



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

Dissertação de Mestrado

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs LEVES EM
ÁGUAS E SOLOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA DE
NÁILON, ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM

Alcides da Silva Siqueira

João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro/2019



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

Dissertação de Mestrado

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs LEVES EM
ÁGUAS E SOLOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA DE
NÁILON, ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM**

Alcides da Silva Siqueira*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador 1: Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso

Orientador 2: Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida

*** Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

João Pessoa – PB – Brasil

Fevereiro/2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S618m Siqueira, Alcides da Silva.

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HPAs LEVES EM ÁGUAS E SOLOS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM MEMBRANA DE NÁILON, ESPECTROFLUORIMETRIA E CALIBRAÇÃO DE SEGUNDA ORDEM / Alcides da Silva Siqueira. - João Pessoa, 2019.

65 f.

Orientação: Wallace Duarte Fragoso, Luciano Farias de Almeida.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. 2. PARAFAC, espectrofluorimetria. 3. extração em fase sólida com membrana. I. Fragoso, Wallace Duarte. II. Almeida, Luciano Farias de. III. Título.

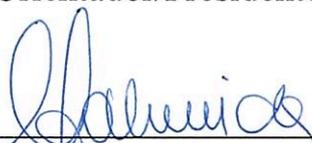
UFPB/CCEN

Metodologia analítica para determinação de HPAs leves em águas e solos por extração em fase sólida com membrana de náilon, espectrofluorimetria e calibração de segunda ordem.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Alcides da Silva Siqueira e aprovada pela banca examinadora em 27 de fevereiro de 2019.



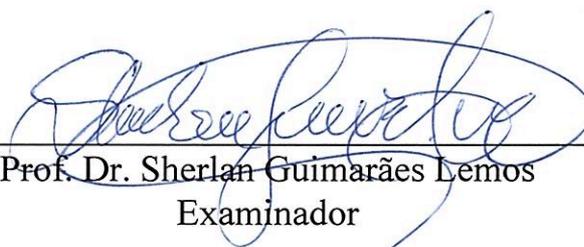
Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida
2º Orientador



Prof.ª Dr.ª Glauciene Paula de Souza Marcione
Examinadora



Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
Examinador

Aos meus pais José Siqueira e Maria Siqueira.

Dedico.

"Sobretudo, tenho certeza de que Deus está nos detalhes e as coisas mais simples são as melhores. Tá aí uma dessas velhas e surradas sabedorias que a gente teima em esquecer".

Humberto Gessinger

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me colocado em caminhos que me possibilitaram crescimento pessoal para servir ao próximo cada vez mais e melhor.

A minha família, principalmente meus pais José e Maria, pelo amor, união, companheirismo, compreensão e apoio incondicional.

A meus amigos do GEAQA e LAQA, junto a eles, foi mais fácil e agradável desempenhar as atividades acadêmicas.

A meus orientadores Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso (orientador 1) e Prof. Dr. Luciano Farias de Almeida (orientador 2) por toda a atenção e dedicação, pelo imenso suporte, por seus ensinamentos, motivações e correções durante este processo.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química que possibilitaram, através de toda sua estrutura (espaço físico, corpo docente, direção e administração) e organização, uma formação com seriedade e qualidade.

RESUMO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são compostos formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados e que constituem um grupo de mais de cem substâncias conhecidas. Dezesseis dessas são monitoradas devido à maior exposição humana, toxicidade e seus possíveis efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos em humanos. Eles são poluentes emergentes formados por combustão incompleta, sendo gerados em grande quantidade e de forma contínua pela atividade humana. Os métodos analíticos utilizados para determinação desses analitos são demorados, com alto consumo de solventes e necessitam de extração e /ou pré-concentração. A extração Soxhlet é recomendada e a etapa de concentração do extrato orgânico é geralmente feita por roto-evaporação ou fluxo de nitrogênio. Nesses procedimentos ocorrem perdas por evaporação das espécies mais voláteis como antraceno e fenantreno. Nesse contexto, a extração em fase sólida com membrana aliada a espectroscopia de fluorescência diretamente na membrana se mostra uma alternativa sensível, rápida e de baixo custo que, associada à calibração de ordem superior, permite quantificar esses compostos em diversas matrizes. Esse conjunto de técnicas possui uma limitação da sua aplicação em sistemas reais: possíveis particulados em suspensão na solução da amostra ficam retidos na membrana após a extração e podem comprometer a detecção de fluorescência por efeito filtro, inviabilizando a aplicação em matrizes mais complexas. Assim, no presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia para determinação de antraceno e fenantreno em amostras de águas e de solo utilizando a extração em fase sólida em membrana de náilon, espectroscopia de fluorescência direto na membrana e calibração de 2ª ordem (PARAFAC). A estratégia utilizada para evitar a interferência de particulados retidos na filtração foi realizar a detecção na face oposta à filtração. Os resultados obtidos mostraram que o método proposto permite identificar fenantreno e antraceno, e quantificar o fenantreno de forma simples, rápida e eficaz em amostras de solos e água de torneira contendo os dois isômeros.

Palavras Chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, espectroscopia de fluorescência, extração em fase sólida, membrana de náilon, calibração de segunda ordem, PARAFAC.

ABSTRACT

Aromatic Polycyclic Hydrocarbons are compounds formed by two or more condensed aromatic rings and constituting a group of more than one hundred substances. Sixteen of these are monitored because of increased human exposure, toxicity, and possible carcinogenic and / or mutagenic effects. They are emerging pollutants formed by incomplete combustion that are generated in large quantity and continuously by human activity. The analytical methods used to determine these analytes are time consuming, high solvent consumption and require extraction and / or preconcentration. Soxhlet extraction is recommended and the concentration step of the organic extract is generally done by roto-evaporation or nitrogen flow. In these procedures, evaporative losses occur of more volatile species, such as anthracene and phenanthrene. In this context, the solid phase extraction with membrane allied to the fluorescence spectroscopy directly on the membrane shows a sensitive, fast and low cost alternative that, together with the higher order calibration, allows to quantify these compounds in several matrices. This set of techniques has a limitation for its application in real systems: possible suspended particles in the sample solution are retained in the membrane after the extraction and can compromise the detection of fluorescence by filter effect, making it impossible to apply to matrices that are more complex. Thus, in the present work a methodology was developed for the determination of ANT and FEN in water and soil samples using solid phase extraction in nylon membrane, direct total membrane fluorescence spectroscopy and second order calibration. The strategy used to avoid the interference of particulates retained in the filtration was to perform the detection on the opposite side of the filter. The results showed that the proposed method allows to identify phenanthrene and anthracene, and to quantify phenanthrene in a simple, fast and efficient way in samples of soils and tap water containing the two isomers.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, fluorescence spectroscopy, continuous phase extraction, nylon membrane, second order calibration, PARAFAC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Figura 1 – Algumas fontes de HPAs e dispersão dos mesmos no ambiente.....	5
Figura 2 –	Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro	8
Figura 3 –	Espectros do FEN: em A, emissão (330-455 nm) sob excitação em 255 nm; em B, excitação (246-279 nm) e emissão 382 nm e; em C, fluorescência total (3D) com emissão (330-455 nm) e excitação (246-279 nm).....	9
Figura 4 –	Representação esquemática da decomposição PARAFAC. Decomposição de um tensor de dados em três vias.....	12
Figura 5 –	Diagrama esquemático da montagem para aquisição de espectro de fluorescência de uma membrana filtrante.....	13
Figura 6 –	Diagrama esquemático do porta filtro de aço e seus constituintes.....	14
Figura 7 –	Esquema da metodologia aplicada em águas.....	21
Figura 8 –	Esquema de procedimento utilizado em amostra de solo.....	22
Figura 9 –	Sistema de EFS desenvolvido, com localização dos componentes...	23
Figura 10 –	EFS em sistema básico, seringa + porta filtro.....	26
Figura 11 –	Câmara e funil para adição.....	28
Figura 12 –	Bomba construída com seringa.....	28
Figura 13 –	Espectros de emissão dos filmes da 1ª e 2ª filtrações de ANT e FEN, excitação em 255 nm.....	29
Figura 14 –	Variação do sinal de fluorescência do ANT e do FEN para diferentes volumes processados quando o número de mols do analito é mantido constante.....	30
Figura 15 –	Espectro de emissão de uma mistura de 24 ppb de ANT e 60 ppb de FEN (comprimento de onda de excitação de 255 nm).....	31
Figura 16 –	Decomposição dos componentes puros realizada pelo PARAFAC para os padrões de ANT e as misturas (em água destilada).....	32
Figura 17 –	Decomposição dos componentes puros realizada pelo PARAFAC para os padrões de FEN e as misturas (em água destilada).....	32

Figura 18 – Em (nu), membrana não utilizada; em (df), membrana que extraiu o analito de água destilada e; em (tf), membrana que extraiu o analito de água de abastecimento.....	34
Figura 19 – Deconvoluções e quantificações do ANT em água de potável.....	34
Figura 20 – Deconvoluções e quantificações do FEN em água de potável.....	35
Figura 21 – Membrana, não utilizada (nu), que filtrou solução em água destilada, frente (df) e verso (dv), e, que filtrou solução em água de torneira, frente (tf) e verso (tv).....	36
Figura 22 – Espectros medidos na frente (azul) e verso (vermelho) de membranas que processaram (EFS) soluções em água de torneira de ANT (a) e FEN (b).....	37
Figura 23 – Curvas analíticas do ANT e FEN medidas no lado exposto à filtração (azul) e oposto à filtração (vermelho).....	38
Figura 24 – Resultado, com detecção no verso da membrana, das deconvoluções e quantificações do ANT em misturas em água potável.....	38
Figura 25 – – Resultado, com detecção no verso da membrana, das deconvoluções e quantificações do FEN em misturas em água potável.....	39
Figura 26 – Membranas que filtraram, água destilada frente (df) e verso (dv), água de torneira frente (tf) e verso (tv) e, extrato de solo (0,5g) frente (sf) e verso (sv).....	41
Figura 27 – Resultado das deconvoluções e quantificações do ANT em solo contaminado com HPAs leves (detecção no verso da membrana).....	41
Figura 28 – Resultado das deconvoluções e quantificações do FEN em solo contaminado com HPAs leves (detecção no verso da membrana).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– HPAs monitorados (USEPA) e suas propriedades.....	3
Tabela 2	– Classificação dos HPAs quanto a carcinogenicidade de acordo com a Agência Internacional de Investigação em Câncer.....	4
Tabela 3	– Faixas de concentrações de HPAs encontrados em diversos compartimentos ambientais.....	5
Tabela 4	– Limites de prevenção e intervenção de HPAs em solos e águas subterrâneas segundo o CONAMA.....	6
Tabela 5	– Misturas, concentração obtida e recuperação de ANT e FEN em água destilada para teste do modelo PARAFAC.....	33
Tabela 6	– Misturas e recuperações de ANT e FEN em água de abastecimento para teste do modelo PARAFAC.....	35
Tabela 7	– Misturas de ANT e FEN em água de torneira e suas respectivas recuperações para teste do modelo PARAFAC. Espectros registrados no verso da membrana.....	39
Tabela 8	– Recuperações de ANT e FEN em amostras de solo.....	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
BaP	benzo[a]pireno
USEPA	United States Environmental Protection Agency
IARC	International Agency for Research on Cancer
CONAMA	Concelho Nacional do Meio Ambiente
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FEN	Fenantreno
RAFA	<i>Rank Annihilation Factor Analysis</i>
PARAFAC	Parallel Factor Analysis
N-PLS	N-way Partial Least Squares
MATLAB	MATLAB MATrix LABoratory
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
PCR	Principal. Components Regression
PLS	Partial Least Squares
CORCONDIA	CORe CONSistency, DIAGnostic
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PTFE	Politetrafluoretileno
EFS	Extração em Fase Sólida
SWATLD	Self-Weighted Alternating Trilinear Decomposition
RBL	Residual Bilinearization
DBA	Dibenzo(a,h)antraceno
ANT	Antraceno
PVC	Polyvinyl chloride
ES-FTA	Espectroscopia de superfície e Fluorescência em Temperatura Ambiente

SUMÁRIO

1	Fundamentos	1
1.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	2
1.2	HPAs no meio ambiente.....	4
1.3	Espectroscopia de fluorescência.....	7
1.4	Calibração de segunda ordem.....	9
1.5	Análise de fatores paralelos (PARAFAC)	11
1.6	Extração em fase sólida em membrana e análise por fluorescência em superfície sólida.....	13
2	Motivação e Objetivos	16
2.1	HPAs leves. Acúmulo e permanência de ANT e FEN no solo.....	17
2.2	Objetivo geral.....	18
2.3	Objetivos específicos.....	18
3	Metodologia.....	19
3.1	Procedimento experimental	20
3.2	Aparatos para a extração.....	22
3.3	Modelagem e calibração	24
4	Resultados e discussão..	25
4.1	Sistema de propulsão por pressão positiva.....	26
4.2	Avaliação inicial da adsorção dos analitos na membrana de náilon.....	29
4.3	Pré-concentração e variação do volume filtrado	30
4.4	Testes iniciais dos modelos de calibração.....	31
4.5	Determinação de FEN em água de abastecimento contaminada artificialmente com HPAs leves.....	34
4.6	Determinação de FEN em solo contaminado com HPAs leves.....	40
5	Conclusão	44
	Referências.....	46

Capítulo 1

Fundamentos

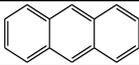
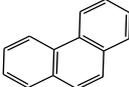
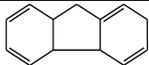
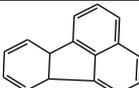
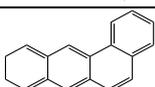
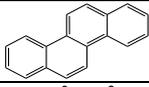
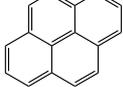
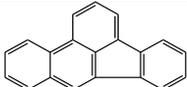
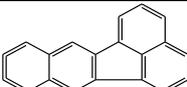
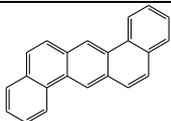
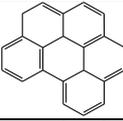
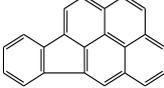
1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados, podendo apresentar também anéis com menos de seis carbonos, que constituem um grupo de mais de 100 compostos conhecidos. Eles apresentam baixa solubilidade em água e alto coeficiente de partição octanol/água. São formados por combustão incompleta de matéria orgânica e são os contaminantes mais frequentes no meio ambiente, podendo ser encontrados em diversos compartimentos ambientais como solo, água, ar e alimentos. A incidência de HPAs no ambiente é preocupante, pois, ocorre de forma abundante é associada a problemas respiratórios, gastrointestinais, hepáticos, geniturinários, hematológicos, dermatológicos, imunológicos, reprodutivos e cardiovasculares [1]. A principal relevância no monitoramento dos HPAs está no fato deles serem relacionados ao aumento de diversos tipos de cânceres em animais e humanos [2].

O primeiro indício de que os HPAs seriam agentes causadores de câncer ocorreu em 1775, quando o cirurgião do hospital St. Bartholomew (Londres, Inglaterra) Sir Percival Pott percebeu a incidência de casos de câncer de testículo em limpadores de chaminés, relacionando assim, a exposição à fuligem das chaminés com esse tipo de câncer [3]. Porém, apenas em 1922 foi realizado o primeiro experimento para testar essa hipótese, quando animais foram expostos a extratos orgânicos de fuligem [4]. O isolamento e a síntese do benzo[a]pireno (BaP) foram alcançados em 1931 e dois anos depois foi comprovado o alto potencial carcinogênico desse HPA em animais [4].

