os analitos (VILLAR-NAVARRO *et al.*, 2017).

Um dispositivo adsorativo sensível e rápido, apto a extrair substâncias químicas de interesse diretamente da matriz da amostra, foi proposto por Amiri e Ghaemi (2017). O dispositivo em evidência é composto de grafeno cultivado em malha de aço e suas vantagens foram sondadas em combinação com cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama – GC-FID (do inglês, *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*) na determinação de HPAs em amostras de águas. Os parâmetros ajustados para a otimização da extração foram a velocidade de agitação, o tempo de extração, a força iônica e as condições de dessorção. Limites de detecção entre 1 e 3 pg mL⁻¹ foram obtidos, com valores de RSD na faixa de 4,9 a 8,7% e a repetibilidade do método foi realizada para dois níveis de concentração, 0,01 e 10 ng mL⁻¹, obtendo-se valores entre 5,5 a 8,7 para o primeiro nível de concentração e 4,9 a 7,9 para o segundo (AMIRI e GHAEMI, 2017).

Shokouh e colaboradores (2017) aplicaram a extração em fase sólida magnética em amostras de água de rio, águas residuais e água de cachimbo (narguilé). A extração foi realizada com um nanocomposto do tipo Fe₃O₄@SiO₂@GO-PEA sintetizado pelos autores, capazes de adsorver moléculas de HPAs. Após a extração e posterior dessorção, o analito foi quantificado por GC-FID. Os limites de detecção calculados foram de 0,005 a 0,1 µg L⁻¹ com o coeficiente de regressão linear maior que 0,9954 e desvios padrão relativos de 5,8% para medidas realizadas no dia e 6,2 % para dias posteriores. Recuperações no intervalo entre 71,7% e 106,7% foram encontradas para as determinações. Não foram detectados HPAs nas amostras de água de rio, enquanto concentrações de 7,43 µg L⁻¹ de fenantreno e valores abaixo do limite de quantificação para fluoreno e benzo(a)antraceno foram encontradas. Por fim, concentrações de 10,34 a 78,60 µg L⁻¹ para acenaftileno, antraceno, fenantreno foram encontradas nas amostras de água de cachimbo, além de valores de fluoreno e pireno abaixo dos respectivos limites de quantificação (SHOKOUH *et al.*, 2017).

Sadeghi e colaboradores (2016) usaram a microextração líquido-líquido dispersiva combinada com a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *gas chromatography–mass spectrometry* – GC-MS) para a extração e determinação de 13 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos prioritários em amostras de água mineral. Para esse trabalho, os solventes extrator e dispersor que resultaram em melhores resultados para a análise foram o clorofórmio e a acetona, respectivamente. O fator de enriquecimento

encontrado estava na faixa de 93 a 129 % e a recuperação entre 71 e 90%. A faixa linear para todos os HPAs foi de 0,10 a 2,80 ng mL⁻¹, o desvio padrão relativo para cada analito determinado na água mineral apresentou-se no intervalo de 4 a 11% e o limite de detecção para diferentes HPAs no intervalo de 0,03 e 0,1 ng mL⁻¹. Com isso, os autores concluíram que as duas técnicas utilizadas em combinação resultaram em satisfatórios valores de recuperação e precisão (SADEGHI *et al.*, 2016).

Al-Rashdi (2016) apresentou um método rápido e simples para separação e determinação de cinco HPAs em água de torneira que consiste na extração seletiva dos contaminantes por nanopartículas magnéticas combinadas com a técnica de dispersão em fase sólida, utilizando-se a facilidade de dispersão dessas partículas em amostras de água. Os analitos foram quantificados por HPLC após serem separados da fase aquosa com um ímã e eluídos com metanol. O método desenvolvido mostrou-se simples, exato, preciso, rápido utilizando pequenas quantidades de solventes, tornando-o uma alternativa aos métodos tradicionais de extração como a extração de Soxhlet, a extração assistida por ultrassom e a extração líquido-líquido. Os procedimentos de recuperação dos analitos resultaram em percentuais satisfatórios compreendidos entre 88 e 96%, evidenciando a eficiência do uso das nanopartículas magnéticas. Além disso, mostraram-se estáveis e passíveis de reutilização mesmo após quatro aplicações. O método foi empregado com êxito e os limites de detecção obtidos dispostos entre os valores de 0,14 e 0,31 ng L⁻¹ para os analitos em questão (AL-RASHDI *et al.*, 2016).

Naing e colaboradores (2016) sintetizaram e empregaram a quitosana magnética funcionalizada com óxido de grafeno em microextração em fase sólida combinada GC-MS para determinação de sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras de água de rio. Para o objetivo do trabalho, foram sintetizados três tipos de partículas magnéticas funcionalizadas utilizando quitosana reticulada com glutaraldeído e óxido de grafeno com diferentes quantidades de magnetita (Fe₃O₄), caracterizados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. Os parâmetros utilizados para otimização do método de extração foram: tipo de sorvente, tempos de extração e dessorção, o volume da solução da amostra e o tipo de solvente de dessorção. Os limites de detecção encontrados para os analitos variaram de 0,2 a 1,8 ng L⁻¹, RSDs variaram de 2,1 a 8,2 %, recuperações no intervalo de 67,5 a 106,9 % e fatores de enriquecimento entre 67 e 302 (NAING *et al.*, 2016).

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com álcool polivinílico, produzidos sob condições de temperatura de congelamento, foram preparados por Kueseng e colaboradores (2010) e utilizados como sorvente para extração em fase sólida, com o objetivo de extrair e pré-concentrar três HPAs em amostras de águas de reservatório, poços, águas residuais e de efluentes. As amostras foram analisadas por HPLC e detectadas por fluorescência. O método proposto mostrou-se eficiente, uma vez que foi quantificado benzo(a)pireno com concentração de $7,0 \text{ ng L}^{-1}$ em água de poço e benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno em águas residuais em concentrações variando de $9,0$ a $22,0 \text{ ng L}^{-1}$. Além disso, foram obtidos percentuais de recuperação entre 89 e 98%, com desvios-padrão menores que 8%. O benzo(a)pireno e o benzo(a)antraceno apresentaram limites de detecção de $5,0 \text{ ng L}^{-1}$ enquanto que para o benzo(b)fluoranteno foi obtido o valor de $8,0 \text{ ng L}^{-1}$ (KUESENG *et al.*, 2010).

2.2 Extração em ponto nuvem

Análises de contaminantes ambientais frequentemente representam uma tarefa difícil, uma vez que estas espécies estão distribuídas de diferentes formas nos compartimentos ambientais e encontram-se em concentrações traço ou ultratraço. Determinações deste cunho podem também ser dificultadas por interferentes ou por efeitos de matriz inerentes à cada tipo de amostra. Portanto, métodos analíticos de extração e pré-concentração são indispensáveis para contornar problemas desta magnitude, pois além de isolarem o analito da matriz, reduzem, controlam e eliminam interferentes presentes originalmente no meio (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; BEZERRA, 2006).

Métodos de extração e pré-concentração combinados com técnicas de detecção são amplamente utilizados em diversas análises químicas, por isso, apresentam grande interesse em Química Analítica e Ambiental, haja vista que a eliminação de efeitos de matriz e interferentes são possíveis e complementam técnicas pertinentes para a detecção de analitos. (BEZERRA, 2006). Para esta finalidade, técnicas como precipitação, co-precipitação e destilação estão entre as primeiras utilizadas (PALEOLOGOS *et al.*, 2005). Técnicas de extração líquido-líquido – LLE (do inglês, *liquid-liquid extraction*) convencionais também são amplamente reportadas na literatura, porém o tempo consumido e o volume de solventes orgânicos utilizados tornam o método tedioso e prejudicial ao meio ambiente (MERINO *et al.*, 2002). Como alternativa a estes problemas acarretados pela LLE, a extração em ponto nuvem – CPE (do inglês, *cloud*

point extraction) mostra-se promissora por reduzir tanto a quantidade de solventes utilizados quanto o tempo de preparo das amostras, além de apresentar exatidão e precisão adequadas e estar de acordo com os princípios da Química Verde (MARANHÃO, 2007).

A turbidez de uma solução aquosa de surfactante causada por adição de uma substância apropriada ou pela alteração de algumas de suas propriedades, como pressão e temperatura, provocam o fenômeno de ponto nuvem. Este fenômeno é a base para CPE. No momento em que a solução aquosa de surfactante torna-se turva diz-se que atingiu o ponto nuvem. Nesse momento, há a separação da solução em duas fases isotrópicas, uma fase micelar que apresenta maior concentração de surfactante e pequeno volume, chamada de fase rica, e outra fase aquosa com baixa concentração de surfactante e grande volume. A primeira é a fase de interesse onde se encontra o analito, já a outra fase deve ser descartada (BEZERRA, 2006).

A primeira publicação referente a esta técnica aconteceu em 1978, idealizada por Watanabe e Tanaka, utilizada com o intuito de diminuir o uso de solventes orgânicos (WATANABE e TANAKA, 1978). Desde então desenvolveu-se gradativamente, sendo empregada em extrações de várias espécies químicas, tanto orgânicas como inorgânicas (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; BEZERRA, 2006).

2.2.1 Surfactantes e formação micelar

Surfactantes, também conhecidos por tensoativos, apresentam a capacidade de alterar algumas propriedades reacionais, assim como diminuir a tensão superficial do meio ao qual estão presente e a tensão interfacial, que é definido como limite entre duas fases imiscíveis. Essa classe de substâncias, devido a essas características, apresenta relevante importância em Química Analítica, pois o ganho de seletividade e sensibilidade analíticas quando utilizadas são evidentes (MANIASSO, 2001). A ação exercida por surfactantes no meio onde estão presentes os caracteriza como agentes de superfície ativa (do inglês, *surface-active agent*). Em português, a palavra surfactante é derivada da contração dessa expressão em inglês (BEZERRA, 2006).

Tensoativos são moléculas anfifílicas, pois apresentam em suas estruturas dois grupos distintos, uma região hidrofóbica formada por uma longa cadeia de hidrocarbonetos e uma região hidrofílica, também chamada de grupo cabeça, composto por um grupamento polar ou iônico (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; PELIZZETTI *et al.*, 1985; YAZDI, 2011). Tipicamente, a estrutura de um surfactante pode ser representada por R-X, na qual R é, geralmente, uma

longa cadeia de hidrocarbonetos contendo de 8 a 18 átomos de carbono, porém pode também apresentar uma longa cadeia de fluorocarbonetos, uma cadeia de siloxano ou uma curta cadeia polimérica e X é um grupo cabeça polar ou iônico (PELIZZETTI *et al.*, 1985; KAMAL *et al.*, 2017) (**Figura 2.5**). A classificação dos surfactantes é definida de acordo com a natureza do grupo cabeça (X) dividindo-se em não iônicos, catiônicos, aniônicos e anfóteros (PELIZZETTI *et al.*, 1985).

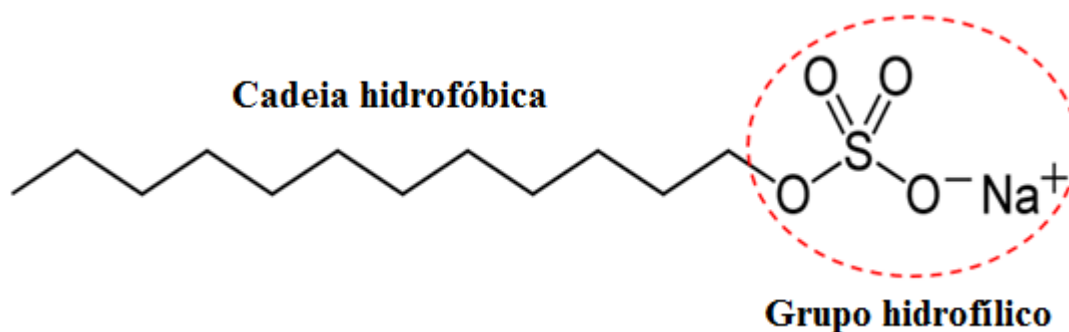


Figura 2.5 – Estrutura molecular do SDS. Fonte: o autor.

Surfactantes aniônicos apresentam no grupo hidrofílico uma carga negativa ligada a um contraíon. Quando dissolvidos em água, essas moléculas assumem uma carga negativa, uma vez que há a dissociação do surfactante em água, que é um sal. Por consequência, o contraíon separa-se do restante da molécula (DALVIN, 2011). A carga negativa suportada pelo grupo cabeça pode ser íon carboxilato, sulfato, sulfonato ou fosfato (MYERS, 1999; HOLMBERG, 2003; BEZERRA, 2006). Esta classe de surfactantes é a mais utilizada pelo fato de apresentar tanto baixo custo como facilidade para a produção. Estima-se que os surfactantes aniônicos representam 60% da produção mundial de tensoativos (HOLMBERG, 2003). Íons sódio, potássio, amônio, cálcio e diferentes alquilaminas protonadas são, normalmente, os contraíons mais usados. Esses contraíons revelam características do surfactante em água ou óleo. Por exemplo, íons sódio e potássio conferem solubilidade em água, já os íons cálcio e o magnésio promovem solubilidade em óleo (HOLMBERG, 2003).

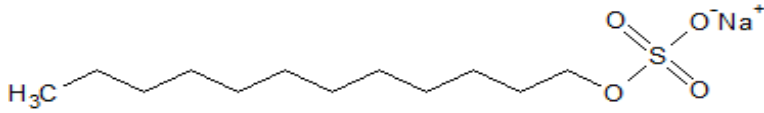
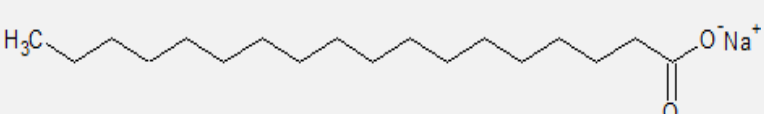
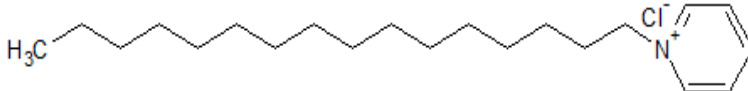
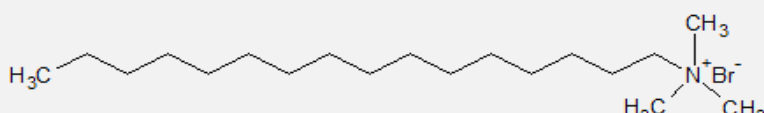
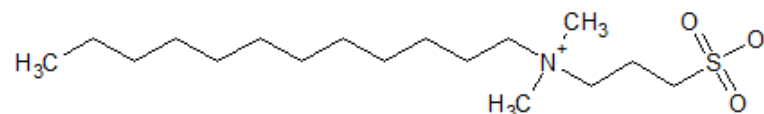
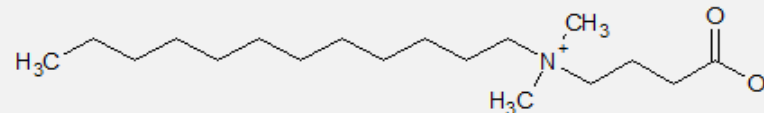
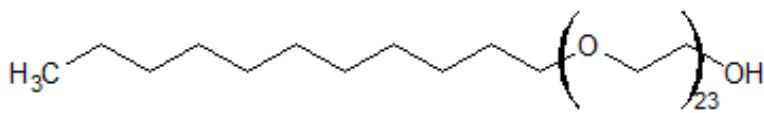
Os tensoativos catiônicos suportam no grupo cabeça uma carga positiva ligada a um contraíon, possuem a fórmula geral $R_nX^+Y^-$, no qual R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X um elemento apto a compor uma estrutura catiônica e Y um contraíon. Assim como os surfactantes aniônicos, os catiônicos dissociam-se em água resultando na estrutura catiônica (R_nX^+) e no contraíon (Y^-) elucidados previamente. Na estrutura do surfactante, X pode ser N, P, As, Bi, S, Te e os halogênios, uma vez que estes elementos apresentam alta

eletronegatividade. Em muitas moléculas de tensoativos desta classe, os elétrons compartilhados entre um destes elementos que formam a região catiônica do grupo cabeça são parcialmente atraídos, assim há o enfraquecimento da carga positiva do surfactante na região hidrofílica da molécula e, como consequência, a polaridade dessa região também é reduzida (BEZERRA, 2006, DALTIM, 2011). Com isso, a solubilidade em água dos surfactantes catiônicos diminui com a polaridade, pois a quantidade de cargas contidas num surfactante define sua solubilidade, ou seja, maior será a solubilidade do tensoativo em água quando maior for a carga, seja ela positiva ou negativa. Assim, esse fator de atenuação de polaridade que acontece normalmente em tensoativos catiônicos faz com que estes sejam menos solúveis em água que os aniônicos (DALTIM, 2011).

