UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Desenvolvimento de método voltamétrico de determinação de benzo(a)pireno em amostras de água de abastecimento e cachaça

Flávia Rhuana Pereira Sales

João Pessoa – PB – Brasil

Maio/2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Desenvolvimento de método voltamétrico de determinação de benzo(a)pireno em amostras de água de abastecimento e cachaça

Flávia Rhuana Pereira Sales*

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, área de concentração em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso

Coorientador: Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos

***Bolsista CNPq**

João Pessoa – PB – Brasil

Maio/2020

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S163d Sales, Flávia Rhuana Pereira.
Desenvolvimento de método voltamétrico de determinação de benzo(a)pireno em amostras de água de abastecimento e cachaça / Flávia Rhuana Pereira Sales. - João Pessoa, 2020.
65 f.

Orientação: Wallace Duarte Fragoso.
Coorientação: Sherlan Guimarães Lemos.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. benzo(a)pireno. 2. voltametria de onda quadrada. 3. eletrodo de pasta de carbono. 4. nanopartículas de ouro. I. Fragoso, Wallace Duarte. II. Lemos, Sherlan Guimarães. III. Título.

UFPB/BC

Desenvolvimento de método voltamétrico de determinação de benzo(a)pireno em amostras de água de abastecimento e cachaça.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Flávia Rhuana Pereira Sales e aprovada pela banca examinadora em 29 de maio de 2020.

Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Sherlan Guimarães Lemos
2º. Orientador

Prof. Dr. Gildiberto Mendonça de Oliveira
Examinadora

Profa. Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 29/05/2020, digitalizadas e certificadas pela Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso (SIAPE 1352049) em 29/05/2020

À minha mãe, Giovanna, ao meu pai, Flávio, à minha irmã, Giulianna, à minha parceira, Maria Salianny, meu parceiro Gael, a Lucy, todos meus familiares, as minhas amigas

Com amor, carinho e satisfação

Dedico

RESUMO

Dentre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o benzo(a)pireno (BaP) é um dos mais conhecidos e estudados, devido a evidência de carcinogenicidade em humanos e animais. Produzido a partir de combustão incompleta de matéria orgânica, pode ser encontrado em diversas matrizes, a exemplo da cachaça. O BaP pode ser determinado por diversas técnicas analíticas, tais como: técnicas voltamétricas, cromatográficas, espectrofluorescentes, etc. Nesse sentido, a oxidação eletroquímica do BaP foi investigada em diferentes valores de pH, tempos de pré-concentração, bem como quanto ao uso de surfactantes e proporção em volume de água-acetonitrila na cela eletroquímica utilizando eletrodo de pasta de carbono (EPC), visando a obtenção de método voltamétrico de determinação em água de abastecimento e cachaça. Com o estudo dos parâmetros supramencionados obteve-se uma condição experimental – mistura 1:1 de tampão Britton-Robinson (BR) pH 4,0 e acetonitrila, tempo de pré-concentração de 10 minutos em potencial de circuito aberto e 10 mg L^{-1} do surfactante dodecil sulfato de sódio – onde foi observado um pico de oxidação bem definido em +1,06 V (vs. Ag/AgCl) por voltametria de onda quadrada (VOQ) com EPC em 100 μg L^{-1} de BaP. O EPC foi modificado com nanopartículas de ouro sintetizadas por eletrodeposição. A modificação no EPC apresentou maior sensibilidade e foi escolhido para o desenvolvimento do método. Com intuito de obter respostas mais reprodutíveis, um planejamento fatorial para otimização robusta, método Taguchi, foi empregado para selecionar os níveis ideais dos parâmetros estudados. Uma vez estabelecidos o eletrodo e as condições voltamétricas de análise, o método apresentou faixa linear de trabalho de 20 μg L^{-1} a 260 μg L^{-1}, alcançando limite de detecção (LD) 0,29 μg L^{-1} (1,14 nmol L^{-1}) e limite de quantificação (LQ) de 0,96 μg L^{-1} (3,8 nmol L^{-1}). O método foi aplicado na determinação de BaP em amostras de água de abastecimento e cachaça e os resultados foram comparados aos obtidos com espectroscopia de fluorescência usando o método estatístico t *student* pareado, apresentando boa concordância entre as duas técnicas. O LD e LQ do método desenvolvido, encontram-se próximos aos obtidos na literatura pelos métodos eletroquímicos clássicos.

Palavras-chave: benzo(a)pireno, voltametria de onda quadrada, eletrodo de pasta de carbono, nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Among polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene (BaP) is one of the best known and studied, due to evidence of carcinogenicity in humans and animals. Produced from incomplete combustion of organic matter, they can be found in several matrices, for example, cachaça. BaP can be determined by several analytical techniques, including voltammetric techniques. In this sense, the electrochemical oxidation of BaP was investigated at different pH values and concentration times, as well as the use of surfactants and the volume quantity of water-acetonitrile in electrochemistry employing carbon paste electrode (CPE), using the voltammetric method of determination in supply water and distilled drink. With the study of the aforementioned parameters, an experimental condition was obtained - 1: 1 mixture of Britton-Robinson (BR) pH 4.0 buffer and acetonitrile, pre-concentration time of 10 minutes in open circuit potential and 10 mg L^{-1} of the sodium dodecyl sulfate surfactant - where a well-defined oxidation peak at +1.06 V (vs. Ag / AgCl) was observed by square wave voltammetry (VOQ) with EPC in 100 μg L^{-1} of BaP. The CPE was modified with gold nanoparticles synthesized by electrodeposition. The CPE modification showed greater sensitivity and was chosen for the development of the method. In order to obtain more reproducible answers, a factorial design for robust optimization, Taguchi method, was used to select the ideal levels of the studied parameters. Once the electrode and voltammetric conditions of analysis were established, the method presented a linear working range from 20 μg L^{-1} to 260 μg L^{-1}, reaching the detection limit (LD) 0.29 μg L^{-1} (1.14 nmol L^{-1}) and limit of quantification (LQ) of 0.96 μg L^{-1} (3.8 nmol L^{-1}). The method was applied to determine BaP in samples of drinking water and cachaça and the results were compared to those obtained with fluorescence spectroscopy using the paired t student statistical method, showing good agreement between the two techniques. The LD and LQ of the developed method are close to those obtained in the literature by the classical electrochemical methods.

Keywords: benzo(a)pyrene, square wave voltammetry, carbon paste electrode, gold nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química e anelação de alguns HPAs. Fonte: VOLLHARDT; SCHORE, 2013.	1
Figura 2	Esquema do destino e distribuição de HPAs no ambiente e na atmosfera. Fonte: Adaptado de KIM, *et al.,* 2013.	4
Figura 3	Metabolismo do BaP pelo citocromo P450 gerando como produto o metabólito com atividade carcinogênica. Fonte: Adaptado de JALALVAND, *et al.,* 2015.	8
Figura 4	(A) Aplicação do potencial para a voltametria cíclica, (B) voltamograma cíclico para um sistema reversível. Fonte: WANG, 2006a.	12
Figura 5	(A) Aplicação do sinal de excitação da técnica VOQ, (B) voltamograma de um processo redox de um sistema reversível da VOQ, (C) e de um sistema irreversível. Fonte: SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.	14
Figura 6	Ilustração de uma corrente de redução envolvida na eletrodeposição de uma espécie eletroativa sem formação de núcleos. Fonte: SILVA, 2008.	15
Figura 7	Análise dos efeitos dos parâmetros de controle a partir da média da razão S/N (força de adesão). Fonte: ROSA, *et al.,* 2009.	19
Figura 8	Voltamogramas de onda quadrada do estudo de pré-concentração em OCP de BaP 1 mg L^{-1} em tampão BR pH 4,0 em EPC. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	27
Figura 9	Voltamogramas de onda quadrada de BaP 1 mg L^{-1} em tampão BR pH 4,0 em EPC e EPC-MWNTs com pré-concentração de 600 s em OCP. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	27
Figura 10	Voltamogramas de onda quadrada em EPC com BaP 1 mg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR pH 2,0 a 5,0. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	28
Figura 11	Voltamogramas de onda quadrada em EPC de BaP 100 μg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR (pH 4,0) contendo (A) diferentes concentrações de DSS (5 - 20 mg L^{-1}) e (B) 5 - 20 mg L^{-1} de DBSA. Em linha vermelha estão representados os voltamogramas sem surfactante. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	29
Figura 12	Voltamogramas de onda quadrada em EPC de BaP 100 μg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR (pH 4,0) contendo DSS 10 mg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	30

Figura 13	Voltamogramas onda quadrada em EPC de BaP 100 μg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em diferentes proporções de acetonitrila-tampão BR contendo DSS 10 mg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.	31
Figura 14	Voltamogramas de onda quadrada em EPC com BaP pré-concentrado por 600 s em OCP em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1:1 (v/v) contendo DSS 10 mg L^{-1}. Foram empregadas diferentes concentrações de BaP: 16, 32, 78, 104 e 130 μg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Inserção: a curva analítica para BaP. Fonte: Própria, 2019.	32
Figura 15	Voltamogramas cíclicos dos perfis dos EPC-Au em diferentes concentrações de $HAuCl_4$ ($1,0x10^{-5}$ – $4,0x10^{-5}$ mol L^{-1}) em NaCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Fonte: Própria, 2020.	33
Figura 16	Voltamogramas de onda quadrada de BaP 100 μg L^{-1} em diferentes pH com pré-concentração de 600 s em acetonitrila-água (tampão BR) na proporção 1:1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS. E_{dp}: +0,4 V; t_{dp}: 80 s; $HAuCl_4$ 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Fonte: Própria, 2020.	35
Figura 17	Variação do design de experimentos sobre a razão (S/N). Fonte: Própria, 2020.	37
Figura 18	Efeitos dos fatores em relação à média da razão (S/N). A - E_{dp} (+0,2 V e +0,4 V); B – *f* (50 Hz e 75 Hz); C – t_{dp} (80 s e 120 s); D – ΔE_p (25 mV e 35 mV); E – Vol. de DSS (100 μL e 250 μL). Fonte: Própria, 2020.	38
Figura 19	Voltamogramas de onda quadrada comparando o sinal analítico do BaP pré-concentrado por 600 s em EPC e EPC-Au. As medidas foram realizadas nas condições otimizadas dos parâmetros de eletrodeposição em tampão BR pH 4,0 -acetonitrila 1:1, com 10 mg L^{-1} de DSS. Fonte: Própria, 2020.	39
Figura 20	Voltamogramas de onda quadrada do BaP pré-concentrado por 600 s em diferentes concentrações 20; 55; 105; 175 e 250 μmol L^{-1} no EPC-Au. Executadas em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1: 1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS. Inserção: curva analítica. Fonte: Própria, 2020.	40
Figura 21	Voltamogramas de onda quadrada das amostras sem adição de BaP (▬) e em diferentes concentrações de BaP 20 (▬); 55 (▬); 105 (▬); 175 (▬) e 250 (▬) μg L^{-1} no EPC-Au. Medidas executadas em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1:1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS e pré-concentração de 600 s. (A) água de torneira (B) cachaça. Inserção: curvas analíticas. Fonte: Própria, 2020.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades físicas e químicas de alguns HPAs. Fonte: Adaptada de NETTO, *et al.,* 2000.	2
Tabela 2	Propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos HPAs. Fonte: Adaptado de SINGH; AGARWAL; VARSHNEY, 2016.	6
Tabela 3	Métodos analíticos comuns empregados na análise de HPAs.	7
Tabela 4	Revisão bibliográfica dos trabalhos que determinam BaP por métodos eletroanalíticos.	10
Tabela 5	Arranjos ortogonais formulados por Taguchi. Fonte: PADKE, 1989.	16
Tabela 6	Arranjo ortogonal L_9 de Taguchi utilizado no estudo de separação de íons cobre. Fonte: Adaptado de MOHAMMEDI*, et al.*, 2004.	17
Tabela 7	Fatores e níveis empregados para o planejamento Taguchi.	23
Tabela 8	Arranjo ortogonal empregado no método eletroquímico.	23
Tabela 9	Arranjo ortogonal e respostas da corrente de pico (μA) dos 32 ensaios.	37
Tabela 10	Fatores e níveis empregados na determinação de BaP.	38
Tabela 11	Limites de detecção de BaP em métodos analíticos em comparação ao obtido no método eletroquímico desenvolvido.	41
Tabela 12	Dados das equações das retas obtidas para a faixa linear de concentração das curvas analíticas das amostras realizadas com o EPC-Au.	42
Tabela 13	Resultados de ensaios de recuperação aparente do BaP das análises de amostras de água de abastecimento e cachaça com o método que emprega o EPC-Au.	43
Tabela 14	Resultados de ensaios de recuperação aparente do BaP na cachaça pelo método eletroquímico desenvolvido e método comparativo (espectroscopia de fluorescência).	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRABE	Associação Brasileira de Bebidas
BaP	benzo(a)pireno
BPDE	benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido
BPE	(+)benzo(a)pireno-7,8-epóxido
BR	Britton-Robinson
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYP450	citocromo P450
DBSA	ácido dodecilbenzenosulfônico
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSS	dodecil sulfato de sódio
EPC	eletrodo de pasta de carbono
EPC-Au	eletrodo de pasta de carbono modificado com eletrodepósitos de ouro
EPC-MWNTs	eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono
EU	European Union
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Programme on Chemical Safety
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MWCNTs	nanotubos de carbono com paredes múltiplas
OCP	potencial em circuito aberto
PARAFAC	análise de fatores paralelos
SCF	Scientific Committee on Food
SFA	Snack Food Association
S/N	sinal - ruído
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV-vis	ultravioleta-visível

VC	voltametria cíclica
VOQ	voltametria de onda quadrada
VPD	voltametria de pulso diferencial
ΔE_p	amplitude de pulso de potencial
ΔE_s	incrementro de potencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) 1
1.1.1 Benzo(a)pireno 7
1.2 Técnicas Voltamétricas 11
1.2.1 Voltametria Cíclica 11
1.2.2 Voltametria de Onda Quadrada 13
1.3 Cronoamperometria e eletrodeposição 14
1.4 Método Taguchi 15
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivo Geral 20
2.2 Objetivos Específicos 20
3 METODOLOGIA 20
3.1 Reagentes e Soluções 20
3.2 Instrumentação 21
3.3 Preparação do eletrodo e modificações 21
3. 3.1 Obtenção do eletrodo de pasta de carbono 21
3.3.2 Modificação com nanotubos de carbono (MWNTs) 22
3.3.3 Modificação por eletrodeposição de ouro 22
3.5 Planejamento Taguchi 22
3.6 Estudos voltamétricos 23
3.6.1 Estudo com EPC 23
3.6.2 Estudo do EPC modificado a partir da eletrodeposição de ouro 24
3.7 Avaliação da metodologia de determinação 24
3.7.1 Validação do método eletroanalítico 24
3.7.2 Procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de BaP em cachaça 25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 26
4.1 Estudo do sinal analítico do BaP em EPC e EPC-MWNTs 26
4.2 Modificação do EPC por eletrodeposição de ouro 33
4.3 Aplicação do método em amostras de água de abastecimento e cachaça 41
5 CONCLUSÃO 44
6 PERSPECTIVAS 45
REFERÊNCIAS 46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compõem um grupo com mais de 100 compostos lipofílicos conhecidos por sua atividade mutagênica e carcinogênica. Esses compostos são formados, exclusivamente, por carbono e hidrogênio, dado por dois ou mais anéis aromáticos condensados em sua estrutura (VOLLHARDT; SCHORE, 2013). Como exemplos, são apresentadas as estruturas dos HPAs, fenantreno, antraceno, criseno e benzo(a)pireno (Figura 1).

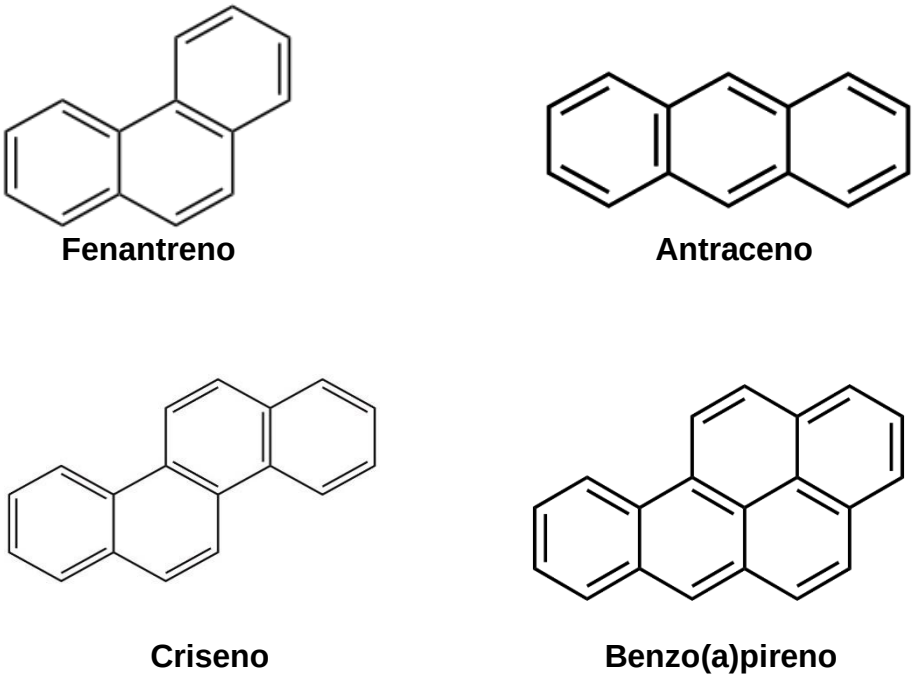

Figura 1. Estrutura química e anelação de alguns HPAs. Fonte: VOLLHARDT; SCHORE, 2013.