Apesar da grande variedade de HPAs existentes, apenas dezesseis foram escolhidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, United States Environmental Protection Agency) para serem monitorados no ambiente por haver: mais informações a respeito desses; indícios que são mais nocivos que os demais e; maior possibilidade de exposição humana. Esses HPAs, assim como algumas de suas propriedades, podem ser vistos na Tabela 1 [5].

Tabela 1 - HPAs monitorados (USEPA) e suas propriedades [5]

COMPOSTOS	MASSA MOLAR (g/mol)	SOLUBILIDADE EM ÁGUA (mg/L)	PRESSÃO DE VAPOR (mmHg)	MOLÉCULA
Naftaleno	128,17	31	$8,89 \times 10^{-2}$	
Acenafteno	154,21	3,8	$3,75 \times 10^{-3}$	
Acenaftaleno	152,20	16,1	$2,90 \times 10^{-2}$	
Antraceno	178,23	0,045	$2,55 \times 10^{-5}$	
Fenantreno	178,23	1,1	$6,80 \times 10^{-4}$	
Fluoreno	166,22	1,9	$3,24 \times 10^{-3}$	
Fluoranteno	202,26	0,26	$8,13 \times 10^{-6}$	
Benzo[a]antraceno	228,29	0,011	$1,54 \times 10^{-7}$	
Criseno	228,29	0,0015	$7,80 \times 10^{-9}$	
Pireno	202,26	0,132	$4,25 \times 10^{-6}$	
Benzo[a]pireno	252,32	0,0038	$4,89 \times 10^{-9}$	
Benzo[b]fluoranteno	252,32	0,0015	$8,06 \times 10^{-8}$	
Benzo[k]fluoranteno	252,32	0,0008	$9,59 \times 10^{-11}$	
Dibenzo[a,h]antraceno	278,35	0,0005	$2,10 \times 10^{-11}$	
Benzo[g,h,i]perileno	276,34	0,00026	$1,00 \times 10^{-10}$	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276,34	0,062	$1,40 \times 10^{-10}$	

Considerando o potencial carcinogênico e o número de estudos que comprovam o fato, a Agência Internacional de Investigação em Câncer (IARC) classificou esses HPAs em quatro grupos como descrito na Tabela 2 [6].

Tabela 2: Classificação dos HPAs quanto a carcinogenicidade de acordo com a Agência Internacional de Investigação em Câncer [6].

GRUPO 1 Carcinogênico para humanos	GRUPO 2A Provavelmente carcinogênico para humanos	GRUPO 2B Possivelmente carcinogênico para humanos	GRUPO 3 Não classificado quanto a carcinogenicidade para humanos
Benzo[a]pireno	Dibenzo[a,h]antraceno	Benzo[a]antraceno Benzo[b]fluoranteno Benzo[k]fluoranteno Criseno Indeno Naftaleno	Acenafteno Antraceno Fluoreno Fluoranteno Fenantreno Pireno Benzo[e]pireno Benzo[g,h,i]perileno

1.2 HPAs no meio ambiente

A extensa faixa de variação de pressão de vapor dos HPAs resulta numa ampla distribuição desses compostos no ar, águas e solo. Além do mais, a pressão de vapor também influencia diretamente na distribuição das partículas entre a fase gasosa e aerossol no ar [7]. HPAs com dois ou três anéis aromáticos apresentam-se em parte como vapor na atmosfera, enquanto os HPAs que possuem 5 anéis ou mais encontram-se impregnados ao material particulado. Através da atmosfera os HPAs podem se deslocar por longas distâncias e se depositar em ambientes aquáticos e terrestres. Sendo assim os HPAs são encontrados em praticamente todos os compartimentos ambientais [8]. A Tabela 3 mostra faixas de concentração de HPAs em algumas matrizes ambientais [9].

Tabela 3 - Faixas de concentrações de HPAs encontrados em diversos compartimentos ambientais [9].

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng/m ³
Solo	0,8 ng/kg a 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/L
Plantas	< 150 µg/kg
Alimentos	0,1 a 20 µg/kg

As fontes de emissão de HPAs podem ser divididas em naturais, principalmente emissões vulcânicas e queimadas espontâneas, e antropogênicas, onde predominam a queima de derivados do petróleo, de carvão e madeira. Devido à grande extensão de atividades humanas relacionadas a esses processos as fontes antropogênicas são enormemente predominantes com relação às naturais [7]. Dessa forma, as concentrações de HPAs são significativamente maiores em ambientes urbanos e/ou industriais, podendo chegar a superar em até duas ordens de grandeza as concentrações em ambientes distantes das fontes de contaminação [10]. De acordo com suas propriedades físico-químicas os HPAs tendem a acumular-se nos solos ou, quando em meio aquoso, permanecerem associados à matéria orgânica em suspensão [11]. A figura 1 mostra algumas fontes de HPAs assim como, a dispersão dos contaminantes no ambiente.

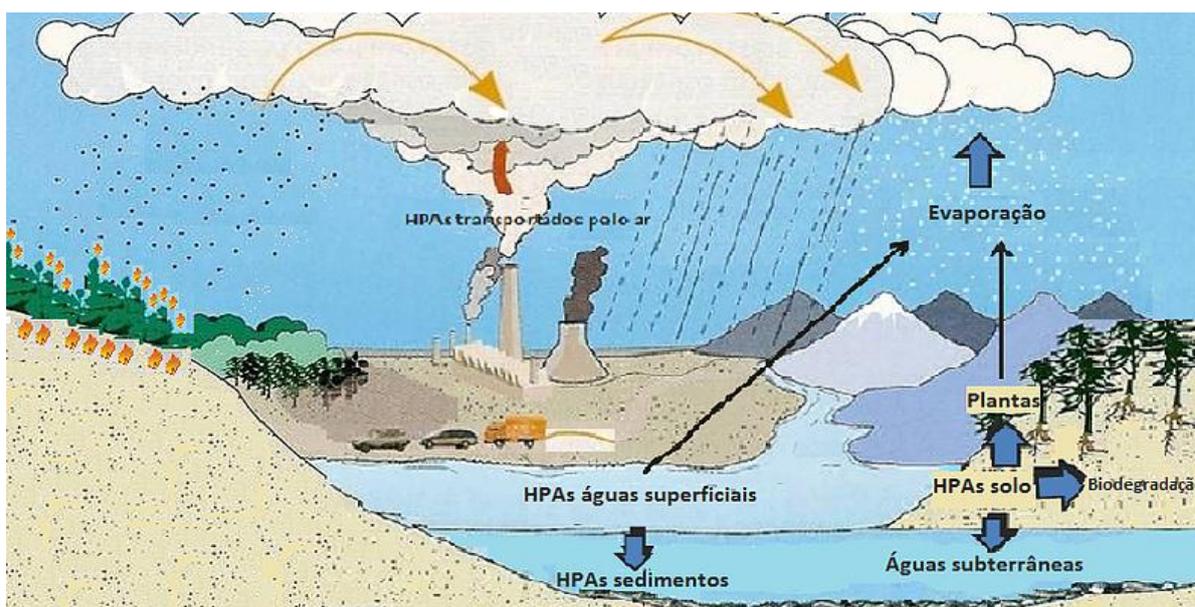


Figura 1 – Algumas fontes de HPAs e dispersão dos mesmos no ambiente[12].

O solo pode ser considerado um receptor de HPAs provenientes da atmosfera e possui concentrações dos mesmos variando de acordo com a proximidade das fontes de emissão, por exemplo, em solos superficiais (0-10 cm), pode atingir concentrações de 818 µg/kg em áreas urbanas e 3000 µg/kg em áreas industriais [13].

A resolução nº 420/2009 do CONAMA (Concelho Nacional do Meio Ambiente) [14] determina que, contaminantes com concentrações que ponham em risco a saúde humana ou o meio ambiente devem sofrer intervenção. A tabela 4 apresenta os valores referentes a prevenção e intervenção para alguns HPAs em solos e águas subterrâneas.

Tabela 4: Limites de prevenção e intervenção de HPAs em solos e águas subterrâneas segundo o CONAMA [15].

Substância	Solo (mg kg ⁻¹ de peso seco)			Água subterrânea (µg L ⁻¹)	
	Prevenção	Intervenção			Intervenção
		Agrícola	Residencial	Industrial	
Antraceno	0,039	-	-	-	-
Benzo (a) antraceno	0,025	9	20	65	1,75
Benzo(k) fluoranteno	0,38	-	-	-	-
Benzo (g,h,i) perileno	0,57	-	-	-	-
Benzo (a) pireno	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	8,1	-	-	-	-
Dibenzo (a,h) antraceno	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	3,3	15	40	95	140
Indeno (1,2,3- c,d)pireno	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	0,12	30	60	90	140

1.3 Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica baseada na medição da radiação emitida durante o processo de relaxação radiativa do estado excitado de uma dada molécula. A molécula é dita fluorescente quando essa relaxação radiativa ocorre em intervalos de tempo muito curtos após a excitação, na ordem de nano segundos, sendo devido a transições entre estados de mesma multiplicidade de spin (transições singleto-singleto) [16]. Há também relaxações radiativas entre estados de multiplicidade de spin diferentes (triplete-singleto). Esses processos são chamados de fosforescentes e são bem mais lentos e em geral menos intensos que a fluorescência, podendo perdurar desde alguns segundos até mesmo horas após a excitação da molécula.

A intensidade da fluorescência é proporcional a concentração da espécie emissora e pode ser usada na construção de modelos quantitativos. A espectroscopia de fluorescência é considerada uma técnica de grande sensibilidade pois detecta a emissão luminosa contra um fundo escuro. Em geral, para garantir a linearidade da intensidade de emissão com a concentração é importante evitar o chamado “efeito filtro”, que é a supressão da luminescência observada quando a radiação emitida pela substância em análise é absorvida por moléculas próximas, inclusive do próprio analito em altas concentrações. Para tanto, é necessário verificar se a absorbância da amostra não é superior a 0,05 [16].

Um espectrofluorímetro é um equipamento que registra as intensidades do sinal de emissão de fluorescência, sob uma dada excitação, em uma faixa de comprimentos de onda pré-determinados pelo analista. Nesse instrumento o comprimento de onda de excitação também pode variar à escolha do analista. Os componentes básicos de um espectrofluorímetro são: fonte de luz (geralmente uma lâmpada de xenônio de alta pressão); monocromador de excitação; suporte da amostra; monocromador de emissão e; detector (fotomultiplicador). A figura 2 mostra um diagrama esquemático simplificado de um espectrofluorímetro.

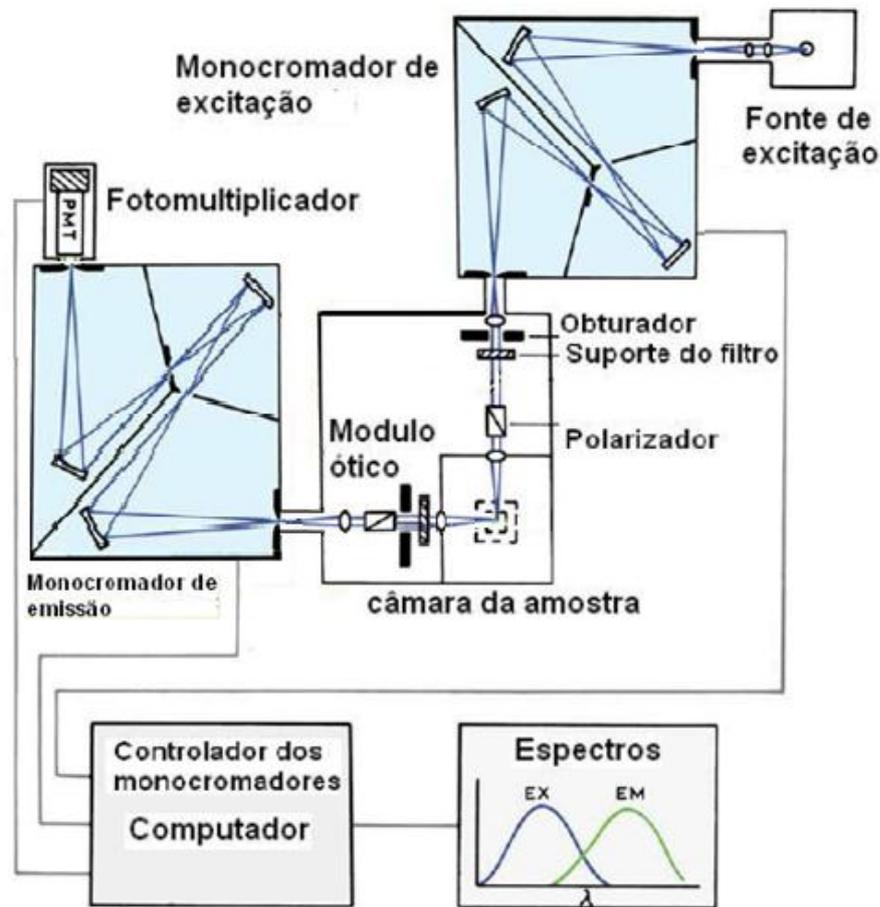


Figura 2: Diagrama esquemático de um espectrofluorímetro [17].

Ao manter o comprimento de onda de excitação fixo e variar o comprimento de onda de emissão numa determinada faixa, obtém-se o espectro de emissão na faixa selecionada. Por outro lado, registrando-se a variação de intensidade emissão em um comprimento de onda de emissão fixo enquanto o comprimento de onda de excitação varia numa faixa definida, adquire-se o espectro de excitação. Um espectro de excitação corresponde a energia absorvida pela molécula emissora que foi efetivamente emitida durante o processo de relaxação radiativa da molécula, ou seja, é o espectro de absorção descontando-se a contribuição da radiação absorvida que é relaxada por processos radioativos e não-radioativos. O conjunto de espectros medidos numa dada faixa de emissão sob excitações com diferentes comprimentos de onda (um para cada espectro) forma o chamado espectro de fluorescência total que é o espectro 3D de excitação-emissão da amostra. A figura 3 mostra espectros de emissão (A), excitação (B) e um espectro de fluorescência total (C) para a molécula de Fenantreno (FEN), como exemplo.