Os surfactantes que apresentam em sua estrutura tanto o grupo catiônico como o grupo aniônico são conhecidos como anfóteros. Desse modo, o comportamento das moléculas de tensoativo dessa classe é ditado pelo valor de pH do meio, ou seja, podem atuar como espécie aniônica, catiônica ou neutra (BEZERRA, 2006; MANIASSO, 2001; DALTIM, 2011). Entre os surfactantes anfóteros mais comuns, estão o N-alquil betaína e sultaína, C-alquil betaína e sultaína, assim como álcool amino fosfatidil e seus ácidos (BEZERRA, 2006; MANIASSO, 2001).

Existem ainda os surfactantes que não apresentam cargas no grupo hidrofílico, no entanto são solúveis em água graças a grupos altamente polares nesta região como grupos hidroxila ou unidades de óxido de etileno. Esses surfactantes são conhecidos como não iônicos e são derivados do polioxietileno e polioxipropileno ou poliálcoois, ésteres de carboidratos, amidas de álcoois graxos e óxidos de amidas graxas (BEZERRA, 2006; MANIASSO, 2001; DALTIM, 2011). Na **Tabela 2.4**, pode-se observar exemplos dos tipos de tensoativos.

Tabela 2.4 – Classes de tensoativos e suas estruturas. Fonte: adaptado de MANIASSO, 2001.

Classe	Estrutura química
Aniônicos	 <p>Dodecil sulfato de sódio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}^+$</p>
	 <p>Octadecanoato de sódio $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-\text{Na}^+$</p>
Catiônicos	 <p>Cloreto de cetilpiridino (CICP) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+\text{C}_5\text{H}_5\text{Cl}^-$</p>
	 <p>Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$</p>
Anfóteros	 <p>3-(dodecildimetil amônio) propano-1-sulfonato (SB 12) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$</p>
	 <p>4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{COO}^-$</p>
Não iônicos	 <p>Polioxiétileno (23) dodecanol (brij 35) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{23}\text{OH}$</p>

Os surfactantes agregam-se espontaneamente em solução aquosa para formar aglomerados de tamanho coloidal conhecidos como micelas (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; MANIASSO, 2001; QUINA *et al.*, 1999). Quando a concentração de surfactantes em solução é baixa, encontram-se principalmente na forma de monômeros no meio, no entanto, a presença de dímeros e trímeros também é observada (PALEOLOGOS *et al.*, 2005). A concentração na qual as micelas começam a se formar é chamada de concentração micelar crítica (CMC) (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; MANIASSO, 2001; QUINA *et al.*, 1999). A formação das micelas ocorre em um intervalo curto de concentrações e pode ser evidenciada experimentalmente pela variação de algumas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do surfactante (MANIASSO, 2001), como é observado na **Figura 2.6**.

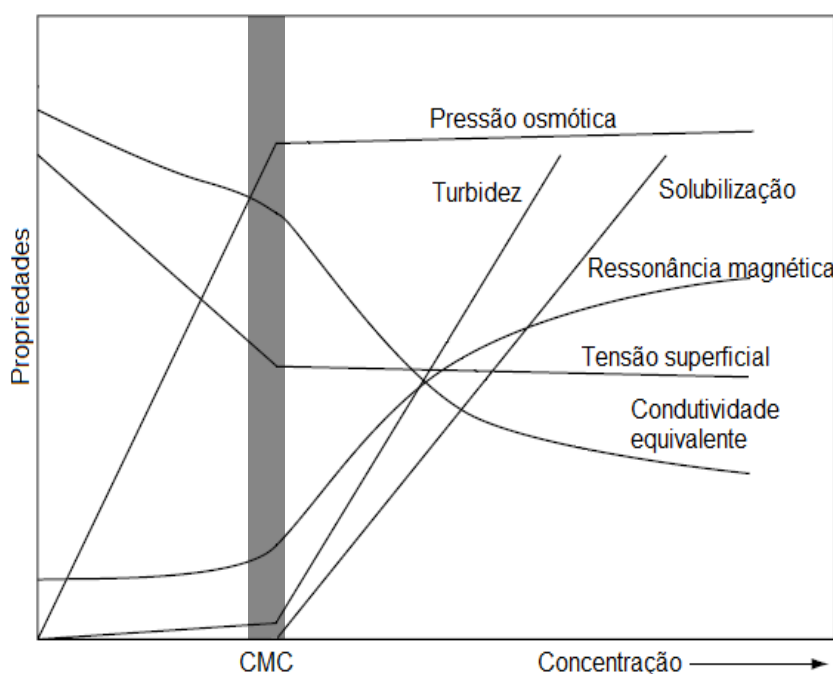


Figura 2.6 – Variação de propriedades físico-químicas com a concentração de um surfactante iônico. Fonte: adaptado de HOLMBERG, 2002.

Cada tensoativo apresenta um valor de CMC característico que depende, principalmente, da estrutura do composto e é afetado pelas propriedades do solvente, temperatura e presença de outras substâncias, como eletrólitos fortes (KAREL *et al.*, 2006).

Em soluções aquosas diluídas, as moléculas tensoativas distribuem-se majoritariamente na forma de monômeros, sua ação acarreta em uma redução da tensão superficial, uma vez que se orientam na interface das soluções (ROSSI *et al.*, 2006). À medida que a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta e atinge a CMC, há o favorecimento da formação micelar.

A partir deste ponto, é estabelecida uma relação de equilíbrio dinâmico entre os monômeros em solução, monômeros na interface ar-água e micelas (BEZERRA, 2006). Em meio aquoso, a estrutura da micela apresenta uma camada exterior formada pelos grupos cabeça das moléculas de surfactante direcionados para o contato com as moléculas de água e a região hidrofóbica da molécula orienta-se para o interior da micela, no sentido inverso ao da água, protegida pela camada exterior hidrofílica, formando um núcleo central apolar (MANIASSO, 2001; QUINA *et al.*, 1999; DAVE *et al.*, 2017), conforme mostrado na **Figura 2.7**.

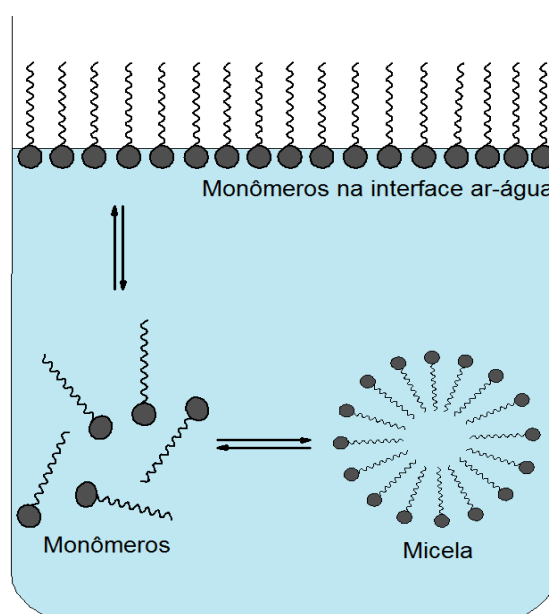


Figura 2.7 – Representação esquemática do equilíbrio dinâmico entre os monômeros em solução, monômeros na interface ar-água e micelas. Fonte: KAREL *et al.*, 2006.

O número de agregados é definido como a quantidade de moléculas de surfactante que constitui uma micela, desse modo o tamanho da micela é expresso pela medida do número de agregados presentes na estrutura micelar (DAVE *et al.*, 2017). A forma da micela é, normalmente, descrita na literatura como esférica, porém associações de micelas na forma cilíndrica, lamelar e outras também são relatadas (QUINA *et al.*, 1999; DAVE *et al.*, 2017). As micelas lamelares formam-se em concentrações muito superior à CMC, de tal modo que as moléculas de água direcionam-se para a região localizada entre folhas paralelas de tensoativo (**Figura 2.8**). A estrutura do surfactante muitas vezes é responsável pela forma da micela, ou seja, o tamanho do grupo cabeça e da cadeia hidrocarbônica exercem grande influência na constituição micelar. Por exemplo, as micelas formadas por surfactantes iônicos são menores

do que as não iônicas, pois a repulsão eletrostática entre os grupos cabeça iônicos é maior que a interação entre os grupos cabeça não iônicos (DAVE *et al.*, 2017).

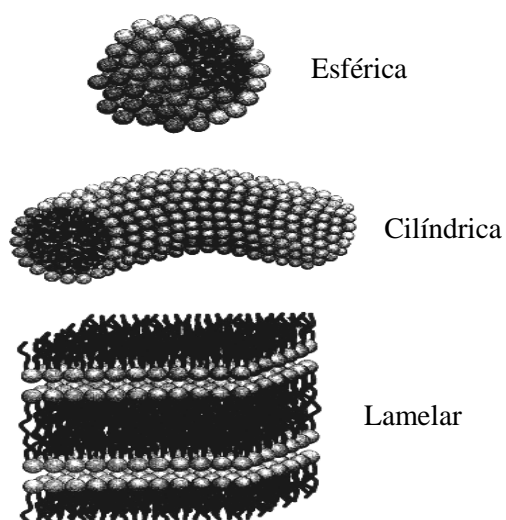
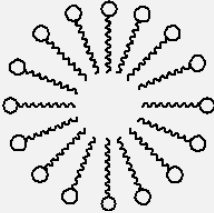
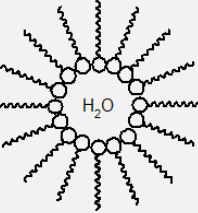
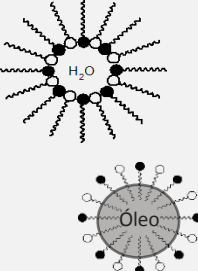
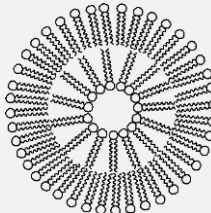


Figura 2.8 – Algumas formas assumidas por micelas. Fonte: HOLMBERG, 2003.

Os surfactantes apresentam características singulares de dissolução, tanto em água quanto em outros solventes, graças à combinação de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única molécula (BEZERRA, 2006). As micelas que se formam em meio aquoso são intituladas micelas normais, no entanto esses agregados de tamanho coloidal também podem se manifestar em diferentes solventes apolares. À essa aglomeração de moléculas tensoativas dá-se o nome de micelas reversas ou micelas invertidas, onde os grupos hidrofílicos das moléculas formam um núcleo polar e o grupo hidrofóbico interage com o solvente apolar (MANIASSO, 2001). Além das micelas normais e reversas, outros tipos de ambientes organizados podem ser gerados de acordo com a estrutura química da molécula tensoativa e a natureza do meio, como é apresentado na **Tabela 2.5** (BEZERRA, 2006).

Tabela 2.5 - Comparação das características de diferentes tipos de agregados formados com surfactantes. Fonte: BEZERRA, 2006. Fonte: adaptado de MANIASSO, 2001.

Características	Micelas	Micelas inversas	Micro emulsões	Vesículas
Constituinte	Surfactante	Surfactante	Surfactante, co-surfactante, solvente apolar	Surfactante com duas caudas
Preparo	Dissolver o surfactante em água acima da CMC	Dissolver o surfactante em solvente apolar	Dissolver o surfactante e co-surfactante numa mistura de solventes apolar-água	Submetendo a solução de surfactante a ultrassom
Estrutura				
Massa molecular média	2.000-6.000	2.000-6.000	10^5 - 10^6	$>10^7$
Diâmetro (Å)	30-60	40-80	50-100	300-10.000

2.2.2 Princípios de extração em ponto nuvem

A CPE baseia-se no fenômeno em que uma solução aquosa de surfactante torna-se turva após a alteração de alguma propriedade ou a adição de alguma substância, tal fenômeno é chamado de ponto nuvem. Em surfactantes catiônicos, não iônicos ou anfóteros acima da CMC, esse fenômeno se manifesta quando aquecidos em determinada temperatura, também chamada de temperatura de ponto nuvem, que é específica para cada tipo de tensoativo. Após esse processo de aquecimento, a solução inicial torna-se turva separando-se em duas fases isotrópicas (BEZERRA, 2006; MANIASSO, 2001; YAZDI, 2011). Em surfactantes aniônicos, o fenômeno de ponto nuvem acontece quando se eleva a concentração ácida do meio, pois a repulsão entre os monômeros é reduzida como consequência da protonação, favorecendo a

separação das fases, o que permite sua utilização para propósitos de pré-concentração de substâncias (BEZERRA, 2006).

Portanto, para objetivos práticos relativos à extração/pré-concentração, observa-se que há a separação das fases em duas partes distintas, uma fase aquosa pobre em surfactante e a outra rica em surfactante, a qual representa uma porção pequena do volume inicial da mistura, para onde o analito é capturado (MANIASSO, 2001; YAZDI, 2011). Por fim, a fase rica em surfactante deve ser separada da fase aquosa para posterior quantificação do analito por técnicas analíticas. Para facilitar a medição em alguns equipamentos, pode-se diluir a fase de interesse em solvente não viscoso para diminuir a viscosidade da fase rica em surfactante (YAZDI, 2011).

Experimentalmente, o processo de extração em ponto nuvem é simples, como pode ser observado na **Figura 2.9**. Inicialmente, o surfactante ou uma solução concentrada de surfactante é adicionada a uma solução aquosa contendo o analito a ser extraído, pré-concentrado e quantificado. Com a finalidade de formação de agregados micelares, a concentração final de surfactante na solução deve ser maior que a CMC característica do tensoativo utilizado (YAZDI, 2011; QUINA *et al.*, 1999). Uma solução de agente quelante deve ser adicionada caso o analito em questão seja um metal para promover a formação de um quelato hidrofóbico, porém se o analito for apolar ou apresentar baixa polaridade não há necessidade de adição de nenhum composto com finalidade de possibilitar a extração e pré-concentração (BEZERRA, 2006). Após a incorporação do analito no agregado micelar da solução, a separação das fases é atingida pelo aumento ou redução da temperatura, adição de sal ou outros aditivos para promover o fenômeno de ponto nuvem. Na próxima etapa, para acelerar a separação das fases, utiliza-se a centrifugação, observando-se no fim a separação em duas fases isotrópicas, o analito está pré-concentrado em um pequeno volume no topo ou no fundo da solução, a fase rica (YAZDI, 2011; QUINA *et al.*, 1999). Para facilitar a remoção da fase rica, a sua viscosidade pode ser aumentada após refrigeração, já a fase aquosa pode ser descartada (BEZERRA, 2006). Algumas vezes, há a necessidade de diluição da fase rica em surfactante por causa de sua elevada viscosidade, este diluente deve ser apropriado à técnica usada para medição do analito na fase micelar (BEZERRA, 2006; QUINA *et al.*, 1999).

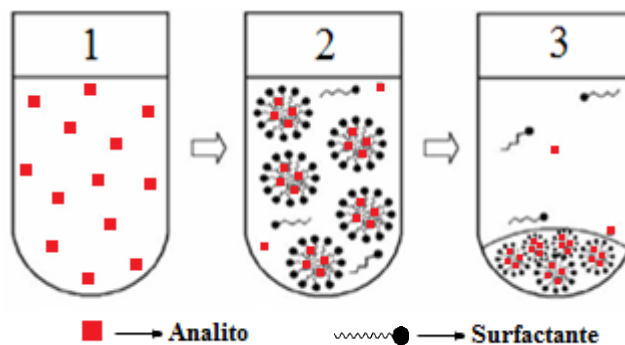


Figura 2.9 – Representação esquemática de uma extração em ponto nuvem convencional. (1) Solução inicialmente com o analito em baixa concentração, (2) Após a adição de surfactante há a captura do analito pelo núcleo hidrofóbico das micelas e a formação das duas fases após alteração de uma das propriedades (3) Separação das fases após centrifugação. Fonte: adaptado de BEZERRA, 2006.

Para a otimização da CPE, diferentes fatores devem ser considerados. Aplicações em espécies orgânicas e inorgânicas são comuns por esse tipo de técnica, no entanto o sucesso na aplicação da técnica deve-se à avaliação de parâmetros como pH, força iônica do meio, concentração do surfactante e temperatura (PALEOLOGOS *et al.*, 2005).