No ambiente, a emissão de HPAs pode ser proveniente de fontes naturais – incêndios de florestais naturais e erupções vulcânicas – e antropogênicas – combustão de motores a diesel e gasolina, queimadas florestais, fumaça de cigarro e cozimento de alimentos (churrasco, frituras e assados à lenha ou carvão) (RENGARAJAN, *et al*., 2015). Após sua emissão, os HPAs apresentam mobilidade e persistência no meio ambiente, com deposição nos principais compartimentos ambientais (ar, solo, água).

O comportamento biológico e ambiental desses compostos pode ser compreendido por meio de algumas propriedades físico-químicas (Tabela 1). Os HPAs são sólidos em temperatura ambiente, são pouco solúveis em água, sendo que a solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Como apresentam uma estrutura consideravelmente estável, possuem pontos elevados de fusão e ebulição. São solúveis em solventes orgânicos e demonstram elevada afinidade lipofílica corroborada pelo coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), que aumenta com a massa molecular (PURCARO; MORET; CONTE*,* 2015).

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas de alguns HPAs. Fonte: Adaptada de NETTO, *et al.,* 2000.

Substância	Peso molecular (g mol^{-1})	PF (°C)	PE (°C)	Pressão de Vapor (Pa, 25°C)	Log $K_{(o/w)}$	Solubilidade em Água (mg L^{-1})
Naftaleno	128,17	81	217,9	10,4	3,40	$3,17 \times 10^{4}$
Acenaftileno	152,20	92-93	-	$8,90 \times 10^{-1}$	4,07	-
Fluoreno	166,22	115-116	295	$8,00 \times 10^{-2}$	4,18	$1,98 \times 10^{3}$
Fenantreno	178,23	100,5	340	$1,60 \times 10^{-2}$	4,60	$1,9 \times 10^{3}$
Antraceno	178,23	216,4	342	$8,00 \times 10^{-4}$	4,50	73,0
Pireno	202,26	150,4	393	$6,00 \times 10^{-4}$	5,18	135
Criseno	228,29	253,8	448	$8,40 \times 10^{-5}$	5,91	2,00
Benzo(a)pireno	252,32	178,1	496	$7,30 \times 10^{-7}$	6,50	3,80

*PF – ponto de fusão; PE – ponto de ebulição; Log $K_{o/w}$ – coeficiente de partição (octanol/água).

Em contrapartida, a volatilidade desses compostos diminui com o aumento da massa molecular. Nesse sentido, os HPAs com massas moleculares menores como o naftaleno, acenaftileno e fluoreno, são voláteis e apresentam maiores pressões de vapor quando comparados a HPAs mais pesados. Posto isto, estas substâncias podem ser encontradas na atmosfera na fase gasosa, bem como, adsorvida em material particulado. A meia-vida dos HPAs com maior peso molecular é elevada (benzo(a)pireno – 269 dias a 8,2 anos no solo), o que indica uma degradação lenta (NETTO, *et al,* 2000).

Na atmosfera, o comportamento dos HPAs depende das interações com outros poluentes, transformações fotoquímicas e deposição seca e úmida. No ar, os HPAs existem na fase de vapor ou adsorvidos em partículas transportadas pelo ar, dependendo das condições atmosféricas (temperatura ambiente, umidade relativa, etc.). Tais compostos são capazes de reagir com ozônio,

óxidos de nitrogênio e dióxido de enxofre para formar outros poluentes, como o nitro- e dinitro-HPAs e ácidos sulfúricos.

A adsorção de HPAs em fases particuladas depende do tipo de partículas em suspensão (por exemplo, fuligem, cinzas, poeira, pólens, óxidos de metais pirogênicos etc.) e podem ser afetadas pela umidade (ZHANG; TAO, 2009). Esses compostos também são detectados no solo e na água, bem como em vários produtos consumíveis, porém em concentrações muito menores que no ar. Na água, eles se apresentam em quantidades muito baixas devido a sua alta hidrofobicidade. São encontrados em águas superficiais contaminadas (0,255 $\mu g\ L^{-1}$ benzo(a)pireno), efluentes de refinaria, águas residuais municipais e escoamento urbano (AZEVEDO; GERCHON; REIS, 2004). Parte dos HPAs são solubilizados na água e parte deles ficam adsorvidos ao material em suspensão e/ou sedimentos, facilitando a absorção destes compostos por organismos vivos (frutos do mar e peixes), sendo um meio de contaminação pertinente (MOSTAFA, 2002).

Os resíduos gerados a partir de processos e operações industriais, incluindo resíduos domésticos, quando tratados parcialmente e descartados no ambiente solo-água, entram em lagos, córregos, rios, oceanos e outros corpos d'água. Os poluentes são dissolvidos, suspensos na água e/ou depositados em leitos de sedimentos no solo. Dentro do exposto, um esquema do destino e distribuição de HPAs no ambiente e na atmosfera é ilustrado na Figura 2.

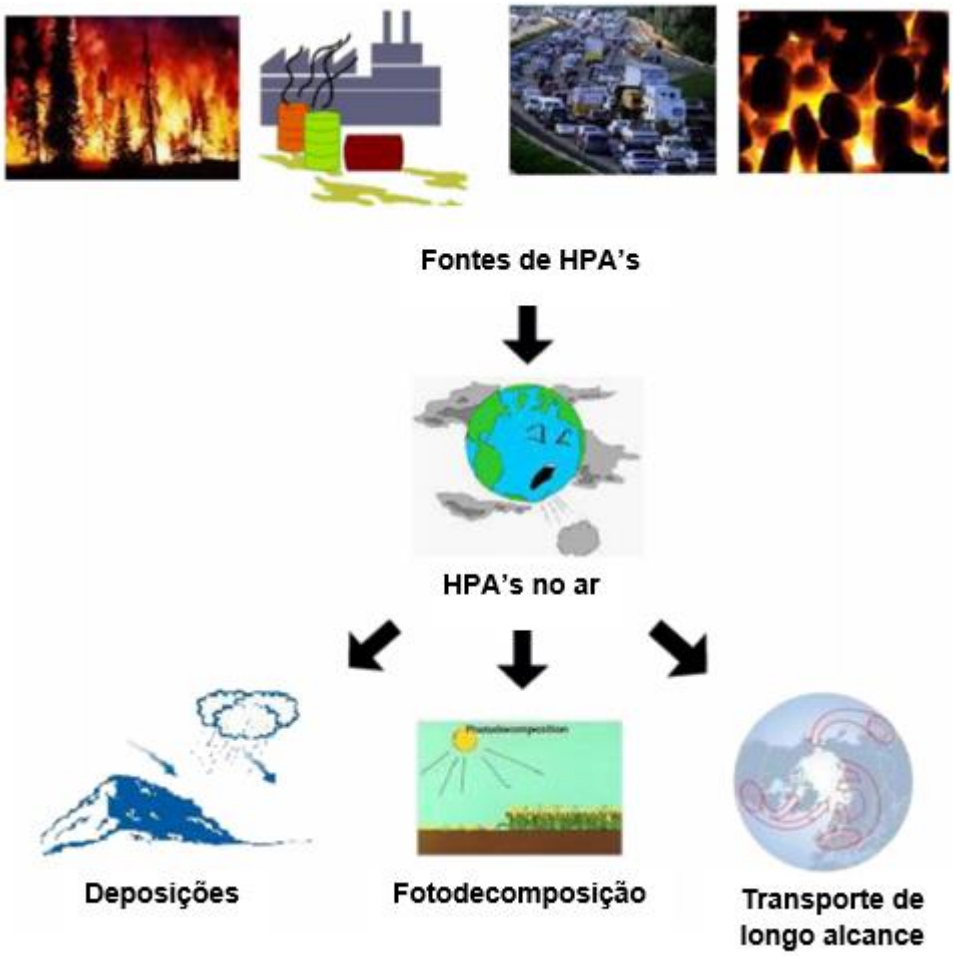

Figura 2. Esquema do destino e distribuição de HPAs no ambiente e na atmosfera. Fonte: Adaptado de KIM, *et al.,* 2013.

Os HPAs encontram-se no solo, em sua maior parte, adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas mais externas, onde estes contaminantes, geralmente, estão mais presentes na superfície da planta (folhas externas, casca) do que no tecido interno (LAWAL, 2017). Sob esse viés, diversos alimentos podem ser contaminados por HPAs presentes no solo.

A presença de HPAs nos alimentos implica um risco potencial para a saúde humana. Sua presença se reflete em níveis detectáveis em muitos tipos de alimentos não cozidos, cereais, vegetais, em gorduras e óleos como girassol, oliva, soja, palma e óleos de colza, chá, bebidas destiladas, entre outros tipos (LEE, *et al.*, 2016). A exemplo, sabe-se que a cachaça é a primeira bebida destilada mais consumida no Brasil e a terceiro do mundo, segundo a Associação Brasileira de Bebidas – ABRABE. Para a produção da cachaça, a colheita da cana-de-açúcar no Brasil é na maioria das vezes, conduzida após a

queima dos canaviais. Este procedimento resulta em contaminação ambiental, por meio das partículas de palha queimada (fuligem) e dos inúmeros compostos tóxicos, dentre os quais destacam-se os HPAs, que introduzidos na atmosfera, podem contaminar a cana-de-açúcar e, consequentemente, a cachaça (TFOUNI, *et al*., 2007).

O risco potencial à saúde tem sido apresentado em estudos que demonstram alguns compostos desse grupo como altamente tóxicos, carcinogênicos e/ou mutagênicos em experimentação com microorganismos, bem como para sistemas superiores, incluindo seres humanos (SENTURK, 2013). Vale ressaltar que esses compostos se bioacumulam na cadeia alimentar.

A toxicidade dos HPAs tem sido avaliada por várias organizações como por exemplo, United States Environmental Protection Agency (US EPA), International Agency for Research on Cancer (IACR), Scientific Committee on Food (SCF), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e International Programme on Chemical Safety (IPCS). A USEPA selecionou 16 HPAs que são tóxicos e carcinogênicos, frequentemente encontrados em amostras de monitoramento ambiental (água, ar, solo).

A seleção dispõe as substâncias com base na frequência de ocorrência, toxicidade e potencial à exposição humana. Esses HPAs foram identificados em 1970, sendo eles, em ordem de massa molecular: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzeno(a)antraceno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenz(a, h)antraceno (MUMTAZ; GEORGE, 1995; PANDEY; KIM; BROWN, 2011; ZELINKOVA; WENZL, 2015).

A Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC) separou os 16 HPAs em grupos baseados em suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas, como descreve a Tabela 2. O grupo 1 representa os agentes que são carcinogênicos em humanos. O grupo 2A representa os agentes que são prováveis carcinogênicos em humanos. O grupo 2B representa os agentes que são possíveis carcinogênicos em humanos e o grupo 3 representa os agentes que não apresentam atividade carcinogênica em humanos.

Tabela 2. Propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos HPAs. Fonte: Adaptado de SINGH; AGARWAL; VARSHNEY, 2016.

N°	HPA	Genotoxicidade	Grupos de classificação IARC
1	Acenafteno	Questionável	Ainda não avaliado
2	Acenafteno	Questionável	Ainda não avaliado
3	Antraceno	Negativo	3
4	Benzo(a)antraceno	Positivo	2B
5	Benzo(b)fluoranteno	Positivo	2B
6	Benzo(k)fluoranteno	Positivo	2B
7	Benzo(g,h,i)perileno	Positivo	3
8	Benzo (a) pireno	Positivo	1
9	Criseno	Positivo	2B
10	Dibenzo(a,h)antraceno	Positivo	2A
11	Fluoranteno	Positivo	3
12	Fluoreno	Negativo	3
13	Indeno(1,2,3– c,d)pireno	Positivo	2B
14	Fenantreno	Questionável	3
15	Pireno	Questionável	3
16	Naftaleno	Positivo	2B

O dano ao DNA induzido por poluentes ambientais é uma importante via de toxicidade endógena no sistema biológico. A maioria desses poluentes orgânicos pode não causar danos ao DNA de forma direta, mas seus produtos metabolizados por reações enzimáticas são genotóxicos e podem lesionar o DNA. O número de anéis nos compostos correlaciona-se proporcionalmente com o nível de toxicidade (ZHANG, *et al.,* 2006; XIA, *et al.,* 2013).

Os HPAs com quatro ou mais anéis em sua estrutura e seus metabólitos são compostos mutagênicos e tóxicos com risco significativo para a saúde humana. Esses compostos se convertem em epóxidos de diol ou agem sinergicamente na ligação covalente eficiente com macromoléculas celulares como o DNA, adicionando erros em sua replicação, mutação e gênese do tumor, gerando o câncer (SINGH; AGARWAL; VARSHNEY, 2016). Frente a isso, há a necessidade em controlar os níveis de concentração desses compostos nas mais diversas matrizes. Nesse sentido, estas substâncias podem ser determinadas pelo método referência 8310 encontrado na US-EPA (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV ou fluorescência), pelo método referência 6440 B do Standard Methods (APHA, 2005) ou por diversos outros métodos, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Métodos analíticos comuns empregados na análise de HPAs.

N°	Técnica	Matriz	Referência
1	Fluorimetria	Amostra ambiental e de alimentos	WENZL, *et al*., 2006
2	Espectroscopia de Infravermelho	Amostras forenses	TOMMASINI, *et al.,* 2016
3	Espectrometria de Fluorescência	Água	ZHANG, *et al*. 2012
4	Espectroscopia de Fluorescência	Polpa de resíduos	AEMIG; CHÉRON, *et al.*, 2016
5	CG-EM	Furtas e vegetais	BANERJEE, *et al.*, 2012
6	CLAE - Fluorescência	Partículas atmosféricas e Solo	PHAM, *et al.*, 2015

1.1.1 Benzo(a)pireno

Como descrito na Tabela 2, o benzo(a)pireno (BaP) está classificado no grupo 1 pelo IARC, sendo o HPA de maior atividade carcinogênica. Pode-se afirmar que este está presente na maioria das amostras contaminadas por HPA (Du, *et al.,* 2015). O BaP é um composto lipofílico, com cinco anéis em sua estrutura como ilustrado na Figura 1, possui altos valores de ponto de fusão e ebulição, baixa solubilidade em água e baixa pressão de vapor. Devido às suas características, os seres humanos são expostos a este composto por diferentes vias, entre elas inalação, ingestão de alimentos e água contaminados e contato dérmico.

Assim como outros HPAs, o BaP tende a ser mais facilmente incorporado no tecido, fígado e rim. O BaP é metabolizado pelos mamíferos por meio de uma monooxigenase e epóxido hidrolase dependente do citocromo P450 a metabólitos epóxidos, incluindo metabólitos primários e secundários, tais como dióis, fenóis, quinóis, di-hidrodióis e conjugados solúveis em água (ZHANG, *et al.,* 2006; XIA, *et al.,*2013).

Estudos comprovam que, para que tenha atividade carcinogênica, o BaP necessita de uma ativação metabólica (PADRÓS, PELLETIER, 2000). *In vivo* geralmente o BaP é catalisado por citocromos como o P450 para formar o benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (BPDE), que é o principal agente cancerígeno que causa dano ao DNA. O BPDE é o produto cancerígeno de três reações enzimáticas.

Primeiro, o BaP é oxidado pelo citocromo P450 para formar uma variedade de produtos, incluindo o (+)benzo(a)pireno-7,8-epóxido (BPE). O citocromo P450 é um catalisador poderoso, capaz de gerar muitos tipos de reação, como:

epoxidação e hidroxilação das ligações C-H, mesmo na presença de uma ligação C=C. Segundo, o produto BPE é metabolizado pela epóxido hidrolase, abrindo o anel epóxido para produzir (-)benzo(a)pireno-7,8-dihidrodiol. E por último, o agente cancerígeno é formado após outra reação com o citocromo P450 para produzir o BPDE (KESKIN, *et al.,* 2010; YARDIM, *et al.,* 2011; SENTURK, 2013; NI, *et al.,* 2014). O esquema de reação ilustrado na Figura 3 (JALALVAND, *et al.*, 2015).

O BPDE se liga covalentemente ao DNA, de tal modo que essa molécula se intercala no DNA, distorcendo-o e perturbando a estrutura da dupla fita do DNA. Tal reação, interrompe o processo normal de cópia do DNA e induz mutações, o que explica a ocorrência de câncer após a exposição (JALALVAND, *et al.*, 2015).