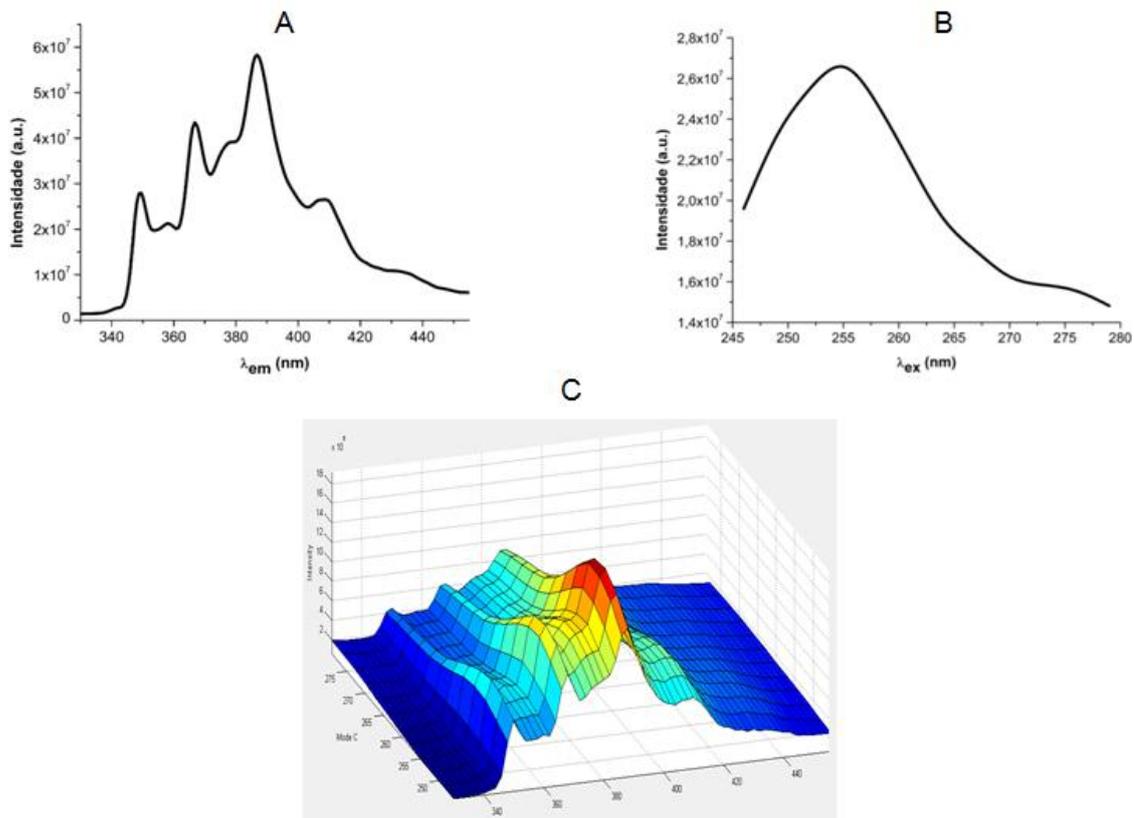


Figura 3 - Espectros do FEN: em A, emissão (330-455 nm) sob excitação em 255 nm; em B, excitação (246-279 nm) e emissão 382 nm e; em C, fluorescência total (3D) com emissão (330-455 nm) e excitação (246-279 nm).

1.4 Calibração de segunda ordem

Métodos multidimensionais foram primeiramente desenvolvidos na década de 1960 por psicometristas ao aplicarem estatística multivariada em dados na área de psicologia. Na época, havia uma tendência positivista de valorizar excessivamente as análises quantitativas nas ciências humanas. Uma grande quantidade de dados obtida através da aplicação de questionários e os pesquisadores, com uso desses, buscavam extrair informações para determinar influências ou padrões de comportamentos.

A aplicação dos métodos multidimensionais em química teve início em 1978 através do artigo de Ho, Christian e Davidson que propuseram o método de análise de fatores por aniquilação de posto (RAFA, *Rank Annihilation Factor Analysis*) [18]. Até o final da década de 1980 as aplicações de calibração de ordem superior em

química foram em pequena quantidade e com aplicações muito específicas. Segundo Geladi [19], “aplicações que não vão além do próprio exemplo”. Bro, em sua tese de doutorado, contribuiu significativamente para difusão dos métodos quimiométricos PARAFAC e N-PLS ao descrever, de forma didática e com clareza, os métodos e algoritmos, assim como, suas aplicações em diferentes áreas. Outra contribuição de grande importância para a propagação do uso desses algoritmos foi a disponibilização gratuita desses na forma de pacotes (toolboxes) programados na plataforma MATLAB (Mathworks) [20, 21].

A ordem de um tensor é o número de dimensões que o mesmo possui. Tensores de ordem zero são números escalares. Se estes números correspondem a um sinal analítico de um conjunto de amostras, como a absorvância de um determinado comprimento de onda, então eles podem ser organizados em um vetor com dimensão igual ao número de amostras, gerando uma estrutura de dados de uma via. Tensores de primeira ordem são vetores, como por exemplo, um espectro de absorção completo, e a estrutura e dados, organizada quando se agrupam várias amostras, possui duas vias, ou seja, é uma matriz. Este é o tipo de estrutura de dados usado na calibração multivariada. Tensores de segunda ordem são matrizes, como os espectros de fluorescência, ou os arranjos de dados provenientes de técnicas hífenadas como o HPLC-DAD, por exemplo. Este tipo de arranjo de dados dá origem as estruturas de três vias, que são tensores formados pelo empilhamento das matrizes de resposta das amostras.

Aos modelos de calibração construídos com os conjuntos de dados de primeira e segunda ordem, ou segunda e terceira vias, respectivamente, estão associadas as vantagens de primeira e segunda ordem. Essas vantagens dizem respeito a robustez do modelo obtido à presença de interferentes. Enquanto modelos construídos com conjuntos de dados de ordem zero são vulneráveis a presença de quaisquer interferentes no sinal analítico, modelos de primeira ordem, como os construídos pelos métodos multivariados PCR ou PLS, são robustos a presença de interferentes, desde que os mesmos sejam conhecidos e já estejam presentes nas amostras do conjunto de calibração. Esta é a chamada vantagem de primeira ordem. Já os modelos de segunda ordem são robustos à presença de interferentes desconhecidos mesmo na etapa de calibração. Por essas razões são

mais apropriados para monitoramento ambiental ou de qualquer outro sistema quimicamente complexo.

Um conceito importante na calibração de ordem superior é a trilinearidade. Um arranjo de três vias é trilinear se a seguinte equação for válida:

$$X_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk}$$

onde $X_{i,j,k}$ é o arranjo trilinear de dados, i é a dimensão da amostra e j e k são os canais do instrumento de medida, A_i é a concentração, B_j e C_k são os perfis instrumentais dos componentes puros em ambas as dimensões, e $E_{i,j,k}$ é o resíduo deixado pelo modelo. Na espectrofluorimetria, por exemplo, podemos adquirir espectros de emissão-excitação que são trilineares (mantendo-se dois modos dimensionais constantes, o terceiro varia linearmente com a resposta analítica) mas que podem desviar da trilinearidade se apresentarem interferências por espalhamento. É importante ressaltar que nem todo arranjo de três vias é trilinear. Quando o sinal obtido por amostra é uma imagem, as imagens de um conjunto de amostras podem ser empilhadas em um arranjo de três vias, mas este não será trilinear uma vez que as distribuições de pixels nas duas dimensões da imagem não guardam qualquer dependência entre si.

1.5 Análise de fatores paralelos (PARAFAC)

O PARAFAC é um algoritmo empregado na decomposição de dados de segunda ordem em F tríades de vetores pesos (A , B e C), onde F representa o número de fatores e as tríades são formadas pelos dados referentes às três dimensões, sendo a primeira formada pelo primeiro fator de cada dimensão e assim sucessivamente. As vias **B** e **C** são normalizadas e correspondem respectivamente aos perfis espectrais de emissão e excitação dos componentes da amostra. A via **A** corresponde ao perfil de intensidade e pode ser associada a concentração do componente por meio de uma calibração contra a concentração conhecida dos

padrões incluídos no tensor de dados. Esse procedimento é chamado de calibração pseudo-univariada. Na prática ocorre uma fatoração trilinear que decompõe o tensor de dados dos padrões e amostra em três vias, de acordo com o esquema na figura 4.

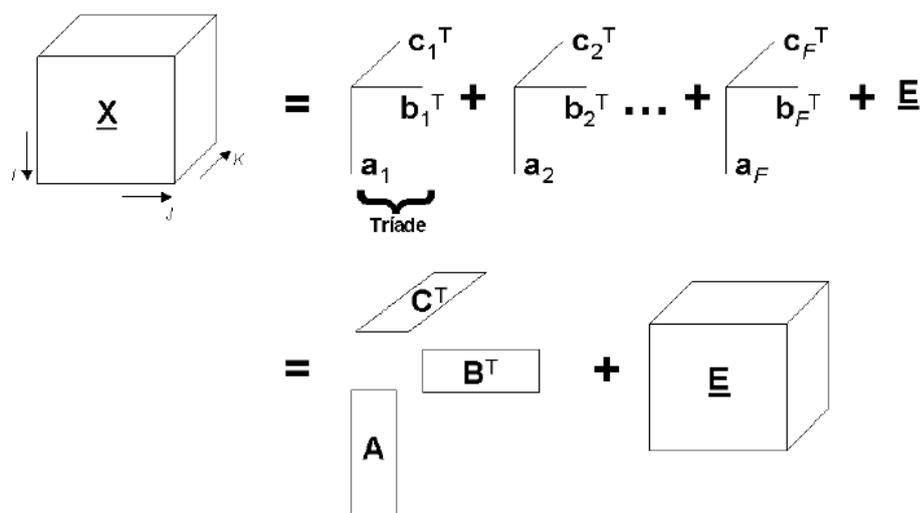


Figura 4 - Representação esquemática da decomposição PARAFAC. Decomposição de um tensor de dados em três vias [48].

O método é aplicável desde que os dados sigam um modelo trilinear, o número correto de fatores (F) seja escolhido e a relação sinal/ruído seja adequada.

O número de fatores pode ser escolhido através da variância explicada, conhecimento químico do sistema, validação cruzada, métodos de reamostragem ou teste de consistência trilinear (“CORCONDIA, CORE CONSistency, DIAGnostic”) [22]. De acordo com o CORCONDIA resultados acima de 90% indicam trilinearidade do adequada ao PARAFAC, próximos de 50% representam deficiência de trilinearidade e valores negativos ou em torno de 0% indicam inconsistência trilinear. Quando aplicado de forma adequada o PARAFAC permite extrair os espectros puros dos componentes do sistema, as concentrações obtidas no vetor A_i não são as concentrações reais, mas sim concentrações relativas. No entanto, a partir de um conjunto de padrões, pode-se construir uma curva analítica para relacionar com os escores PARAFAC (intensidades obtidas das amostras) e determinar as concentrações do(s) analito(s). O maior número de aplicações do PARAFAC tem sido na espectroscopia de fluorescência devido ao fato de os dados serem facilmente gerados e intrinsecamente trilineares.

1.6 Extração em fase sólida em membrana e análise por fluorescência em superfície sólida

A crescente demanda por análises de HPAs em compartimentos ambientais para monitoramento e remediação, demonstra a necessidade de técnicas analíticas mais rápidas e de menor custo [23]. De forma geral, as análises são realizadas através de um procedimento de extração seguido de determinação por sistemas cromatográficos. Para análise de HPAs em água são necessários métodos mais sensíveis como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) [24-27] ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de fluorescência [28-32], devido as baixas concentrações desses analitos que são fortemente lipofílicos e por isso tendem a ficar adsorvidos na matéria orgânica em suspensão (na água) ou no solo. Nesse caso, em muitas das análises, é necessário realizar a extração e pré-concentração dos HPAs antes do procedimento cromatográfico.

A combinação de extração em fase sólida e espectrometria de luminescência em superfície sólida sob temperatura ambiente tem se destacado por se mostrar uma alternativa simples, rápida e de baixo custo para a determinação de HPAs em amostras de água. A figura 5 representa um esquema básico da detecção do sinal analítico nessa técnica.

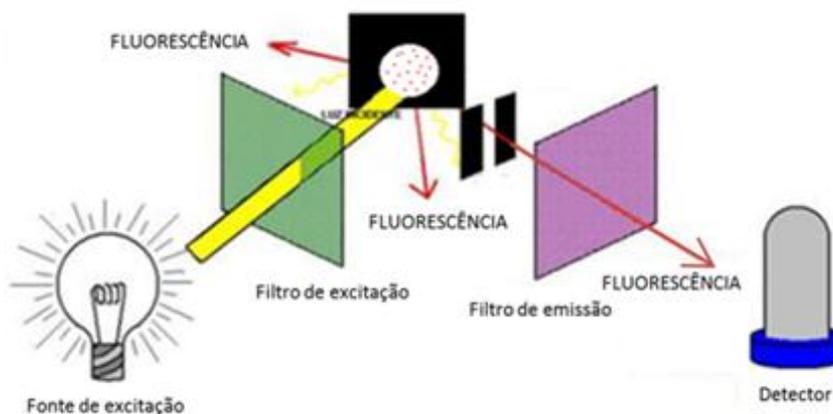


Figura 5 - Diagrama esquemático da montagem para aquisição de espectro de fluorescência de uma membrana filtrante.

A primeira utilização dessa combinação de técnicas para essa finalidade ocorreu em 1991 quando Poziomek, Eastwood e colaboradores realizaram a extração em fase sólida imergindo pequenas tiras de membranas octadecil (C_{18}) em soluções aquosas de HPAs e aguardando a adsorção do analito (entre 1 e 2 h). Em seguida as tiras foram retiradas, secas e levadas para a detecção de fluorescência (diretamente na superfície da membrana) [33 34]. Hagestuen e Campiglia utilizaram bomba de vácuo para forçar a passagem da solução (1 L) aquosa de HPA através da membrana octadecil (C_{18}), conseguindo dessa forma uma extração mais rápida (45 min.) e eficiente. O sinal analítico medido foi a fosforescência em temperatura ambiente [23]. Em 2000, os mesmos pesquisadores melhoraram o sistema de extração ao substituir o uso de bomba de vácuo e vidrarias volumosas por um kit de seringa e porta filtro de aço inoxidável (figura 6), simplificando a aplicação do método, reduzindo o volume da solução (10 mL) e o tempo de análise, sem perdas no limite de detecção. Nesse trabalho, foram feitos testes para quantificar HPAs misturados em solução, onde se conseguiu a determinação de até 6 componentes em mistura, utilizando a seleção de comprimentos de onda na matriz de excitação-emissão de fosforescência [35].

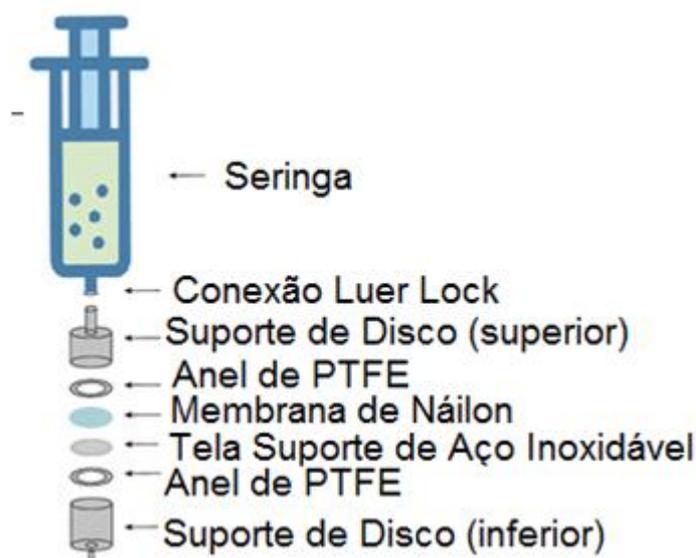


Figura.6 - Diagrama esquemático do porta filtro de aço e seus constituintes

Campiglia e Whitcomb (2001), fizeram um estudo sobre o potencial de aplicação da detecção por fluorescência em temperatura ambiente utilizando o

mesmo procedimento de EFS em soluções aquosas de HPAs [36]. Nesse trabalho destaca-se a maior praticidade do uso da fluorescência que, ao contrário da fosforescência, não necessita do uso de soluções de átomos pesados e de purga de nitrogênio para a aplicação da técnica, além de manter a mesma sensibilidade analítica.