As características do surfactante e do analito definem o efeito que o pH causa na extração em ponto nuvem (XIE *et al.*, 2010). O pH é um dos fatores mais críticos em relação à partição de moléculas orgânicas na fase micelar. Um exemplo disso está em espécies ionizáveis como fenóis e aminas. Os valores de pH que permitem a existência dessas espécies na forma neutra propiciam a máxima eficiência de extração por ponto nuvem (PALEOLOGOS *et al.*, 2005). Em geral, o pH pode afetar a CPE de analitos que apresentam um grupo ácido ou básico na estrutura. A interação com o agregado de surfactante da forma iônica formada pela desprotonação de um ácido fraco ou protonação de uma base fraca não é tão forte como sua forma neutra, ou seja, é menos hidrofóbica que a forma neutra. Assim, para esses casos, o controle do pH é de grande importância em relação à eficiência de extração (BEZERRA, 2006; XIE *et al.*, 2010). Para espécies inorgânicas, observa-se que há pouca variação da eficiência de extração em valores diferentes de pH (PALEOLOGOS *et al.*, 2005).

No caso de surfactantes aniônicos, o pH desempenha função essencial em CPE. A separação de fases em meio aquoso acontece em altas concentrações ácidas, condição em que ocorre a protonação da molécula do surfactante, resultando na minimização das repulsões entre os monômeros, favorecendo a separação das fases (BEZERRA, 2006). Na **Tabela 2.6**, observa-

se a influência da concentração de ácido clorídrico sobre a separação de fases para o dodecil sulfato de sódio, surfactante aniônico, com um limiar de eficiência em torno de 4 mol L⁻¹.

Tabela 2.6 - Influência da concentração de ácido na separação de fases de uma solução aquosa dodecil sulfato de sódio (SDS). Fonte: NASCENTES, 2002.

HCl, mol L ⁻¹	SDS, 1% (m v ⁻¹)
1	N
2	N
3	F
4	F
5	N*

N: não ocorre a separação; F: ocorre a separação; N*: não ocorre a separação (4h de observação).

A extração em ponto nuvem também pode ser otimizada por aumento da força iônica propiciada por adição de um sal acima da saturação da solução, promovendo recuperações mais altas sem comprometer o desempenho analítico. A adição de eletrólitos altera a densidade da fase aquosa da maioria dos surfactantes não iônicos, o que proporciona maior facilidade na separação das fases. Além disso, esse tipo de adição também pode modificar o ponto nuvem de surfactantes não iônicos (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2010).

Os efeitos *salting in* e *salting out* também podem afetar o ponto nuvem de surfactantes, principalmente em ambientes micelares formados por tensoativos não iônicos (BEZERRA, 2006; XIE *et al.*, 2010). A redução da temperatura de ponto nuvem pelo efeito *salting out* pode ser percebida com a adição de eletrólitos de pH neutro como cloretos e sulfatos, enquanto que o efeito *salting in* favorece o aumento da temperatura de ponto nuvem com eletrólitos como nitratos, iodetos e tiocianatos (BEZERRA, 2006). Uma comparação entre as temperaturas de ponto nuvem, assim como CMCs, para os diferentes tipos de surfactantes está mostrada na **Tabela 2.7**. Por fim, a maioria dos estudos relacionados indicam que o aumento da força iônica não afeta o volume da fase rica em surfactante (XIE *et al.*, 2010).

Tabela 2.7 – Temperatura de ponto nuvem e CMC de algumas soluções aquosas de surfactantes empregados em CPE. Fonte: adaptado de QUINA, 1999.

Surfactante	CMC, mM	Temperatura de ponto nuvem, °C
Triton X-100	0,17 a 0,30	64 a 65
Triton X-114	0,20 a 0,35	23 a 25
PONPE 7,5 ^a	0,085	5 a 20
PONPE 10 ^b	0,07 a 0,085	62 a 65
CH ₃ (CH ₂) ₇ (OCH ₂ CH ₂) ₃ OH (C ₈ E ₈)	5,9-7,5	10,6
Genapol X-80 (TridecylE ₈)	0,05	42
CH ₃ (CH ₂) ₁₁ (OCH ₂ CH ₂) ₄ OH (Brij-30)	0,02-0,06	2-7

^a Éter polioxietileno (7,5) nonilfenil; ^b Éter polioxietileno (10) nonilfenil.

O efeito da concentração do surfactante em extrações por meio de ambientes micelares exerce significativa influência no sucesso de procedimentos analíticos, pois parâmetros como a máxima eficiência de extração e sinal analítico são dependentes de uma curta faixa de concentrações, onde a separação de fases pode ser realizada mais facilmente. Concentrações de tensoativos acima dos valores ótimos comprometem o sinal analítico, pois desta forma o volume final da fase rica em surfactante aumenta, como consequência, há a diminuição do fator de pré-concentração. Por outro lado, concentrações de surfactantes abaixo da faixa ótima acarretam no comprometimento da precisão e reprodutibilidade da técnica, uma vez que a fase rica em surfactante não é suficiente para realização de medidas reprodutíveis, tanto de extração quanto de separação (PALEOLOGOS *et al.*, 2005).

O efeito da temperatura para a eficiência da pré-concentração e facilidade de separação de fases é evidente para procedimentos de CPE (PALEOLOGOS *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2010). Sabe-se que, teoricamente, a maior eficiência de extração ocorre em temperaturas de 15 a 20 °C acima da temperatura de ponto nuvem do surfactante. Em contrapartida, as duas fases não são formadas quando a temperatura está abaixo do ponto nuvem do surfactante na solução (XIE *et al.*, 2010).

A extração em ponto nuvem apresenta algumas vantagens, dentre elas estão:

- Possui alta capacidade de concentração para várias espécies de analitos além de possuir eficiência de extração (BEZERRA, 2006; PALEOLOGOS *et al.*, 2005; ESCALEIRA, 2005);

- Está de acordo com os princípios da Química Verde, pois os surfactantes utilizados não são tóxicos (BEZERRA, 2006; ESCALEIRA, 2005);
- Diferentes técnicas de análise podem ser utilizadas após o procedimento de CPE (BEZERRA, 2006);
- Os surfactantes comerciais apresentam baixo custo e a quantidade utilizada para extração é mínima (PALEOLOGOS *et al.*, 2005);
- O processo é simples e rápido (BEZERRA, 2006);.

Dentre as limitações destacam-se:

- Baixos coeficientes de partição de algumas espécies de quelatos metálicos (BEZERRA, 2006);
- Deficiência na extração de espécies orgânicas polares (BEZERRA, 2006);
- Alta absorção UV dos surfactantes;
- Dificuldade no manuseio da fase rica em surfactante devido a sua viscosidade.

2.2.3 Métodos analíticos para a determinação de benzo(a)pireno em águas por extração em ponto nuvem

O crescimento do interesse em CPE deve-se à busca contínua de procedimentos de preparo de amostra rápidos, simples, sensíveis e eficientes para determinações em níveis traço (QUINA *et al.*, 1999).

A eficiência da extração em ponto nuvem foi estudada utilizando-se três surfactantes não iônicos biodegradáveis com similaridade molecular em procedimento de pré-concentração de HPAs em concentrações traço em água a 25 °C, por Hung e colaboradores (2007). Para regular e reduzir as temperaturas de ponto nuvem, foi adicionado sulfato de sódio e fosfato de sódio às soluções micelares. Os autores observaram que, aumentando a concentração de sal ou diminuindo a concentração de surfactante da solução inicial, o fator de pré-concentração poderia ser melhorado. Fatores de pré-concentração entre 30 e 45 foram obtidos com os surfactantes Tergitol 15-S-9, Neodol 25-7 e Tergitol 15-S-7 (HUNG *et al.*, 2007).

Soares e colaboradores (2015) fizeram determinações de dezesseis HPAs por GC-MS utilizando a CPE como etapa prévia, sendo empregado para tal atividade o surfactante OPEO30. Neste trabalho as condições reacionais de derivatização do tensoativo foram exploradas, pois é um processo necessário para análises cromatográficas. A otimização da concentração de

surfactante, temperatura e tempo da extração também foi realizada. O método otimizado apresentou precisão, exatidão e eficiência para determinação dos 16 HPAs prioritários, sendo obtido limites de detecção entre 0,02 e 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ e recuperação de analitos entre 70 e 98%. Por fim, o método foi aplicado para análise de águas subterrâneas provenientes de lençóis freáticos (SOARES *et al.*, 2015).

Goryacheva e colaboradores (2005) utilizaram o dodecil sulfato de sódio (SDS) na CPE induzida por ácido para pré-concentração de dez hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como etapa prévia para determinação fluorimétrica. A avaliação do efeito da acidez na solução, concentrações de SDS e de eletrólitos, tempo de centrifugação, taxa de separação de fases e a porcentagem de extração de HPAs foram estudadas minuciosamente. Percentagens entre 67 a 93% foram obtidas para os compostos avaliados. As características analíticas e vantagens da determinação fluorimétrica foram exibidas. Sendo que, foram obtidas faixas lineares de 2×10^{-4} a 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limites de detecção de 136 a 2×10^{-4} $\mu\text{g L}^{-1}$. A extensão da extração foi avaliada e os valores oscilaram de 67 a 95%. O método proposto foi reproduzido para determinação de BaP em água de torneira. Para tal, testes de recuperação foram realizados, sendo desta forma obtidos valores entre 98 e 125%, enquanto que o RSD para este composto variou de 1,7 a 11%. Por fim encontraram concentrações acima de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BaP nas amostras analisadas (GORYACHEVA *et al.*, 2005).

O uso de misturas de surfactantes não iônicos, polioxietileno-10-lauril éter (POLE), Triton X-114 e Brij 30, para otimizar a temperatura de ponto nuvem foi empregado por Delgado e colaboradores (2004) com o objetivo de extrair e pré-concentrar HPAs de água do mar. Diagramas de fase, razão de volume das fases, fator de pré-concentração e temperatura de extração foram avaliados. A mistura POLE/Brij 30 apresentou as melhores condições para o procedimento e foi utilizada como processo precedente para determinação por HPLC com detecção fluorimétrica de 13 HPAs. Assim, o método proposto apresentou limites de detecção até 23 ng L^{-1} , RSD de 9,2 % e faixa linear variando de 0,3 a 80 μL^{-1} . Para a validação do método utilizou-se a LLE e GC-MS por serem técnicas bem estabelecidas. Recuperações de 72 a 98% utilizando POLE/Brij 30 foram obtidas e concentrações de HPAs de 0,09 até 0,62 ng mL^{-1} foram encontrados em água do mar (DELGADO *et al.*, 2004).

Pino e colaboradores (2002) extraíram e pré-concentraram quatorze hidrocarbonetos poliaromáticos de água do mar empregando o tensoativo PONPE. Parâmetros como a força iônica, diagrama e razão das fases, concentração do analito e o efeito do surfactante sobre o

analito durante o armazenamento foram estudados. Esses contaminantes foram quantificados por HPLC com detecção fluorimétrica, sendo encontrados limites de detecção na faixa de 1,0 a $1,5 \times 10^2$ ng L⁻¹ e RSDs menores que 10,4 %. Recuperações de HPAs em água do mar foram realizadas, sendo obtidos valores de 32,6 a 115 %. Foram encontrados HPAs em amostras de água do mar em concentrações no intervalo de 0,05 a 1,85 ng mL⁻¹. A validação do método foi realizada por LLE e GC-MS (PINO *et al.*, 2002).

Sicilia e colaboradores (1999) utilizaram a CPE para extração e pré-concentração de dezesseis HPAs prioritários empregando o surfactante aniônico ácido dodecano sulfônico de sódio (SDSA) em amostras de água subterrânea, de rio e de rede de abastecimento. O diagrama de fases do surfactante em solução ácida, o efeito do surfactante na estabilidade da solução do analito durante o armazenamento e o efeito do surfactante na recuperação de HPAs em soluções de ácido húmico foram avaliados. A separação dos analitos foi realizada por HPLC e a quantificação por fluorescência. Para o método proposto, os limites de detecção variaram de 0,5 a 7,9 ng L⁻¹, RSD variaram de 4,6 até 13,8 % e a faixa linear de 0,5 a 300 ng L⁻¹. Teste de recuperação foi realizado para água de rede de abastecimento e água subterrânea. Para a primeira, recuperações de 62,6 até 106 % foram obtidas, já para a segunda, recuperações de 91 à 106,4 foram alcançadas. Concentrações dos contaminantes variando de 1,8 a 32,8 ng L⁻¹ foram encontradas em água subterrânea e água de rio (SICILIA *et al.*, 1999).

2.3 Espectroscopia de fluorescência molecular

O método óptico de fluorescência molecular está inserido, assim como as técnicas de fosforescência e quimiluminescência, nos fenômenos conhecidos como luminescência molecular. Tais métodos permitem determinações quantitativas de teor orgânico e inorgânico. Dentre esses métodos, o fluorimétrico apresenta maiores aplicações. Apesar dos métodos luminescentes apresentarem altas sensibilidades e limites de detecção muito inferiores aos provenientes da espectroscopia de absorção, além de largas faixas de concentração linear são grandemente suscetíveis a efeitos de interferentes (SKOOG, 2008). O fenômeno de fluorescência acontece em vários tipos de sistemas químicos como líquidos, gasosos e sólidos (SKOOG, 2008). Pode ser, de forma simples, conceituado como a luz emitida por um átomo ou molécula após a absorção de energia eletromagnética (JAMESON, 2014). Isso ocorre porque após a absorção de energia por um par de elétrons de uma espécie há a promoção de um desses elétrons para um nível de energia maior, originando um estado excitado, e imediatamente

(próximo a 10^{-9} segundos) esse elétron retorna ao estado fundamental emitindo um fóton no processo (SKOOG, 2008; LAKOWICZ, 2006; JAMESON, 2014). O estado gerado após a absorção da energia eletromagnética é chamado de “estado excitado singleto” e acontece quando o spin do elétron promovido ao um nível mais energético está emparelhado com o spin do elétron remanescente no orbital do estado fundamental (SKOOG, 2008; LAKOWICZ, 2006) (**Figura 2.10**).

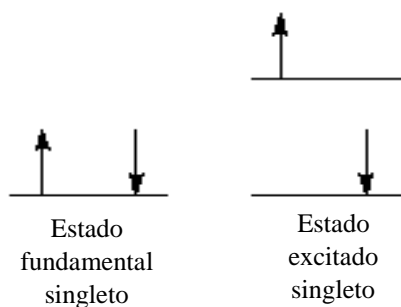


Figura 2.10 – Representação esquemática da distribuição eletrônica de moléculas no estado fundamental singleto e estado excitado singleto. Fonte: SKOOG, 2008.

As substâncias, que se caracterizam por fluorescer, são nomeadas fluoróforos. A fluorescência apresentada por fluoróforos é representada por um espectro de emissão que responde à estrutura química do composto e depende do solvente no qual a substância está dissolvida (LAKOWICZ, 2006). A absorção e emissão de luz são efetivamente explicitadas por meio dos estados de energia e transições entre eles, representados pelo diagrama de Jablonski (SKOOG, 2008; LAKOWICZ, 2006; FALCO, 2012), mostrado na **Figura 2.11**.

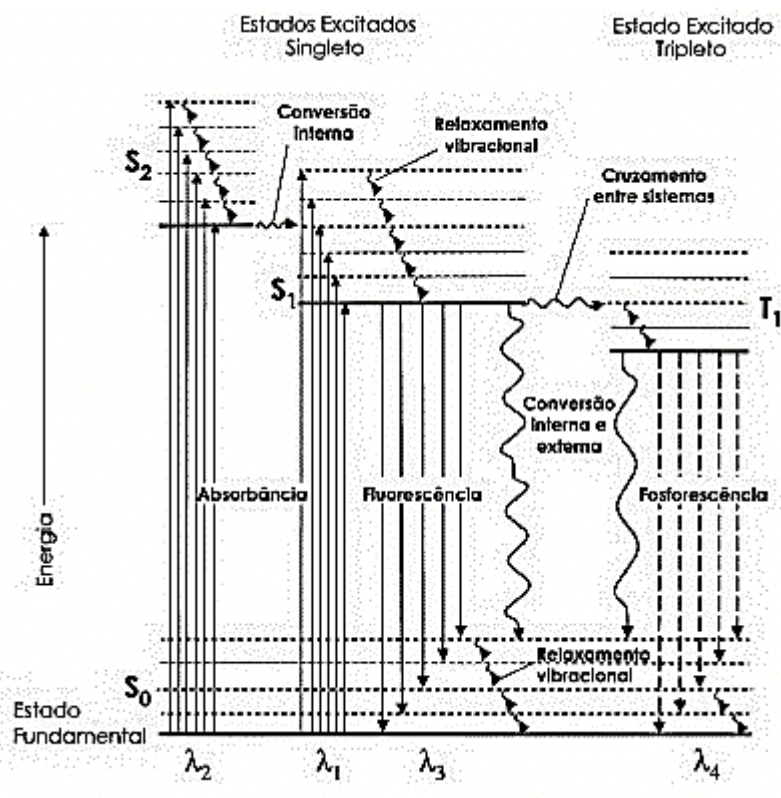


Figura 2.11 – Diagrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente. Fonte: SKOOG, 2008.