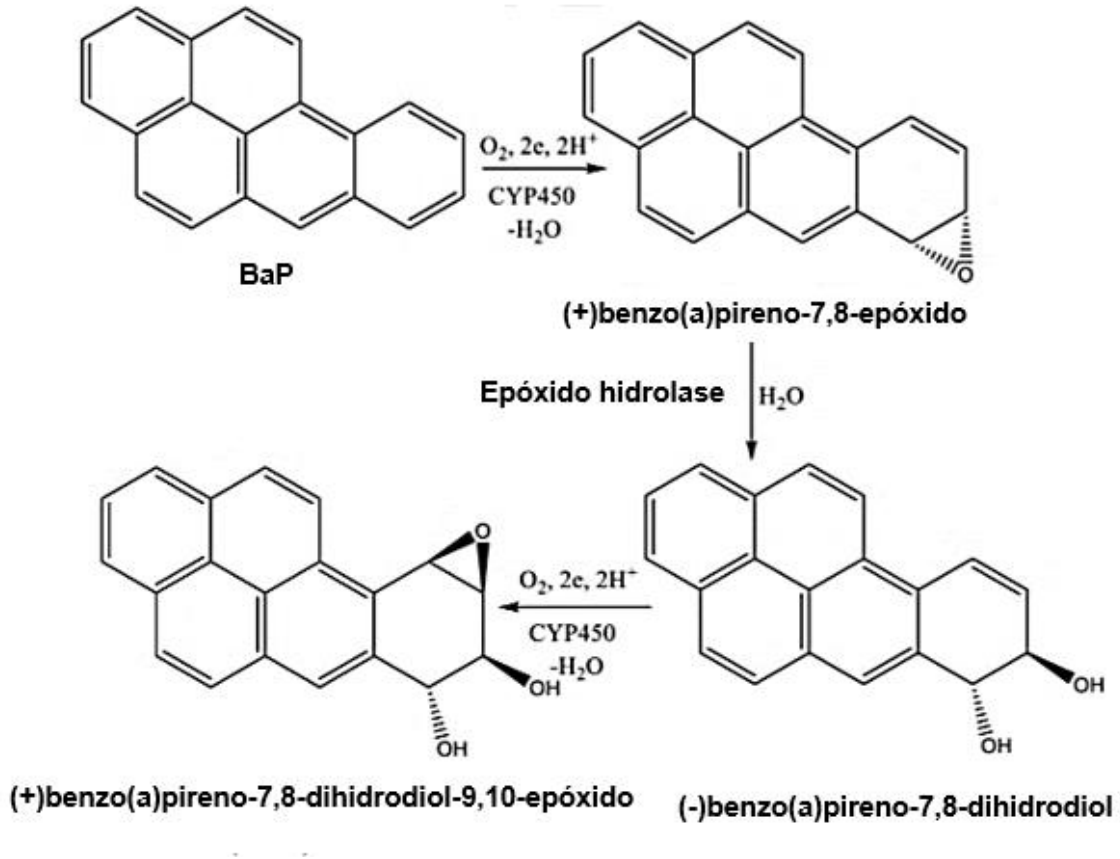

Figura 3. Metabolismo do BaP pelo citocromo P450 gerando como produto o metabólito com atividade carcinogênica. Fonte: Adaptado de JALALVAND, *et al.,* 2015.

Diante do exposto, há uma preocupação em determinar o BaP em diversas matrizes, para que haja um controle mais rigoroso deste contaminante. Apesar da problemática e dos diversos estudos abordando a toxicidade e características

carcinogênicas dos HPAs em geral, até o presente momento, não há limite legal, mundialmente, para os teores de HPAs em água, solo e alimentos. Na falta desses limites, alguns países adotaram limites próprios.

A União Europeia (European Union, EU) em uma de suas diretrizes (directive 98/83/EC) fixou limite máximo de 100 ng L^{-1} para benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e o indeno(1,2,3-c,d)pireno, individualmente, em água potável. Ainda, foi fixado um limite máximo de 10 ng L^{-1} para o benzo(a)pireno (EU, 1998).

Países europeus como Itália, Alemanha, Suíça, República Tcheca, Áustria, Eslováquia e Polônia adotaram um limite tolerável de benzo(a)pireno de 1 μg Kg^{-1} em alimentos defumados (EC, 2003). Nos Estados Unidos, a Snack Food Association (SFA) adota que os aromas/aromatizantes dos condimentos empregados na produção de alimentos industrializados não devem ter concentrações de benzo(a)pireno e benzo(a)antraceno superiores a 10 μg Kg^{-1} e 20 μg Kg^{-1}, respectivamente (USEPA, 1998).

No Brasil, não há um acompanhamento do processo de redução da concentração desses contaminantes. A avaliação nesses meios tem sido realizada apenas com o auxílio de parâmetros químicos, nos quais os contaminantes de interesse, de acordo com cada caso de contaminação, são comparados com os valores de referência da Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005, que dita um limite máximo de BaP para água destinada ao abastecimento para consumo humano de 0,05 μg L^{-1} e em água salinas de 0,018 μg L^{-1} (BRASIL, 2005). Ainda, o Ministério da Saúde na Portaria n° 2.914, de 12 de dezembro de 2011, estabelece para que haja um padrão de potabilidade um limite máximo de 0,7 μg L^{-1} para o BaP na água para consumo humano (BRASIL, 2011).

As técnicas convencionais de identificação e quantificação do BaP são: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografias líquida e gasosa com detecção por espectrometria de massas (CL-EM e CG-EM, respectivamente) e espectrometria de fluorescência (KLIMISCH, 1973; PERRY, *et al*., 1983; HILPERT, *et al*., 1984; WATERMAN, *et al.*, 2000). Como a maioria dessas técnicas envolvem instrumentos que exigem um pré-tratamento complexo da amostra, a investigação e quantificação recorrente deste composto,

ou seja, um monitoramento dos níveis de concentração do BaP em diferentes matrizes se torna inviável.

Em contrapartida, os métodos eletroanalíticos vem se destacando na determinação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos. Entre outras características, os métodos eletroanalíticos podem alcançar limites de detecção comparáveis aos métodos cromatográficos. Na literatura são encontrados trabalhos para a determinação de HPAs envolvendo métodos voltamétricos e diversos tipos de eletrodos de trabalho. A Tabela 4 apresenta alguns estudos relacionados à determinação eletroquímica de BaP.

Tabela 4. Revisão bibliográfica dos trabalhos que determinam BaP por métodos eletroanalíticos.

	Autores	**Eletrodo de Trabalho**	**Modificação / Adaptação Metodologia**	**Solvente BaP / Eletrólito**	**Técnica de Determinação**	**Limite de Detecção**
1	Udomsap, *et al*., 2018	Pasta de carbono	Polímeros baseados em vinil-ferroceno	ACN/ TBA-PF6	Voltametria de Onda Quadrada	0,93 μM – 245 ppb
2	Jalalvand, *et al*., 2015	Carbono vítreo	Nanotubos de carbono/náfion/ dsDNA	DMSO / tampão fosfato pH 5,5	Voltametria de Pulso diferencial	0,65 nM – 0,16 ppb
3	Du, *et al*., 2015	Carbono Vítreo	pré-concentração de 600s em circuito aberto	ACN-H_2O (1:1) / Perclorato de Sódio	Voltametria de Pulso diferencial	0,67 nM – 0,17 ppb
4	Liu, *et al*., 2012	Ouro	dsDNA baseado em SiO_2 NPs	ACN / tampão fosfato pH 7,4	Voltametria Cíclica e Fluorescência	2 mM – 505 ppb
5	Yardim, *et al.*, 2011	Diamante dopado com boro	surfactante DSS e pré-concentração de 120s	DMSO / tampão BR pH 2	Voltametria de Onda Quadrada	2,9 nM – 0,73 ppb
6	Kerman, *et al.*, 2001	Carbono vítreo	dsDNA	DMSO / tampão acetato pH 4,8	Voltametria de Pulso diferencial	2,8 nM – 0,70 ppb
7	Keskin, *et al.*, 2010	Mina de grafite	pré-concentração de 180s em potencial fixo de +0,7V	DMSO / tampão acetato pH 4,8	Voltametria de Redissolução e Onda Quadrada	27 nM – 6,82 ppb
8	Ni, *et al.,* 2014	Carbono Vítreo	Grafeno-náfion-hemina-DNA	Acetona / tampão fosfato salino pH 7,4	Voltametria de Pulso Diferencial	11,2 nM - 2,82 ppb

A maioria dos estudos empregam eletrodos de trabalho de alto custo ou apresentam modificações laboriosas em sua superfície, a exemplo do estudo de Ni e colaboradores (2014), que modificaram eletrodo de carbono vítreo. Os

autores executaram o polimento da superfície do eletrodo para ser ativado por repetidas varreduras de potencial entre -1,0 e 1,0 V em 10 mL de ácido sulfúrico 0,25 mol L^{-1} até que um voltamograma cíclico reprodutível fosse obtido.

Para o processo de modificação do eletrodo, 1,0 mg de grafeno foi disperso em 1,0 mL de solução de náfion a 0,5 %, que foi então ultra-sonicada por 2 horas para formar uma mistura homogênea de grafeno-náfion. Esta mistura (20 mL) foi depositada gota a gota sobre a superfície do eletrodo ativado e seco ao ar por 4 horas. Posteriormente, 10 mL de 2,0 mg mL^{-1} de hemina e 10 mL de 1,0 mg mL^{-1} de DNA foram adicionados, sucessivamente, ao eletrodo modificado náfion-grafeno, e foi seco ao ar por 12 horas.

O sensor obtido foi então imerso no tampão fosfato salino (pH 7,4) e o benzo(a)pireno foi determinado por voltametria de pulso diferencial alcançando um limite de detecção de 11,2 nmol L^{-1} (2,82 μg L^{-1}) em matriz aquosa (NI, *et al.,* 2014).

Nessa conjuntura, esse estudo visa desenvolver um método mais simples, mais sensível e econômico para identificar e determinar o BaP por meio da análise eletroquímica.

1.2 Técnicas Voltamétricas

As técnicas voltamétricas são amplamente empregadas para estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários meios, em que se baseiam na medida da corrente em uma célula eletroquímica em função do tempo e do potencial aplicado (SKOOG, 2005).

1.2.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica comumente empregada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Na VC, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho varia continuamente com o tempo na forma de onda triangular (Figura 4A), em que três potenciais caracterizam a técnica como cíclica, sendo eles: o potencial inicial; o potencial de retorno, no qual ocorre inversão do sentido da varredura de potencial e, por fim, o potencial final sendo que este pode ou não coincidir com o potencial inicial (SKOOG, 2005).

De modo geral, a eficiência desta técnica destaca-se pela habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, de transferência de elétrons, da cinética de reações heterogêneas e também sobre reações químicas acopladas à processos adsortivos (WANG, *et al.,* 2006a).

O sentido da varredura pode ocorrer em direção a região anódica ou catódica, em que se pode analisar semi-quantitativamente as velocidades da reação com o intuito de identificar espécies eletroativas. Mediante essa análise obtém-se informações de parâmetros elétricos relativo ao processo de oxirredução da(s) substância(s) eletroativa(s) na superfície do eletrodo de trabalho (SCHUETZLED, *et al*.,1989).

Afim de se obter parâmetros cinéticos e de reversibilidade do sistema eletroquímico, a avaliação da influência da variação da velocidade de varredura no perfil do voltamograma cíclico é realizada. O sinal de corrente registrada dá origem ao voltamograma, curva de potencial vs. corrente (Figura 4B). As correntes de pico de oxidação ou de redução obtidas no voltamograma são proporcionais à concentração da espécie.

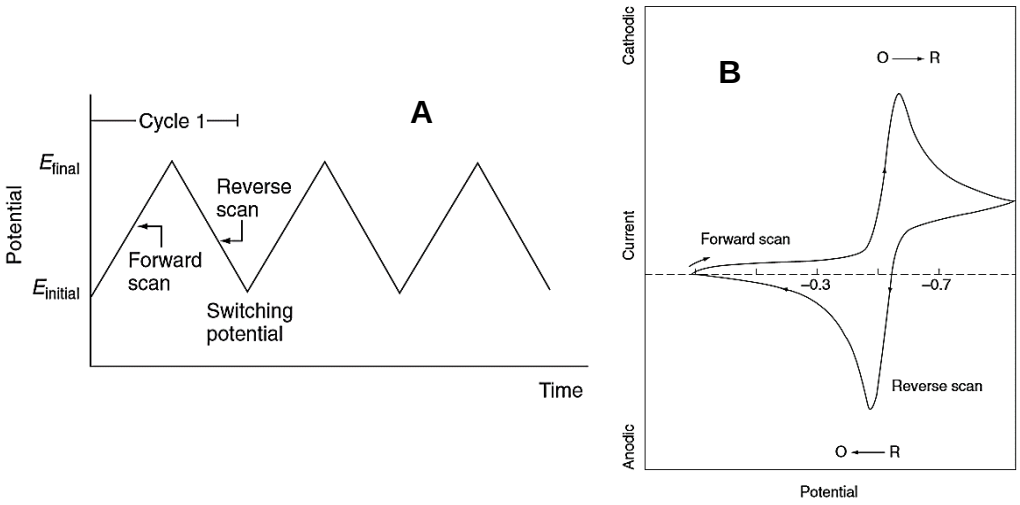

Figura 4. (A) Aplicação do potencial para a voltametria cíclica, (B) voltamograma cíclico para um sistema reversível. Fonte: WANG, 2006a.

Apesar da VC ser empregada para análises quantitativas, os limites de detecção obtidos não são satisfatórios quando comparados com os obtidos pelas técnicas voltamétricas de pulso.

1.2.2 Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) foi desenvolvida em 1952, quando Barker e Jenkins (1952), estudaram a utilização da corrente em modo alternado ao invés do modo contínuo, produzindo corrente elétrica na forma de um pico simétrico a partir de um eletrodo gotejante de mercúrio (EGM).

Em 1969, o EGM foi substituído por eletrodos estacionários permitindo uma nova teoria de análise da onda quadrada. Essa modificação eliminou a interferência dos ruídos gerados pelo uso do EGM, entretanto ainda havia perda de sensibilidade analítica (RAMALEY; KRAUSE JÚNIOR, 1969).

Em 1977, Christie, Turner e Osteryoung (1977) analisaram as limitações e desenvolveram o modelo de onda quadrada empregado atualmente. Neste, as medidas são realizadas ao final do pulso de potencial, garantindo a resposta com a corrente capacitiva minimizada. Também, foi permitido realizar as medidas de corrente com velocidades de varredura superiores a 1 V s^{-1} aderindo uma melhora na sensibilidade analítica.

O modelo atual usado na VOQ consiste na variação do potencial sobreposta em uma escada de potencial de mesma altura (incremento de potencial - ΔE_s), de tal forma que o pulso direto coincida com o início do degrau da escada em um determinado tempo ou período (Figura 5A). Esse modelo permite obter como resposta, a corrente adquirida ao final do pulso direto (corrente direta), a corrente registrada no final do pulso reverso (corrente reversa) e a corrente final que corresponde à diferença entre essas duas (corrente resultante). (BRETT; BRETT, 1996)

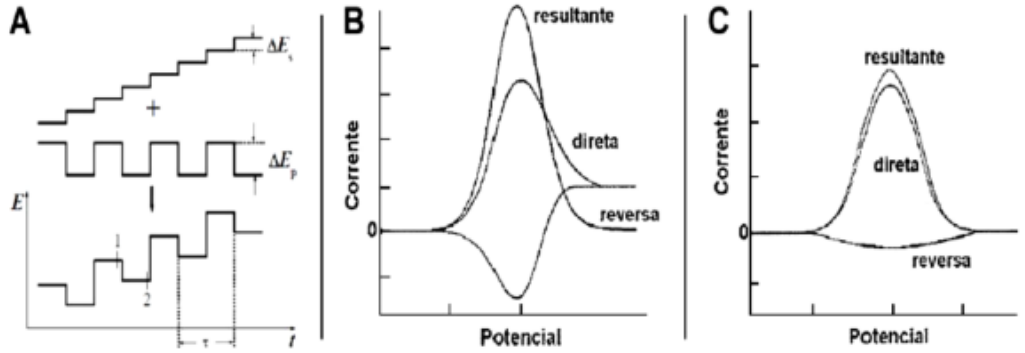

Figura 5. (A) Aplicação do sinal de excitação da técnica VOQ, (B) voltamograma de um processo redox de um sistema reversível da VOQ, (C) e de um sistema irreversível. Fonte: SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003.

Quando o sistema é reversível, a resposta da corrente reversa apresenta intensidade de corrente similar a direta, gerando uma corrente resultante mais intensa que ambas pois esta é gerada a partir da contribuição da corrente direta e reversa (Figura 5B). Para um sistema irreversível, a corrente resultante não difere de forma significativa da corrente direta, pois a corrente reversa é praticamente irrelevante neste processo (Figura 5C). (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003)

Para o desempenho da técnica, os parâmetros operacionais da VOQ: frequência, amplitude e incremento de varredura são de fundamental importância, pois estes, influenciam diretamente na obtenção da resposta (corrente resultante).

1.3 Cronoamperometria e eletrodeposição

A cronoamperometria é um método eletroquímico fundamentado na aplicação de um potencial fixo por um determinado intervalo de tempo, produzindo uma corrente. A cronoamperometria apresenta-se como um método dinâmico de análise interfacial em potencial constante, aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo em função do tempo (BRETT; BRETT, 1996).

Os resultados da variação de corrente pelo tempo são apresentados na forma de um cronoamperograma (Figura 6). A corrente é empregada no estudo do mecanismo de nucleação eletroquímica.

Figura 6. Ilustração de uma corrente de redução envolvida na eletrodeposição de uma espécie eletroativa sem formação de núcleos. Fonte: SILVA, 2008.

Tal técnica é bastante empregada no processo de eletrodeposição de compostos, em sua maioria, metais. Para que seja possível eletrodepositar um material, deve-se escolher o potencial que se deve fixar na faixa desejada (redução ou oxidação) e medir a corrente que flui na célula em função do tempo. O que se obtém como resposta é o transiente de corrente (SILVA, 2008). No processo de deposição, é imprescindível utilizar o potencial de redução numa faixa que a corrente aplicada garanta apenas a eletrodeposição do material de interesse, pois se outro processo estiver intrínseco, a corrente utilizada para esta fração é considerada desperdiçada.

Não obstante, a técnica permite controlar parâmetros importantes durante a eletrodeposição tais como: carga eletrodepositada e consequentemente a espessura do depósito, além da cinética de reação. Uma análise mais detalhada dos transientes fornece informações importantes sobre o modo de crescimento do depósito ou processos de nucleação (BRETT; BRETT, 1996).

1.4 Método Taguchi

Entre 1950 e 1960, o Dr. Genichi Taguchi desenvolveu um protocolo de otimização robusta e aplicou esse método em muitas indústrias, dentre elas, a automotiva e a eletrônica (TAGUCHI, 1986). O método Taguchi possibilita a investigação das variáveis que afetam o sistema e suas interações com número reduzido de experimentos.

Semelhante ao planejamento fatorial fracionário, o método possibilita reduzir significativamente o número de experimentos incialmente arquitetados, por se tratar de uma estrutura composta por matrizes fracionadas saturadas, que em sua visão, iria garantir a qualidade do produto, além de diminuição de custos operacionais (TAGUCHI, 1986).