Diferentemente das metodologias anteriores, Escandar e colaboradores (2003) fizeram uso da calibração de ordem superior, aplicando a vantagem de 2ª ordem para determinar o(s) analito(s) na presença de interferência no sinal. O fármaco “Piroxicam” foi determinado em matriz de soro sanguíneo (sem tratamento da amostra) através da detecção de fosforescência diretamente na membrana (octadecil (C₁₈)) e do tratamento quimiométrico dos dados com algoritmos de 2ª ordem PARAFAC e SWATLD [37]. Outra contribuição importante do grupo de Escandar foi a introdução do uso de membranas de náilon para a adsorção dos analitos, onde o mesmo se mostrou um material compatível com as aplicações com detecção direta na membrana, tanto para a fluorescência quanto para a fosforescência, em temperatura ambiente. O náilon foi utilizado em determinações de fármacos em matrizes de soro sanguíneo, urina e água e, posteriormente, na determinação de HPAs em amostras de água [38-40]. As aplicações do náilon para essa determinação revelaram a alta capacidade de adsorção de HPAs nesse material. Para avaliar esse potencial, Escandar e colaboradores (2008) realizaram duas extrações consecutivas da mesma solução aquosa de Benzo(a)pireno (BaP), fazendo a troca da membrana entre as filtrações. Ao comparar as intensidades dos sinais, observou que o sinal da 2ª membrana (2ª extração) praticamente não diferiu do sinal do branco (medido em uma membrana que processou apenas água) [41]. Utilizando membrana de náilon para EFS seguido de detecção (excitação e emissão) de fluorescência em temperatura ambiente e calibração de ordem superior (PARAFAC e U-PLS/RBL), esse grupo conseguiu determinar BaP e Dibenzo[a,h]antraceno (DBA) em amostras de água de torneira, mineral e subterrânea sob interferência de outros cinco HPAs [42].

Capítulo 2

Motivação e objetivos

2.1 HPAs leves. Acúmulo e permanência de antraceno e fenantreno no solo.

Antraceno (ANT) e fenantreno (FEN) são isômeros formados por três anéis aromáticos condensados que podem ser carcinogênicos. São gerados em grande quantidade e de forma contínua pela atividade humana, tendo como destino principal o solo. Estão entre os HPAs com maior solubilidade em água, por isso são alvos frequentes de estudos [43]. Porém, de forma geral os HPAs são substâncias bastante lipofílicas, o que pode ser comprovado pelos altos valores de coeficiente de partição octanol-água ($\text{Log } K_{ow}(\text{ANT}) = 4,45$ e $\text{Log } K_{ow}(\text{FEN}) = 4,46$) que implica em uma tendência de deslocarem-se na direção dos substratos de polaridade semelhante como matéria orgânica. Compostos dissolvidos em solução estão mais vulneráveis a foto-oxidação, biodegradação, transporte, volatilização, etc. que compostos associados à fase sólida. Assim, HPAs adsorvidos na matéria orgânica (ou superfície de minerais) estão de certa forma mais protegidos desses processos, o que resulta no acúmulo desses contaminantes no solo e maior risco de exposição humana a esses contaminantes [43].

Os métodos analíticos recomendados pela USEPA para determinação de HPAs em resíduos sólidos são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência e possuem uma dificuldade inerente na quantificação de HPAs de massa molecular baixa como os isômeros ANT e FEN (178,23 g/mol). Ocorre que todos os métodos disponíveis passam por alguma etapa de extração e concentração. A extração pode ser por Soxhlet, ultrassom, agitação mecânica, entre outros [44]. Já a concentração normalmente envolve roto-evaporação ou pré-concentração em fase sólida seguida de extração Soxhlet. O problema é que esses métodos expõem esses analitos a altas temperaturas por longo período de tempo (16 h ou mais), provocando assim, a volatilização e/ou oxidação de HPAs mais leves [45-46]. Isso leva a recuperações (%) da ordem de 63,7 (RSD=4,4%) para o ANT e 83,3 (RSD=16,9%) para o FEN [44].

Assim, existe a demanda por métodos para a determinação de ANT e FEN em solos que sem tratamentos térmicos da amostra, de modo a evitar perdas por evaporação e melhorar as recuperações. Adicionalmente o uso da espectroscopia de fluorescência no lugar da cromatografia é vantajoso por ser uma técnica mais barata, limpa e rápida.

2.2 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia para a determinação de ANT e FEN em água potável e solos a partir da extração em fase sólida com membrana de náilon, espectroscopia de fluorescência total com detecção do sinal diretamente no verso da membrana e calibração de ordem superior.

2.3 Objetivos específicos

- 1 – Construir um sistema de propulsão para realizar as filtrações de forma mais eficiente e reprodutível, melhorando a ergometria e a frequência analítica da técnica em relação aos trabalhos já publicados na literatura;
- 2 – Estudar o comportamento espectral dos HPAs adsorvidos no filme em função de volume filtrado, tempo de secagem, “refiltração” e outras variações em parâmetros experimentais;
- 3 –Elaborar estratégias para minimizar as possíveis interferências causadas por particulados retidos na superfície da membrana após a pré-concentração;
- 4 –Construir modelos para a identificação e quantificação de ANTe FEN adsorvidos em filme filtrante de náilon empregando calibração de ordem superior;
- 5 – Aplicar os modelos para a determinação de ANT e FEN em amostras complexas como água potável e extratos de solos.

Capítulo 3

Metodología

3.1 Procedimento Experimental

Soluções estoque de ANT (10 ppm) e FEN (20 ppm) foram preparadas em metanol a partir dos reagentes padrão SUPELCO $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As soluções padrões de trabalho foram preparadas diariamente, diluindo volumes apropriados das soluções estoque em água.

Amostras de água de torneira foram preparadas por adição dos volumes apropriados dos estoques de FEN e ANT a fim de obter concentrações de 10 e 14 ppb.

Sete amostras de solo de cerca de 500 mg foram adicionadas de ANT e FEN no laboratório em proporções diferentes e conhecidas. Estas amostras foram então submetidas ao procedimento de extração por agitação ultrassônica durante 15 minutos na presença de 1,5 mL de acetona/água (1:1) e, posteriormente, centrifugadas durante 5 minutos a 4.000 rpm [47]. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e avolumado com água deionizada. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

Padrões analíticos, amostras de água de torneira e extratos de amostras de solos foram filtradas (25 mL) em filme de náilon, cortada em discos de 13 mm de diâmetro, e com poros de $0,2 \mu\text{m}$. Foi usado um sistema de propulsão por pressão positiva *labmade* acoplado a um porta-filtro Millipore de aço inoxidável. O porta-filtro possui um anel interno de politetrafluoretileno (PTFE) devidamente posicionado sobre o filme de náilon, restringindo assim a superfície de filtração para 5 mm de diâmetro. O tempo médio de filtração foi de 3 minutos por solução e, após as filtrações, os filmes foram secos em estufa por 8 minutos a 40°C .

Após a secagem, foram adquiridos os espectros de fluorescência total das membranas com os analitos imobilizados. A aquisição dos espectros, tanto dos padrões quanto as amostras, foram realizadas no verso da membrana, ou seja, na face oposta a que esteve em contato com a solução filtrada e que reteve o

particulado sólido. O equipamento empregado foi o espectrofluorímetro Agilent Cary Eclipse equipado com lâmpada pulsada de Xênio. As medidas de fluorescência foram realizadas em uma faixa de excitação 230 nm a 280 nm e de emissão 315 nm a 455 nm, ambas com passo de 2 nm. As figuras 7 e 8 mostram os esquemas dos experimentos em águas (destilada e potável) e em solo repectivamente.

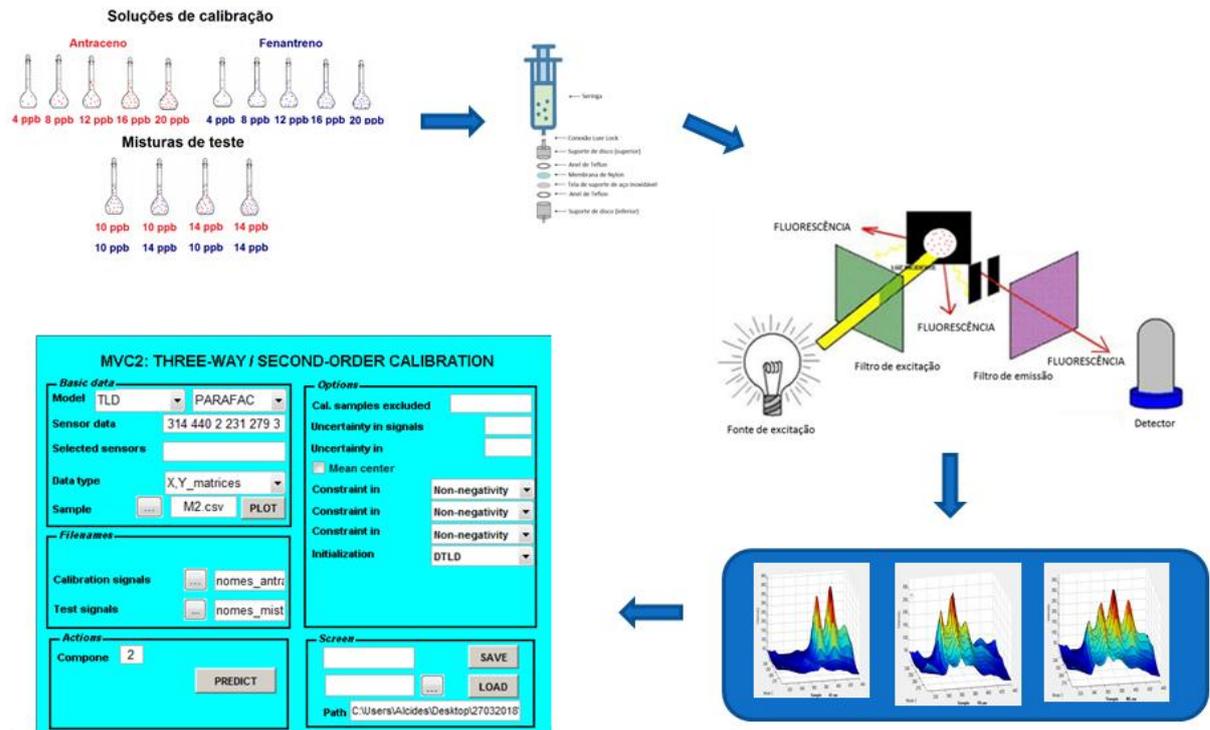


Figura 7 – Esquema da metodologia aplicada em águas.

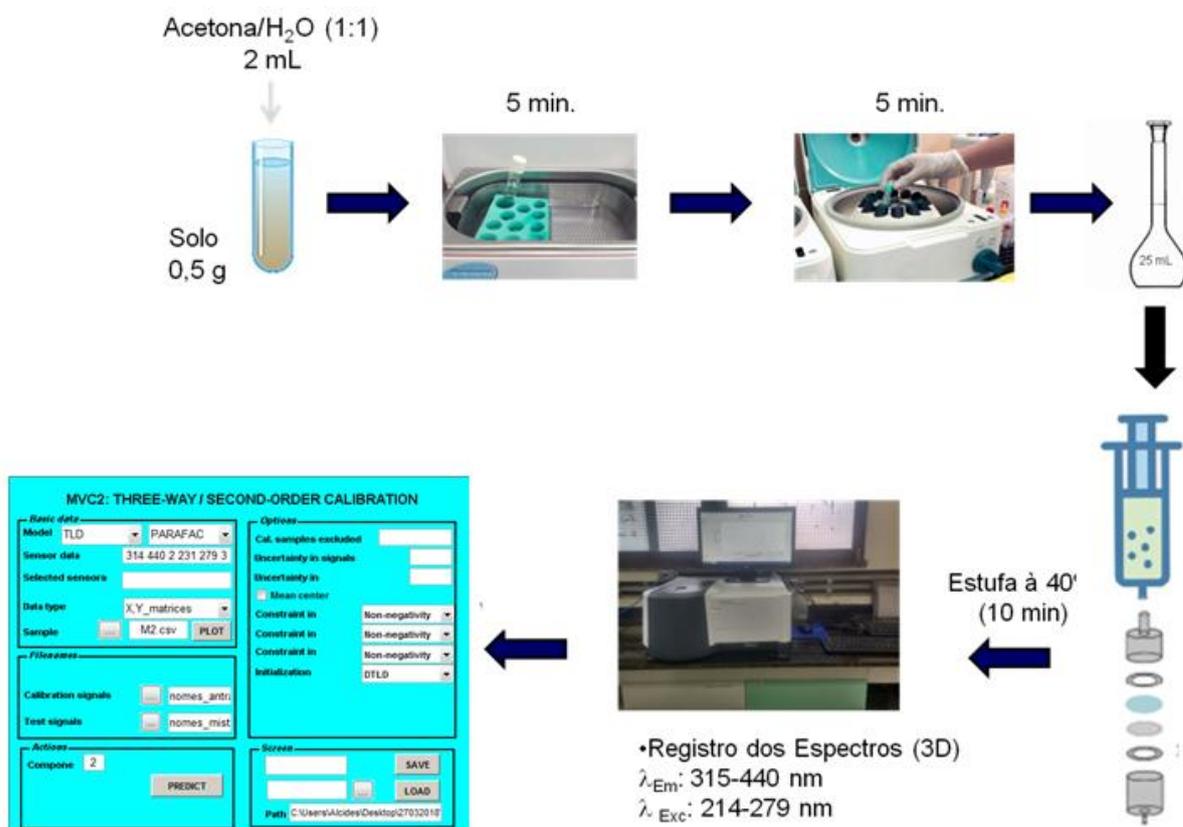


Figura 8 – Esquema de procedimento utilizado em amostra de solo.

3.2 Aparatos para a extração

Foi montado um sistema de filtração de propulsão por pressão positiva que foi utilizado em substituição ao acionamento manual da seringa, buscando melhor eficiência, reprodutibilidade e frequência analítica da técnica, além de uma maior ergonomia para o analista. Os componentes do sistema são: câmara de adição; válvula de três vias; câmara de filtração; manômetro; válvula agulha; compressor de ar manual e porta-filtro com conexão *luer lock*. Veja na figura 9.

