

Universidade Federal de Juiz de Fora

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


**“Metodologia para Determinação de
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em
Sedimentos e Solos Periféricos à Represa
São Pedro – Juiz de Fora, MG”**

Rogério Chinelato de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Dissertação apresentada ao
departamento de Química da
Universidade Federal de Juiz de Fora
como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de Mestre em
Química

Juiz de Fora – Maio de 2008



*Dedicado a Deus,
minha família e
as pessoas de
boa-fé.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos, pelas oportunidades de aprendizado, pelo apoio, incentivo, atenção, paciência, dedicação e pelos exemplos de humildade e humanidade.

Ao Prof Dr. Renato Camargo Matos agradeço o exemplo de dedicação, o auxílio sempre presente, atenção e pelos momentos de alegria e boa convivência que sempre nos proporcionou.

Aos professores Dr. Mauro Vieira de Almeida, Dra. Mireille Le Hyaric, Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira, Dra. Rosana Colombara, Dr. Alexandre Amaral Leitão, Dra. Viridiana Santana Ferreira Leitão (INT-RJ) pela atenção e auxílios prestados, assim como aos demais membros do corpo docente do Departamento de Química pela soma de esforços em prol do ensino de qualidade.

Ao Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (LABQOM) pela doação dos padrões para o presente trabalho e pela mão sempre estendida.

Ao Prof. Dr. José Eugênio Graúdo pelo incentivo e atenção sempre presentes desde a graduação.

À Melina, Aline, Kelliton, Diego, João, Rômulo, Patrícia e Marquinho pelo auxílio, fraternidade, boas conversas e discussões sempre proveitosas no decorrer deste trabalho. Agradeço também à Michele, Vanésia, Luis, Pollyana, Karina, Fernando, Adriana, Felipe e Cabrini, pela boa companhia, atenção e partilhas cotidianas.

Aos colegas sempre tão solícitos e de boa-fé Humberto, Vanessa, Gustavo, Maurício, Aline, Cristiane, Roberta e Camila.

A Alice, Simone, Sérgio, Hilda, Gedair, Fernando e Mariângela pela paciência e presteza dispensadas no dia-a-dia.

Ao Cesama, na pessoa do Dr. Joaquim Tarcísio e Dr. Ricardo Gomes Albuquerque pela anuência da realização dos procedimentos de coleta na Represa de São Pedro.

Aos meus pais Agostinho e Aparecida, meus irmãos Alex e Josi pela dedicação, amor, lições e apoio sempre presentes em toda minha vida. Da mesma forma agradeço à Cris pelo amor, zelo e cumplicidade.

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

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HPAs EM SEDIMENTOS DE MANANCIAIS E EM SOLOS PRÓXIMOS À RODOVIAS.....	5
1.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HPAs.....	7
1.2.1 ULTRA-SOM.....	7
1.2.2 TRATAMENTO DOS EXTRATOS.....	8
1.2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	8
1.3 CARACTERIZAÇÃO DA REPRESA DE SÃO PEDRO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 LIMPEZA DO MATERIAL.....	13
3.2 MATERIAL E REAGENTES.....	13
3.3 COMPOSTOS ESTUDADOS E SOLUÇÃO PADRÃO.....	14
3.4 AMOSTRAGEM.....	14
3.4.1 DESENVOLVIMENTO DO COLETOR.....	14
3.4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO.....	15
3.4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	15
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	17
3.6 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
3.6.1 MÉTODO 1: EXTRAÇÃO EM CADINHO DE GOOCH.....	18
3.6.2 MÉTODO 2: EXTRAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO.....	18
3.7 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (MOE).....	18