A linha sólida horizontal na base do diagrama representa o estado mais baixo de energia da molécula, o estado fundamental, simbolizado por S₀ que geralmente é um estado singlete. Logo acima a esquerda estão o primeiro e segundo estados excitados singletos, representados pelos símbolos S₁ e S₂ respectivamente e a direita encontra-se o primeiro estado excitado tripleto simbolizado por T₁. As linhas horizontais tracejadas relacionadas aos estados eletrônicos citados anteriormente correspondem os níveis de energia vibracionais (SKOOG, 2008; Lakowicz, 2006). As transições de estado sofridas por elétrons ocorrem a partir do estado fundamental singlete (S₀) para os primeiro e segundo estados excitados singletos e seus estados vibracionais, em contrapartida transições do estado fundamental para o estado excitado tripleto (T₁) são altamente improváveis, pois acarretaria em uma mudança na multiplicidade, configurando-se desta forma uma “transição proibida” (SKOOG, 2008; LAKOWICZ, 2006). O processo conhecido como “relaxação ou relaxamento vibracional” ocorre quando moléculas excitadas a estados eletrônicos vibracionais, por exemplo, os estados eletrônicos vibracionais relativos ao primeiro estado excitado singlete, relaxam-se dissipando o excesso de energia vibracional ao nível vibracional fundamental do estado S₁ (LAKOWICZ, 2006). Os processos de desativação estão indicadas pelas setas verticais direcionadas para baixo, no centro está

representado o processo de desativação por fluorescência que acontece entre os estados S_1 e S_0 entre 10^{-5} a 10^{-10} segundos (SKOOG, 2008).

2.3.1 O deslocamento de Stokes

Em 1852, Sir G. G. Stokes observou pela primeira vez que a energia fluorescente emitida por uma espécie era normalmente menor que a sua energia de absorção. Essa observação o levou à conclusão de que a fluorescência ocorre em energias menores ou em comprimentos de onda mais longos (LAKOWICZ, 2006). Desta forma, a obtenção do espectro de emissão de um fluoróforo acontece pela excitação da espécie com um comprimento de onda coincidente com o seu máximo de absorção. Após a excitação do composto para um estado eletrônico excitado, ocorrerá a dissipação de parte dessa energia, por conversão interna e/ou relaxação vibracional, até chegar no primeiro estado eletrônico excitado seguindo-se da emissão de fluorescência em um comprimento de onda menos energético, diferente daquele utilizado para excitar a espécie (WIETHAUS, 2010). A esta característica que os fluoróforos apresentam dá-se o nome de Deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 2006).

A energia de absorção de uma fluoróforo pode ser representada por:

$$E_{\text{absorção}} = \frac{hc}{\lambda_{\text{absorção}}} \quad (2.1)$$

E a energia de emissão por:

$$E_{\text{emissão}} = \frac{hc}{\lambda_{\text{emissão}}} \quad (2.2)$$

Onde:

$E_{\text{absorção}}$ é a energia de absorção do fluoróforo; $E_{\text{emissão}}$ a energia de emissão do fluoróforo; h a constante de Planck; c a velocidade de propagação da luz; $\lambda_{\text{absorção}}$ é o comprimento de onda de absorção; $\lambda_{\text{emissão}}$ é o comprimento de onda de emissão.

Sabe-se que frequentemente a energia de emissão do fluoróforo ($E_{\text{emissão}}$) é menor que sua energia de absorção ($E_{\text{absorção}}$), a consequência disso é que o comprimento de onda de emissão será maior que o comprimento de onda de absorção, ou seja o fóton emitido terá um comprimento de onda menos energético e mais largo (ALBANI, 2007). Assim quanto mais largo o Deslocamento de Stokes, mais fácil a detecção de espécies fluorescentes (VALEUR, 2001). O deslocamento de Stokes está representado na **Figura 2.12**.

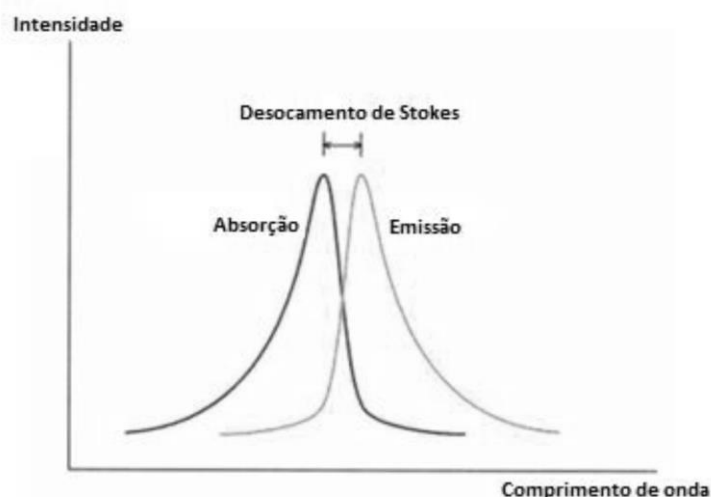


Figura 2.12 – Representação do deslocamento de Stokes. Fonte: ARAÚJO, 2010.

2.3.2 Transições em fluorescência

O fenômeno de fluorescência raramente é observado devido a transições do tipo $\sigma^* - \sigma$, pois transições deste tipo envolvem radiações muito energéticas capazes de provocar desativação dos estados excitados por pré-dissociação ou dissociação. Portanto este fenômeno caracteriza-se por transições do tipo $\pi^* - \pi$ e $\pi^* - n$ por serem menos energéticas, porém, observou-se empiricamente que processos que acarretam em desativação do primeiro tipo apresentam maior eficiência quântica que o segundo tipo. Isso ocorre porque o tempo de vida médio de processos que envolvem transições entre orbitais π e π^* são menores, além da probabilidade de ocorrer processos de desativação que diminuem a eficiência quântica ser pequena (SKOOG, 2008). Assim, transições eletrônicas em moléculas ocorrem pela promoção de um elétron partindo do orbital molecular de mais alta energia ocupado (HOMO) para o orbital molecular de mais baixa energia desocupado (LUMO) (GORE, 2000).

2.3.3 Fundamentos da análise quantitativa

A potência radiante do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema influencia consideravelmente a potência da emissão fluorescente (F), uma vez que, o segundo é proporcional ao primeiro (SKOOG, 2008). Essa relação de proporcionalidade está representada na **Equação 2.3** seguir:

$$F = k'(P_0 - P) \quad (2.3)$$

Onde F é potência da emissão fluorescente, k' depende do rendimento quântico da fluorescência, P_0 é a potência do feixe incidente (radiação excitadora) e P é a potência após atravessar uma distância b do meio.

A lei de Beer pode ser escrita da seguinte forma para relacionar F às concentrações das espécies fluorescentes:

$$P_0/P = 10^{-\epsilon bc} \quad (2.4)$$

Onde ϵ é a absortividade molar das moléculas fluorescentes, b é o comprimento do percurso ótico e c a concentração.

Assim, obtém-se a relação mostrada na **Equação 2.5** ao substituir a **Equação 2.4** na **Equação 2.3**.

$$F = k'P_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (2.5)$$

A expressão $1 - 10^{-\epsilon bc}$ pode ser expandida em uma série de Maclaurin como mostrado na **Equação 2.6**.

$$F = k'P_0[2,303\epsilon bc - (2,303\epsilon bc)^2/2! + (2,303\epsilon bc)^3/3! + \dots] \quad (2.6)$$

Desde que $2,303\epsilon bc = A$ (absorbância) $< 0,05$, todos os demais termos dentro do colchete são menores em comparação com o primeiro termo, assim tem-se que:

$$F = 2,303 k' \epsilon bc P_0 \quad (2.7)$$

Quando P_0 é mantido constante, obtém-se a **Equação 2.8**.

$$F = Kc \quad (2.8)$$

Onde K é um coeficiente de proporcionalidade, que depende da absortividade associada ao pico de absorção, do rendimento quântico da fluorescência, da potência do feixe incidente da radiação excitadora e do percurso ótico.

Os métodos fotoluminescentes quantitativos quando comparados com métodos baseados em absorção UV-vis têm apresentado resultados satisfatórios, uma vez que, apresentam altas sensibilidades e melhores faixas dinâmicas. A **Equação 2.8** é utilizada como base para a construção de curvas analíticas fluorimétricas, além disso, há a necessidade de um planejamento experimental que possibilite a redução de problemas de desvios da linearidade, uma vez que, quando c torna-se grande suficientemente os termos negligenciados da **Equação 2.6** tornam-se importantes, implicando em perda da linearidade. Notando-se que a potência da emissão fluorescente (F) é diretamente proporcional à potência do feixe incidente (P_0), conclui-se que o aumento da potência da radiação excitadora promove aumento da sensibilidade da emissão fluorescente (SKOOG, 2008).

2.3.4 Fluorescência em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

O fenômeno de fluorescência ocorre principalmente em moléculas aromáticas, uma vez que, tais estruturas apresentam elétrons π deslocalizados e rigidez estrutural (SKOOG, 2008). Compostos que apresentam grupos funcionais aromáticos são responsáveis por prover fluorescência mais intensa e útil, uma vez que transições π - π^* de baixas energias possibilitam boas eficiências quânticas de fluorescência, como discutido anteriormente. Porém, a emissão de fluorescência não é um fenômeno exclusivo de compostos que apresentam anéis aromáticos, podendo acontecer em compostos com grupos carbonilas em estruturas alifáticas e alicíclicas ou estruturas com ligações duplas altamente conjugadas. Soluções de hidrocarbonetos aromáticos não substituídos, geralmente, apresentam fluorescência, sendo o número de anéis e o grau de condensação fatores preponderantes para o aumento da eficiência quântica (SKOOG, 2008).

O rendimento quântico de fluorescência indica a eficiência em que a energia radiante absorvida pelo fluoróforo é emitida por fluorescência (ARAÚJO, 2010). A razão entre o número de moléculas que fluorescem e o número total de moléculas excitadas exprime o rendimento quântico (SKOOG, 2008). Moléculas que possuem alto rendimento quântico apresentam valores próximos à unidade. Dessa forma, nota-se que este parâmetro sempre assumirá um valor menor que um, uma vez que parte da energia absorvida pelo fluoróforo é perdida por desativação não radiativa como conversão interna, relaxação vibracional e outros (LAKOWICZ, 2006). Geralmente, o rendimento quântico não depende do comprimento de onda utilizado para realizar a excitação da espécie, segundo a regra de Kasha-Vavilov (Jameson, 2014). O cálculo do rendimento quântico pode ser realizado através da **Equação 2.9**:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + K_{nr}} \quad (2.9)$$

Onde Γ é a taxa de emissão do fluoróforo e K_{nr} é a taxa de desativação dos processos não radiativos. Quanto menor for a taxa de desativação não radiativa maior será o rendimento quântico, uma vez que a energia absorvida pela espécie fluorescente não será perdida por esses processos, sendo posteriormente emitida (LAKOWICZ, 2006).

Compostos que apresentam altos valores de eficiência quântica são propícios à determinação por meio da espectroscopia de fluorescência, dado que é um método que apresentam vantagens como largas faixas lineares, além limites de detecção e quantificação baixíssimos (MORALES *et al.*, 2010). Dentre esses compostos incluem-se os HPAs que apresentam fluorescência em razão de suas estruturas aromáticas rígidas com elétrons π deslocalizados distribuídos ao longo das moléculas (SILVA, 2010).

A sensibilidade analítica pode ser melhorada com o uso de ambientes organizados tais como: micelas, ciclodextrinas e calixarenos. Assim, nesses ambientes a eficiência quântica de luminescência resultante de HPAs é incrementada. Isso ocorre porque nas micelas, interações físico-químicas que acontecem entre os HPAs e a região hidrofóbica dos surfactantes são os fatores considerados responsáveis pelo aumento da luminescência destes compostos. Interações desta magnitude aumentam a solubilidade deste grupo de compostos em meio aquoso, acarretando em redução de seus movimentos vibracionais e como consequência, aumentando a intensidade de luminescência destas espécies (MORALES *et al.*, 2010).

Muitos processos são responsáveis por reduzir a intensidade de fluorescência de alguns fluoróforos, tal redução é denominada “supressão”. A supressão dinâmica acontece quando há a desativação do fluoróforo no estado excitado pelo contato com moléculas do solvente (supressor). Assim a emissão fluorescente ocorre após o contato com o agente supressor sem que haja mudança nas características químicas da espécie fluorescente (LAKOWICZ, 2006). A probabilidade de colisão entre a espécie excitada e o supressor depende da concentração do supressor que deve ser grande para uma alta probabilidade de ocorrer a supressão. Além de reduzir a intensidade de fluorescência, a supressão dinâmica diminui a eficiência quântica e o tempo de vida da fluorescência (SKOOG, 2008).

A supressão também pode acontecer por meio da formação de um complexo estável entre o fluoróforo e outra molécula, nesse caso tem-se a supressão estática, pois a espécie se

mantém no estado fundamental sem a possibilidade de fluorescer, ou seja, o fluoróforo é estaticamente suprimido (JAMESON, 2014). Além desses tipos, a supressão pode acontecer através de vários outros processos, podendo ser causada pelo próprio fluoróforo ou a presença de outras espécies absorventes na solução (LAKOWICZ, 2006).

2.4 Calibração univariada

A calibração univariada é uma operação que relaciona um único valor obtido instrumentalmente com a concentração de uma espécie de interesse, ou seja, a calibração descreve a relação entre uma função analítica, representada pelas quantidades ou concentrações de analitos em uma amostra e uma função medida, representada pela resposta instrumental (BARROS *et al.*, 2002).

Normalmente, as etapas descritiva e preditiva são utilizadas no processo de calibração. Na etapa descritiva, constrói-se um modelo, a curva analítica, para relacionar o valor obtido instrumentalmente com a concentração do analito. Esta etapa consiste na medida de padrões analíticos de concentração conhecida para construção do modelo. Na etapa preditiva, o modelo é utilizado para estimar as concentrações desconhecidas do analito em amostras (PIMENTEL e BARROS, 1996; BARBOSA, 2015).

O método dos mínimos quadrados é o mais utilizado para obter-se a correlação entre o valor instrumental e os valores experimentais, permitindo inferir se o modelo apresenta precisão e exatidão, além de fornecer resultados não tendenciosos e com variância mínima. Este modelo descreve uma relação linear entre uma variável dependente (y) e uma variável independente (x) de acordo com a **Equação 2.10** (PIMENTEL e BARROS, 1996; BARROS *et al.*, 2002).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon \quad (2.10)$$

Onde y é, normalmente, a resposta instrumental, β_0 e β_1 são os parâmetros do modelo, x é a concentração da espécie química que se quer determinar e ε é o erro aleatório associado à determinação de y .

A avaliação da validade do modelo é realizada pela análise de variância (ANOVA), sendo aplicada apenas para modelos lineares. As equações para ANOVA são vistas na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 - Equações para ANOVA. Adaptado de PIMENTEL e BARROS, 1996.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_{ei} - y_m)]^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p - 1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / (n - p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_{ei} - y_{im})]^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m - p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n - m)$

n = número total de medidas; m = número de níveis da variável independente x ; p = número de parâmetros avaliados; o índice i indica o nível da variável x e o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x .

As médias quadráticas de regressão (MQ_{reg}) e do resíduo (MQ_r) são consideradas uma boa forma de avaliar a qualidade do modelo durante a análise dos resultados obtidos após a ANOVA. Assim, o modelo é considerado melhor a medida que o valor da razão entre médias quadráticas (MQ_{reg}/MQ_r) é maior (PIMENTEL e BARROS, 1996; BARBOSA, 2015). O resultado obtido dessa razão deve ser comparado com o valor do teste F apropriado para verificar a significância da regressão, desta forma, o resultado obtido através da razão deve ser muito maior que o valor do F crítico (PIMENTEL e BARROS, 1996; BARBOSA, 2015). O valor da razão das médias quadráticas da falta de ajuste (MQ_{faj}) e do erro puro (MQ_{ep}) é utilizado para averiguar se o modelo está bem ajustado, para isso, é necessário comparar o resultado desta razão (MQ_{faj}/MQ_{ep}) com o valor do teste F apropriado, com isso, considera-se como um modelo bem ajustado se o resultado obtido por esta razão for menor que o valor do F crítico (BARBOSA, 2015). Por fim, a descrição da variação da resposta instrumental pelo método é maior quanto mais próximo de 1 for o valor do coeficiente de correlação múltipla (R^2) (PIMENTEL e BARROS, 1996; BARBOSA, 2015).