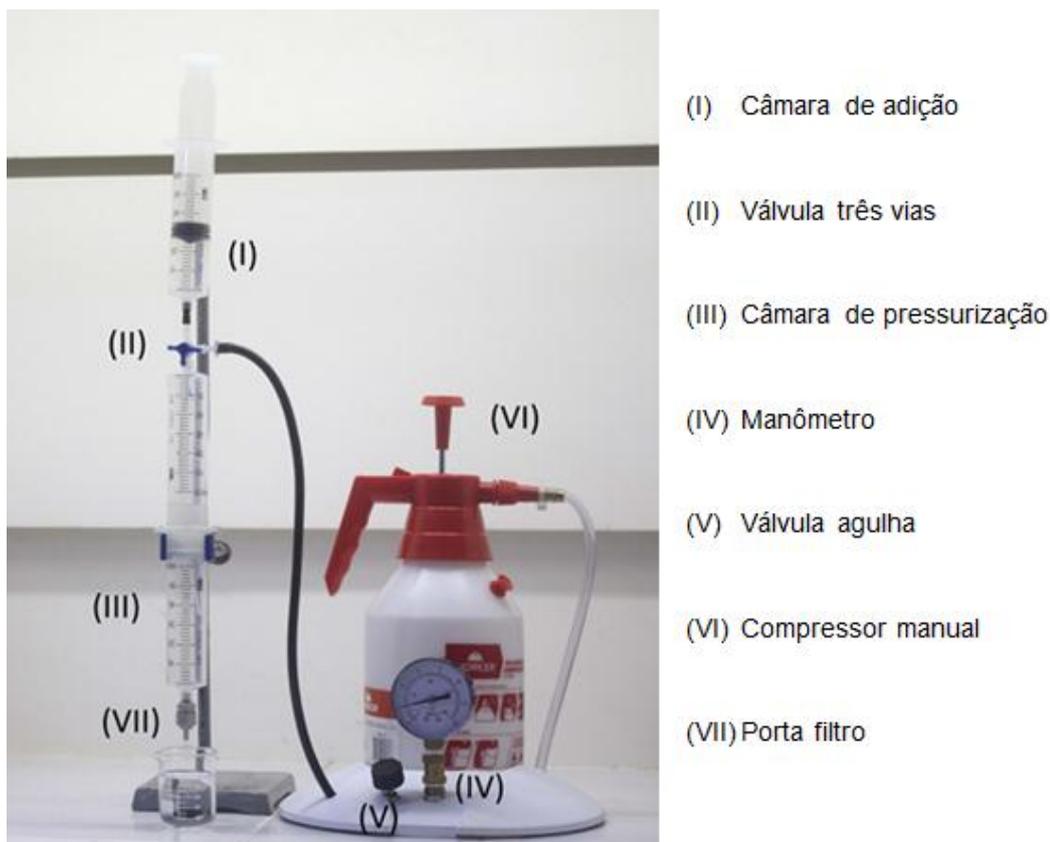


Figura 9 - Sistema de EFS desenvolvido, com localização dos componentes.

Para a execução do procedimento de filtração, a solução (25 mL) é transferida do balão volumétrico para a câmara de adição, que consiste em uma terceira seringa de 60 mL, conectada a câmara de filtração por meio da válvula de 3 vias. Com a ajuda de um êmbolo, a solução é deslocada para o interior da câmara de filtração. Em seguida, a válvula agulha é aberta e a válvula de três vias girada, de forma que, o ar comprimido seja conduzido à câmara de filtração, forçando assim a passagem da solução pela membrana. Após completar-se a filtração a válvula agulha é fechado e a válvula três vias girada para despressurizar a câmara de filtração. Então, remove-se o *holder* (porta-filtro) e é realizada a retirada do filme de náilon que é transferido para um recipiente devidamente rotulado. Por fim, o sistema pressurizador é desconectado e o sistema de adição/filtração é substituído para a realização da próxima filtração. Todo este processo leva em torno de três minutos.

3.3 Modelagem e calibração

Os espectros de fluorescência são representados por matrizes de valores de intensidades. Para este trabalho, convencionou-se que os espectros de excitação correspondem as linhas da matriz, enquanto os espectros de emissão correspondem as colunas. As matrizes dos padrões e de uma amostra por vez podem ser empilhadas em um tensor tridimensional, que é um arranjo de dados de segunda ordem.

A análise de fatores paralelos (PARAFAC) foi a técnica empregada para decompor os espectros de fluorescência das amostras nos espectros das componentes puras.

Para realizar a decomposição PARAFAC e a calibração pseudo-univariada usamos os algoritmos para Mathworks Matlab do N-PLS toolbox, desenvolvidos por Bro [20, 21] e executado através da interface de usuário MVC2 desenvolvida por Olivieri e colaboradores [49].

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Sistema de propulsão por pressão positiva

As primeiras extrações foram realizadas com o uso de uma seringa para pressionar a passagem da solução pela membrana, como mostrado na Figura 10. Apesar de os resultados analíticos destes testes terem sido satisfatórios, algumas dificuldades foram levadas em consideração ao se utilizar uma seringa para propulsionar a solução. A principal delas diz respeito à exaustão causada no analista para manter o êmbolo pressionado até que todo o volume passe através da membrana. Como a membrana possui porosidade muito pequena ($0,2\ \mu\text{m}$), demanda uma pressão considerável para forçar a passagem da amostra durante um tempo que varia de 2 a 30 minutos, dependendo do volume filtrado (5 a 50 mL). Além do mais, a pressão exercida varia inevitavelmente durante a extração de uma solução e entre diferentes soluções, o que pode comprometer a homogeneidade da fixação do analito no filme e levar a uma menor reprodutibilidade e a maiores erros experimentais.



Figura 10 - EFS em sistema básico, seringa + porta filtro.

Na busca de minimizar essas dificuldades, foi montado um sistema de propulsão por pressão positiva que consistiu por uma câmara de pressurização, e uma bomba manual construída com uso de outra seringa para transferir ar para dentro da câmara (figura 12). A câmara de filtração foi construída utilizando-se de duas seringas (sem êmbolos) de 60 mL que foram unidas através do uso de uma conexão interna tipo “luva” obtida pelo corte de uma secção transversal de um tubo Falcon de 50 mL e fixada com adesivo cianoacrilato. Um tubo de teflon foi acoplado na entrada superior da câmara para conduzir a solução diretamente à base, evitando dessa forma o respingo na parede interna da câmara.

Este sistema tornou o processo de filtração mais automatizado e menos exaustivo. Após a adição da amostra a saída de ar da bomba é acoplada à entrada superior da câmara e o ar é bombeado. Com a câmara pressurizada, a passagem da solução através do filtro ocorre de forma espontânea (sem esforço do analista). Com o uso desse sistema, a frequência analítica dobrou, por exemplo, para 25 mL de solução o aumento foi de 5 para 10 filtrações por hora, quando comparado com o uso da seringa. Porém, a adição da amostra na câmara foi dificultada, já que, o volume de solução deve ser introduzido através do pequeno orifício superior da câmara, usando uma pipeta de Pauter como funil, veja na Figura 11.



Figura 11 - Câmara e funil para adição



Figura 12 - Bomba construída com seringa

Nestes dois sistemas a pressão varia significativamente e é usada em valores desconhecidos durante a filtração. Assim, foi feito um melhoramento no sistema de pressurização desenvolvido, adicionando-se na saída superior da câmara, uma válvula de “três vias” (Figura 9 (I)) que possibilitou a separação dos canais de adição da amostra e de adição de ar. Uma seringa (60mL) foi acoplada a parte superior dessa válvula para ser usada como câmara de adição, como ilustrado na figura 9 (II). Deixando a adição da amostra mais fácil e rápida que no sistema anterior.

Na outra saída da válvula de três vias foi acoplado um novo sistema de pressurização. Esse sistema foi montado a partir do uso de um pulverizador de 1,5L (compressor de ar manual) ligado a um manômetro com válvula agulha através de uma mangueira em PVC (transparente). Após a válvula, foi acoplada outra mangueira em PVC (preta) com uma saída *luer slip* na extremidade. Uma base plástica foi usada para fixar os componentes (Figura 9).

Com esse sistema foi possível quantificar a pressão exercida durante a filtração da amostra, pressão essa, muito mais constante que no sistema anterior, visto que, no momento em que a válvula agulha é aberta para pressurizar a câmara

de filtração, os volumes da câmara e do compressor se unem num só compartimento gasoso com volume notadamente superior à variação de volume provocada pela saída da solução. Outra vantagem no uso desse sistema de pressurização é que, não há necessidade de bombeamento de ar periodicamente para cada filtração, ou seja, consegue-se realizar várias extrações sem necessidade de reposição de ar no compressor, pelo fato de o volume do compressor ser muito maior que o da câmara de pressurização.

4.2 Avaliação inicial da adsorção dos analitos na membrana de náilon

A fim de verificar se a adsorção do analito é quantitativa foi realizada a filtração de 25 mL de uma solução 8 ppb dos analitos, o recolhimento do filtrado e uma nova filtração deste filtrado em um novo filtro. A figura 13 mostra os espectros adquiridos nesse experimento para ANT e FEN.

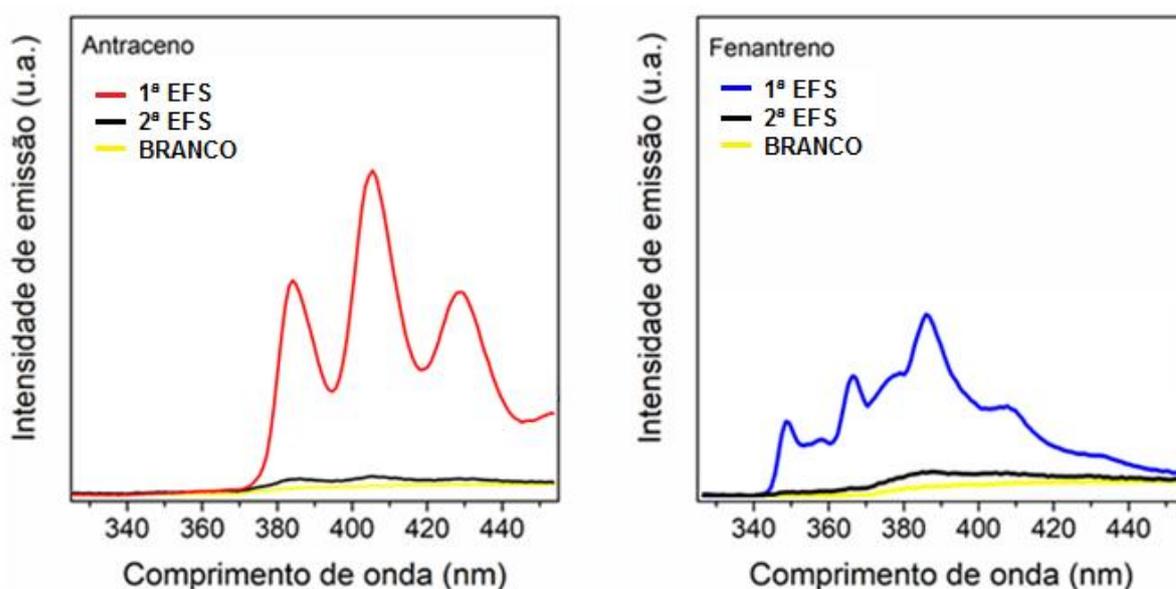


Figura 13 - Espectros de emissão dos filmes da 1ª e 2ª filtrações de ANT e FEN, excitação em 255 nm.

Podemos verificar que praticamente todo o analito, para ambos os compostos, foi retido no primeiro filtro. Isso evidencia uma forte interação do analito com o filme e o grande potencial do náilon em extrair HPAs em fase aquosa.

4.3 Pré-concentração e variação do volume filtrado

Foi realizado um teste para investigar a retenção da mesma quantidade do analito para diferentes volumes filtrados. Adicionou-se, para ambos os analitos, 20 microlitros da solução estoque 10 ppm em balões de 5, 10, 25 e 50 mL, então, os balões foram avolumados e as soluções foram processadas no sistema de EFS. Os espectros obtidos estão apresentados na figura 14.

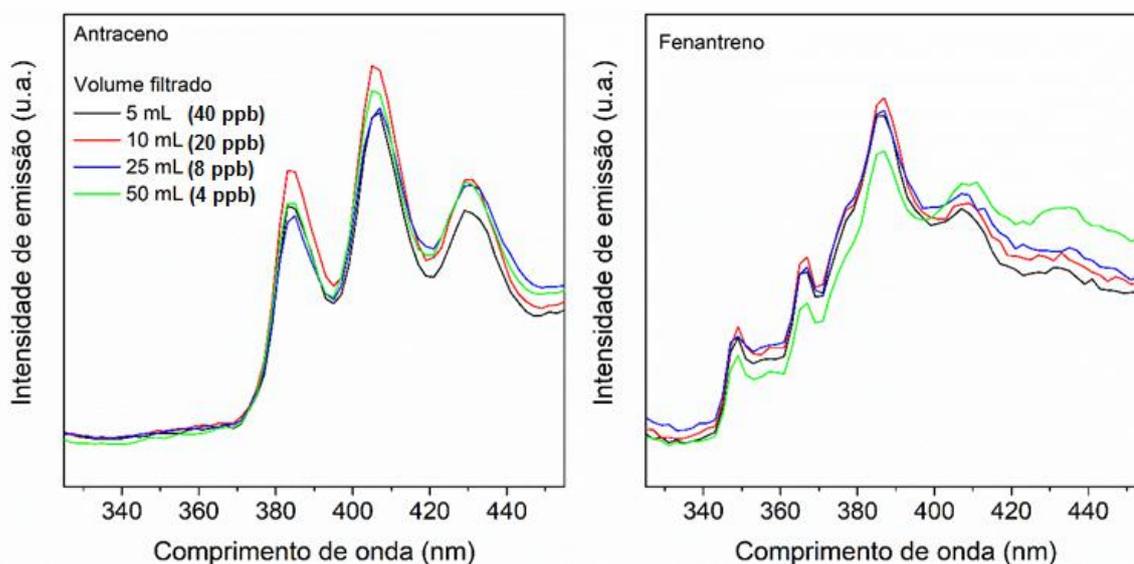


Figura 14 - Variação do sinal de fluorescência do ANT e do FEN para diferentes volumes processados quando o número de mols do analito é mantido constante.

Observe que as intensidades dos espectros são comparáveis em todos os volumes filtrados, tanto para o ANT quanto para o FEN, indicando que nessa faixa de variação de volumes a quantidade de analito adsorvida se mantém inalterada, independente do volume da solução que flui através da membrana, ou seja, pode-se detectar HPAs em concentrações muito baixas aumentando o volume da solução

filtrada, detecções de até ppq/L são relatadas na literatura. Esse potencial de retenção foi demonstrado de forma extrema por Campiglia [35] ao filtrar 1 L de solução aquosa 4 pg.mL^{-1} de FEN em membrana octadecyl (C_{18}) e obter o espectro característico do mesmo.

4.4 Testes iniciais dos modelos de calibração

A figura 15 mostrara o espectro de uma mistura de ANT e FEN. Observando a figura 13 podemos verificar que os espectros de emissão de fluorescência dos HPAs se sobrepõem em boa parte da faixa estudada. No caso desses dois analitos apenas em comprimentos de onda abaixo de 370 nm é que não há sobreposição, pois, existe apenas emissão do FEN (entre 340 e 370), porém, o espectro do ANT encontra-se sobreposto pelo do FEN em toda a faixa de emissão e excitação estudada, assim nos espectros de emissão das misturas testadas não é possível identificar a presença de ANT ou FEN apenas pelo perfil do espectro de emissão.

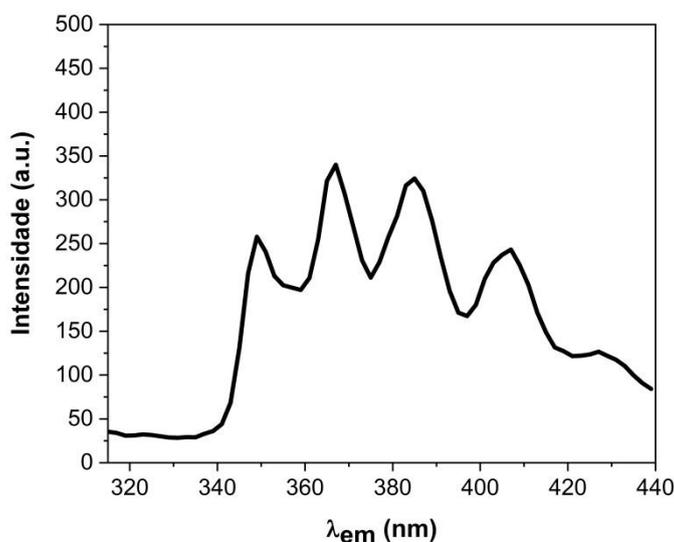


Figura 15 - Espectro de emissão de uma mistura de 24 ppb de ANT e 60 ppb de FEN (comprimento de onda de excitação de 255 nm).