Pode-se definir a metodologia de Taguchi por dois parâmetros importantes (TAGUCHI, 1986; LIMA, *et al.,* 2011):

- Minimização na variabilidade da resposta, de modo a garantir um produto que seja robusto à inconstância de seus componentes quando nesses, há problemas.
- Aplicação do planejamento almejando à otimização do processo e à redução de experimentos em situações reais, obtendo redução de custos com experimentação.

Taguchi (1986) propôs arranjos ortogonais que são selecionados a partir do número de níveis que as variáveis vão assumir e do número de variáveis e interações a serem estudadas.

A seleção do arranjo ortogonal adequado, o qual representa o nº de experimentos a serem realizados, se baseia na Tabela 5. O arranjo ortogonal a ser escolhido depende do número de fatores e do número de níveis de cada fator. O arranjo deve possuir um número de condições experimental, no mínimo, igual ao número de graus de liberdade. Isto é definido na tabela dos arranjos ortogonais de Taguchi (PADKE, 1989).

Tabela 5. Arranjos ortogonais formulados por Taguchi. Fonte: PADKE, 1989.

Arranjo Ortogonal	N° de linhas	N° máximo de fatores	N° máximo de fatores com esses níveis			
			2	3	4	5
L_4	4	3	3	-	-	-
L_8	8	7	7	-	-	-
L_9	9	4	-	4	-	-
L_{12}	12	11	11	-	-	-
L_{16}	16	15	15	-	-	-
L_{16}	16	5	-	-	5	-
L_{18}	18	8	1	7	-	-
L_{25}	25	6	-	-	-	6
L_{27}	27	13	-	13	-	-
L_{32}	32	31	31	-	-	-
L_{32}	32	10	1	-	9	-
L_{36}	36	23	11	12	-	-
L_{36}	36	16	3	13	-	-
L_{50}	50	12	1	-	-	11
L_{54}	54	26	1	25	-	-

L_{64}	64	63	63	-	-	-
L_{64}	64	21	-	-	21	-
L_{81}	81	40	-	40	-	-

O número do arranjo (L_8) informa quantos designs de respostas (8 linhas) terá. Cada arranjo possui um limite máximo de fatores que podem ser analisados, bem como a quantidade de níveis que podem ser empregados para cada um dos fatores escolhidos. Mohammadi e colaboradores (2004) empregaram o design experimental de Taguchi com intuito de estudar a separação de íons de cobre por eletrodiálise.

Os autores analisaram quatro fatores (temperatura, concentração, vazão e voltagem) com três níveis cada um a partir de um arranjo L_9. Logo, o design experimental contém nove linhas (Tabela 6), que está de acordo com os arranjos ortogonais formulados por Taguchi. O arranjo L_9, permite apenas a análise de quatro fatores com três níveis, cada um, como descrito na Tabela 5.

Tabela 6. Arranjo ortogonal L_9 de Taguchi utilizado no estudo de separação de íons cobre. Fonte: Adaptado de MOHAMMEDI*, et al.*, 2004.

Design	**Fatores**			
	Temperatura	**Concentração**	**Vazão**	**Voltagem**
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	0	0	0
3	-1	1	1	1
4	0	-1	0	1
5	0	0	1	-1
6	0	1	-1	0
7	1	-1	1	0
8	1	0	-1	1
9	1	1	0	-1

O termo robusto pode ser aplicado para produtos e processos que apresentem desempenho compatível com a qualidade exigida e que sejam relativamente insensíveis aos fatores que sejam de difícil controle. Taguchi (1986) classifica os fatores em dois grupos, os controláveis (fatores internos) e os não-controláveis (fatores externos). Os fatores não-controláveis ou ruídos são as causas que eventual ou sistematicamente afetam a variabilidade das respostas.

A análise do planejamento se baseia na razão Sinal-Ruído (S/N), que é a utilização de conceitos matemáticos e estatísticos que indicam qual a melhor maneira experimental para que exista uma menor variação em determinado sistema. A razão S/N procura observar, ao mesmo tempo, a média e a variância de uma distribuição estatística, reunindo estas características em um só número (TAGUCHI; PADKE, 1984).

De acordo com Taguchi e Padke (1984), maximizar a razão S/N ou η significa diminuir a variabilidade do processo e otimizar seu resultado. Ela se divide em três condições:

- Smaller the better – quando o objetivo é minimizar a resposta. Nesta condição, a razão Sinal/Ruído é definida pela equação:

$$\eta = -10\log\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} {y_i}^2\right)$$

- Larger the better – quando o objetivo é maximizar a resposta. Nesta condição, a razão Sinal/Ruído é definida pela equação:

$$\eta = -10\log\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} \frac{1}{{y_i}^2}\right)$$

- Nominal the better – quando o objetivo é obter uma resposta com a menor variabilidade possível. Nesta condição, a razão S/N é definida pela equação:

$$\eta = 10log\frac{\mu^2}{\sigma^2}.$$

Onde:

- y_i é o valor da observação;
- μ é o valor médio;
- σ^2 é a variância;
- n é o número de observações.

Para a distribuição dos fatores na matriz, bem como avaliar suas interações, deve-se utilizar os gráficos lineares de Taguchi. Nestes gráficos, os pontos representam as variáveis ou fatores e as linhas entre os pontos as interações entre eles (PADKE, 1989; RANJIT, 1990). A Figura 7 representa os gráficos lineares dos fatores de controle de Rosa e colaboradores (2009), que estudaram a eletrodeposição de cobre sobre fio de titânio a partir de um arranjo L_{16} de quinze fatores com dois níveis cada um.

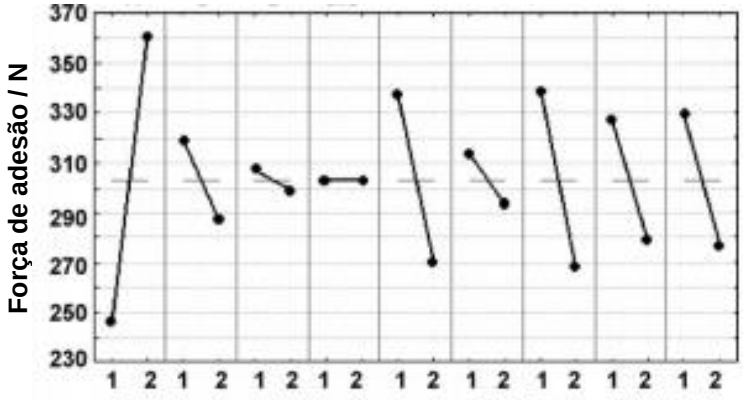

Figura 7. Análise dos efeitos dos parâmetros de controle a partir da média da razão S/N (força de adesão). Fonte: ROSA, *et al.,* 2009.

De acordo com a Figura 7, a qual descreve a análise dos efeitos dos parâmetros controláveis proposto por Rosa e colaboradores (2009), é permitido afirmar que para o segundo, quinto, sexto, sétimo, oitavo e nono parâmetro, a otimização encontra-se no primeiro nível dos fatores, pois nestes há uma maior relação S/N. Para o primeiro parâmetro, encontra-se a otimização no segundo nível, enquanto que no terceiro e quarto, não houveram variações significativas nos níveis estudados, podendo ser escolhidos qualquer um dos níveis.

A desvantagem da metodologia Taguchi está na impossibilidade de se comparar os resultados entre os ensaios realizados, uma vez que em cada ensaio todos os parâmetros são variados. Dessa forma, as conclusões só podem ser tomadas e confirmadas na etapa final da metodologia.

Diante do exposto, o método Taguchi foi empregado para solucionar o problema de reprodutibilidade do sistema eletroquímico. O arranjo ortogonal foi empregado dividindo os fatores como controláveis e incontroláveis, em que as respostas dos ensaios foram analisadas a partir da relação sinal-ruído, proposta pelo método. Como haviam muitos fatores e respostas incoerentes quando analisadas em planejamentos fatoriais, o método Taguchi permitiu alcançar os níveis dos fatores controláveis e de ruído que resultaram em um método eletroquímico reprodutível.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método voltamétrico de determinação do benzo(a)pireno em amostras de água de abastecimento e cachaça empregando eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os perfis voltamétricos do benzo(a)pireno (BaP) (voltametria cíclica e onda quadrada) utilizando eletrodos de pasta de carbono a fim de identificar os potenciais do processo de oxidação;
- Investigar como os fatores: pH do eletrólito, carga e concentração de surfactante, proporção de solvente orgânico na cela eletroquímica e tempo de pré-concentração no circuito, afetam o sinal analítico de BaP;
- Avaliar o sinal analítico do BaP com o eletrodo de trabalho modificado com nanotubos de carbono (MWCNTs);
- Executar um planejamento robusto (método Taguchi) para eletrodeposição de ouro na superfície do eletrodo e para os parâmetros da técnica voltamétrica com intuito de melhorar a sensibilidade e reprodutibilidade do sistema;
- Validar a metodologia empregada por meio de testes de recuperação aparente em água de abastecimento e cachaça;
- Comparar o método avaliando os resultados em cachaça com uma outra técnica analítica comparativa (fluorescência molecular).

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e Soluções

Soluções-estoque do benzo(a)pireno em metanol de concentração 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} foram utilizadas, bem como uma de 100 mg L^{-1} em acetonitrila. O eletrólito-suporte empregado nas medidas voltamétricas foi a solução-tampão Britton-Robinson (BR) em pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0; e cloreto de sódio (NaCl) 0,1 mol L^{-1}. Com exceção do HPA, todas as soluções foram

preparadas com água ultrapura obtida por meio de sistema Millipore Milli-Q System (resistividade de 18,2 MΩ cm). Todos os reagentes utilizados nesse estudo são de grau analítico. Ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido bórico (H_3BO_3) e ácido clorídrico (HCl) da VETEC (Rio de Janeiro, BR), ácido acético (CH_3COOH) da ALPHATEC (Rio de Janeiro, BR); acetonitrila 99% da J.T.Baker, benzo(a)pireno (BaP) obtido junto a Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA), o dodecil sulfato de sódio (DSS) adquirido na Synth (São Paulo, BR), nitrato de prata ($AgNO_3$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido cloroáurico ($HAuCl_4$), nanotubos de carbono (MWCNTs) e o ácido dodecilbenzenosulfônico (DBSA).

3.2 Instrumentação

As medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 101 acoplado ao módulo polarográfico 663 VA Stand® (Metrohm, Suíça) e a um microcomputador com o software NOVA 1.11.

A célula eletroquímica foi composta por três eletrodos: um eletrodo de referência Ag/AgCl – KCl (3,0 mol L^{-1}), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de pasta de carbono (com e sem modificação) como eletrodo de trabalho. As medidas de pH dos eletrólitos-suporte utilizados foram realizadas em um pHmetro de bancada AT-355 da Alfakit.

Os espectros de excitação e emissão foram obtidos em um espectrofluorímetro Agilent Cary Eclipse, equipado com lâmpada pulsada de xenônio.

3.3 Preparação do eletrodo e modificações

3. 3.1 Obtenção do eletrodo de pasta de carbono

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) foram preparados a partir da mistura de pó de grafite e óleo mineral em uma proporção (m/m) de 70 % e 30 %, respectivamente. A mistura foi homogeneizada em almofariz por 30 minutos para a preparação da pasta. Em seguida, os eletrodos foram confeccionados preenchendo seringas de 1 mL com as pastas, nas quais, introduziu-se uma haste de cobre para o contato elétrico.

Os eletrodos foram polidos em papel manteiga e posteriormente lavados com água ultrapura. Este procedimento foi realizado entre as medidas, quando necessário.

3.3.2 Modificação com nanotubos de carbono (MWNTs)

O eletrodo de pasta de carbono modificado com MWNTs (EPC-MWNTs) foi preparado a partir da mistura de pó de grafite, nanotubos de carbono e óleo mineral em uma proporção (m/m) de 55 %, 10 % e 30 %, respectivamente. A mistura foi homogeneizada em almofariz por 30 minutos para a preparação da pasta. Em seguida, os eletrodos foram confeccionados preenchendo seringas de polipropileno de 1 mL com a pasta, na qual, introduziu-se uma haste de cobre para o contato elétrico.

3.3.3 Modificação por eletrodeposição de ouro

A superfície do EPC foi polida por abrasão e condicionada por voltametria cíclica (VC) com 20 ciclos à 0,1 V s^{-1} em uma solução de NaCl 0,1 mol L^{-1} em uma intervalo de potencial de 0,0 V a +1,2 V. Feito isso, o eletrodo foi imerso em uma solução contendo ácido cloroáurico ($HAuCl_4$) 2,0 x 10^{-5} mol L^{-1}/ NaCl 0,1 mol L^{-1} e submetido a um potencial de deposição fixo por um intervalo de tempo determinado (cronoamperometria). O eletrodo modificado foi lavado com água ultrapura e utilizado para a determinação do analito em estudo.

3.5 Planejamento Taguchi

Os fatores controláveis selecionados foram: potencial de deposição (V), tempo de deposição (s), frequência (Hz), amplitude (mV) e volume de surfactante (μL) adicionada na cela eletroquímica. Como fatores de ruído: concentração do surfactante (% m/v), concentração da solução de $HAuCl_4$ (mol L^{-1}) e o pH do meio. Dois níveis foram determinados para cada fator, os quais estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Fatores e níveis empregados para o planejamento Taguchi.

Fatores Internos – Controláveis

Níveis	Potencial de Deposição (V)	Tempo de Deposição (s)	Frequência (Hz)	Amplitude (A)	Volume DSS (μL)
-1	0,2	80	50	25	250
1	0,4	120	75	35	100

Fatores Externos – Incontroláveis

Níveis	Concentração DSS (m/v)	Concentração $HAuCl_4$ (mol L^-)	pH
-1	0,05 %	$2{,}0x10^{-5}$	2
1	0,1 %	$2{,}0x10^{-4}$	4

A matriz de planejamento ortogonal usada encontra-se na Tabela 8. Para a determinação do nível ótimo da resposta ou atingir a robustez do processo, o método Taguchi utiliza a relação sinal-ruído (S/N ou η). O tratamento dos resultados foi determinado a partir do “nominal the better”.

Tabela 8. Arranjo ortogonal empregado no método eletroquímico.

Design da Resposta	Fatores Controláveis					Fatores Incontroláveis				
						[DSS]	-1	-1	1	1
						$[HAuCl_4]$	-1	1	-1	1
	E_{dp}	t_{dp}	f	A	Vol. DSS	pH	1	-1	-1	1
1	-1	-1	-1	-1	-1					
2	-1	-1	-1	1	1					
3	-1	1	1	-1	-1					
4	-1	1	1	1	1					
5	1	-1	1	-1	1					
6	1	-1	1	1	-1					
7	1	1	-1	-1	1					
8	1	1	-1	1	-1					

* E_{dp}: Potencial de deposição; t_{dp}: tempo de deposição; f: frequência; A: amplitude; Vol. DSS: volume de DSS; [DSS]: concentração de DSS; $[HAuCl_4]$: concentração de ácido cloroáurico em mol L^{-1}; pH: potencial hidrogeniônico.
* ▭ Corrente de pico dos 32 ensaios.

3.6 Estudos voltamétricos

3.6.1 Estudo com EPC

O eletrodo foi submetido a um condicionamento no eletrólito-suporte (tampão BR a 0,1 mol L^{-1}) empregando 30 varreduras sucessivas em VC abrangendo uma janela de potencial de 0,0 a +1,3 V, com velocidade de

0,5 V s^{-1}. Esse tratamento foi repetido entre os experimentos para garantir a limpeza da superfície do eletrodo.

Os parâmetros experimentais para as medidas eletroquímicas na voltametria de onda quadrada (VOQ) foram: amplitude de pulso (a) em 25 mV, frequência (*f*) de 50 Hz e incremento de potencial (ΔE_s) de 5 mV. A janela de potencial estudada foi de 0 a +1,3 V.

A determinação eletroquímica se procedeu em duas etapas: (1) pré-concentração do analito com agitação de 600 segundos em circuito aberto. (2) A medida VOQ foi realizada na cela eletroquímica com uma proporção 1:1 de acetonitrila e tampão BR a 0,1 mol L^{-1} junto a 10 mg L^{-1} de DSS.

3.6.2 Estudo do EPC modificado a partir da eletrodeposição de ouro

O EPC foi submetido a um condicionamento no eletrólito suporte (NaCl 0,1 mol L^{-1}), empregando 20 varreduras sucessivas em VC abrangendo uma janela de potencial de 0,0 a +1,3 V, com velocidade de 0,1 V s^{-1}, para garantir a limpeza da superfície do eletrodo.

Os parâmetros experimentais para as medidas eletroquímicas na voltametria de onda quadrada (VOQ) foram: amplitude de pulso (a) em 25 mV, frequência (*f*) de 75 Hz e incremento de potencial (ΔE_s) de 8 mV. A janela de potencial estudada foi de 0,0 a +1,3 V.

A determinação eletroquímica se procedeu em duas etapas: (1) pré-concentração do analito com agitação de 600 segundos em circuito aberto. (2) A medida VOQ foi realizada na cela eletroquímica com uma proporção 1:1 de acetonitrila e tampão BR a 0,1 mol L^{-1} junto a 10 mg L^{-1} de DSS.

3.7 Avaliação da metodologia de determinação

3.7.1 Validação do método eletroanalítico

Após a otimização dos parâmetros, foram construídas curvas analíticas utilizando uma solução estoque de BaP em metanol a 10 mg L^{-1}. Partindo de adições sucessivas, a concentração variou de 20 μg L^{-1} a 250 μg L^{-1}. O limite de detecção (LD) foi calculado com base na relação 3(sd)/b, na qual (sd) é o desvio-

padrão dos valores do branco e (b) é o coeficiente angular da reta. O limite de quantificação (LQ) foi estimado da relação 10(sd)/b (SKOOG, 2005).