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e soluções

O padrão analítico de B(a)P (pureza $\geq 96\%$) foi adquirido da Sigma-Aldrich e utilizado sem purificação. Dodecil sulfato de sódio (SDS) com pureza de 90%, da marca Neon, foi usado como surfactante. Ácido clorídrico concentrado da marca Vetec e acetonitrila da Dinâmica foram utilizados para o procedimento de extração e como solvente para aferição do volume final das soluções de trabalho, respectivamente. A solução estoque de B(a)P ($2,52 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi preparada dissolvendo-se quantidade adequada do analito em acetonitrila e armazenada em frasco âmbar, no refrigerador em temperatura de 5°C . Água ultrapura foi obtida com um sistema Milli-Q, da marca Millipore/MERCK.

3.2 Limpeza de vidrarias

A limpeza das vidrarias foi realizada primeiramente com detergente comum e enxague com água de torneira. Em seguida, o material foi imerso em solução de ácido nítrico a 5% (v v⁻¹) por 24 horas, seguido de lavagem com água destilada, água ultrapura e, finalmente, acetona. Sempre que necessário, caso observada contaminação residual de benzo(a)pireno nas medidas de brancos analíticos, uma solução de surfactante Triton X-114 a 5% (v v⁻¹) foi utilizada após a limpeza ácida, seguindo-se à limpeza anteriormente descrita.

3.3 Amostras

Dez amostras de água para consumo humano foram coletadas no cavalete, definido na Portaria MS 2914/2011 como o kit formado por tubos e conexões destinados à instalação do hidrômetro para realização da ligação de água (Ministério da Saúde, 2011), de cada uma das dez residências localizadas nos bairros dos Estados, dos Bancários, Bessa, Centro, Cruz das Armas, José Américo, Manaíra, Mangabeira, Tambauzinho e Valentina Figueiredo, cidade de João Pessoa - PB (**Figura 3.1**).

Da forma como coletadas, sem qualquer tipo de tratamento prévio, os frascos das amostras foram envoltos em papel alumínio para evitar a incidência de luz, mantidos refrigerados a 5°C . Os procedimentos de CPE foram realizados no máximo 24 horas após as coletas.

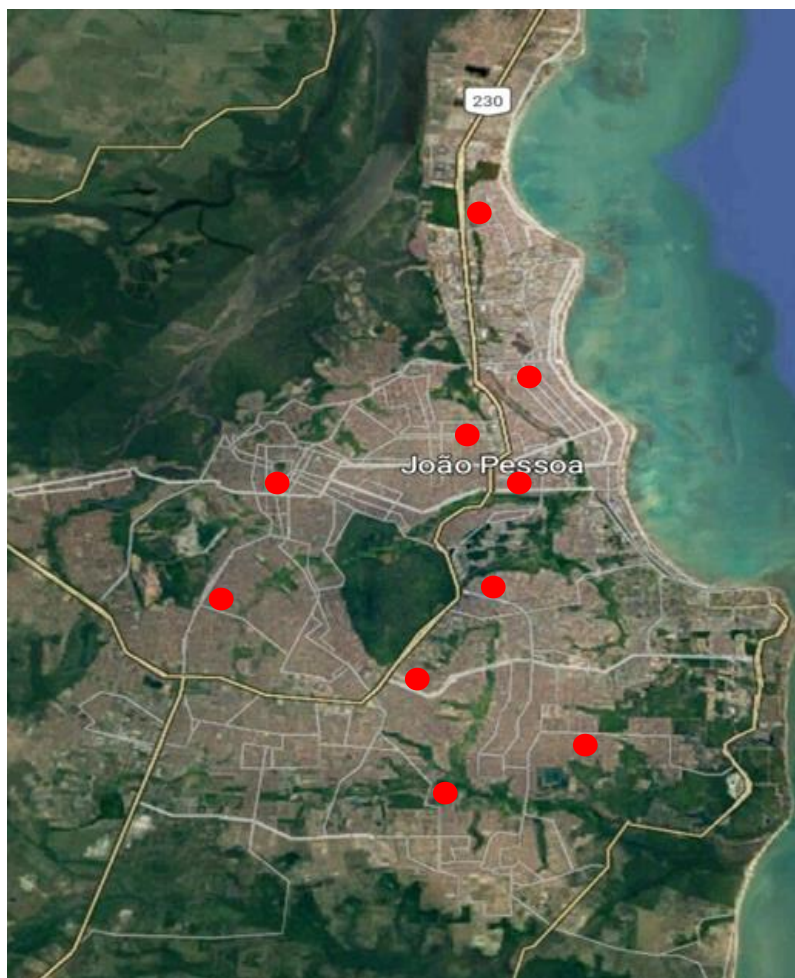


Figura 3.1 – Locais de coleta de amostras indicados no mapa da cidade de João Pessoa. Fonte: GOOGLE MAPS, 2017.

3.4 Equipamentos

O espectro de absorção do BaP foi obtido com um espectrofotômetro UV-Vis da marca Hewlett-Packard (HP) com arranjo de fotodiodos, modelo 8453. Para as medidas no equipamento, usou-se uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Espectros de fluorescência molecular foram obtidos no espectrofotômetro de fluorescência molecular Cary Eclipse (Agilent Technologies), equipado com lâmpada de xenônio pulsada e utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda de excitação do B(a)P foi 286 nm e os espectros de emissão foram registrados em 405 nm, usando aberturas de janelas de excitação de 5 nm e de emissão de 10 nm.

Após a obtenção do ponto nuvem, as fases foram separadas por centrifugação usando uma centrífuga clínica para rotina laboratorial com capacidade para 12 tubos de 15 mL, modelo 80-2B da marca Centribio.

As medidas de massa do padrão analítico de B(a)P e do SDS foram feitas em uma balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY220, com precisão de cinco casas decimais.

Para favorecer a máxima separação das fases durante o procedimento de CPE, as amostras foram submetidas à refrigeração na temperatura de $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura próxima das encontradas normalmente em congeladores, utilizando-se um refrigerador comum de laboratório.

3.5 Procedimento experimental de extração em ponto nuvem e determinação fluorimétrica

A extração em ponto nuvem foi realizada misturando-se 3 mL de amostra com 0,06 g de SDS ($1\text{ }\% \text{ m v}^{-1}$), seguida de adição de 3 mL de ácido clorídrico concentrado (12 mol L^{-1}) em um tubo falcon de 15 mL para atingir uma concentração ácida final de 6 mol L^{-1} , sob temperatura ambiente de $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Com o intuito de separar as fases, foi realizada uma etapa de centrifugação em 4.000 rpm durante 25 minutos. Em seguida, o tubo falcon foi submetido à refrigeração em temperatura de $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos para favorecer a remoção da fase rica em surfactante. Nos casos em que a separação das fases não ocorreu completamente, ou seja, foi observada a presença de partículas da fase rica no sobrenadante, centrifugou-se por mais 5 minutos para posterior etapa de retirada da fase rica em surfactante.

Após o processo de extração e pré-concentração, a fase rica contendo o analito foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL com auxílio de uma micropipeta e o volume aferido com acetonitrila. As soluções assim preparadas, tanto as fortificadas para os testes de recuperação como as amostras de água para consumo humano, foram analisadas. As etapas do procedimento de extração em ponto nuvem são apresentadas na **Figura 3.2**.

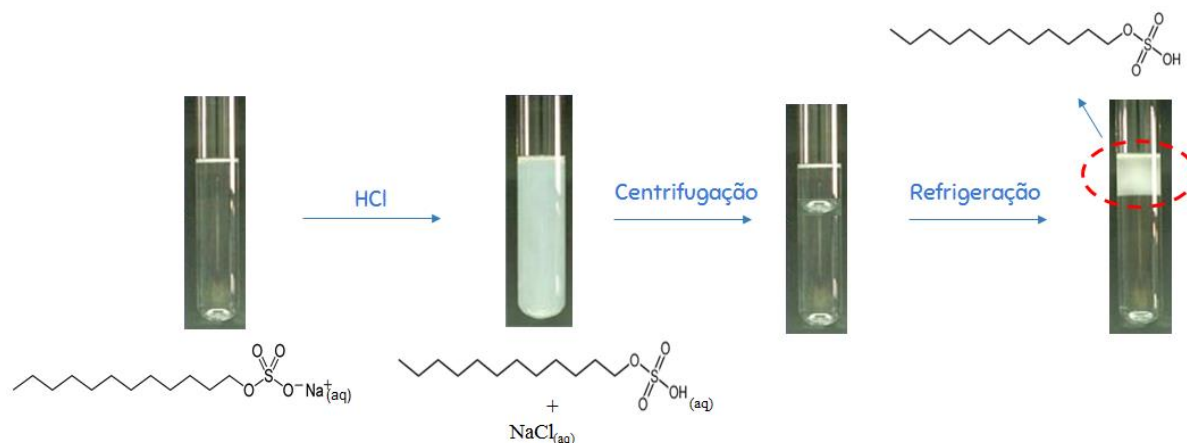


Figura 3.2 – Procedimento de extração em ponto nuvem para o método proposto.

3.6 Procedimento para construção da curva analítica

Para a construção da curva analítica, cada solução-padrão de B(a)P foi produzida misturando-se quantidade adequada da solução estoque de B(a)P com o dodecil sulfato de hidrogênio (fase rica), produzido a partir de solução aquosa de dodecil sulfato de sódio em meio ácido clorídrico, 6 mol L^{-1} , e avolumado para o volume final de 5 mL com acetonitrila. Dessa forma, a concentração de surfactante foi mantida constante tanto para as soluções padrão quanto para as amostras. Água ultrapura foi utilizada para gerar a fase rica de interesse. Para tanto, misturou-se 3 mL de água ultrapura com 0,06 g de SDS ($1,0 \% \text{ m v}^{-1}$), adicionou-se 3 mL de ácido clorídrico concentrado, gerando assim a fase rica de interesse e a fase aquosa a ser descartada após a centrifugação e refrigeração. Por fim, após a transferência da fase de interesse para um balão volumétrico de 5 mL, misturou-se com quantidade adequada da solução estoque de B(a)P para produzir as concentração de cada solução-padrão. Então elevou-se a volume de 5 mL com acetonitrila. Em seguida, as concentrações das soluções-padrão foram medidas por fluorescência molecular. As concentrações das soluções-padrão produzidas para a curva analítica variaram de 1 a $110 \mu\text{g L}^{-1}$, com triplicata em cada nível.

3.7 Procedimento para avaliar a percentagem ótima de SDS

Foram feitos testes para avaliar as respostas de fluorescência com a variação da porcentagem de SDS utilizando-se uma solução padrão de B(a)P $20 \mu\text{g L}^{-1}$. As quantidades de SDS testadas foram: $1,0 \%$; $1,5 \%$; $2,0 \%$; $2,5 \%$; $3,5 \%$ e $4,3 \% \text{ (m v}^{-1})$. Este estudo foi realizado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.6, com variações apenas no parâmetro analisado, ou seja, nas concentrações de SDS utilizadas no processo.

3.8 Procedimento para avaliar a estabilidade da solução de benzo(a)pireno

A estabilidade dos analitos nas amostras e soluções-padrão é fator primordial para garantir a precisão e exatidão dos resultados. Tal estabilidade deve se manter por pelo menos algumas horas a partir do preparo das soluções. Deste modo, a avaliação da estabilidade de uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ B(a)P dissolvido em acetonitrila armazenada em frasco âmbar sob refrigeração de $-6 \text{ }^\circ\text{C}$ foi realizada no presente estudo, fazendo-se medidas com frequência semanal durante nove semanas. Para todos os estudos, as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.9 Parâmetros de desempenho analítico

A sensibilidade, uma medida da capacidade do método analítico em distinguir pequenas diferenças na concentração de um analito, foi avaliada através dos cálculos de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Sete medidas brancas foram usadas para estimar o desvio-padrão da média das respostas, que representa o nível de ruído da técnica (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectada pelo método é estabelecida pelo limite de detecção, calculado conforme **Equação 3.1**.

$$\text{LOD} = 3 s_b / a \quad (3.1)$$

Onde:

s_b = desvio-padrão da média do sinal do branco em eletrólito puro

a = coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação expressa a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão credíveis (INMETRO, 2008), calculado conforme **Equação 3.2**.

$$\text{LOQ} = 10 s_b / a \quad (3.2)$$

A concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro é definida como exatidão, que pode ser realizada por meio de três processos principais: uso de materiais de referência certificados, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (ANVISA, 2003). Os testes de recuperação foram realizados em três níveis de concentração, 1, 50 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo todos executados em triplicata, conforme **Equação 3.5**.

$$\text{Recuperação, \%} = ((C_1 - C_2) / C_3) \times 100 \quad (3.3)$$

Onde C_1 = a concentração do analito na amostra fortificada, C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada e C_3 = concentração do analito adicionada.

O fator de melhoramento foi calculado através da razão entre os coeficiente angulares das curvas analíticas confeccionadas com 1 % (m v^{-1}) e acetonitrila e da curva construída com

padrões de B(a)P em água para avaliar a diferença de intensidade máxima de emissão de fluorescência do analito em meio micelar e em meio aquoso (COSTA, 2013).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação dos comprimentos de onda de excitação

O comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência do B(a)P ocorreu em 405 nm, partindo-se de uma excitação em comprimento de onda de 286 nm. A aplicação deste comprimento de onda para excitar as moléculas do analito pode ser justificada através da observação do espectro UV-Vis do B(a)P em acetonitrila (**Figura 4.1**).

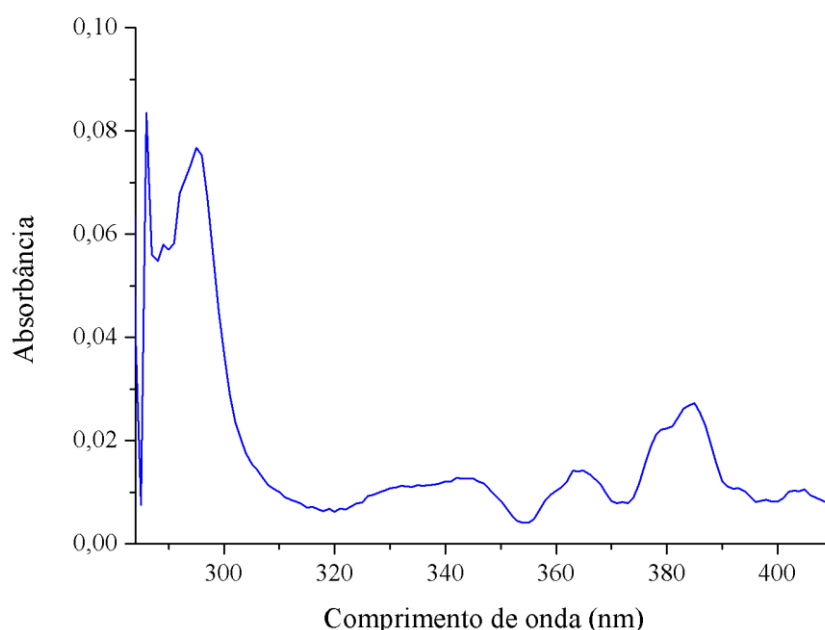


Figura 4.1 – Espectro típico de absorção molecular para uma solução $110 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P em acetonitrila.

Assim, observa-se no espectro que a absorção máxima do analito ocorre na região de comprimento de onda de 280 a 295 nm. Tendo em vista que a formação de estados excitados acontece primeiramente por absorção de radiação, para em seguida haver a emissão de fluorescência, o espectro de excitação deve ser idêntico ao de absorção em condições semelhantes (SKOOG, 2008). O comprimento de onda que corresponde à máxima magnitude de absorção para uma molécula fluorescente deve ser aquele que proporciona maior intensidade de fluorescência, uma vez que absorve mais radiação luminosa, o que possibilita o aumento da população de moléculas que podem alcançar o estado excitado (JAMESON, 2014; ALBANI, 2007). Isso significa que a intensidade de emissão depende do comprimento de onda de excitação (JAMESON, 2014). Assim, diferentes comprimentos de onda de excitação podem ser

utilizados para a obtenção de espectros de emissão, os quais são apresentados na **Figura 4.2** para o B(a)P.