Foi realizado um teste de aplicação do método em misturas de ANT e FEN em diferentes proporções, onde, o volume filtrado foi de 25 mL e todas as soluções foram preparadas em água destilada. Para recuperar (deconvoluir) os espectros puros de ANT e FEN na mistura e quantificar os mesmos, foi utilizado o algoritmo PARAFAC (parâmetros: 2 componentes; não-negatividade em todas as vias) através da plataforma MATLAB. As figuras 16 e 17 mostram as deconvoluções dos espectros e puros de excitação e emissão de ANT e FEN, respectivamente, além das curvas analíticas e quantificações dos analitos nas misturas.

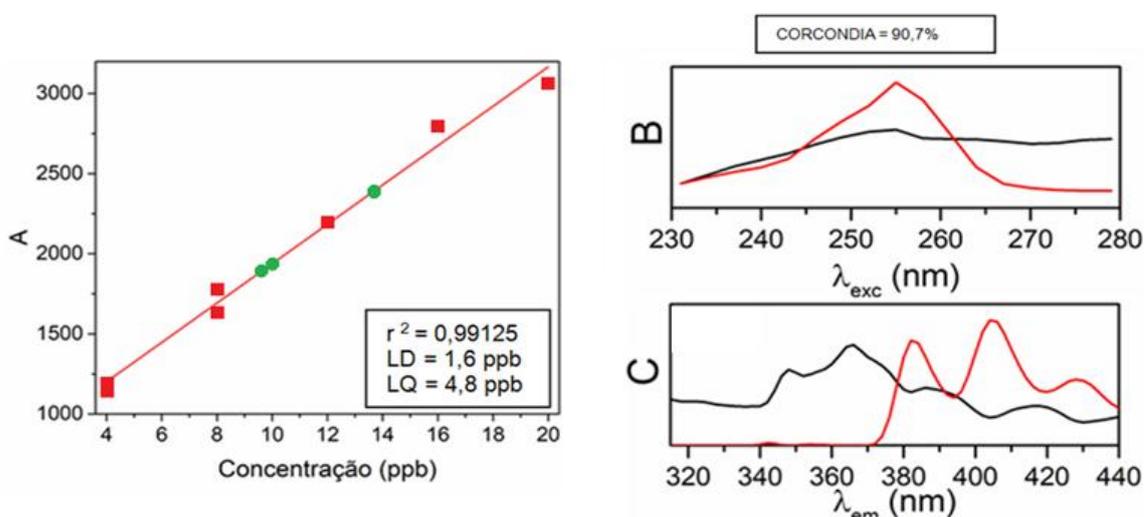


Figura 16 - Decomposição dos componentes puros realizada pelo PARAFAC para os padrões de ANT e as misturas (em água destilada).

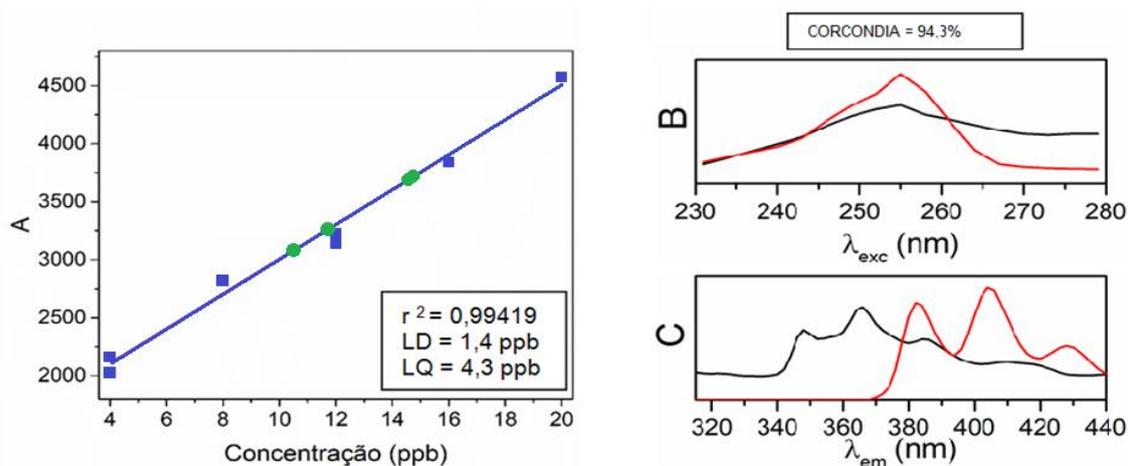


Figura 17 - Decomposição dos componentes puros realizada pelo PARAFAC para os padrões de FEN e as misturas (em água destilada).

Os perfis **B** e **C** nas figuras 16 e 17, correspondem aos perfis espectrais de excitação e emissão, respectivamente, dos analitos (ANT e FEN). Isso demonstra o potencial do algoritmo em recuperar perfis espectrais dos analitos, o que já habilita a técnica para a realização de análise qualitativa. Também é possível identificar os possíveis interferentes, mesmo que esses sejam desconhecidos no conjunto de calibração, visto que, o algoritmo fornece o perfil espectral do ANT mesmo quando lhe é fornecido apenas os padrões de FEN e vice-versa. Não apenas o perfil espectral do analito é recuperado de forma precisa, mas também a intensidade do sinal analítico, que está diretamente relacionado com a concentração do mesmo na amostra. Assim uma calibração pseudo-univariada pode ser realizada entre as concentrações conhecidas do analito nos padrões (pontos pretos nos gráficos a direita nas figuras 15 e 16) e o perfil **A** obtido do PARAFAC. Os valores do perfil **A** para as amostras (pontos vermelhos nos gráficos à direita nas figuras 16 e 17) são interpolados nessa curva e fornecem os valores de concentração do analito na mistura. Neste contexto, os próprios analitos são os únicos interferentes (um do outro) presentes.

A tabela 5 mostra as quantificações de ANT e FEN obtidas para diferentes misturas em água deionizada.

Tabela 5 - Misturas, concentração obtida e recuperação de ANT e FEN em água destilada para teste do modelo PARAFAC.

Mistura	Concentração de Referência (ppb)		Concentração Obtida (ppb) e Desvio Padrão				Recuperação %	
	ANT	FEN	ANT		FEN		ANT	FEN
			C	DP	C	DP		
1	10	10	10,0	0,26	10,5	0,29	100,0	105,0
2	10	14	9,6	0,26	14,7	0,31	96,0	105,0
3	14	10	13,7	0,31	11,7	0,29	97,9	117,0
4	14	14	13,7	0,31	14,6	0,30	97,9	104,3

4.5 Determinação de FEN em água de abastecimento contaminada artificialmente com HPAs leves.

O experimento realizado anteriormente em água deionizada foi reproduzido em água de abastecimento. Após as pré-concentrações (EFS) das amostras de água de torneira (25 mL), foi observado que uma quantidade considerável de material ficou retido na membrana, como podemos ver na Figura 18.

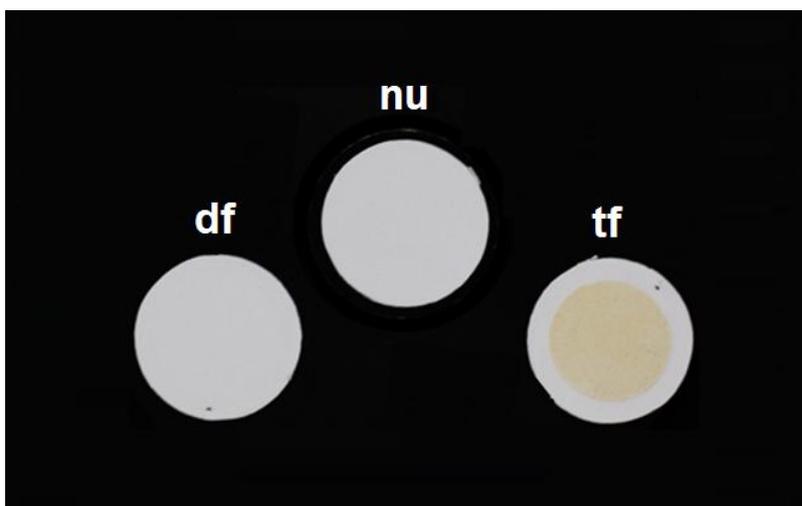


Figura 18 - Em (nu), membrana não utilizada; em (df), membrana que extraiu o analito de água destilada e; em (tf), membrana que extraiu o analito de água de abastecimento.

As deconvoluções dos espectros e as curvas analíticas dos dois analitos são mostrados nas figuras 19 e 20.

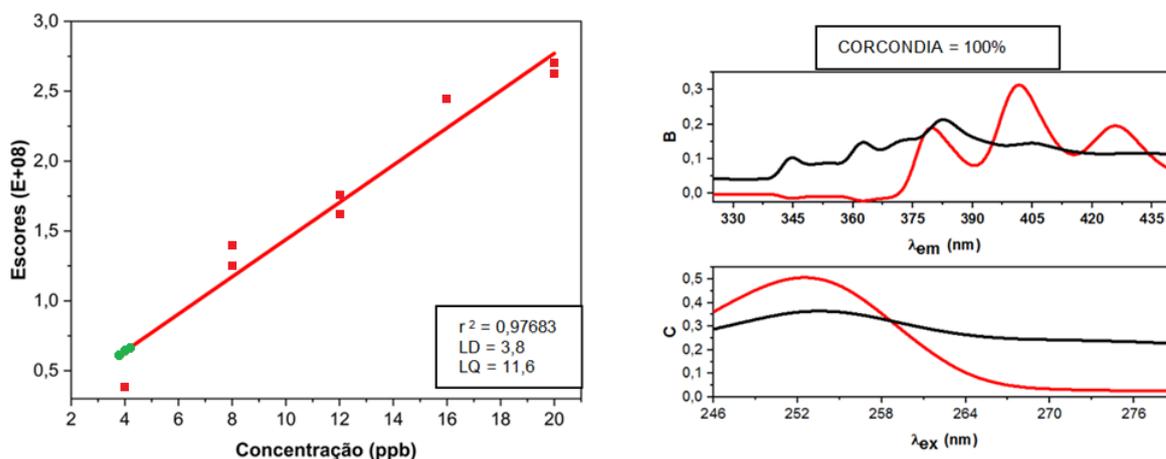


Figura 19 – Deconvoluções e quantificações do ANT em água de potável.

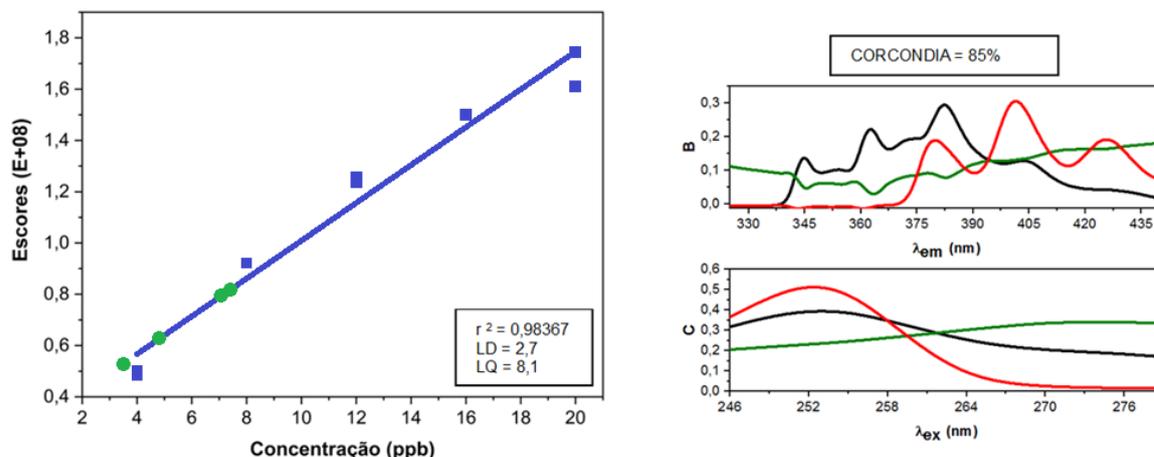


Figura 20 – Deconvoluções e quantificações do FEN em água de potável.

Ao final do procedimento metodológico, as recuperações tanto do ANT quanto do FEN foram notavelmente baixas como mostrado na tabela 6.

Tabela 6 - Misturas e recuperações de ANT e FEN em água de abastecimento para teste do modelo PARAFAC.

Amostra	Concentração de Referência (ppb)		Concentração Obtida (ppb)		Recuperação %	
	ANT	FEN	ANT	FEN	ANT	FEN
1	10	14	4	7,4	40,0	52,9
2	10	14	3,8	7,1	38,0	50,7
3	14	10	4,2	3,5	30,0	35,0
4	14	10	4,0	4,8	28,6	48,0
5	10	-	5,8	-	58,0	-
6	-	14	-	7,8	-	55,7

Este material retido corresponde, provavelmente, a matéria orgânica dissolvida, que por sua vez absorve radiação na região de emissão dos HPAs. Assim podemos observar uma atenuação do sinal de emissão por efeito filtro, o que explica a redução significativa da concentração prevista do analito obtida por esse método. Por outro lado, o material é retido apenas na superfície do filtro que foi exposta diretamente à solução, assim, o lado da membrana oposto à filtração

permanece tão limpo quanto uma membrana que filtrou um padrão em água deionizada como podemos ver na Figura 21.

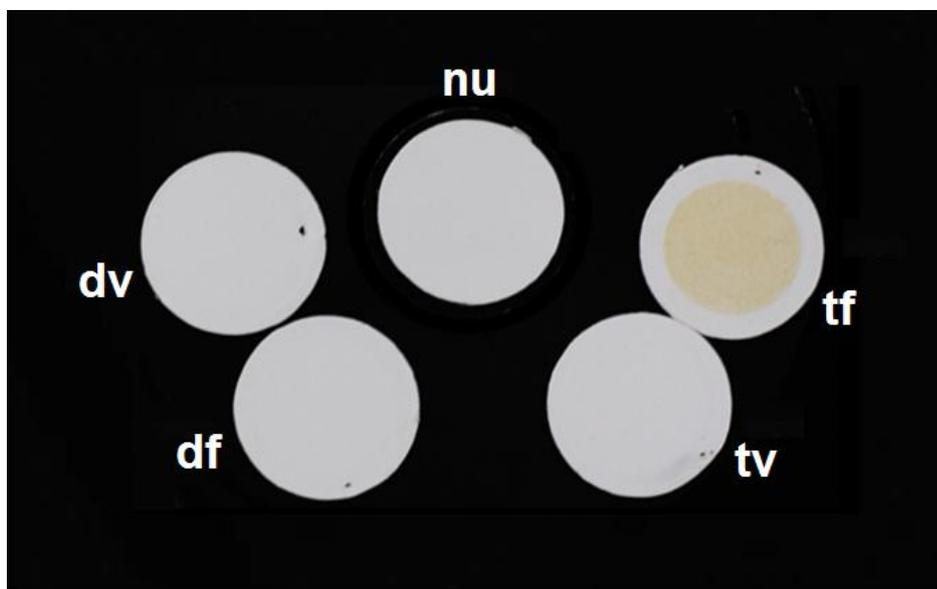


Figura 21 - Membrana, não utilizada (nu), que filtrou solução em água destilada, frente (df) e verso (dv), e, que filtrou solução em água de torneira, rente (tf) e verso (tv).