O método foi aplicado na determinação de BaP em duas matrizes: água de torneira e cachaça. Nesse sentido, foram realizados testes de recuperação aparente baseados na fortificação de amostras de água de abastecimento (água de torneira) e de cachaça com concentrações conhecidas de BaP. As amostras de água foram coletadas diretamente de torneiras em locais diferentes e analisadas sem pré-tratamento. As amostras de cachaça também foram analisadas sem pré-tratamento.

Os voltamogramas obtidos foram submetidos à correção de linha de base pela média móvel com janela de 1 ponto, seguido da suavização (Smooth) dos ruídos em nível 1 com ordem polinomial 2, existente no software Nova 1.11.

3.7.2 Procedimento espectrofluorimétrico para a determinação de BaP em cachaça

O procedimento empregado para determinação de BaP em cachaça foi baseado no método proposto por Beltran e colaboradores (1998), bem como Nahorniak e Booksh (2006). Foi preparado uma solução estoque de BaP 500 μg L^{-1} em solução hidroalcóolica a partir do padrão de 10 mg L^{-1} em metanol. A partir do estoque, foram diluídos volumes apropriados em balões volumétricos para construção da curva em um intervalo de 20 μg L^{-1} a 180 μg L^{-1}. Os pontos de recuperação foram preditos na cachaça sem pré-tratamento. Para isso, foi preparado um estoque de BaP 500 μg L^{-1} em cachaça a partir do padrão de 10 mg L^{-1} em metanol e em seguida, volumes apropriados foram diluídos em balões volumétricos para determinação.

As medidas de fluorescência foram realizadas em uma faixa de excitação de 251 a 270 nm com passo de 3 nm e emissão de 380 a 456 nm com passo de 2 nm. Foram convencionados os espectros de excitação como as linhas da matriz, enquanto as colunas foram expressas pelos espectros de emissão. Sob esse viés, a técnica empregada para decompor os espectros de fluorescência das amostras nos espectros das componentes puras foi a análise de fatores paralelos (PARAFAC). Utilizou-se os algoritmos do N-PLS toolbox no Mathworks Matlab e a execução por meio da interface de usuário do MVC2 para realizar a

decomposição PARAFAC e a calibração pseudounivariada. Os dados foram comparados com a metodologia eletroanalítica desenvolvida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do sinal analítico do BaP em EPC e EPC-MWNTs

Incialmente, nenhum pico de oxidação foi observado na execução de uma varredura voltamétrica de onda quadrada empregando o EPC e as condições experimentais indicadas pelo software do potenciostato na análise de uma solução 10 mg L^{-1} de BaP em tampão BR 0,1 mol L^{-1} em pH 4,0. Entretanto, quando uma etapa prévia à varredura era executada em que o EPC era mantido na solução de BaP em circuito aberto com agitação constante por 600 s, observou-se um pico largo e com baixa intensidade de corrente no potencial +0,98 V (vs. Ag/AgCl), o qual foi atribuído a oxidação do BaP pré-concentrado na superfície do EPC por adsorção. O pico de oxidação em +0,98 V está em acordo com o observado nos trabalhos de Du *et al.* (2015) e Keskin *et al.* (2010).

O tempo de pré-concentração em circuito aberto foi então avaliado entre 0 s e 600 s e os voltamogramas resultantes dessa avaliação estão ilustrados na Figura 8. Pôde-se observar que com o aumento do tempo de acumulação, o pico de oxidação do BaP tornou-se mais intenso e bem definido, indicando que a adsorção do BaP na superfície do eletrodo de trabalho é favorecida com o aumento do tempo. Entretanto, não houve ganho significativo na intensidade da corrente de pico após 600 s, optando-se pelo tempo de 600 s para a realização dos experimentos. Os resultados demonstraram que a etapa de pré-concentração é essencial para determinação voltamétrica do BaP em baixas concentrações.

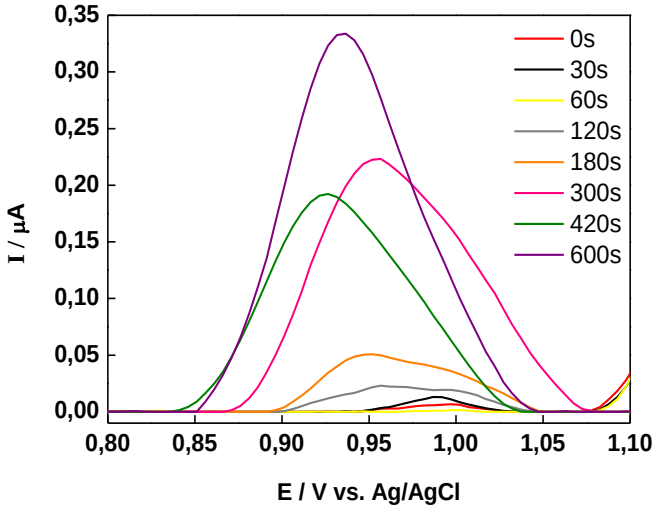

Figura 8. Voltamogramas de onda quadrada do estudo de pré-concentração em OCP de BaP 1 mg L^{-1} em tampão BR pH 4,0 em EPC. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

O mesmo procedimento de pré-concentração em potencial de circuito aberto e varredura com voltametria de onda quadrada foi utilizado para investigar a oxidação do BaP com o eletrodo de pasta de carbono modificada com nanotubos de carbono. Com o tempo de pré-concentração de 600 s, no eletrodo de pasta de carbono, a corrente de pico no processo de oxidação é de 0,34 µA, enquanto a corrente de pico no eletrodo modificado com MWNTs é 0,03 µA (Figura 9). Assim, foi empregado apenas o eletrodo de pasta de carbono para o desenvolvimento do método.

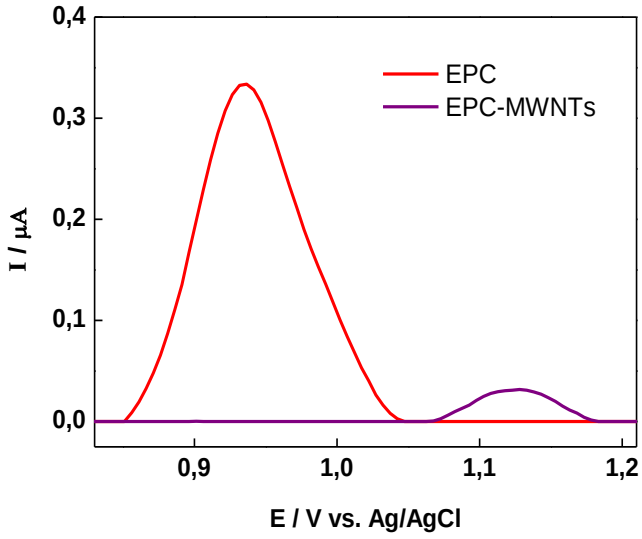

Figura 9. Voltamogramas de onda quadrada de BaP 1 mg L^{-1} em tampão BR pH 4,0 em EPC e EPC-MWNTs com pré-concentração de 600 s em OCP. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

A fim de avaliar a influência do pH no processo oxidativo do BaP, testes foram realizados em tampão BR 0,1 mol L^{-1} nos pHs 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 (Figura 10). O processo de oxidação do BaP, de modo geral, foi facilitado em potenciais mais negativos com o aumento do pH. Tendo observado que em pH 4,0 foi obtido uma maior intensidade de corrente, este foi o escolhido para as demais análises.

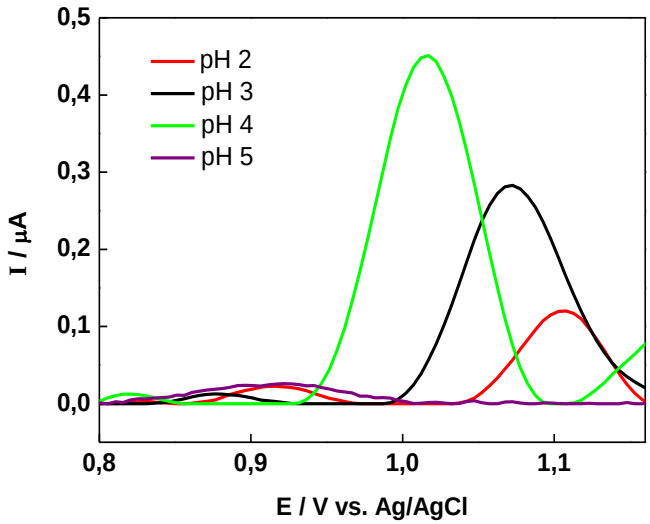

Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada em EPC com BaP 1 mg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR pH 2,0 a 5,0. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

Para aumentar a intensidade do sinal eletroquímico do BaP, foi avaliado o uso de surfactantes aniônicos (ácido dodecilbenzenosulfônico - DBSA e dodecilsulfato de sódio - DSS) com o intento de facilitar o processo de adsorção, visto que alguns estudos que utilizaram surfactantes no processo de determinação de BaP, não mostraram resultados satisfatórios com surfactantes catiônicos ou neutros (YARDIM, *et al.,* 2011; ZHU; AITKEN, 2011).

O uso de surfactantes em medidas eletroquímicas é justificado pela sua estrutura, pois estes possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Tal característica permite que este seja adsorvido na superfície do eletrodo, formando micelas superficiais adsorvidas, como cilindros ou outros agregados, como resultado de interações hidrofóbicas entre a parte orgânica do surfactante, outras moléculas em solução e a superfície do eletrodo (ESUMI, 2001). Tal fenômeno é denominado adsolubilização. Estudos mostram que moléculas pouco solúveis em água podem ser incorporadas em camadas de surfactante

adsorvidas em uma superfície sólida (SIEBURG, *et al.*, 2010). Sob esse viés, o aumento da corrente de pico na oxidação do BaP pode ser corroborado pela interação BaP-surfactante adsorvido na superfície.

Para a avaliação do uso de surfactantes aniônicos, manteve-se a concentração do BaP constante em 100 μg L^{-1}, enquanto foi adicionado surfactante no intervalo de 5 mg L^{-1} a 20 mg L^{-1} em tampão BR pH 4,0 (Figura 11). Como pode ser observado na Figura 11A, o pico de oxidação do BaP aumentou de acordo com o aumento da concentração do DSS até 10 mg L^{-1}. Após esse valor, o aumento da concentração de DSS prejudicou o sinal analítico, provavelmente dificultando a transferência elétrica. Tal efeito pode ser relacionado a um bloqueio da superfície do eletrodo pela elevada concentração de DSS em relação ao BaP, prejudicando sua adsorção.

Verifica-se que a intensidade de corrente com o uso do DSS é aproximadamente duas vezes superior à obtida sem o uso do surfactante. Com relação ao DBSA, sua adição leva à diminuição do sinal eletroquímico de oxidação do benzo(a)pireno na mesma faixa de concentração (Figura 11B); logo, todos os experimentos foram realizados com DSS em uma concentração fixa de 10 mg L^{-1}.

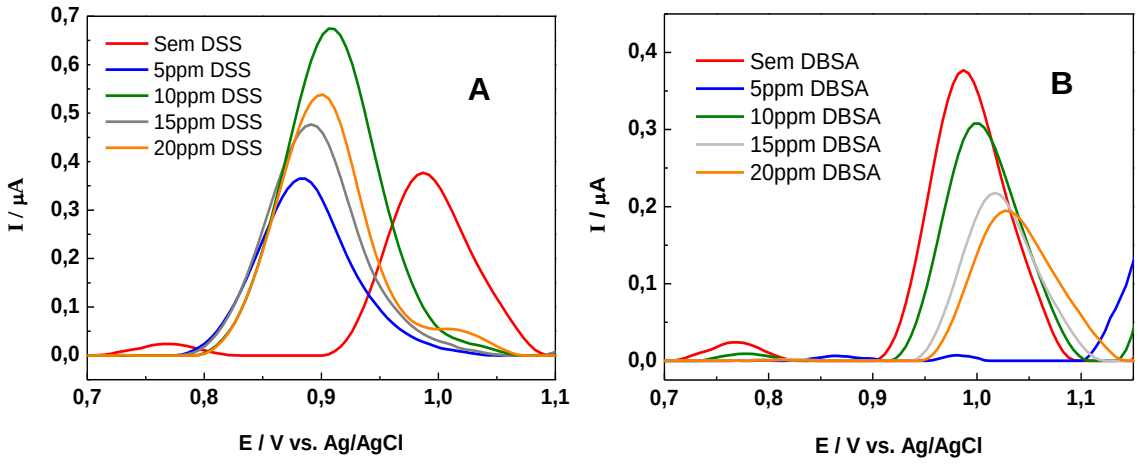

Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada em EPC de BaP 100 μg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR (pH 4,0) contendo (A) diferentes concentrações de DSS (5 - 20 mg L^{-1}) e (B) 5 - 20 mg L^{-1} de DBSA. Em linha vermelha estão representados os voltamogramas sem surfactante. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

As otimizações realizadas até então, não contribuíram para reprodutibilidade do sistema. A intensidade de corrente varia para uma mesma concentração de BaP e mesmas condições voltamétricas a cada medida (Figura 12), não alcançando uma boa reprodutibilidade.

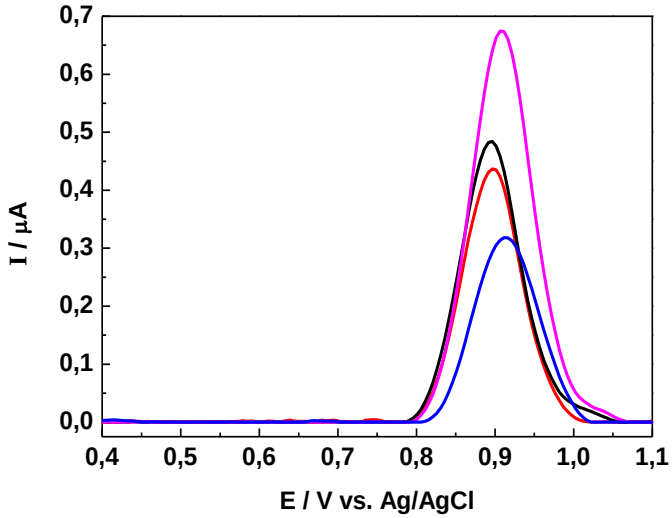

Figura 12. Voltamogramas de onda quadrada em EPC de BaP 100 μg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em tampão BR (pH 4,0) contendo DSS 10 mg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

As respostas frente ao pH, tempo de pré-concentração e surfactante variam de forma linear à perda de sinal. Tal problema pode estar associado a baixa solubilidade do BaP em meio aquoso.

Du *et al.* (2015) estudaram o processo de oxidação do BaP em meio apenas aprótico (acetonitrila) e apenas aquoso com tampão em pH 0,7 e não obtiveram boa intensidade de corrente em ambos os meios isolados. Entretanto, quando foram avaliadas diferentes proporções de água no sistema aprótico até uma proporção equivalente, foi observado uma melhoria significativa na intensidade da corrente no processo de oxidação.

Tendo em vista que a água, de acordo com Fukuzumi *et al.* (1999), exibe um efeito catalítico no processo de oxidação eletroquímica do antraceno devido ao seu ataque nucleofílico ao An+, especula-se que a melhoria do sinal eletroquímico para o BaP também possa ser atribuída ao efeito catalítico da água em determinadas proporções na mistura com o meio aprótico.

Assim, foram testadas proporções diferentes em um sistema binário de água e solvente orgânico (acetonitrila). A acetonitrila favorece a solubilização do BaP no meio com o aumento da proporção. Nesse intuito, utilizou-se diferentes proporções de acetonitrila na cela eletroquímica (Figura 13).

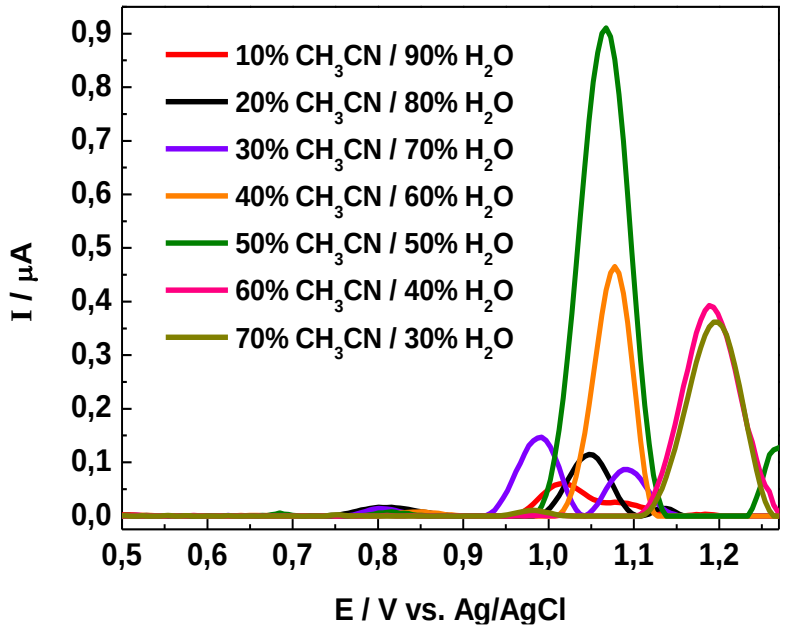

Figura 13. Voltamogramas onda quadrada em EPC de BaP 100 µg L^{-1} pré-concentrado por 600 s em OCP em diferentes proporções de acetonitrila-tampão BR contendo DSS 10 mg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Fonte: Própria, 2019.

Os resultados demonstraram que a proporção 1:1 água/acetonitrila contribuíram para o aumento da corrente de pico. Maiores proporções de acetonitrila na cela eletroquímica prejudicaram o sinal eletroquímico, uma vez que a intensidade de corrente diminuiu e o potencial de pico foi deslocado para potenciais mais positivos. Em outras palavras, foi observado que os meios aprótico e prótico isoladamente não favorecem a transferência de elétrons em comparação ao sistema binário em uma proporção 1:1, tendo a acetonitrila um papel facilitador na solubilização do BaP e a água exibindo um efeito catalítico no processo de oxidação (FUKUZUMI, 1999).