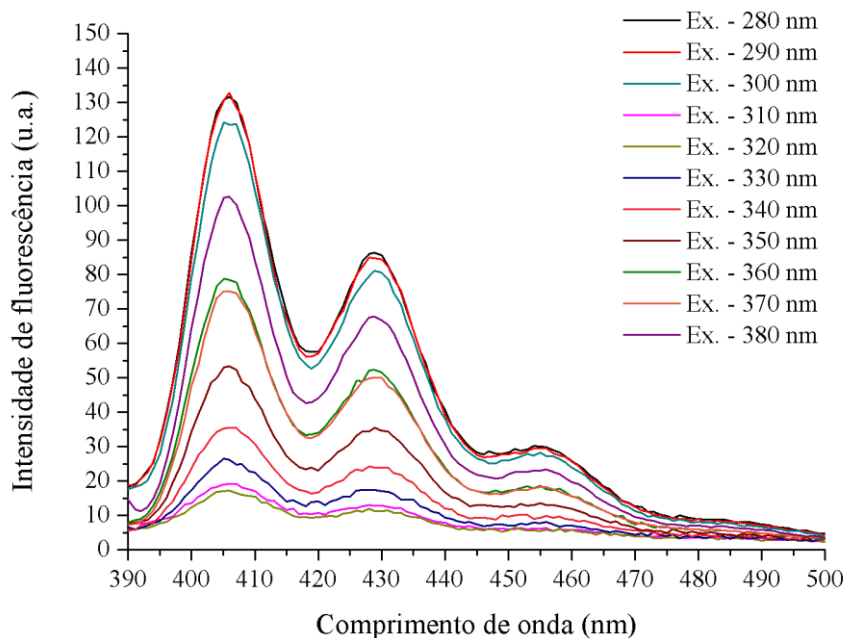


Figura 4.2 – Espectros de fluorescência para uma solução de B(a)P $20 \mu\text{g L}^{-1}$ com comprimento de onda de excitação variando de 280 a 380 nm.

Nas medidas realizadas, observou-se na **Figura 4.1** que a região espectral onde ocorre a maior absorção de radiação situa-se entre 280 e 300 nm, apresentando, portanto, maior intensidade de emissão. Assim, para se obter espectros de fluorescência com intensidades maiores possíveis no comprimento de onda de emissão (405 nm), utilizou-se comprimento de onda de excitação de 286 nm.

A intensidade do sinal de emissão fluorescente (405 nm) em função do comprimento de onda de excitação (variando de 280 nm a 380 nm) para a concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P, está mostrada na **Figura 4.3**.

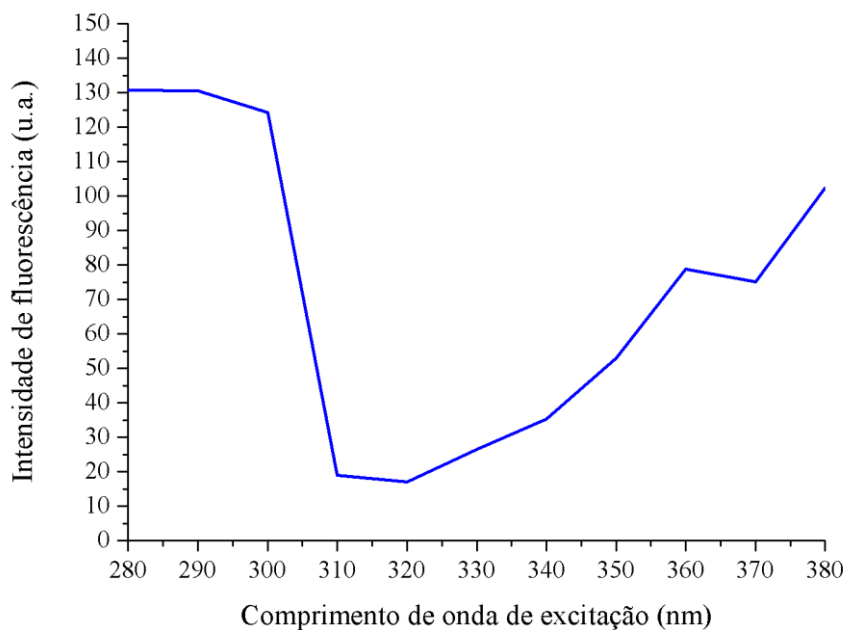


Figura 4.3 – Intensidade máxima de emissão de fluorescência em 405 nm de uma solução de B(a)P com concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para diferentes comprimentos de onda de excitação.

A informação apresentada nos gráficos reitera o uso de comprimentos de onda de excitação na região entre 280 e 290 nm, pois as intensidades de emissão ($\lambda=405$ nm) são maiores nessa faixa. O emprego de comprimentos de onda de excitação na região destacada pode ser confirmado pela comparação de métodos que aplicaram a determinação de B(a)P por fluorescência molecular (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 – Comprimentos de onda de excitação e emissão para determinação fluorimétrica de B(a)P encontrados na literatura.

Analito	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)	Referência
Benzo(a)pireno	286	410	PENA <i>et al.</i> , 2009
	290	405	GORYACHEVA <i>et al.</i> , 2005
	296	406	YUSTY E DAVIÑA, 2005
	294	404	FALCÓN <i>et al.</i> , 1996
	295	405	KAYALI <i>et al.</i> , 1995
	296	405	LAKOWICZ <i>et al.</i> , 1980

4.2 Avaliação da percentagem ótima de dodecil sulfato de sódio

A partir dos espectros de emissão obtidos para amostras de brancos analíticos contendo concentrações de 1,0 e 4,3 % (m v^{-1}) de SDS, observou-se significativo aumento na linha de base (Figura 4.4).

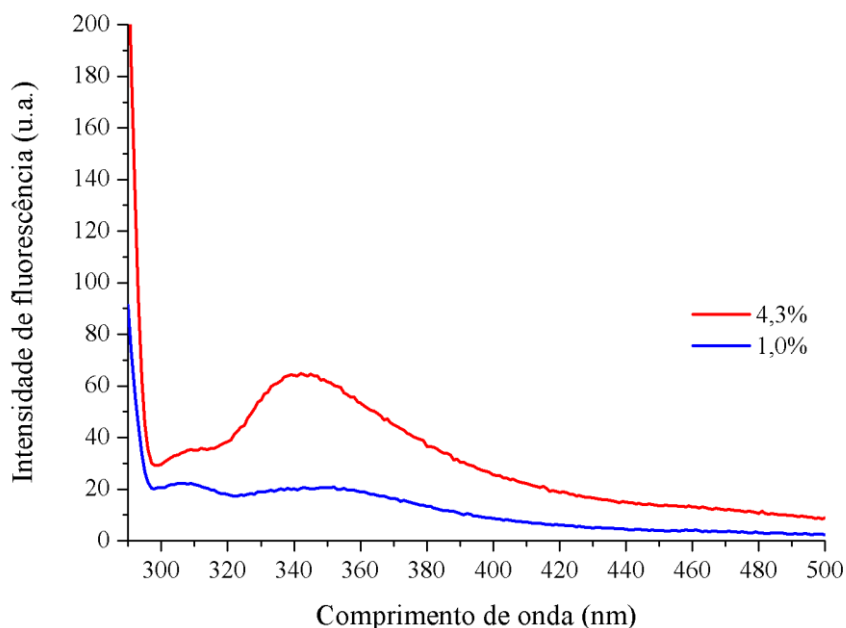


Figura 4.4 - Espectros de fluorescência molecular de brancos analíticos com concentrações de SDS de 1,0 e 4,3 % (m v^{-1}); $\lambda_{\text{excitação}}=286 \text{ nm}$.

Considerando-se que o aumento da linha de base para a concentração de 4,3 % (m v^{-1}) de SDS parece comprometer de forma significativa a região em torno de 405 nm, que corresponde ao comprimento de onda de emissão do B(a)P, um estudo sobre a concentração ótima de surfactante a ser utilizada foi feito, com o objetivo de avaliar possível influência sobre a sensibilidade analítica.

O efeito da concentração de SDS na magnitude de sinal do analito foi avaliado utilizando-se uma solução padrão $20 \mu\text{g L}^{-1}$ B(a)P e diferentes quantidades de SDS (0,0 %; 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 %; 3,5 % e 4,3 % m v^{-1}). Os resultados podem ser observados na Figura 4.5.

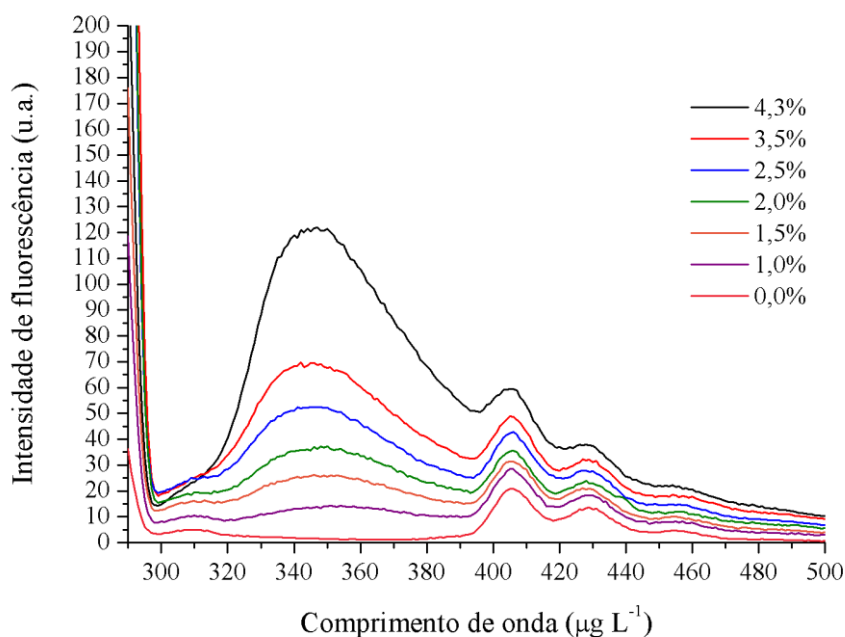


Figura 4.5 – Espectros de fluorescência de uma solução $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P na presença de diferentes concentrações de SDS: 0,0 %; 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 %; 3,5 % e 4,5 % (m v^{-1}); $\lambda_{\text{excitação}} = 286 \text{ nm}$.

Observa-se que o aumento da concentração de SDS promoveu intensificação da banda registrada entre 320 e 390 nm, resultando em sobreposição à banda de emissão de fluorescência molecular do B(a)P ($\lambda=405 \text{ nm}$). O efeito de sobreposição manifesta-se mais acentuadamente a medida que aumenta a concentração de SDS utilizado para realizar o procedimento, fato que compromete a sensibilidade analítica, ou seja, quanto maior a concentração de SDS, maiores serão os limites de detecção para o B(a)P. De acordo com Casero e colaboradores (1999), a porcentagem mínima de SDS para haver o fenômeno de ponto nuvem é de aproximadamente 0,5 % (m v^{-1}). No entanto, tal concentração de surfactante é muito baixa, acarretando em uma pequena quantidade de fase rica em surfactante formada após o procedimento de ponto nuvem, que dificulta o processo de transferência da fase de interesse para o balão volumétrico (CASERO *et. al.*, 1999).

Os espectros gerados para diferentes concentrações de SDS mostrados na **Figura 4.5** foram corrigidos utilizando-se o *software* OriginPro® 8. Para a correção dos espectros, aplicou-se o método de normalização programado para dividir as intensidades de fluorescência em cada comprimento de onda pelo menor valor de intensidade de fluorescência como visto na **Equação 4.1**.

$$Y' = Y/Y_{\text{mínimo}} \quad (4.1)$$

Onde Y' é o dado normalizado, Y é a intensidade de fluorescência e $Y_{\text{mínimo}}$ é o valor mínimo de fluorescência.

Os espectros normalizados, assim como as intensidades de emissão de fluorescência (405 nm) em função da concentração de SDS estão apresentados na **Figura 4.6**.

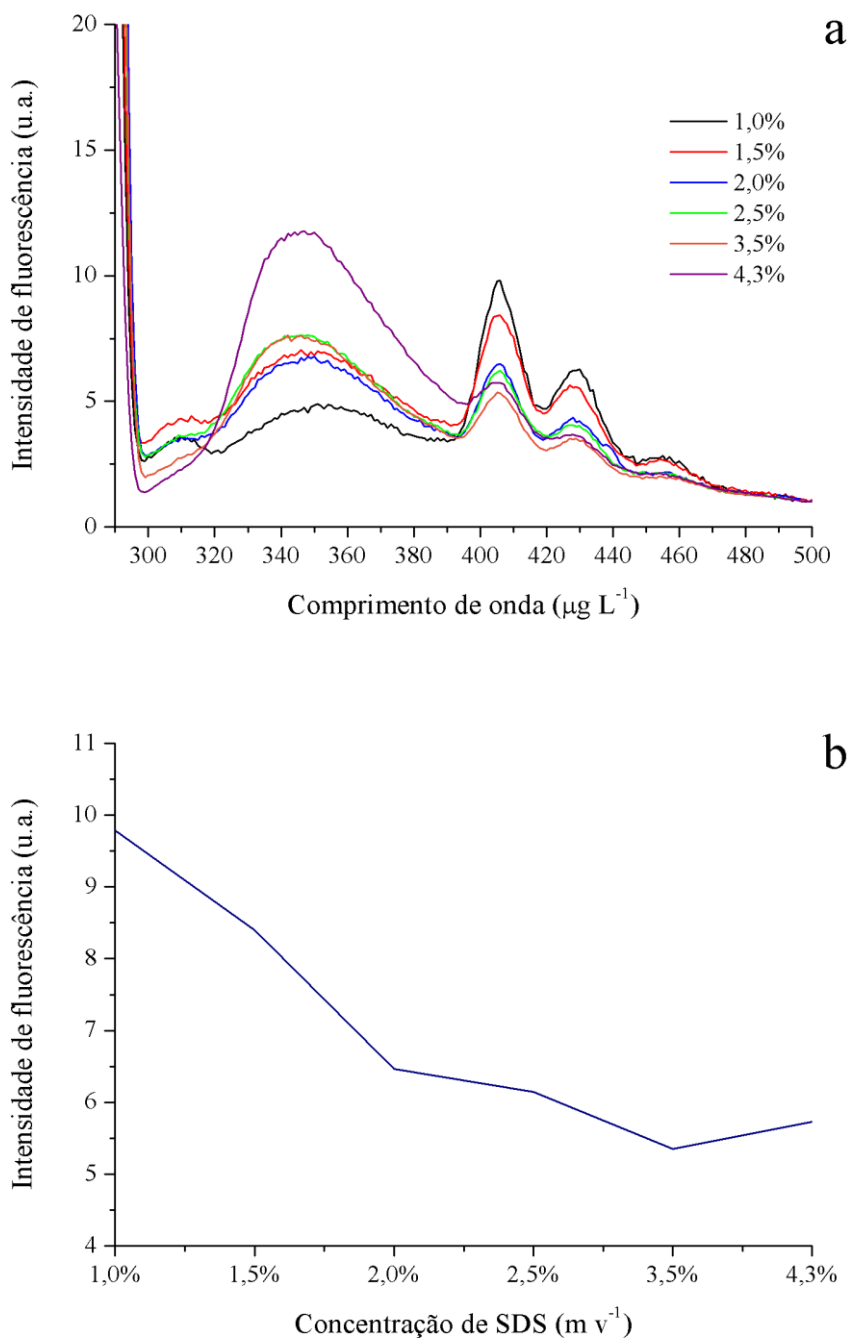


Figura 4.6 – (a) Espectros de emissão normalizados de uma solução $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P na presença de diferentes concentrações de SDS: 1,0 %; 1,5 %; 2,0 %; 2,5 %; 3,5 % e 4,5 % (m v^{-1}); $\lambda_{\text{excitação}} = 286 \text{ nm}$. (b) intensidades de emissão de fluorescência (405 nm) em função da concentração de SDS.

As respostas analíticas normalizadas evidenciaram que a intensidade máxima de emissão do B(a)P diminui à medida que a concentração de SDS aumenta. Essa constatação é reforçada pelo trabalho de Ghosh e colaboradores (2004) onde os autores mostraram que, o aumento da concentração de SDS faz com que a intensidade de fluorescência do 1-metilaminopireno diminua (GHOSH *et. al.*, 2004).

Dessa forma, a concentração de 1,0 % (m v⁻¹) de SDS foi escolhida para a realização do procedimento de extração em ponto nuvem. Ressalta-se que a obtenção do ponto nuvem ocorreu em temperatura ambiente de 21 °C, sem a necessidade de aquecimento, o que facilita sobremaneira o procedimento de extração.