A partir dessas observações, foi cogitada a possibilidade de realizar a aquisição dos espectros no verso das membranas, considerando que o analito é adsorvido na membrana e, conseqüentemente, deve encontrar-se distribuído por toda ela, inclusive no verso. Para verificar se realmente existe uma quantidade mensurável de analito na face oposta. Foi realizada a medição do sinal analítico na face da membrana oposta à filtração em água de torneira, tanto para o ANT quanto para o FEN. Veja na figura 22.

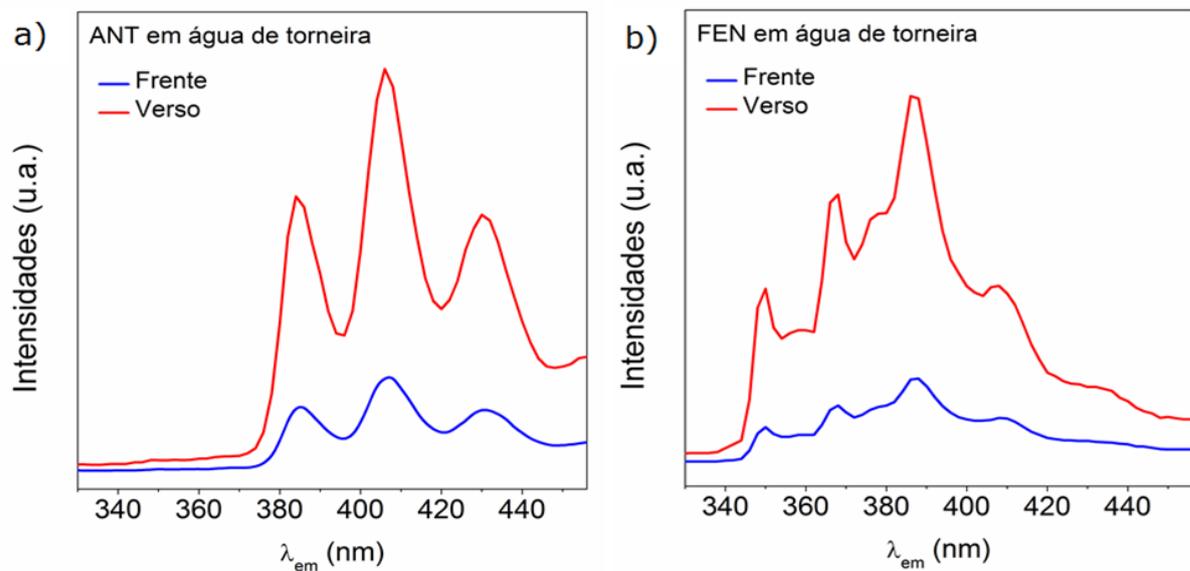


Figura 22 - Espectros medidos na frente (azul) e verso (vermelho) de membranas que processaram (EFS) soluções em água de torneira de ANT (a) e FEN (b).

Nos experimentos com as soluções em água de torneira os espectros no verso, tanto para o ANT quanto para o FEN, mostraram uma enorme diferença quando comparados com os espectros medidos na face frontal do filme. Essa diferença pode ser atribuída à presença de outros componentes da matriz retidos na face do filtro exposta à solução, enquanto o lado oposto à filtração permanece aparentemente limpo.

Após esses resultados, outro experimento foi realizado com o intuito de verificar a linearidade e intensidade do sinal na face oposta à filtração (dos padrões). Foram medidos os espectros dos cinco pontos da curva analítica (em água destilada) dos dois lados da membrana e comparados os sinais da face frontal e do verso. A figura 23 mostra visualmente essa relação para os dois analitos.

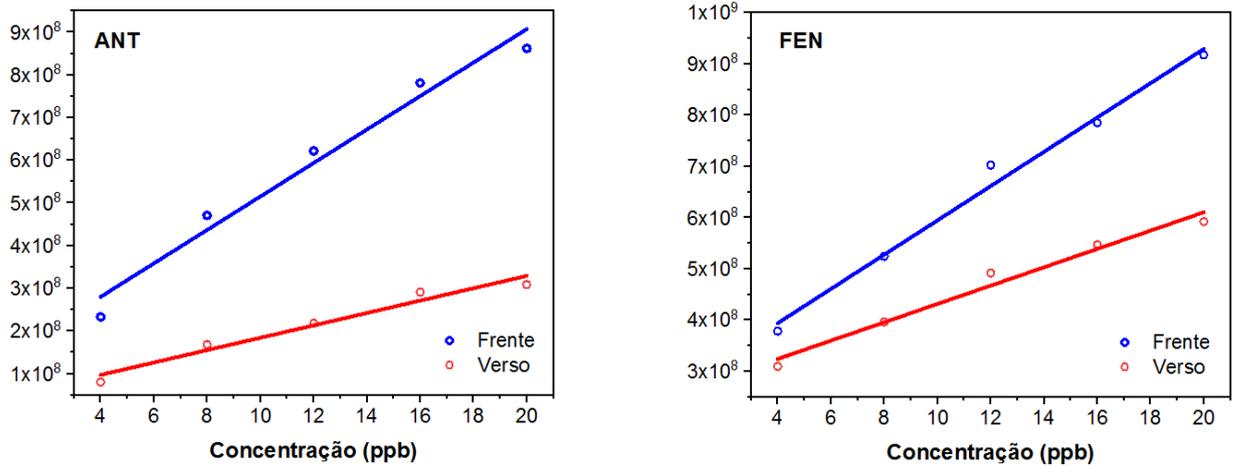


Figura 23 – Curvas analíticas do ANT e FEN medidas no lado exposto à filtração (azul) e oposto à filtração (vermelho).

A curva analítica adquirida com aquisição do sinal no lado oposto a filtração manteve a linearidade, porém com uma pequena diminuição de intensidade e sensibilidade.

Assim sendo, foram medidos os espectros no verso dos mesmos filtros (padrões e amostras) utilizados no teste anterior (em água de torneira) e os dados foram tratados com uso do algoritmo PARAFAC. Os resultados das deconvoluções e quantificações dos analitos estão descritos nas figuras 24 e 25.

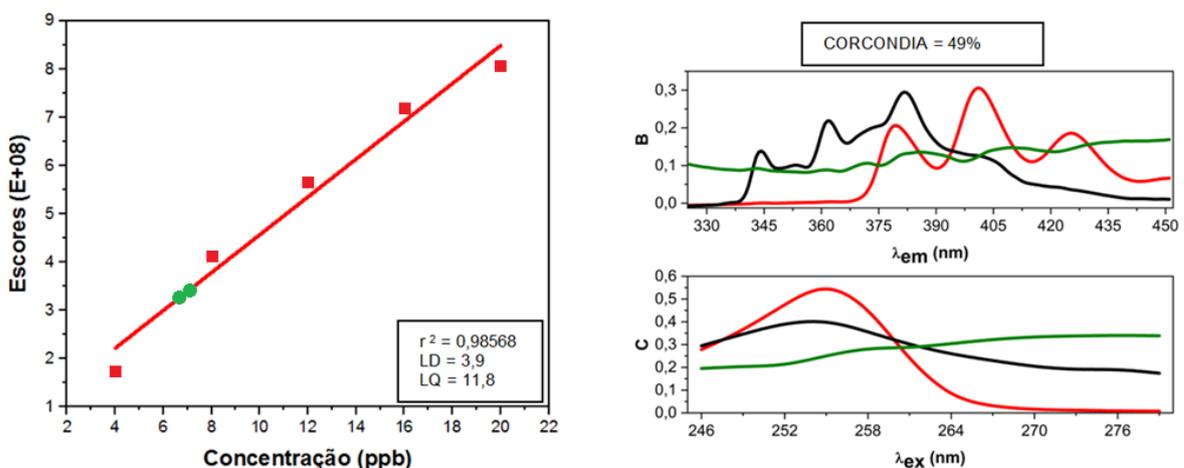


Figura 24 – Resultado, com detecção no verso da membrana, das deconvoluções e quantificações do ANT em misturas em água potável.

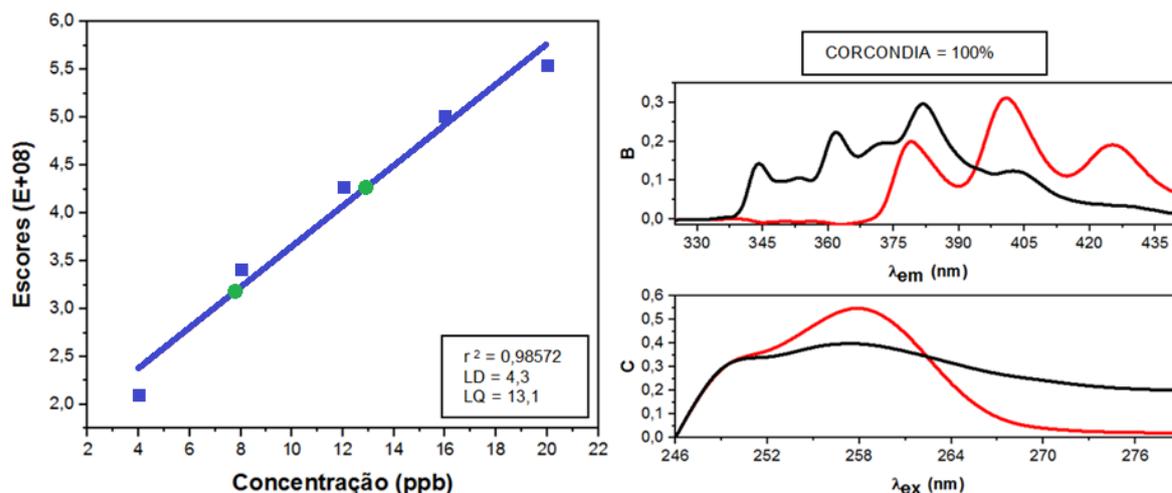


Figura 25 – Resultado, com detecção no verso da membrana, das deconvoluções e quantificações do FEN em misturas em água potável.

As concentrações obtidas e as recuperações dos dois analitos nas amostras (mesmas amostras da tabela 6) estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Misturas de ANT e FEN em água de torneira e suas respectivas recuperações para teste do modelo PARAFAC. Espectros registrados no verso da membrana.

Amostra	Concentração de Referência (ppb)		Concentração Obtida (ppb) e Desvio Padrão				Recuperação %	
	ANT	FEN	ANT		FEN		ANT	FEN
			C	DP	C	DP		
1	10	14	6,4	0,52	12,9	0,39	64,0	92,6
3	14	10	7,0	0,57	7,9	0,47	50,0	79,0
5	10	-	8,7	0,54	-	-	87,0	-
6	-	14	-	-	14,1	0,37	-	100,7

A intensidade do sinal medido no verso foi consideravelmente maior para todas as amostras, porém, enquanto as amostras 5 e 6 (contaminadas com apenas um dos analitos) as recuperações foram boas tanto para o ANT como para o FEN, nas amostras 1 e 3 (contaminadas com a mistura) as recuperações só foram satisfatórias para o FEN e, ainda assim, um pouco menor na amostra 1 (ANT e FEN em água de torneira) comparada a amostra 6 (apenas FEN em água de torneira). Os

resultados obtidos sugerem uma provável retenção dos analitos na matéria orgânica que ficou retida na superfície da membrana. Nesse caso, a diminuição no sinal do ANT é significativamente superior ao sofrido pelo FEN. Essa observação pode ser justificada pelo fato de a molécula do FEN ser menos apolar que a do ANT, estando assim o ANT, mais sujeito à adsorção na matéria orgânica.

Podemos considerar que a estratégia de registrar o sinal analítico no verso do filme obteve êxito em eliminar as interferências causadas por efeito filtro pela matriz da amostra (principalmente material orgânico dissolvido) retido na superfície frontal da membrana. Dessa forma, foi considerado a possibilidade aplicar essa técnica para análise desses analitos em amostras ambientais complexas.

4.6 Determinação de FEN em solo contaminado com HPAs leves.

Finalmente, visando ampliar o potencial de aplicação da estratégia de espectroscopia em membranas, um método foi proposto para análise de HPAs leves em solos, utilizando como analitos ANT e FEN. Foram feitas adições de ANT e FEN em amostras de solo (nas faixas de 0,4 a 1,6 mg/Kg e 1 a 4 mg/Kg, respectivamente), extração, diluição do extrato, EFS em membrana de náilon e detecção da fluorescência no verso da membrana. Após a EFS na membrana, uma quantidade considerável de particulado ficou retido na parte frontal do filtro, enquanto o verso permaneceu aparentemente limpo, como pode ser visto na Figura 26. Como esperado, a intensidade do sinal de fluorescência medido na face da membrana exposta à filtração foi consideravelmente atenuada na presença do material retido, assim como ocorreu nas análises em água de torneira.

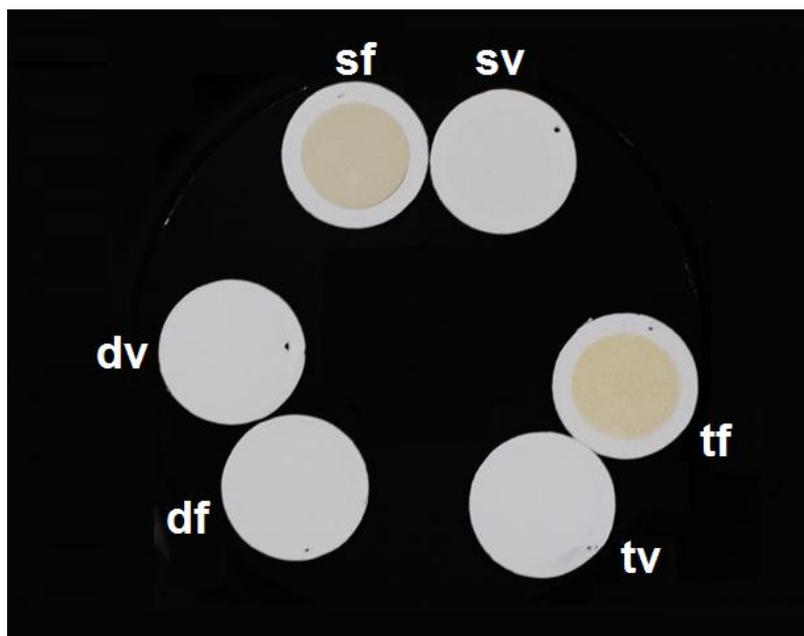


Figura 26 - Membranas que filtraram, água destilada frente (df) e verso (dv), água de torneira frente (tf) e verso (tv) e, extrato de solo (0,5g) frente (sf) e verso (sv).

Assim sendo, o método foi aplicado empregando a detecção do sinal analítico no verso, em todas as membranas (padrões e amostras). Os resultados obtidos com uso do PARAFAC são mostrados nas figuras 27 e 28.