O uso do sistema binário água:acetonitrila juntamente com uma etapa de pré-concentração, o uso do surfactante DSS e o pH adequado favoreceram o processo de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho e oxidação do BaP, bem como aumentaram a sensibilidade e intensidade da corrente (0,901 µA) 100 vezes em relação ao sinal observado no sistema em EPC apenas com tampão BR pH 4,0 nas mesmas condições voltamétricas e concentração de BaP (i = 0,009µA).

Empregando-se essa condição experimental, uma curva analítica para o BaP foi obtida a partir da média de três replicatas (Figura 14) e apresentou faixa linear de 16 a 130 µg L^{-1} com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9905. O

limite de detecção 1,34 μg L^{-1} e quantificação 4,49 μg L^{-1} foram estimados de acordo com o procedimento descrito por Skoog (2005).

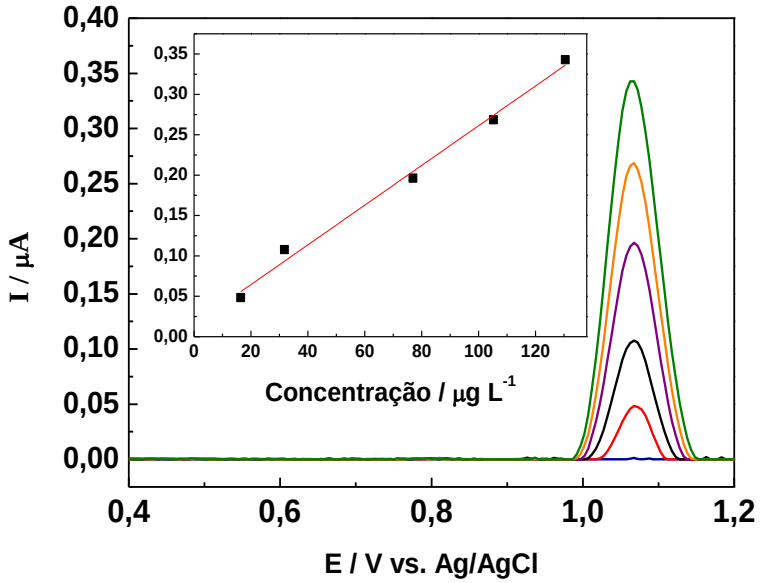

Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada em EPC com BaP pré-concentrado por 600 s em OCP em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1:1 (v/v) contendo DSS 10 mg L^{-1}. Foram empregadas diferentes concentrações de BaP: 16, 32, 78, 104 e 130 μg L^{-1}. *f :* 50Hz, ΔE_s: 5mV, ΔE_p: 25mV. Inserção: a curva analítica para BaP. Fonte: Própria, 2019.

Até então, o método desenvolvido se destaca, uma vez que utiliza um eletrodo de trabalho mais simples, econômico, sem modificação, enquanto os reportados na literatura empregam etapas prévias de modificação ou são realizados com eletrodos de alto custo. Entretanto, apesar das vantagens analíticas apresentadas, a aplicabilidade do método para a determinação de BaP é limitada, pois a curva analítica é obtida em concentrações superiores à solubilidade do BaP em amostras de água. Além disso, verifica-se que há uma discrepância nas intensidades de corrente da curva analítica em relação ao estudo anterior, com valores bem menores obtidos na construção da curva.

Assim, com o intuito de se obter um eletrodo de trabalho mais reprodutível e mais sensível, para que limites de detecção menores sejam alcançados, modificações na superfície do eletrodo foram realizadas com a adição de nanopartículas metálicas. Observa-se que a modificação de eletrodos com nanopartículas metálicas é uma prática que tem se tornado comum nas últimas décadas quando se busca aumento de sensibilidade (GARCÍA; GARCÍA, 1995; HERNÁNDEZ-SANTOS, *et al.*, 2002; WANG; HU, 2005; ATTIA, *et al.,* 2016; ABDEL-RAOOF, *et al.,* 2019). Também se observa que as nanopartículas

promovem um aumento da área superficial do eletrodo e facilitam a transferência eletrônica, uma vez que os metais geralmente empregados para modificação – Au, por exemplo – apresentam boa condutividade elétrica e estabilidade química. Além disso, os metais possuem propriedades mecânicas (alta ductilidade, baixa dureza, etc.) adequadas para aplicações elétricas (LEE, 1999; PYYKKO, 2004; GIMENO, 2008).

4.2 Modificação do EPC por eletrodeposição de ouro

Inicialmente foram feitos testes para investigar os parâmetros da eletrodeposição de ouro sobre a superfície do EPC. A Figura 15 apresenta voltamogramas cíclicos obtidos em uma velocidade de 0,1 V s^{-1} na janela de -0,4 V a +1,3 V em soluções com diferentes concentrações de $HAuCl_4$.

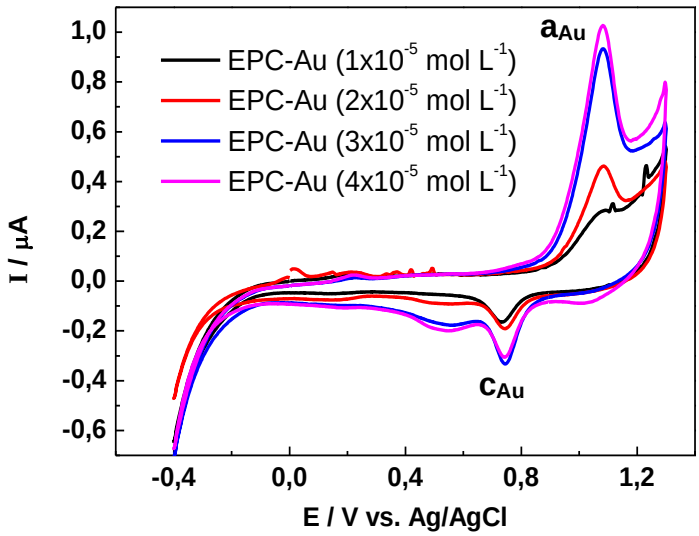

Figura 15. Voltamogramas cíclicos dos perfis dos EPC-Au em diferentes concentrações de $HAuCl_4$ ($1,0x10^{-5}$ – $4,0x10^{-5}$ mol L^{-1}) em NaCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte. Fonte: Própria, 2020.

Os voltamogramas apresentam um pico de redução em +0,78 V (pico c_{Au}) que apresenta variação proporcional ao aumento da concentração de ouro em solução, o qual provavelmente está associado com a redução de íon $AuCl_4^-$, já que este pico não foi observado nas varreduras para as soluções de NaCl 0,1 mol L^{-1} (branco). Também, pode-se observar o aumento da corrente catódica a partir de potenciais mais negativos que -0,1 V, sendo este aumento atribuído à reação de redução da água (reação de desprendimento de gás hidrogênio).

Observou-se também um pico anódico situado em +1,10 V, o qual pode ser atribuído a oxidação do ouro metálico (a_{Au}) depositado sobre a superfície do eletrodo. Em seguida, o aumento expressivo da corrente anódica é observado em potenciais mais positivos que +1,20 V, que corresponde a oxidação da água (reação de desprendimento de gás oxigênio). A partir dessa investigação, foram escolhidos potenciais suficientemente mais negativos que +0,78 V para a deposição do ouro sobre o eletrodo por cronoamperometria, evitando-se os potenciais relacionados à redução da água.

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 para a otimização do processo de eletrodeposição, variando-se o potencial de deposição (+0,2 V e +0,4 V), o tempo de deposição (80 s e 120 s) e a concentração de $HAuCl_4$ ($2,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} e $2,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}). Os eletrodos produzidos foram submetidos a análise voltamétrica de uma solução de BaP 100 μg L^{-1} em mistura 1:1 acetonitrila:tampão BR pH 4,0 contendo DSS e etapa de pré-concentração em circuito aberto. Assim, usou-se a corrente de pico da oxidação do BaP nessas condições como resposta ao planejamento de otimização da eletrodeposição. Entretanto, nenhuma das variáveis apresentou significância estatística devido à irreprodutibilidade dos picos de oxidação nas replicatas dos experimentos do planejamento.

Como a resposta variava aleatoriamente, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 para os parâmetros da voltametria de onda quadrada, variando frequência (25 Hz e 50 Hz), amplitude (20 mV e 25 mV) e incremento de potencial (5 mV e 8 mV), a fim de encontrar uma condição experimental de medida que garantisse intensidade de corrente adequada e, principalmente, reprodutibilidade dos sinais. Da mesma forma, o eletrodo era submetido à análise de uma solução de BaP 100 μg L^{-1} em mistura 1:1 acetonitrila:tampão BR pH 4,0 contendo DSS e etapa de pré-concentração em circuito aberto, usando-se a corrente de pico da oxidação do BaP como resposta ao planejamento. Entretanto, assim como observado no estudo de otimização da eletrodeposição de ouro, nenhuma das variáveis apresentou significância estatística devido à irreprodutibilidade dos picos de oxidação, pois a variação do sinal eletroquímico apresentava comportamento aleatório.

Ainda, o sistema foi reavaliado com relação ao pH do meio aquoso para investigar se este seria um problema para o novo sistema. Foram testados por

VOQ os pH 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 da solução tampão BR com acetonitrila na proporção 1:1, com DSS 10 mg L^{-1} em concentração 100 μg L^{-1} de BaP (Figura 16). Essa análise foi realizada empregando +0,4 V como potencial de deposição, tempo de deposição 80 s, concentração de $HAuCl_4$ 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}, frequência 50 Hz, amplitude 25 mV e incremento de potencial 8 mV. O EPC foi condicionado em uma solução NaCl 0,1 mol L^{-1}, em seguida, imerso na solução $HAuCl_4$ 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}/NaCl 0,1 mol L^{-1}, no qual foi aplicado o potencial pelo tempo estimado. Feito a deposição de ouro na superfície, o EPC-Au foi lavado com água deionizada e imerso na solução de trabalho.

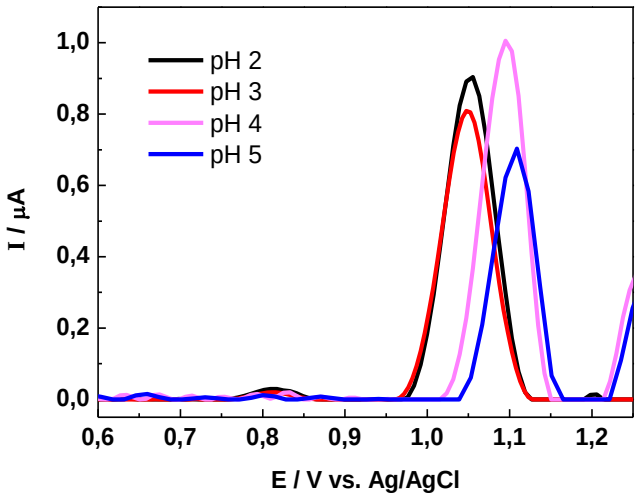

Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada de BaP 100 μg L^{-1} em diferentes pH com pré-concentração de 600 s em acetonitrila-água (tampão BR) na proporção 1:1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS. E_{dp}: +0,4 V; t_{dp}: 80 s; $HAuCl_4$ 2,0 x 10^{-4} mol L^{-1}. Fonte: Própria, 2020.

Aparentemente, o sistema não é tão sensível quanto a variação do pH. Como os picos em pH 2,0 e 4,0 apresentaram intensidades de corrente aproximadas, além de uma antecipação no potencial de pico em meio pH 2,0, tais faixas foram testadas em um planejamento robusto.

Uma vez que não era possível otimizar o processo de eletrodeposição de forma independente dos parâmetros da voltametria de onda quadrada dada a irreprodutibilidade do processo de oxidação do BaP, foi executado um planejamento experimental mais robusto envolvendo todos os parâmetros que pudessem estar afetando a resposta. Assim, o método Taguchi foi aplicado com a finalidade de obter o conjunto de níveis dos parâmetros que contribuem para maior estabilidade do sinal analítico. O uso desse método estatístico no

planejamento experimental é especialmente relevante pois favorece a obtenção de produtos e processos robustos, insensíveis a fatores que possam estar influenciando seu desempenho (MONTGOMERY; RUNGER, 1994).

Foram listados sete parâmetros principais: frequência e amplitude da técnica de onda quadrada, potencial de deposição, tempo de deposição, concentração de $HAuCl_4$, concentração de surfactante (% m/v), volume de surfactante adicionado na cela eletroquímica e o pH do meio. Foi elaborado um arranjo interno L_8 para cinco parâmetros (potencial de deposição, tempo de deposição, frequência, amplitude e volume de surfactante na cela eletroquímica) cruzado com um arranjo externo L_4 para três fatores (concentração de surfactante, concentração $HAuCl_4$ e pH).

Todos os parâmetros instrumentais foram selecionados como controláveis, bem como o volume de DSS adicionado na cela eletroquímica. O planejamento Taguchi é formulado de tal maneira que a variabilidade da resposta seja minimizada apesar da variação dos fatores ditos incontroláveis. Como a resposta da corrente de pico para valores de pH 2,0 e 4,0 para um mesmo conjunto de análise apresentou resultados semelhantes, o parâmetro foi avaliado como incontrolável.

As concentrações de surfactante e $HAuCl_4$ foram escolhidas como fatores de ruído, devido a ocupação de sítios na superfície do eletrodo. De acordo com a literatura (WANG, *et al.,* 2006b), algumas moléculas do surfactante ficam adsorvidas na superfície do eletrodo, podendo influenciar na deposição de ouro na superfície. Como a intensidade do sinal, varia de acordo com a quantidade de sítios ativos dispostos para adsorção do BaP, tais parâmetros foram analisados como fatores de ruído. Essa organização dos fatores para análise do processo de oxidação do BaP, possibilitou identificar os níveis dos fatores controláveis que minimizam a interferência dos fatores de ruído na resposta analítica, garantindo a reprodutibilidade do sinal analítico.

O método de Taguchi propõe que se analise a resposta média para cada combinação no arranjo interno, e que a variabilidade seja analisada escolhendo uma razão sinal-ruído (S/N) apropriada para o objetivo do estudo. A razão sinal-ruído analisada foi a “nominal the better”, utilizada quando se deseja reduzir a variabilidade em torno da resposta. A Tabela 9 exibe os resultados (correntes de pico) encontrados a partir da organização do arranjo ortogonal para o sistema,

realizados com o sistema binário (água-acetonitrila 1:1) com 600 s de pré-concentração de BaP 100 μg L^{-1}.

Tabela 9. Arranjo ortogonal e respostas da corrente de pico (μA) dos 32 ensaios.

Design da Resposta	Fatores Controláveis					Fatores Incontroláveis					S/N_T*
						[DSS]*	-1	-1	1	1	
						$[HAuCl_4]$	-1	1	-1	1	
	E_{dp}*	t_{dp}*	*f* *	A*	Vol. DSS*	pH*	1	-1	-1	1	
1	-1	-1	-1	-1	-1		0,54	1,93	1,13	0,75	4,945
2	-1	-1	-1	1	1		3,26	2,37	1,18	0,74	4,351
3	-1	1	1	-1	-1		0,77	1,27	0,72	2,10	5,586
4	-1	1	1	1	1		1,99	2,11	1,20	2,02	12,708
5	1	-1	1	-1	1		1,93	1,71	1,53	1,44	17,705
6	1	-1	1	1	-1		1,25	1,95	0,68	0,75	5,951
7	1	1	-1	-1	1		1,67	1,61	0,96	1,23	12,287
8	1	1	-1	1	-1		1,34	2,25	1,01	0,93	7,170

* E_{dp}: Potencial de deposição; t_{dp}: tempo de deposição; *f*: frequência; A: amplitude; Vol. DSS: volume de DSS; [DSS]: concentração de DSS; $[HAuCl_4]$: concentração de ácido cloroáurico em mol L^{-1}; pH: potencial hidrogeniônico; S/N_T: relação sinal-ruído.

Quanto maior a razão sinal-ruído nesse tratamento, menor será a variação do sinal analítico. A Figura 17, confirma que o design de experimentos 5 possui a menor variação de resposta dentre todos os experimentos realizados, proporcionando, portanto, a melhor condição do processo, em relação à variabilidade de sinal.

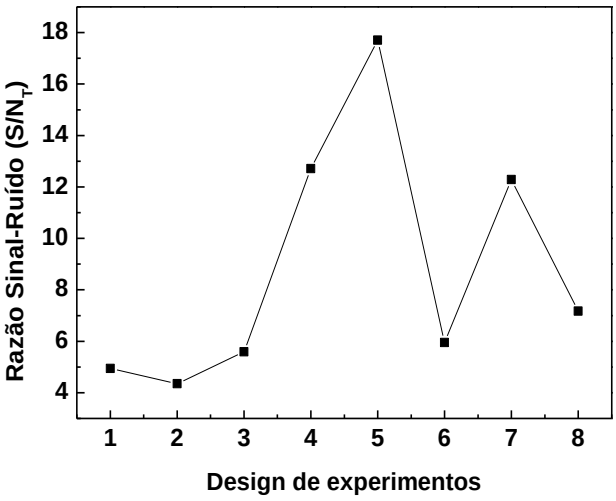

Figura 17. Variação do design de experimentos sobre a razão (S/N). Fonte: Própria, 2020.

Na metodologia de Taguchi, a análise é feita com gráficos dos resultados dos valores médios e das razões S/N para cada variável do arranjo interno e seus níveis. Os níveis ótimos dos parâmetros são aqueles que maximizam o S/N

apropriado para cada análise estatística específica. A Figura 18, representa esse comportamento para cada fator selecionado como controlável.