Com base nesses resultados, a eficiência de extração utilizando-se uma concentração de 1,0 % (m v⁻¹) de SDS foi testada, visando à determinação de B(a)P em amostras de água potável. Um teste preliminar foi realizado para avaliar o percentual de recuperação do analito para uma solução aquosa com concentração de 20 µg L⁻¹ B(a)P. O teste evidenciou uma recuperação média de 95,5%, indicando a porcentagem de 1,0 % (m v⁻¹) de SDS promissora para o desenvolvimento do método, especialmente em termos de limite de detecção devido a menor interferência da linha de base quando comparado com às demais concentrações de SDS avaliadas.

4.3 Curva analítica e parâmetros de desempenho

Uma curva analítica foi construída empregando-se a quantidade ótima de SDS definida como 1,0 % (m v⁻¹) para formação da fase rica e subsequente utilização para preparação dos padrões analíticos, com concentrações de 1, 4, 28, 55, 82 e 110 µg L⁻¹, **Figura 4.7**.

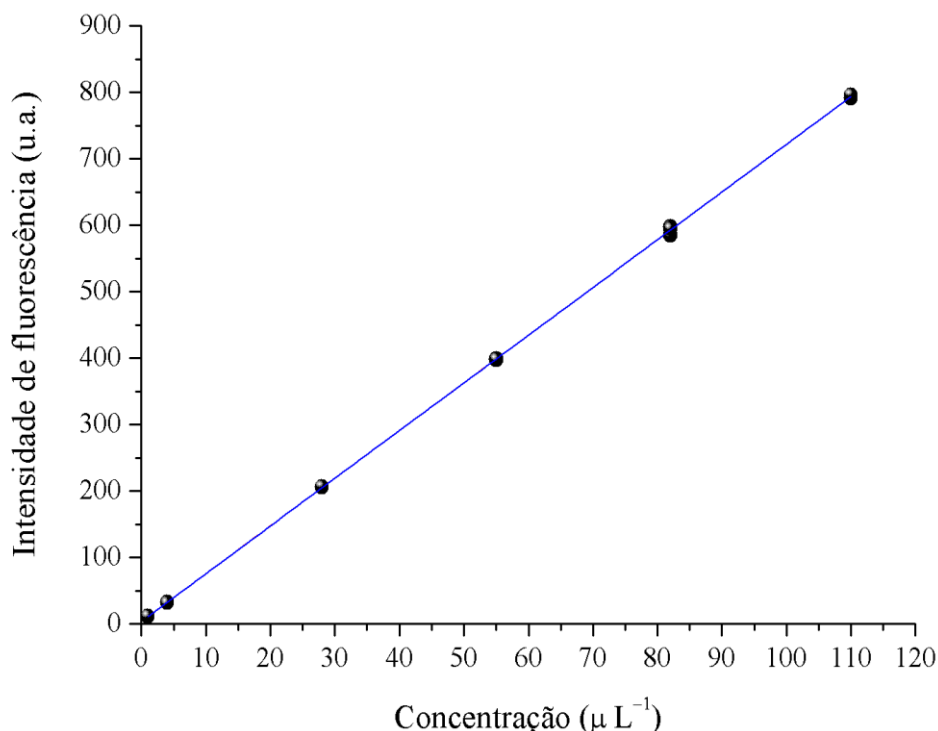


Figura 4.7 – Curva analítica ($y = 7,1627x + 4,8644$) construída para o B(a)P com concentrações de 1 a $110 \mu\text{g L}^{-1}$ e triplicata em cada ponto.

Valores de LOD e LOQ de $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, foram calculados considerando um desvio padrão de 0,26 para sete medidas de brancos analíticos.

A linearidade mostrou-se satisfatória, pois apresentou r^2 de 0,9999. Portanto, o procedimento de extração de B(a)P a partir de uma solução de 1,0 % (m v^{-1}) de SDS utilizada para a formação da fase rica foi satisfatório, uma vez que o LOD obtido exibiu valor suficientemente abaixo do limite máximo permitido de benzo(a)pireno ($0,7 \mu\text{g L}^{-1}$) em água potável pelo Ministério da Saúde. É importante destacar que valores de LOD superiores foram obtidos para concentrações de SDS superiores a 1 % (m v^{-1}), inadequados para a aplicação proposta. Como exemplo, utilizando concentração de SDS de 4,3 % (m v^{-1}), foram obtidos os valores de $2,15 \mu\text{g L}^{-1}$ para LOD e $7,18 \mu\text{g L}^{-1}$ para LOQ.

Embora os valores de LOD, LOQ, r^2 e a linearidade da curva analítica sejam satisfatórios, não é possível assegurar a validade do modelo sem avaliar a sua significância e averiguar se o modelo está bem ajustado. Para isso, a análise de variância (ANOVA) mostra-se necessária como ferramenta de validação do modelo de calibração construído. Na **Tabela 4.2** estão exibidos os valores das somas e médias quadráticas obtidos para o modelo.

Tabela 4.2 – Tabela de ANOVA para a avaliação do modelo univariado.

Fonte de variação	Soma quadrática (SQ)	Média quadrática (MQ)
Regressão	1,76 x 10 ⁶	1,76 x 10 ⁶
Resíduo	121,15	6,37
Falta de ajuste	51,10	10,22
Erro puro	70,04	5,00

Para a avaliação da significância da regressão e de falta de ajuste foram utilizadas as médias quadráticas. O valor para o teste de significância da regressão foi calculado pela razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo (MQ_{reg}/MQ_r). O valor obtido para este teste deve ser muito maior que o ponto da distribuição F a um nível de confiança de 95%. O valor para o teste de falta de ajuste foi calculado pela razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}). O valor obtido para este teste deve ser menor que o ponto da distribuição F a um nível de confiança de 95%. Os resultados para estes testes são apresentados na **Tabela 4.3**.

Tabela 4.3 – Resultados de significância da regressão e de falta de ajuste do modelo obtidos a partir da ANOVA.

MQ_{reg}/MQ_r	MQ_{faj}/MQ_{ep}	Graus de liberdade		$F_{v1,v2}$ a 95%	
		Significância da regressão	Falta de ajuste	Significância da regressão	Falta de ajuste
$2,7 \times 10^5$	2,04	$v1 = 1$ e $v2 = 19$	$v1 = 5$ e $v2 = 14$	4,38	2,96

$v1$ = graus de liberdade do numerador; $v2$ = graus de liberdade do denominador.

Os resultados apresentados na Tabela 4.3 mostram que o modelo linear possui significância e não apresenta falta de ajuste, pois, o teste de significância da regressão apresentou valor muito maior que o ponto de distribuição F a um nível de 95% de confiança. Para o teste de falta de ajuste, foi obtido um valor menor que o ponto de distribuição F a um nível 95% de confiança. Os valores de significância da regressão e de falta de ajuste foram obtidos pela tabela de distribuição F de Snedecor.

O fator de melhoramento foi calculado pela razão entre os coeficientes angulares desta curva analítica e o coeficiente angular da curva construída com padrões em água. O fator de melhoramento obtido pelo método apresentou valor de 21. Este valor corrobora o fato de que, na presença do surfactante, o analito apresenta maior intensidade de emissão de fluorescência, pois em solvente polar como a água, a emissão do fluoróforo é significativamente suprimida,

justificando a necessidade de etapas de extração do analito da matriz aquosa (LAKOWICZ, 2006).

Os testes de recuperação estão apresentados na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4 – Resultados para os testes de recuperação do B(a)P realizados para três níveis de concentração, baixo, médio e alto, da faixa linear.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
1	$1,23 \pm 0,68$	123
50	$42,50 \pm 1,36$	85
110	$88,00 \pm 0,40$	80

Para os testes de recuperação realizados em triplicatas, foram utilizados três níveis de concentração, 1, 50 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$. Verificou-se resultados apropriados com valores de recuperação no intervalo de 80 e 123 %. São aceitáveis valores de 70 a 120 %, portanto, os valores calculados foram considerados satisfatórios (ANVISA, 2003).

Uma comparação da curva analítica da **Figura 4.7** com duas curvas construídas com B(a)P em acetonitrila e B(a)P em água pode ser visualizada na **Figura 4.8**.

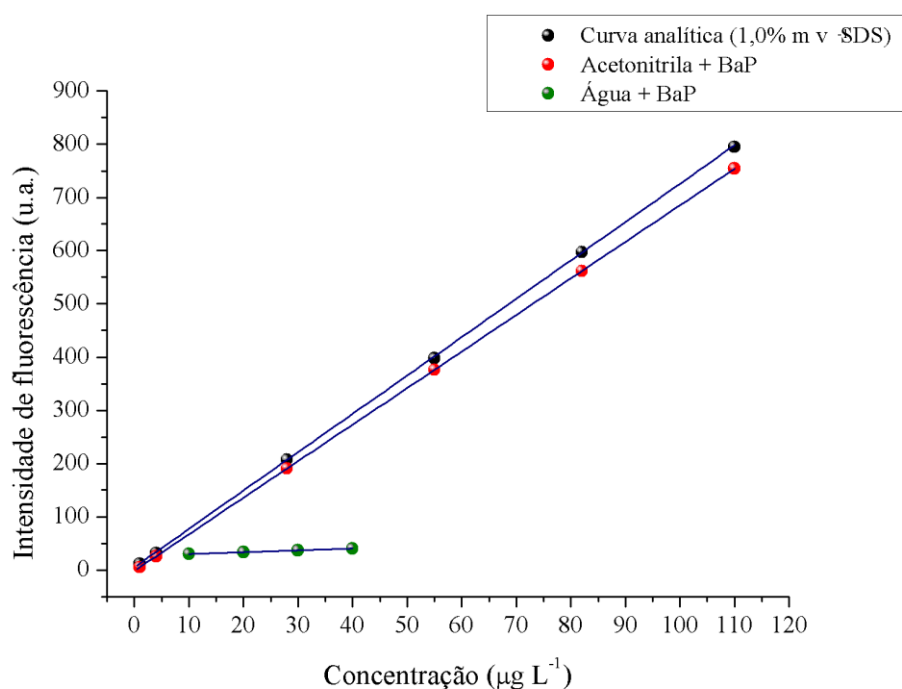


Figura 4.8 – Comparação entre as curvas analíticas geradas para o B(a)P empregando-se o método proposto, a diluição com acetonitrila e com água.

Na **Figura 4.8**, nota-se que há um aumento nas intensidades de emissão para os padrões analíticos na presença do surfactante. A presença do SDS pode aumentar a intensidade de emissão do B(a)P. O surfactante interage com a espécie de interesse modificando seu microambiente, dificultando, dessa forma, o acesso de espécies supressoras de luminescência ao B(a)P (GHOSH *et al.*, 2004; APPELL e BOSMA, 2011).

Um estudo realizado por Appell e Bosma (2011) demonstrou que a intensidade de emissão da zearalenona, uma micotoxina produzida por espécies fúngicas conhecidas como *Fusarium*, é influenciada pelo microambiente através da avaliação da intensidade de fluorescência desta espécie quando presente em soluções de diferentes solventes. Os autores observaram que quanto menor a polaridade do solvente maior a intensidade de emissão da zearalenona. Com isso, concluíram que o aumento na intensidade de fluorescência do fluoróforo na presença de solução micelar formada pelo SDS, assim como outros surfactantes, deve-se a baixa polaridade no interior das micelas (APPELL e BOSMA, 2011).

A mesma conclusão foi descrita por Magri e colaboradores (2009), uma vez que foi percebido que os espectros de fluorescência do antraceno apresentaram maior intensidade de emissão com o aumento da concentração de SDS. Segundo os autores, esses resultados demonstram que há a incorporação do fluoróforo em um microambiente de menor polaridade (MAGRI *et al.*, 2009). Como a água é um solvente polar, espera-se supressão considerável do fluoróforo neste meio, como visto na **Figura 4.8** para as respostas de fluorescência do B(a)P em meio aquoso, pois a emissão fluorescente foi nitidamente suprimida, fato observado pela pequena inclinação da curva analítica.

Com os resultados dos parâmetros analíticos obtidos acima, evidenciou-se que a metodologia proposta tem potencial para a análise de água potável. Desta forma, as dez amostras de água potável coletadas foram analisadas, em triplicatas. Como resultado, não foi detectada a presença de B(a)P em nenhuma das amostras. Todas as amostras estão em conformidade com o previsto na legislação, ou seja, teores de B(a)P inferiores a $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

O método proposto apresenta LOD e LOQ próximos aos encontrados em outros métodos de extração e determinação de B(a)P em água, podendo apresentar valores muito abaixo dos obtidos até mesmo por cromatografia gasosa, como pode ser visto na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5 – LOD e LOQ para métodos de extração e determinação de B(a)P em água.

Método de extração	LOD (μL^{-1})	LOQ (μL^{-1})	Deteção	Referência
CPE	0,12	0,37	Espectrometria de fluorescência	Este Trabalho
CPE	0,02	0,07	GC - MS	ROCHA, 2013.
SPE	500	1.600	GC - FID	CAVALCANTE, 2007.
SPE	0,03	0,12	GC - FID	BISPO, 2005.
μ - SPE	0,14	-	UV/Vis	HUANG <i>et al.</i> , 2011.

4.4 Avaliação da estabilidade da solução de benzo(a)pireno

Segundo Caruso e colaboradores (2008), os HPAs são estáveis quimicamente, porém degradáveis por oxidação e luz. Para os autores, a degradação desses compostos diminui com o aumento do número de anéis aromáticos. Deste modo, sendo o B(a)P um HPA com alto número de anéis aromáticos, evidencia-se sua estabilidade mesmo em ambientes que apresentam fatores possíveis de acarretarem degradação a este tipo de composto (CARUSO *et al.*, 2008). A estabilidade de uma solução de B(a)P foi avaliada ao longo de nove semanas e os resultados estão mostrados na **Figura 4.9**.

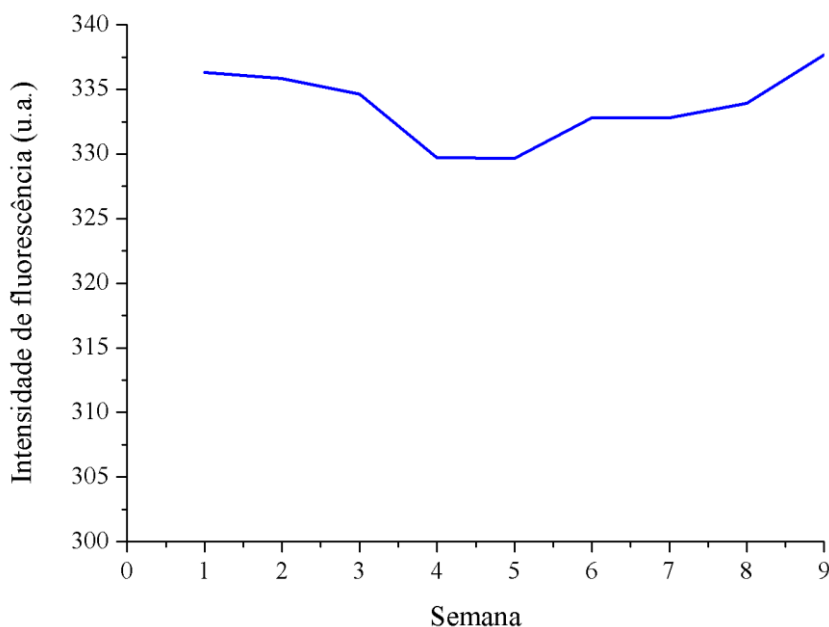


Figura 4.9 – Intensidades de emissão obtidas para uma solução $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ de B(a)P medida semanalmente, ao longo de nove semanas.

Não se percebeu, ao longo das nove semanas, evidências de degradação do analito, ou seja, a solução permaneceu estável, corroborando informações da literatura sobre a estabilidade

dos HPAs, especialmente do B(a)P. Os valores de resposta analítica variaram de 329,66 a 337,68, com valor médio igual a $333,70 \pm 2,77$, correspondendo a um coeficiente de variação de 0,83 %, demonstrando que não houve degradação do composto ao longo das semanas avaliadas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Os estudos mostraram que o máximo de emissão de fluorescência para o B(a)P é obtido na região de comprimento de onda de excitação entre 280 e 290 nm, onde ocorre a máxima absorção de energia pela molécula do benzo(a)pireno.

Observou-se que o aumento da concentração de SDS altera os espectros de fluorescência molecular do analito, acarretando em sobreposições à banda de emissão de fluorescência do B(a)P quando a concentração do surfactante é maior que 1,0 % (m v⁻¹). Além disso, espectros normalizados evidenciaram que a resposta analítica do B(a)P diminui à medida que a concentração do surfactante aumenta. Dessa forma, entre as concentrações do SDS estudadas, a de 1,0 % (m v⁻¹) mostrou-se adequada para o método proposto.