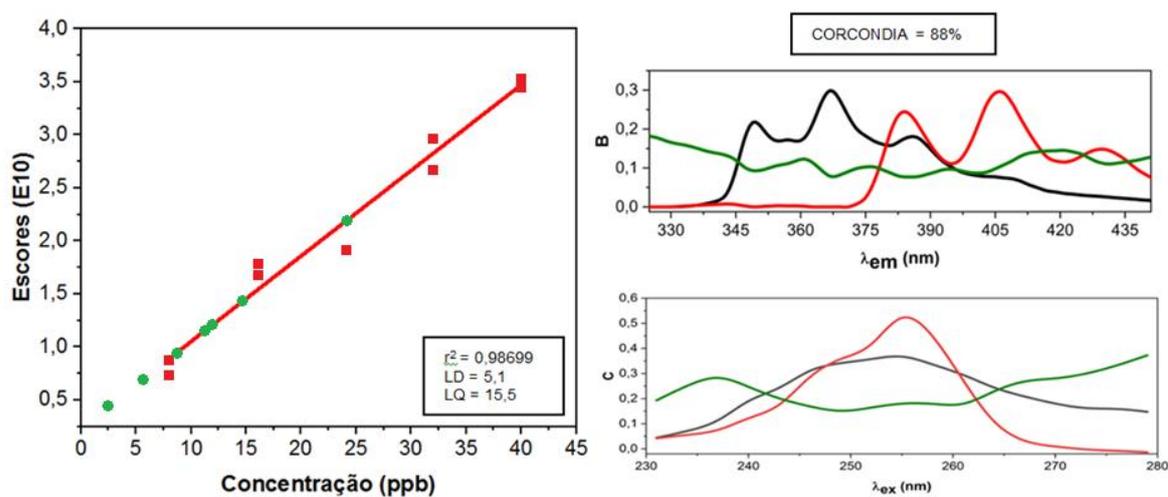


Figura 27 – Resultado das deconvoluções e quantificações do ANT em solo contaminado com HPAs leves (detecção no verso da membrana).

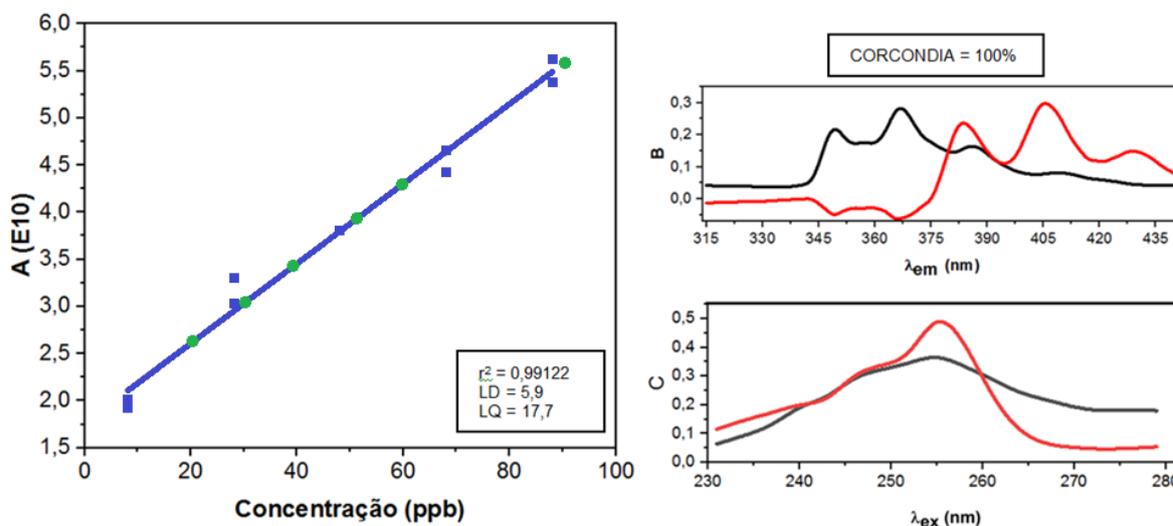


Figura 28 – Resultado das deconvoluções e quantificações do FEN em solo contaminado com HPAs leves (detecção no verso da membrana).

A tabela 8 mostra as concentrações obtidas e as recuperações dos analitos em sete proporções distintas de contaminação em solo.

Tabela 8 - Recuperações de ANT e FEN em amostras de solo.

Amostra	Concentração de Referência (ppb)		Concentração Obtida (ppb) e Desvio Padrão				Recuperação %	
	ANT	FEN	ANT		FEN		ANT	FEN
			C	DP	C	DP		
1	8	80	2,6	1,6	59,8	1,0	32,5	74,7
2	16	60	5,8	1,4	51,3	0,9	36,2	85,5
3	24	40	11,3	1,1	30,1	1,1	47,1	75,2
4	32	20	24,1	0,7	20,4	1,3	75,3	102,0
5	16	40	8,8	1,2	39,2	1,0	55,0	98,0
6	24	60	12,3	1,1	59,9	1,0	51,2	99,8
7	32	80	15,2	0,9	90,3	1,6	47,5	112,9

Os resultados mostram que o método é eficaz na recuperação do FEN em todas as amostras quando a aquisição do espectro é realizada no verso da membrana. A recuperação do ANT é significativamente menor para todas as amostras. Um ponto importante é que os espectros de emissão e excitação do ANT são detectados na decomposição do PARAFAC mesmo quando os padrões de ANT não são fornecidos, ou seja, o espectro do ANT é deconvoluído do sinal da amostra.

Isso significa que o modelo é eficiente para identificar o ANT e deveria ser capaz de quantificá-lo quando os padrões de ANT são fornecidos. Mais uma vez nossa hipótese é pela retenção, principalmente do ANT, na fase orgânica da matriz da amostra, resultando na diminuição das concentrações esperadas de ANT. Uma possível solução para esse problema pode ser o aumento do tempo ou velocidade de centrifugação buscando, dessa forma, diminuir o material orgânico presente na solução.

Outra estratégia para superar essa adversidade é através do uso da matriz da amostra no conjunto de calibração, nesse caso, espera-se que a curva analítica sofra interferências semelhantes às sofridas pelas amostras, resultando em melhores recuperações dos analitos.

Dessa forma, percebe-se que a estratégia utilizada para contornar as interferências causadas por materiais retidos na membrana, funciona e, provavelmente funcionará para casos semelhantes (onde o material depositado sobre a face da membrana exposta à solução inviabilize a detecção do sinal e o verso permaneça aparentemente intacto) aumentando assim, consideravelmente, a aplicação da técnica de detecção medida diretamente na membrana. É importante frisar que, o solvente das amostras deve ser rigorosamente reproduzido nos padrões, por exemplo, nessa análise foram utilizados 2 mL de acetona, para extrair os HPAs do solo, que permaneceram com o solvente até no volume final do balão (25 mL), então, como em todas as amostras estavam presentes 2 mL de acetona, os padrões foram preparados, cada um, com 2 mL de acetona com o solvente. Espera-se que a composição do solvente interfira de forma significativa no arraste dos analitos através da membrana e conseqüentemente nas intensidades dos sinais medidos tanto na frente quanto no verso da mesma.

Capítulo 5

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que o sistema de pré-concentração desenvolvido melhorou consideravelmente a aplicação da técnica de EFS em membrana, melhorando a ergometria, tornando a pressão mais constante e aumentando a frequência analítica de 12 min por extração (seringa) 3 min por extração (sistema desenvolvido). Além de ser um sistema que possui controle de pressão.

Os testes de retenção de ANT e FEN na membrana de náilon mostraram que os analitos são retidos quase que totalmente na primeira pré-concentração nas condições.

As comparações das intensidades dos sinais medidos na frente e no verso da membrana que filtraram água potável revelaram o impacto significativo causado pelo particulado retido na face frontal da membrana.

Os testes de detecção do sinal no verso da membrana que filtrou água destilada mostraram que no verso a intensidade da fluorescência é pouco menor que na face frontal da membrana (para 25 mL de solução aquosa). Isso mostra a viabilidade da aplicação da técnica com essa forma de detecção para minimizar as interferências causadas pelo material retidos na superfície frontal da membrana.

Em soluções de teste preparadas no laboratório com água destilada, ANT e FEN foram devidamente quantificados na faixa de 4 a 20 ppb. ANT e FEN foram corretamente identificados nas amostras de água de abastecimento e solos, sendo que o FEN foi adequadamente recuperado. As aplicações em determinações de FEN na presença de ANT em amostras de água de torneira e em amostras de solo resultaram em recuperações de 78 a 96% e 75 a 112% respectivamente, indicando que o uso dessa técnicas em conjunto (EFS e ES-FTA), pode ser expandida para aplicações em matrizes mais complexas em que ocorre presença de matéria orgânica na membrana.

Referências

- 1 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSD). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). US Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, **1996**.
- 2 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSD). Support document to the 2011 priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles. Division of Toxicology and Environmental Medicine, Atlanta, **2011**.
3. POTT, P; Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kind of ruptures and the mortification of the toes and feet. Hawes, Clark & Collins, p 63-68, 1775. Apud: International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Criteria 202. *Selected Non-heterocyclic PAHs*; World Health Organization, Geneva, **1998**.
- 4 COSTA AF. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): 1-hidroxipireno urinário. [dissertação]. Rio de Janeiro: Centro de estudos de Saúde do trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; **2001**.
- 5 BOJES, H. K.; POPE, P. G. Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.47, p.288-295, **2007**.
- 6 LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química Nova*, v. 19, n. 5, p. 497-516, **1996**.
- 7 INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 92, 2010. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/mono92.pdf>>. Acesso em: 19/01/ 2019.
- 8 GARBAN, B.; BLANCHOU, H.; MOTALAY-MASSEI, A.; CHEVREUIL, M.; OLLIVON, D. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*, v. 36, p. 5395-5403, **2002**.
- 9 ANGERER, J.; MANNUSCHRECK, C.; GÜNDEL, J.; *Int. Arch Environ. Health* **1997**, 70, 365.
- 10 MEIRE.R.O.; AZEREDO.A.; TORRES.M.JP.; Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis*.v.11, n.2, p. 188-201, **2007**.
- 11 SAMPAIO, M. F. C. Desenvolvimento e validação de método para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em caranguejo-uçá (*ucides cordatus*).

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, p. 7. **2016**.

12Disponível em < <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/geografia/chuvas-acidas.htm> > Acesso : 26/02/2019.

13 WILD, S.R., JONES, K.C. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. **Environmental Pollution**,v. 88, p.91–108, **1995**.

14 CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE RESOLUÇÃO – CONAMA nº 420 2009 Disponível em < <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>> Acesso : 26/01/2019.

15 TAN, K.H. Environmental soil science. 2.ed. Nova York, Marcel Dekker, **2000**. 480p.

16 SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH, Fundamentos de. Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana,. Editora Thomson, São Paulo-SP, **2006**. 2.

17 LAKOWICZ J. R., Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. Springer Science + Business Media (**2006**).

18 HO, C. N.; CHRISTIAN, G. D.; DAVIDSON, E. R.; *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1108.

19 GELADI, P.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1989**, *7*, 11.

20 BRO, R.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Amsterdam, Holanda, 1998.

21 BRO, R.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 149.

22 BRO, R.; KIERS, H. A. L.; *J. Chemom.* **2003**, *17*, 274.

23 E.D. HAGESTUEN, A.D. CAMPIGLIA, *Talanta* 49 (**1999**) 547.

24 G. GMEINER, G. STEHLIK, H. TAUSCH, *J. Chromatogr. A* 767 (**1997**) 163.

25 B. JANOSZKA, K. TYRPIEN, D. BODZEK, *J. Planar Chromatogr.*9 (**1996**) 450.

26 R. HARTMANN, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62 (**1996**) 161.

27 L. RIVERA, M.J.C. CURTO, P. PAIS, M.T. GALCERAN, L. PUIGNOU, *J. Chromatogr. A* 731 (**1996**) 85.

28 G. KISS, A. GELENCSEK, Z. KRIVACSY, J. HLAVAY, *J. Chromatogr. A* 774 (**1997**) 349.

29 T. RENNER, D. BAUMGARTEN, K.K. UNGER, *Chromatographia* 45 (**1997**) 199.

- 30 B. BODZEK, B. JANOSZKA, C. DOBOSZ, L. WARZECHA, M. BODZEK, J. Chromatogr. A 774 (1997) 177.
- 31 R. FERRER, J. GUITERAS, L. BELTRAN, Anal. Lett. 29 (1996) 2201.
- 32 MANOLI, C. SAMARA, Chromatographia 43 (1996) 135.
- 33 E.J. POZIOMEK, D. EASTWOOD, R.L. LIDBERG, G. GIBSON, Anal. Lett. 24 (1991) 1913.
- 34 D. EASTWOOD, M.E. DOMINGUEZ, R.L. LIDBERG, E.J. POZIOMEK, Analisis 22 (1994) 305.
- 35 E.D. HAGESTUEN, A.F. ARRUDA, A.D. CAMPIGLIA, Talanta 52 (2000) 727.
- 36 J.L. WHITCOMB, A.D. CAMPIGLIA, Talanta 55 (2001) 509
- 37 J.A. ARANCIBIA, G.M. ESCANDAR, Talanta 60 (2003) 1113.
- 38 G.M. ESCANDAR, D. GONZALEZ´ GOMEZ,´ A. ESPINOSA MANSILLA, A. MUNOZ´ DE LA PENA,´ H.C. GOICOECHEA, Anal. Chim. Acta 506 (2004) 161.
- 39 G.A. IBANEZ,´ G.M. ESCANDAR, A. ESPINOSA MANSILLA, A. MUNOZ´ DE LA PEÑA, Anal. Chim. Acta 538 (2005) 77–84.
- 40 R.A. CORREA, G.M. ESCANDAR, Anal. Chim. Acta 571 (2006) 58–65.
- 41 BORTOLATO SA, ARANCIBIA JA, ESCANDAR GM. A novel application of nylon membranes to the luminescent determination of benzo[a]pyrene at ultra trace levels in water samples. Anal Chim Acta 2008;613:218–27.
- 42 E.M. THURMAN, M.S. MILLS, Solid-phase extraction. Principles and practice, in: J.D. Winefordner (Ed.), Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications, Wiley, New York, 1998, p. 147.
- 43 MANOLI, E. SAMARA, C. *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (1999), 417.
- 44 S.A. BORTOLATO, J.A. ARANCIBIA, G.M. ESCANDAR, Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences, Anal. Chem. 80 (2008) 8276–8286.
- 45 JACQUES, R. J. S. Biorremediação de antraceno fenantreno e pireno em um argissolo. Tese (Doutorado em ciências do solo). Faculdade de agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 1. 2005.

46 SANTOS, A. S. O. Estudo comparativo entre extração soxhlet e ultrassom para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos no estuário do rio Sergipe por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, p. 12. **2011**.

47 BANJOO, D. R.; NELSON, P. K.; *J. Chromatogr., A* **2005**, 1066, 9.

48 SCHWAB, A. P.; SU, J.; WETZEL, S.; PEKAREK, S.; BANKS, M. K. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science Technology*, Easton, v.33, n.11, p.1940-1945, **1999**.

49 SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M. D.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 364, 1.

50 POPPI, R. J. TREVISAN, M. G. SENA, M. M. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Química Nova*, 28(5), p. 910-920, **2005**.

51 www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar (acesso em: 01/19).