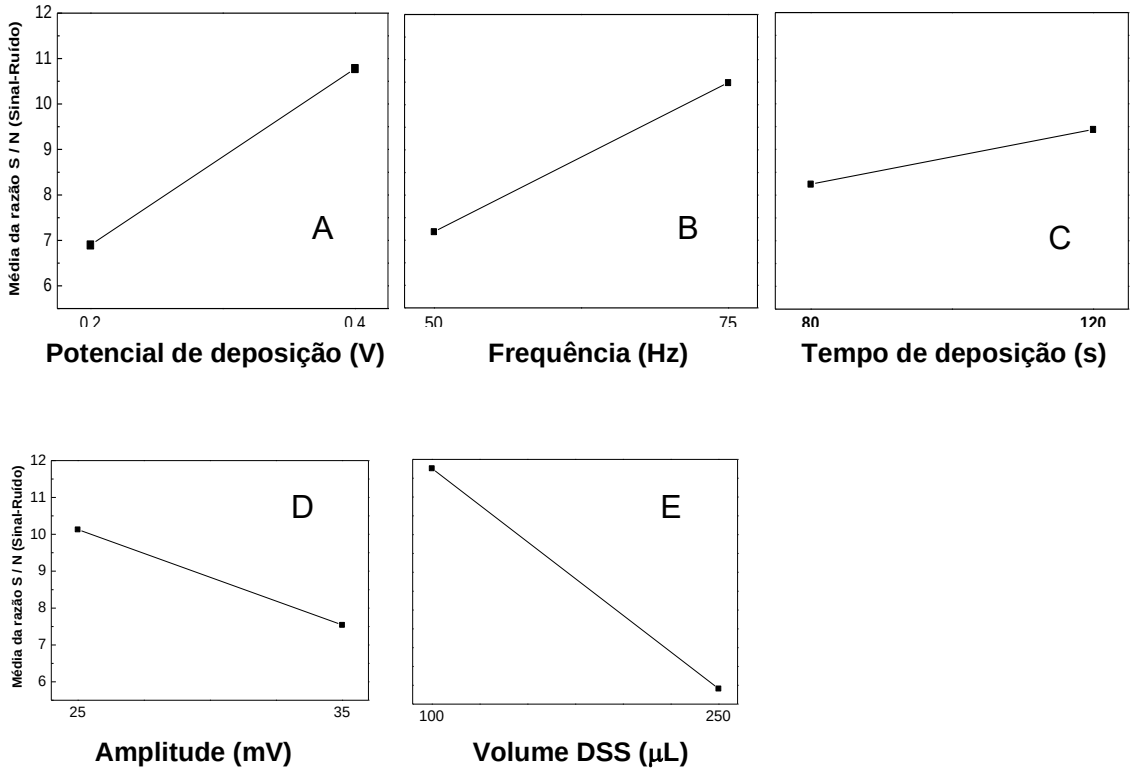

Figura 18. Efeitos dos fatores em relação à média da razão (S/N). A - E_{dp} (+0,2 V e +0,4 V); B – *f* (50 Hz e 75 Hz); C – t_{dp} (80 s e 120 s); D – ΔE_p (25 mV e 35 mV); E – Vol. de DSS (100 μL e 250 μL). Fonte: Própria, 2020.

Os níveis ótimos são aqueles que maximizaram a intensidade da corrente e a razão S/N. Logo, os que minimizaram a variabilidade dos resultados foram: A_{+1} (+0,4 V), B_{+1} (75 Hz), D_{-1} (25 mV) e E_{+1} (100 μL). Como praticamente não houve diferença significativa entre C_{-1} (80 s) e C_{+1} (120 s), pode-se adotar que qualquer um desses níveis levariam a uma maximização do valor média e à minimização da variabilidade. Os níveis dos fatores incontroláveis foram selecionados a partir do maior sinal de corrente no melhor design de resposta.

Tabela 10. Fatores e níveis empregados na determinação de BaP.

Potencial de Deposição (V)	**Tempo de Deposição (s)**	**Frequência (Hz)**	**Amplitude (A)**	**Volume DSS (μL)**
+0,4	80	75	25	100
Concentração DSS (m/v)		**Concentração $HAuCl_4$ (mol L^-)**		**pH**
0,05 %		$2,0 \times 10^{-5}$		4,0

Assim, como condição ideal apontada pelo planejamento executado, o EPC foi condicionado em uma solução NaCl 0,1 mol L^{-1}, em seguida, imerso na solução $HAuCl_4$ 2,0 x 10^{-5} mol L^{-1} / NaCl 0,1 mol L^{-1}, no qual foi aplicado o potencial de +0,4 V por 80 s. Feita a deposição de ouro na superfície, o eletrodo de trabalho foi lavado com água deionizada e imerso na solução tampão BR pH 4,0 - acetonitrila 1:1 (v/v) / DSS 10 mg L^{-1}/ BaP com pré-concentração de 600 s para obtenção do sinal analítico. Todas as medidas seguintes, foram executadas nesta metodologia.

A modificação no EPC gerou uma resposta positiva no sinal analítico do BaP. O eletrodo modificado com ouro (EPC-Au) se mostrou mais sensível e reprodutível. A transferência de elétrons e processo de oxidação do analito foram facilitados, atribuindo um ganho de aproximadamente 1 μA na intensidade da corrente para uma mesma concentração de BaP (Figura 19).

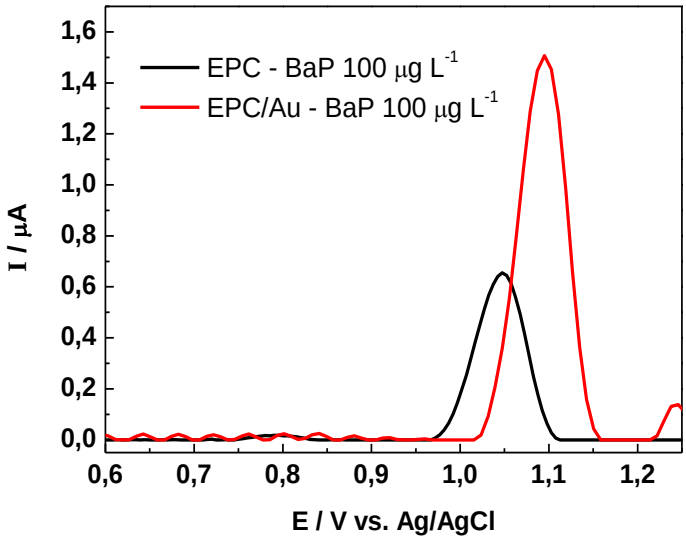

Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada comparando o sinal analítico do BaP pré-concentrado por 600 s em EPC e EPC-Au. As medidas foram realizadas nas condições otimizadas dos parâmetros de eletrodeposição em tampão BR pH 4,0 -acetonitrila 1:1, com 10 mg L^{-1} de DSS. Fonte: Própria, 2020.

Com isso, uma curva analítica por VOQ foi construída com concentração de BaP variando de 20 μg L^{-1} a 250 μg L^{-1}. As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando o EPC-Au, sem renovação da superfície entre as determinações sucessivas de cada ponto da curva. A faixa de concentração investigada no método possui uma resposta linear (Figura 20). A curva analítica tem equação I (μA) = 0,46(μA) + 2,40(μA L μmol^{-1}) x C_{BaP}(μmol L^{-1}), com um coeficiente de correlação linear 0,9974.

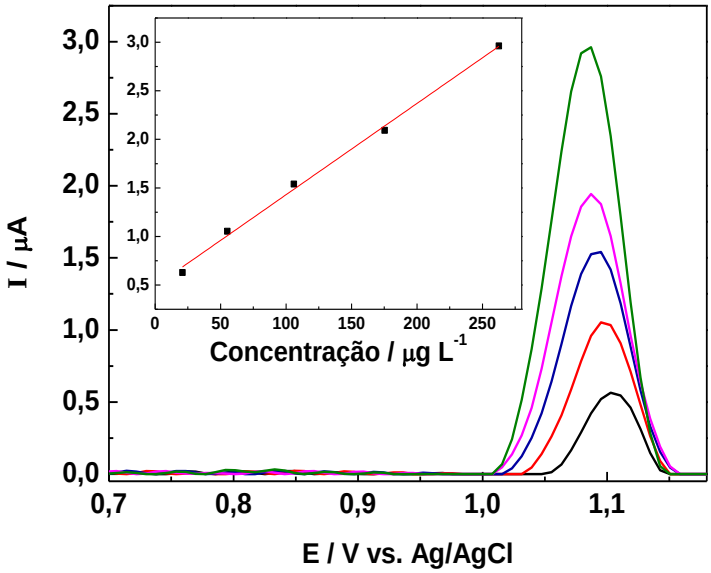

Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada do BaP pré-concentrado por 600 s em diferentes concentrações 20; 55; 105; 175 e 250 μmol L^{-1} no EPC-Au. Executadas em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1: 1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS. Inserção: curva analítica. Fonte: Própria, 2020.

O limite de detecção e quantificação foram calculados a partir do desvio padrão de 20 medidas do branco. Com o cálculo, foi obtido LD de 0,29 μg L^{-1} (1,14 nmol L^{-1}) e o LQ de 0,96 μg L^{-1} (3,81 nmol L^{-1}). Os valores de LD e LQ correspondem, respectivamente, a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método e a menor concentração que pode ser detectada com exatidão e precisão confiável. O método desenvolvido se apresentou mais sensível, mais reprodutível, alcançando um LD menor do que o atingido pelo método empregando EPC.

A significância do modelo de regressão foi calculada pela razão entre a média quadrática da regressão (3,42415) e a média quadrática residual (0,00608). O resultado do valor F (563,18) é comparado com o valor de F tabelado a 95% de confiança. O F crítico tabelado para os graus de liberdade descritos pelo modelo é igual a 10,13, portanto pode-se dizer que os resultados obtidos possuem significância elevada, visto que o F calculado pelo modelo é maior que dez vezes o F crítico (BRUNS *et al*., 2006).

O método desenvolvido não apresenta LD na mesma ordem de grandeza que os obtidos por métodos cromatográficos, mas, pode-se observar que em comparação com os métodos eletroquímicos publicados (YARDIM, *et al.*, 2011; KERMAN, *et al*., 2001; JALALVAND, *et al*., 2015; DU, *et al*., 2015), a

sensibilidade desse método é semelhante. É evidente que é complicado detectar o conteúdo de BaP em meio aquoso por métodos eletroquímicos clássicos; logo, o novo método para análise de BaP, descrito neste trabalho, é particularmente útil neste contexto, uma vez que utiliza um eletrodo de trabalho mais simples, mais econômico e sensível. A Tabela 11 expressa os limites de detecção reportados em algumas matrizes por técnicas voltamétricas, cromatrográficas e espectrofluorescentes.

Tabela 11. Limites de detecção de BaP em métodos analíticos em comparação ao obtido no método eletroquímico desenvolvido.

Métodos	Eletrodos de trabalho	LD / nmol L^{-1}	LD / $\mu g\ L^{-1}$	Matriz	Referência
VOQ-EPC-Au	Pasta de carbono modificado com eletrodepósitos de ouro	1,14	0,28	Aquosa	Este trabalho
VOQ-ECV	Carbono Vítreo	2,85	0,72	Aquosa	Du, *et al.,* 2015.
VPD-ECV	Carbono Vítreo modificado com dupla fita de DNA	2,78	0,70	Aquosa	Kerman, *et al.,* 2001.
Espectroscopia de Fluorescência	-	0,09*	0,02	Aquosa	Miller, 1999.
Espectroscopia de Fluorescência	-	0,12*	0,03	Aquosa	Algarra, *et al*., 2005.
HPLC-FLD	-	0,04*	0,01	Chá	Londoño, *et al.,* 2015.
HPLC-FLD	-	0,02*	0,005	Aquosa	Armutcu, *et al.,* 2019.

*os LD em nmol L^{-1} foram calculadas com base nos LD dos artigos em ng/mL e ng/g.

4.3 Aplicação do método em amostras de água de abastecimento e cachaça

As influências dos componentes das matrizes (água da torneira e cachaça) na determinação do BaP foram estudadas por meio do método desenvolvido. A exatidão do método foi avaliada por meio da recuperação aparente nas amostras, as quais foram fortificadas com BaP aplicando o método da adição de padrão. Na Figura 21, tem-se as curvas construídas para água de torneira e cachaça na ausência de BaP e presença em uma faixa de concentração de 20 a 250 $\mu g\ L^{-1}$.

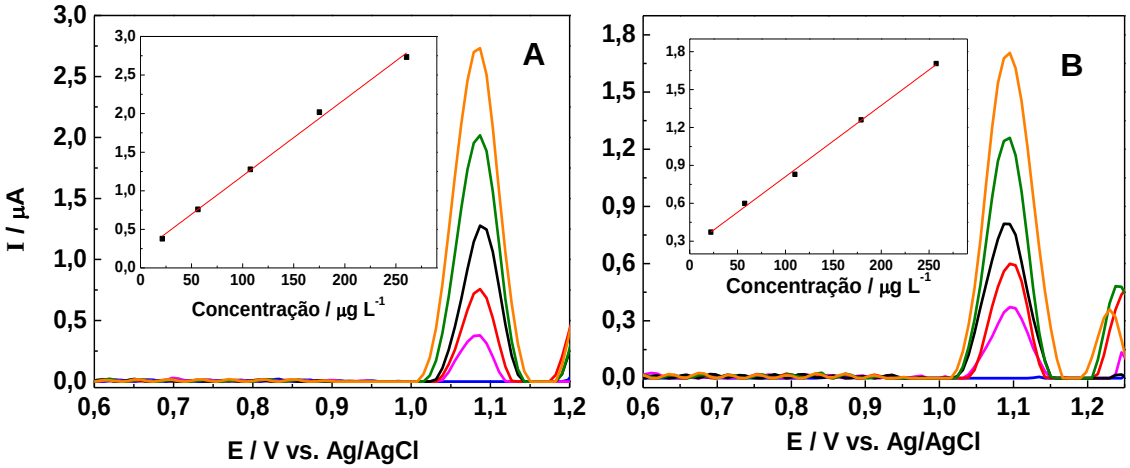

Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada das amostras sem adição de BaP (▬) e em diferentes concentrações de BaP 20 (▬); 55 (▬); 105 (▬); 175 (▬) e 250 (▬) µg L^{-1} no EPC-Au. Medidas executadas em acetonitrila-água (tampão BR pH 4,0) na proporção 1:1 (v/v), com 10 mg L^{-1} de DSS e pré-concentração de 600 s. (A) água de torneira (B) cachaça. Inserção: curvas analíticas. Fonte: Própria, 2020.

As equações referentes às adições de padrão nas amostras estão apresentadas na Tabela 12. Nota-se que a sensibilidade do eletrodo na amostra cachaça diminuiu em relação à curva analítica obtida em solução aquosa. Porém, mesmo com uma menor sensibilidade, o método possui exatidão satisfatória, com valores de recuperação aparente na faixa de 102 a 109 %.

Tabela 12. Dados das equações das retas obtidas para a faixa linear de concentração das curvas analíticas das amostras realizadas com o EPC-Au.

Amostra	Equação da reta
Aquosa	$I(\mu A) = 0{,}46(\mu A) + 2{,}40(\mu A\ L\ \mu mol^{-1}) \times C_{BaP}(\mu mol\ L^{-1})$
Água de Torneira	$I(\mu A) = 0{,}20(\mu A) + 2{,}31(\mu A\ L\ \mu mol^{-1}) \times C_{BaP}(\mu mol\ L^{-1})$
Cachaça	$I(\mu A) = 0{,}25(\mu A) + 1{,}41(\mu A\ L\ \mu mol^{-1}) \times C_{BaP}(\mu mol\ L^{-1})$

Na Tabela 13, estão apresentados os resultados da determinação de BaP na amostra de água de abastecimento e na cachaça, empregando o eletrodo com eletrodepósitos de ouro. Observa-se que o método possui exatidão satisfatória para a faixa de concentração estudada, uma vez que os valores atenderam a média de recuperação preconizada pelos Métodos Analíticos Oficiais (AOAC, 2012), sendo esta, para a faixa de concentração em 1,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, recuperações entre 80-110%.

Tabela 13. Resultados de ensaios de recuperação aparente do BaP das análises de amostras de água de abastecimento e cachaça com o método que emprega o EPC-Au.

Amostra	Concentração adicionada ($\mu g\ L^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu g\ L^{-1}$)	Recuperação (%)
Água de Torneira	30	29	97,8
	70	73	103,8
	120	131	109,0
Cachaça	30	33	109,9
	70	73	104,7
	120	128	107,6

Além disso, os resultados foram comparados com o método adaptado de Beltran e colaboradores (1998), bem como Nahorniak e Booksh (2006). O método comparativo se baseia na espectroscopia de fluorescência de excitação e emissão com análise pelo algoritmo PARAFAC (Análise de Fatores Paralelos).

Foi realizado uma comparação entre os métodos usando o método estatístico t de *student* pareado. A Tabela 14 mostra a recuperação do método comparativo.

Tabela 14. Resultados de ensaios de recuperação aparente do BaP na cachaça pelo método eletroquímico desenvolvido e método comparativo (espectroscopia de fluorescência).

Amostra (Cachaça)	Concentração adicionada ($\mu g\ L^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu g\ L^{-1}$)	Recuperação (%)
Método desenvolvido	30	33	109,9
	70	73	104,7
	120	128	107,6
Espectroscopia de fluorescência	30	25	85,1
	70	68	97,2
	120	121	101,2

O teste t foi calculado por meio dos desvios padrão da diferença dos valores das concentrações detectadas. O resultado foi de 1,39 para amostra de cachaça. Sabendo que o valor crítico tabelado é de 4,30 a 95 % de confiança, o teste t calculado foi menor que este, implicando que a hipótese nula é verdade e os métodos são análogos para determinação de BaP. Dessa forma, conclui-se que o método eletroquímico desenvolvido para determinação de BaP se apresentou com exatidão semelhante ao método comparativo.