O método apresentou linearidade na faixa estudada. Os demais parâmetros de desempenho analítico avaliados (limite de detecção, limite de quantificação e recuperação) foram satisfatórios para a aplicação proposta. A análise de variância mostrou que o modelo linear possui significância e não apresenta falta de ajuste.

A utilização do método para a determinação de B(a)P em água potável mostrou-se viável, uma vez que o limite de detecção estimado (0,12 µg L⁻¹) está abaixo do limite máximo permitido na legislação vigente (0,7 µg L⁻¹). Não foi detectada a presença de B(a)P em nenhuma das dez amostras de água potável coletadas em dez bairros da cidade de João Pessoa.

Diferentes medidas realizadas ao longo de nove semanas para uma mesma solução de B(a)P indicaram que a concentração se manteve estável, o que condiz com informações da literatura sobre a estabilidade de HPAs.

A extração em ponto nuvem de benzo(a)pireno em água potável, usando o dodecil sulfato de sódio como surfactante, revelou-se como uma técnica simples, rápida e de baixo custo, viável para aplicação por fluorescência molecular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes.** Diário Oficial da União; Brasília, 17 jan 2007.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons.** Atlanta, GA, 1995.
- AL-RASHDI, A. A. **Double-functionalized magnetic nanoparticles for preconcentration and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples.** Analytical Chemistry Research 10 (2016) 9-17.
- ALBANI, J. R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy.** Blackwell Publishing, 2007.
- ALMEIDA, J. V. **Efeitos tóxicos de benzo(a)pireno sobre a macroalga vermelha *Gracilaria birdiae*.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AMIRI, A; GHAEMI, F. **Graphene grown on stainless steel mesh as a highly efficient sorbent for sorptive microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples.** Analytica Chimica Acta 994 (2017) 29-37.
- ANTONIOLLI, P. R.; VICENTE, E.; CAMARGO, M. C. R. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Óleos de Soja Comerciais.** 2º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, 2008.
- APPELL, M.; BOSMA, W. B. **Effect of surfactants on the spectrofluorimetric properties of zearalenone.** Journal of Luminescence 131 (2011) 2330-2334
- ARAÚJO, L. P. **Avaliação de exposição de pescados a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na Baía de Guanabara – Rio de Janeiro – Brasil.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- ARAÚJO, L. M. P. **Análise de Detecção de Fluorescência para Aplicação em Sistemas de Diagnóstico em Saúde.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BARBOSA, M. F. **Um método automático de preparação de misturas gasosas para determinação cromatográfica de metano, etano e propano em GNV.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

BARROS, B.N.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada).** Química Nova 25 (2002) 856-865.

BARROSO, H. S. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em organismos marinhos da Baía do Almirantado, Península Antártica.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BERNARDO, D. L. **Estudo teórico do potencial carcinogênico de de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus metabólitos.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C. **Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica.** – Vitória da Conquista: Edições Uesb, 2006.

BISPO, J. R. L. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em água produzida por extração em fase sólida e cromatografia gasosa com detector de ionização por chama.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Diário Oficial da União; Brasília, 12 dez 2011.

BRITO, C. F. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque Pedroso, Santo André, SP.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009.

CARUSO, M. S. F., ALABURDA J. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão.** Revista do instituto Adolfo Lutz, 67(1) (2008) 1-27.

CASTRO, D. M. O. **Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos no Ar Ambiente.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Ambiente). Universidade de Porto, Porto, 2010.

CASERO, I; SICILIA, D.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. **An Acid-Induced Phase Cloud Point Separation Approach Using Anionic Surfactants for the Extraction and Preconcentration of Organic Compounds.** *Analytical Chemistry* 71 (1999) 4519-4526.

CAVALCANTE, R. M. **Otimização de metodologias de extração e análises de HPAs para determinação da distribuição ambiental e estimativa de fontes na cidade de Fortaleza.** Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CHAVÉZ, I. P. A. **Avaliação dos teores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes acondicionadas em tonéis de carvalho.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Diário Oficial da União; 18 mar 2005.

COSTA, A. F. **Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHS): 1-Hidroxi-pireno urinário.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

COSTA, B. E. S. **Extração Seletiva por Ponto Nuvem Para Pré-Concentração e Especificação de Arsênio Inorgânico em Matriz Alimentícia Empregando Espectrometria de Absorção Atômica Eletrotérmica em Forno de Grafite.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2013.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações.** – São Paulo: Blucher, 2011.

DAVE, N.; JOSHI, T. A. **Concise Review on Surfactants and Its Significance.** *International Journal of Applied Chemistry* 13 (3) (2017) 663-672.

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

DIAS, Z. M. M. S. **Degradação do Benzo(a)Pireno em Matrizes Aquosas por Oxidação Química com Reagente de Fenton.** Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente). Universidade do Porto, Porto, 2008.

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

EUROPEAN COMMISSION. **Health and Consumer Protection Directorate-General. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects.** SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Brussels, 2002.

EUROPEAN COMMISSION (EU) n° 835. (2011). Official Journal of the European Union. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:215:0004:0008:EN:PDF>>. Acessado em 12.03.2017

FALCO, W. F. **Aplicação da fluorescência da clorofila α induzida por luz laser no processo de caracterização da interação nanopartícula-planta.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2012.

FALCÓN, M. S. G.; AMIGO, S. G.; YUSTY, M. A. L.; VILLAIZFIN, M. J. L. A.; LOZANO, J. S. **Enrichment of benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography fluorescence detection.** Journal of Chromatography A 753 (1996) 207-215.

GHOSH, S. K.; PAL, A.; KUNDU, S.; MANDAL, M.; NATH, S.; PAL, T. **Emission Behavior of 1-Methylaminopyrene in Aqueous Solution of Anionic Surfactants.** Langmuir 20 (2004) 5209-5213.

GONZÁLEZ, D.; RUIZ, L. M.; GARRALÓN, G.; PLAZA, F.; ARÉVALO, J.; PARADA, J. **Wastewater polycyclic aromatic hydrocarbons removal by membrane bioreactor.** Desalination and Water Treatment 42 (2012) 94-99.

GORE, M. G. **Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach.** Oxford University Press, 2000.

GORYACHEVA, I. Y.; SHYKOV, S. N.; LOGINOV, A. S.; PANTELEEVA, I. V. **Preconcentration and fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on the acid-induced cloud-point extraction with sodium dodecylsulfate.** Analytical and Bioanalytical Chemistry 382 (2005) 1413-1418.

GUI TERAS, J.; BELTRÁN J. L.; FERRER, R. **Quantitative multicomponent analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples.** *Analytica Chimica Acta* 361(1998) 233-240.

HOLMBERG, K. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution.** – The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England: Jhon Wiley & Sons Ltd, 2003.

HUANG, Y.; ZHOU, Q.; XIE, G. **Development of micro-solid phase extraction with titanate nanotube array modified by cetyltrimethylammonium bromide for sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples.** *Journal of Hazardous Materials* 193 (2011) 82-89.

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

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Disponível em http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf. Acesso em 12.11.2017.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear Aromatic Compounds.** Lyon, 1983.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Chemical agents and related occupations volume 100 F A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** Lyon, World Health Organization, 2012.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). **Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs.** World Health Organization, Geneva, 1998.

JAMESON, D. M. **Introduction to Fluorescence.** CRC Press Taylor & Francis Group, 2014.

KAMAL, M. S.; HUSSEIN, I.A.; SULTAN, A. S. **Review on Surfactant Flooding: Phase Behavior, Retention, IFT, and Field Applications.** *Energy Fuels* 31 (2017) 7701-7720.

KAYALI, M. N.; RUBIO-BARROSO, S.; POLO-DIEZ L. M. **Rapid PAH Determination in Urban Particulate Air Samples by HPLC with Fluorometric Detection and Programmed**

Excitation and Emission Wavelength Pairs. Journal of Chromatographic Science 33 (1995) 181-185.

KAREL, N.; IRENA, N. **Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means.** Analytical Letters 39 (2006) 1023-1040.

KAZEROUNI, N.; SINHA, R.; GREENBERG, A.; ROTHMAN, N. **Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study.** Food and Chemical Toxicology 39 (2001) 423-436.

KLEINE, T. **Cinética da toxicidade aguda da fração solúvel de compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) oriundas do petróleo em microcrustáceos marinhos.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente). Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2013.

KUESENG, P.; THAMMAKHET, C.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P. **Multiwalled carbon nanotubes/cryogel composite, a new sorbent for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons.** Microchemical Journal 96 (2010) 317-323.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Third Edition, Springer, 2006.

LAKOWICZ, J. R.; BEVAN D. R.; RIEMER S. C. **Transport of a carcinogen, benzo[a]pyrene, from particulates to lipid bilayers: A model for the fate of particle-adsorbed polynuclear aromatic hydrocarbons which are retained in the lungs.** Biochimica et Biophysica Acta, 629 (1980) 243-258.

LIMA, A. C. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas superficiais nos rios Piracicaba e Doce, Ipatinga-MG, utilizando a técnica de EFS-CLAE-DAD.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

LÓPEZ-LÓPEZ, J. A.; OGALLA-CHOZASA, E.; LARA-MARTÍN, P. A.; PINTADO-HERRERA, M. G. **Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples.** Science of the Total Environment 598 (2017) 58-63.

LUZ, R. L. F. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Queijos Defumados e em Queijos Assados em Churrasqueiras.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. 6^a edition, Lewis Publisher, New York, 1994.

MANIASSO, N. **Ambientes micelares em química analítica**. Química Nova 24 (1) (2001) 87-93.

MARANHÃO, T. A. **Determinação de Cd e Pb em urina e sangue por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite após extração no ponto nuvem com otimização multivariada: Aplicação em trabalhadores de uma fundição**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. **Solubilidade das substâncias orgânicas**. Química Nova 36 (8) (2013) 1248-1255.

MEIRA, M.; QUINTELLA, C. M.; FERRER, T. M.; SILVA, H. R. G.; GUIMARÃES A K.; SANTOS, M. A. **Identificação de adulteração de biocombustível por adição de óleo residual ao diesel por espectrofluorimetria total 3d e análise das componentes principais**. Química Nova 34 (4) (2011) 621-624.

MENICONI, M. F. G. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente: diferenciação de fontes em sedimentos e metabólitos em bile de peixes**. Tese (Doutorado em Química). Universidade do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

MERINO, F.; RUBIO, S.; PEREZ-BENDITO, D. **Acid-induced cloud point extraction and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples**. Journal of Chromatography A 962 (2002) 1-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 2914 de dezembro de 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 02/10/2017.

MORALES, T. V.; ESPONDA, S. M.; RODRIGUEZ, J. J. S.; AARON, S. E.; AARON, J. **Luminescence methods for study and determination of pollutants in the environment**. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering 29 (1) (2010)1-42.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, 1999.

NAING, N. N.; LI, S. F. Y.; LEE, H. K. **Magnetic micro-solid-phase-extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water**. Journal of Chromatography A 1440 (2016) 23-30.

NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z. **Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pré-concentração.** Química Nova 25 (3) (2002) 483-489.

PADOVANI G. R., CAMARGO M. C. R., FURLANI R. P. Z., TFOUNI S. A. V. **Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em Óleos Compostos Comercializados no Brasil.** 6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC, 2012.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; KARAYANNIS, M. I. **Micelle-mediated separation and cloud-point extraction.** Trends in Analytical Chemistry 24 (5) (2005) 426-436.

PAVEI, P. T. **Caracterização e estudo do comportamento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em ecossistemas aquáticos contaminados pelas atividades de mineração de carvão.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

PELIZZETTI, E.; PRAMAURO E. **Analytical applications of organized molecular assemblies.** Analytica Chimica Acta, 169 (1985) 1-29.

PIMENTEL, M.F.; BARROS. B.N. **Calibração: Uma revisão para químicos analíticos.** Química Nova 19 (1996) 268-277.

PINO, V; AYALA, J; AFONSO, A; GONZÁLEZ, V. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following micelle-mediated pre-concentration.** Journal of Chromatography A 949 (2002) 291-299.

PISSINATTI, R. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em café torrado: otimização e validação de método por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

POLAKIEWICZ, L. **Estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nos estuários de Santos e São Vicente - SP utilizando diatomito como material adsorvente.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

PONTES J. P. S. D. **Tratamento eletroquímico de água produzida sintética para remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. **Surfactant-Mediated Cloud Point Extractions: An Environmentally Benign Alternative Separation Approach.** *Industrial Engineering Chemistry Research*. 38 (1999) 4150-4168.

REVISTA ACTA TECNOLÓGICA - Revista Científica - ISSN 1982-422X, Vol. 5, número 1, jan-jun 2010.

ROCHA, S. A. N. **Extração em ponto nuvem com derivatização do surfactante: uma alternativa para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas naturais por cromatografia gasosa.** Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ROSSI, C. G. F. T.; DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; MACIEL, M. A. M. **Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial.** *Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR*, 25 (1-2) (2006) 73-85.

RUBIO-CLEMENTE, A; TORRES-PALMA, R. A; PEÑUELA, G. A. **Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review.** *Science of the Total Environment* 478 (2014) 201-225.

SADEGHI, R.; KOBARFARD, F.; YAZDANPANA, H.; ESLAMIZAD, S.; BAYATD, M. **Validation of an Analytical Method for Determination of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in mineral water using dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 15 (1) (2016) 157-168.

SICILIA, D.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D.; MANIASSO, N.; ZAGATTO, E.A.G. **Anionic surfactants in acid media: a new cloud point extraction approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples.** *Analytica Chimica Acta* 392 (1999) 29-38.

SILVA, P. M. F. **Estudo dos principais fatores que influenciam na solubilização de HPAs em águas.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SHOKOUH, M; SERESHTI, H; AHMADVAND, M. **A nanocomposite consisting of silica-coated magnetite and phenyl-functionalized graphene oxide for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbon from aqueous matrices.** *Journal of environmental sciences* 55 (2017) 164-173.

SHUNPING, X.; PAAU, M. C.; LI, C. F.; XIAO, D.; CHOI, M. M. **Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction.** Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2306-2317.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** Sixth edition, Cengage Learning, 2008.

SOARES, S. A. R.; COSTA, C. R.; ARAUJO, R. G. O.; ZUCCHI, M. R.; CELINO, J. J.; TEIXEIRA L. S. G. **Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Groundwater Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry After Pre-Concentration Using Cloud-Point Extraction with Surfactant Derivatization.** Journal of the Brazilian Chemical Society 26 (5) (2015) 955-962.

TEIXEIRA, V. H. C. G. M. **Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Óleos Vegetais.** Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade). Universidade de Porto, Porto, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). **Priority Pollutant List Trends, 2014.** Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>>. Acessado em 22.04.2017

UNIÃO EUROPEIA. **Priority Substances and Certain Other Pollutants according to Annex II of Directive.** Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/water/waterframework/priority_substances.htm>. Acesso em 02.10.2017.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** Wiley-VCH, 2001.

VAN DER WIELEN, J. C.; JANSEN, J. T.; MARTENA, M. J.; DE GROOT, H. N.; VELD, P. I. **Determination of the level of benzo[a]pyrene in fatty foods and food supplements.** Food Additives and Contaminants 23 (7) (2006) 709-714.

VASCONCELLOS, P. C. **Um estudo sobre a caracterização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados, e hidrocarbonetos alifáticos saturados em material particulado atmosférico provenientes de sítios urbanos, suburbano e florestais.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

VEIGA I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de todos os santos/Bahia.** Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Reservatório e de Exploração). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé, 2003.

VIEIRA M. A. **Análise de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) nas etapas do processamento da erva-mate (*ilex paraguariensis*) e caracterização química dos resíduos da trituração para o desenvolvimento de produto.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VILLAR-NAVARRO, M.; MARTÍN-VALERO, M. J.; FERNÁNDEZ-TORRES, R. M.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; BELLO-LÓPEZ, M. A. **Easy, fast and environmental friendly method for the simultaneous extraction of the 16 EPA PAHs using magnetic molecular imprinted polymers (mag-MIPs).** Journal of Chromatography B 1044-1045 (2017) 63-69.

WATANABE, H.; TANAKA, H. **A nonionic Surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc (II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol.** Talanta 25 (1978) 585.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures.** IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 92 (2010).

WIETHAUS, G. **Síntese e Caracterização de Novas Iminas com Aplicação em Óptica Não-Linear.** Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

YAZDI, A. S. **Surfactant-based extraction methods.** Trends in Analytical Chemistry 30 (6) (2011).

YUSTY, M. A. L.; DAVIÑA, J. L. C. **Supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection method for polycyclic aromatic hydrocarbons investigation in vegetable oil.** Food Control 16 (2005) 59-64.