5 CONCLUSÃO

A otimização dos parâmetros foi uma etapa essencial para determinação do benzo(a)pireno em um sistema simples. Como a molécula possui solubilidade baixa em água, todos os parâmetros que pudessem auxiliar no processo de oxidação do composto foram explorados e otimizados. Foram eles: pH do eletrólito, polaridade do sistema, pré-concentração no circuito, carga e concentração de surfactante, além dos parâmetros instrumentais.

Como na literatura, a maioria dos estudos eletroanalíticos que envolvem determinação de BaP empregam um eletrodo de trabalho sofisticado ou com modificações laboriosas na superfície, o estudo propôs um método eletroanalítico mais simples, a partir da modificação por eletrodeposição de ouro. Não houve diferença significativa, em termos de corrente de pico, ao modificar o eletrodo de pasta de carbono com nanotubos de carbono.

No estudo do perfil empregando voltametria de onda quadrada, o BaP apresentou apenas um processo oxidativo, quando determinado no sistema aquoso tampão BR (pH 4,0) e em mistura tampão BR pH 4,0 e acetonitrila 1:1. A sensibilidade e reprodutibilidade do sistema tiveram resultados satisfatórios quando aplicado o método robusto de Taguchi. O design experimental resultante do planejamento concedeu um desempenho satisfatório na detecção do benzo(a)pireno.

O LD e LQ do método desenvolvido, 0,29 $\mu g\ L^{-1}$ e 0,96 $\mu g\ L^{-1}$, respectivamente, encontram-se próximos aos obtidos na literatura pelos métodos que determinam BaP pelos métodos eletroquímicos clássicos. A exatidão do método foi avaliada por recuperação aparente, aplicada em água de abastecimento e cachaça, nos quais demonstraram resultados satisfatórios 97-110 %. O método eletroquímico desenvolvido e o método comparativo foram avaliados por teste t *student* pareado a partir do desvio padrão das concentrações de BaP detectadas, comprovando que ambos os métodos são análogos na determinação de BaP.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras para o trabalho, incluem-se:

- Aplicar o método de análise na investigação de outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;
- Avaliar o método em uma determinação simultânea de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos;
- Determinar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em outros tipos de matrizes.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOOF, A. M.; EL-SHAL, M. A.; SAID, R. A. M.; ABOSTATE, M. H.; MORSHEDY, S.; EMARA, M. S. Versatile sensor modified with gold nanoparticles carbon paste electrode for anodic stripping determination of brexpiprazole: a voltammetric study. Journal of The Electrochemical Society, v. 166, n. 12, p. B948-B955, 2019.

ABRABE - Associação Brasileira de Bebidas. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/cachaca.php>. Acessado em: 08 maio de 2020.

AEMIG, Q.; CHÉRON, C.; DELGENÈS, N.; JIMENEZ, J.; HOUOT, S.; STEYER, J.-P.; PATUREAU, D. Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in sludge organic matter pools as a driving force of their fate during anaerobic digestion. Waste Management, v. 48, p. 389–396, 2016.

ALGARRA, M.; JIMÉNEZ, V.; DE VIOLET, P. F.; LAMOTTE, M. Detection and quantification of PAH in drinking water by front-face fluorimetry on a solid sorbent and PLS analysis. Anal Bioanal Chem, v. 382, p. 1103–1110, 2005.

AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Gaithersburg: AOAC International, 2012.

APHA (American Public Health Association). Standard methods for examination of water and wastewater. American Water Works Association and Water Environmental Federation. Washington, DC: Port City Press, 21ª ed., 2005.

ARMUTCU, C.; OZGUR, E.; KARASU, T.; BAYRAM, E.; UZUN, L.; ÇORMAN, M. E. Rapid Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples Using an Automated On-line Two-Dimensional Liquid Chromatography. Water, Air & Soil Polution, v. 230, p. 1-11, 2019.

ATTIA, A. K., BADAWAY, A. M.; ABD-ELHAMID, S. G. Determination of sparfloxacin and besifloxacin hydrochlorides using gold nanoparticles modified carbon paste electrode in micellar medium. Royal Society of Chemistry, v. 6, p. 39605-39617, 2016.

AZEVEDO, D. A.; GERCHON, E.; REIS, E. O. Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul River, Brazil. J Braz. Chem. Soc., v. 15 n. 2, p. 292-299, 2004.

BANERJEE, K.; UTTURE, S.; DASGUPTA, S.; KANDASWAMY, C.; PRADHAN, S.; KULKARNI, S.; ADSULE, P. Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification approach. Journal of Chromatography A, v. 1270, p. 283–295, 2012.

BARKER, G. C.; JENKINS, I. L. Square-Wave Polarography. Analyst, v. 77, p. 685-696, 1952.

BELTRAN, J. L.; FERRER, R. GUITERAS, J. Multivariate calibration of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from excitation±emission fluorescence spectra. Analytica Chimica Acta, v. 373, p. 311-319, 1998.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n° 357, 17 de março 2005.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n.º 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de potabilidade de água para o consumo humano. Brasília: SVS, 2011.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A.; Eletroquímica princípios, métodos e aplicações. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARRAS NETO, B.; Statistical desing – Chemometrics; Elsevier, 2006.

CHRISTIE, J. H.; TURNER, J. A.; OSTERYOUNG, R. A. Square Wave Voltammetry at dropping mercury electrode: theory. Analytical Chemistry, v. 49, n. 13, p. 1899-1903, 1977.

DU, C.; HU, Y.; LI, Y.; FAN, L.; LI, X. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene in acetonitrile–water binary medium. Talanta, v. 138, p. 46-51, 2015.

ESUMI, K. Interactions between Surfactants and Particles: Dispersion, Surface Modification, and Adsolubilization. Journal of Colloid and Interface Science, v. 241, p. 1-17, 2001.

EU. European Union, Council Directive 98/83/EC, Off. J. Eur. Comm. L330, 1998.

EC. Regulation n° 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods, 2003.

FUKUZUMI, S.; NAKANISHI, I.; TANAKA, K. Multielectron Oxidation of Anthracenes with a One-Electron Oxidant via Water-Accelerated Electron-Transfer Disproportionation of the Radical Cations as the Rate-Determining Step. The Journal of Physical Chemistry, v. 103, p. 11212-11220, 1999.

GARCÍA, M. B.; GARCÍA, A. C. Adsorptive stripping voltammetric behaviour of colloidal gold and immunogold on carbon paste electrode. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, v. 38, n. 2, 1995.

GIMENO, M. C. The chemistry of gold. Modern supramolecular gold chemistry: Goldmetal interactions and applications, p. 1-64, 2008.

HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; GARCÍA, A. C. Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis. Electroanalysis, v. 14, n. 18, 2002.

HILPERT, L.R.; BYRD, G. D.; VOGT, C. R. Selectivity of negative ion chemical ionization mass spectrometry for benzo[a]pyrene. Analytical Chemistry, v. 56, p. 1842-1846, 1984.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Acessado em 05/12/2019. Disponível em: http://www.iarc.fr/

IPCS. International Programme on chemical Saffety. Acessado em 05/12/2019. Disponível em: http://www.who.int/ipcs/en/

JALALVAND, A. R.; GHOLIVAND, M. B.; GOICOECHEA, H. C.; SKOV, T.; MANSOURI, K. Mimicking enzymatic effects of cytochrome P450 by an efficient biosensor for in vitro detection of DNA damage. International Journal of Biological Macromolecules, v. 79, p. 1004-1010, 2015.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Acessado em 05/12/2019. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/en/

JIFA, W.; ZHIMING, Y.; XIUXIAN, W. Y. Response of integrated biomarkers of fish (Lateolabrax japonicus) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 65, n. 2, p. 230-236, 2006.

KERMAN, K.; MERIC, B.; OZKAN, D.; KARA, P.; ERDEM, A.; OZSOZ, M. Electrochemical DNA biosensor for the determination of benzo[a]pyrene–DNA adducts. Analytica Chimica Acta, v. 450, p. 45-52, 2001.

KESKIN, E.; YARDIM, Y.; SENTURK, Z. Voltammetry of Benzo[a]pyrene in Aqueous and Nonaqueous Media: Adsorptive Stripping Voltammetric Determination at Pencil Graphite Electrode. Electroanalysis, v. 22, p. 1191-1199, 2010.

KIM K. H.; JAHAN, S. A.; KABIR, E.; BROWN, R. J. C. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environment International, v. 60, p. 71–80, 2013.

KLIMISCH, H. J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. Separation of benzopyrene isomers by high-pressure liquid chromatography on cellulose acetate columns Analytical Chemistry, v. 45, p. 1960–1962, 1973.

LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. Cogent Environmental Science, v. 3, p. 1-89, 2017.

LEE, J. D. Química Inorgânica não tão concisa. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

LEE, J. G.; KIM, S. Y.; MOON, J. S.; KIM, S. H.; KANG, D. H.; YOON, H. J. Effects of grilling procedures on levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. Food Chemistry, v. 199, p. 632–638, 2016.

LIMA, V. B. S.; BALESTRASSI, P. P.; PAIVA, A. P. Otimização do desempenho de amplificadores de radiofrequência banda larga: uma abordagem experimental, Produção, v. 21, n. 1, p. 118-131, 2011.

LIU, Y.; YE, Z.; SHAO, G.; WANG, C.; LIN, M.; LUO, Y. Construction of dsDNA biosensor based on dendritic SiO_2 nanoparticle and investigation on its interaction with benzo[a]pyrene. Journal Iran Chem. Soc., v. 9, p. 129-136, 2012.

LONDOÑO, V. A. G.; REYNOSO, C. M.; RESNIK, S. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (Camellia sinensis) commercialized in Argentina. Food Control, v. 50, p. 31-37, 2015.

MILLER, J. S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofuorimetry. Analytica Chimica Acta, v. 388, p. 27-34, 1999.

MOHAMMEDI, T.; MOHEB, A.; SADRZADEH, M.; RAZMI, A. Separation of copper ions by electrodialysis using Taguchi experimental design. Desalination, v. 169, p. 21-31, 2004.

MONTGOMERY D.C.; RUNGER, G. C. "Gauge Capability Analysis and Designed Experiments. Part II: Experimental Design Models and Variance Component Estimation. Quality Engineering, v. 6, n.2, p. 289-305, 1994.

MOSTAFA, G. A. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafoods from Lake Timsah. International Journal of Environmental Health Research, v. 12, p. 83-91, 2002.

MUMTAZ, M.; GEORGE J. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)," in ed. Public Health Service. US Department of Health and Human Services, Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1995.

NAHORNIAK, M. L.; BOOKSH, K. S. Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy in conjunction with multiway analysis for PAH detection in complex matrices. Analyst, v. 131, p. 1308–1315, 2006.

NETTO, A. D. P.; DIAS, E. X. O.; MOREIRA, J. C.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. Quimica Nova, v. 23, n. 6, 2000.

NI, Y.; WANG, P.; SONG, H.; LIN, X.; KOKOT, S. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor. Analytica Chimica Acta, v. 821, p. 34-40, 2014.

PADKE, M. S. Quality Engineering Using Robust Design. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1989.

PADRÓS, J.; PELLETIER, É. In vivo formation of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide–plasma albumin adducts in fish. Marine Environmental Research, v. 50, p.347-351, 2000.

PANDEY, S. K.; KIM, K.-H.; BROWN, R. J. C. A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 30, p. 1716–1739, 2011.

PERRY, M. B.; WEHRY, E. L.; MAMANTOV, G. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in unfractionated solid solvent-refined coal by matrix isolation fluorescence spectrometry. Analytical Chemistry, v. 55, p. 1893–1896, 1983.

PHAM, C. T.; TANG, N.; TORIBA, A.; HAYAKAWA, K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particles and Soil at a Traffic Site in Hanoi, Vietnam. Journal Polycyclic Aromatic Compounds, v. 35, p. 355-371, 2015.

PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Encyclopedia of Food and Health, p. 406-418, 2015.

PYYKKO, P. Theoritical Chemistry of gold. Angewandte Chemie International Edition, p. 4412-4456, 2004.

RAMALEY, L.; KRAUSE JÚNIOR, M. S. Theory of Square-Wave Voltammetry. Analytical Chemistry, v. 41, n. 11, p.1362-1365, 1969.

RANJIT, R. A Primer on the Taguchi Method. Society of Manufacturing Engineers, p.214, 1990.

RENGARAJAN, T.; RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; LOKESHKUMAR, B.; RAJENDRAN, P.; NISHIGAKI, I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 5, n. 3, p. 182-189, 2015.

ROSA, J. L.; ROBIN, A.; SILVA, M. B.; BALDAN, C. A.; PERES, M. P. Electrodeposition of copper on titanium wires: Taguchi experimental design approach. Journal of Materials Processing Technology, v. 209, p. 1181-1188, 2009.

SCF. Scientific Committee on Food. Acessado em 05/12/2019. Disponível em: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports_en.html

SCHUETZLE, D.; HAMMERLE, R. Fundamentals and Applications of Chemical Sensors, ACS Symposium Series 309, American Chemical Society, Washington DC, 1st Ed. pp 1-34, 1983.

SENTURK, Z. Analysis of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS): An Overview of Modern Electroanalytical Techniques and Their Applications. Curr Drug Deliv.; v. 1, p. 76-91, 2013.

SIEBURG, L.; KOHUT, A.; KISLENKO, V.; VORONOV, A. Amphiphilic invertible polymers for adsolubilization on hydrophilic and hydrophobized silica nanoparticles. Journal of Colloids and Interface Science, v. 351, p. 116-121, 2010.

SILVA, G. G. Eletrodeposição de chumbo sobre carbono vítreo, em sistema ácido, alcalino e com a influência do etileno glicol. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J.; Fundamentos de química analítica, Tradução 8º ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 1124p., 2005.

SINGH, L.; AGARWAL, T.; VARSHNEY, J. G. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. Food Chemistry, v. 199, p. 768–781, 2016.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. Química Nova, 1: 81–89, 2003.

TAGUCHI, G. Introduction to quality engineering: design quality into products and process. Tokio. Asian Productivity Organization, 1986.

TAGUCHI, G.; PHADKE, M.S. Quality engineering through design optimization. IEEE Global Telecommunications, Atlanta, p. 1106-1113, 1984.

TFOUNI, S.A.V.; MACHADO, R.M.D.; CAMARGO, M.C.R; VITORINO, S.H.P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M.C.F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. Food Chem., p. 101:334-38, 2007.

TOMMASINI, M.; LUCOTTI, A.; ALFÈ, M.; CIAJOLO, A.; ZERBI, G. Fingerprints of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Infrared Absorption Spectroscopy. Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectroscopy, v. 152, p. 1386-1425, 2016.

UDOMSAP, D.; BRISSET, H.; CULIOLI, G.; DOLLET, P.; LAATIKAEINEN, H. S.; BRANGER, C. Electrochemical molecularly imprinted polymers as material for pollutant detection. Materials Today Communications, v. 17, p. 458-465, 2018.

US EPA. United States Environmental Protection Agency, 1998. Acessado em 05/12/2019. Disponível em: http://www.epa.gov

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. Química Orgânica: estrutura e função. 6ª ed, Porto Alegre: Bookman, 2013.

XIA, Z.H.; DUAN, X. L.; TAO, S.; QIU, W. X.; LIU, D.; WANG, Y. L.; WEI, S. Y.; WANG, B.; JIANG, Q. J.; LU, B.; SONG, Y. X.; HU, X. X. Pollution level, inhalation

exposure and lung cancer risk of ambient atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Taiyuan, China. Environmental Pollution, v. 173, p. 150-156, 2013.

WANG, C. Y.; HU, X. Y. Determination of benorilate in pharmaceutical formulations and its metabolite in urine at carbon paste electrode modified by silver nanoparticles. Talanta, v. 67, p. 625-633, 2005.

WANG, J. Analytical electrochemistry. 3. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Ltd., 2006a.

WANG, X. G.; WU, Q.-S.; LIU, W.-Z.; DING, Y.-P. Simultaneous determination of dinitrophenol isomers with electrochemical method enhanced by surfactant and their mechanisms research. Electrochimica Acta, v. 52, n. 2, p. 589–594, 2006b.

WATERMAN, D.; HORSFIELD, B.; LEISTNER, F.; HALL, K.; SMITH, S. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in the NIST Standard Reference Material (SRM1649A) urban dust using thermal Desorption GC/MS. Analytical Chemistry, v. 72, p. 3563-3567, 2000.

WENZL, T.; SIMON, R.; ANKLAM, E.; KLEINER, J. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 25, p. 716–725, 2006.

YARDIM, Y.; LEVENT, A.; KESKIN, E.; SENTURK, Z. Voltammetric behavior of benzo[a]pyrene at boron-doped diamond electrode: A study of its determination by adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate. Talanta, v.85, p. 441-448, 2011.

ZELINKOVA, Z.; WENZL, T. The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review. Polycyclic Aromatic Compounds, v. 35, p. 248–284, 2015.

ZHANG, L. H.; LI, P. J.; GONG, Z. Q.; ONI, A. A. Photochemical behavior of benzo[a]pyrene on soil surfaces under UV light irradiation. Journal of Environmental Science, v. 18, p. 1226-1232, 2006.

ZHANG, R. P.; YUAN, Q. L.; CHEN, K. H.; HE, L. F. Constant-Wavelength Synchronous Fluorescence Spectrometry for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. Advanced Materials Research, p.3202-3206, 2012.

ZHANG, Y.; TAO, S. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. Atmos Environ, v. 43, p. 812–819, 2009.

ZHU, H.; AITKEN, M. D. Surfactant-Enhanced Desorption and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Contaminated Soil. Environmental Science Technology, v. 19, n. 44, p. 7260–7265, 2010.