3.8 ESTUDOS PARA O TRATAMENTO DOS EXTRATOS.....	19
3.8.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA SEM TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO.....	19
3.8.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO (1 HORA E 6 HORAS).....	20
3.8.3 TRATAMENTO ALCALINO NA COLUNA DE SILICA.....	22
3.9 CALIBRAÇÃO DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS & MOE.....	22
3.9.1 TESTE PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS.....	22
3.9.2 TESTE PARA ELUIÇÃO DA MOE.....	23
3.10 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS.....	23
3.11 ESTUDOS DE SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC	23
3.12 AVALIAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO.....	24
3.12.1 CURVA ANALÍTICA.....	24
3.12.2 LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO.....	25
3.12.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO MÉTODO.....	25
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 26
4.1 ESTUDOS DE SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC.....	26
4.2 CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICAS.....	28
4.3 ELUIÇÃO POR GRADIENTE.	28
4.4 TESTES PARA A SEPARAÇÃO DOS PARES ACE/FLU E BEPE/IND.....	30
4.4.1 SEPARAÇÃO DO PAR ACENAFTENO- FLUORENO.....	32
4.4.2 SEPARAÇÃO DO PAR BENZO(g,h,i)PERILENO E INDENO[c,d-,2,3]PIRENO.....	32
4.5 PROGRAMAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO.....	33
4.6 CONDIÇÃO OTIMIZADA PARA ANÁLISE NO HPLC.....	39
4.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	40
4.7.1 CURVA ANALÍTICAS.....	40
4.7.2 REPETIBILIDADE & REPRODUTIBILIDADE DO PROCEDIMENTO DE INJEÇÃO.....	41
4.8 CROMATOGRAIA EM COLUNA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO POR 1 HORA E TRATAMENTO ALCALINO NA	

COLUNA DE SÍLICA.....	45
4.9 CALIBRAÇÃO DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS & MOE.....	45
4.9.1 TESTE PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS.....	45
4.9.2 TESTE PARA ELUIÇÃO DA MOE.....	46
4.10 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	47
4.10.1 ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS FORTIFICADAS.	47
4.10.2 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRA FORTIFICADA.....	48
4.10.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA O MÉTODO.....	49
4.10.4 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	54
4.11 PERCENTUAL DA MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (%MOE).....	54
4.12 TÉCNICA OTIMIZADA PARA EXTRAÇÃO DE HPA _s EM SOLOS E SEDIMENTOS.....	57
4.13 RESULTADOS E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DO COLETOR	58
5. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO E SOLO.....	60
6. CONCLUSÃO.....	64
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

ABREVIATURAS

Ace	Acenafteno
Acen	Acenaftileno
ACN	Acetonitrila
Ant	Antraceno
ASTM	American Society for Testing Materials
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluranteno
Bepe	Benzo(g,h,i)perileno
BFL	Branco fortificado do laboratório.
BHCSP	Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro
BkF	Benzo(k)fluranteno
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CL-FR	Cromatografia Líquida em Fase Reversa
Cri	Criseno
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DCM	Diclorometano
Dib	Dibenzo(ah)antraceno
Desvpad	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DQ/NUPIS	Departamento de Química / Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separações Analíticas
EEC	“European Environmental Council”
Flu	Fluoreno
Fluo	Fluoranteno
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
Ind	Indeno[1,2,3-cd]pireno
k'	Fator de retenção
K _{ow}	Lipofilicidade

LABQOM	Laboratório de Química Orgânica Marinha do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo
LDM	Limite de detecção do método
LQM	Limite de quantificação do método
MeOH	Metanol
MIX HPA-20	Mistura padrão contendo os 16 HPAs diluídos em metanol, obtendo-se a concentração final de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
MOE	Matéria orgânica extraída.
Naph	Naftaleno
n-Hex	n-hexano
NOAA	“National Oceanic Atmospheric Administration, USA”
Phe	Fenantreno
PEL	Probable Effect Levels
Pyr	Pireno
USF&W	“United States Fish and Wildlife Service”
U.S. EPA	“United States Environmental Protection Agency”
USP	“The United States Pharmacopeia”
UV	Ultra violeta.

INDICE DE TABELAS

TABELA 1.1. Probable Effect Levels (PEL) expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco para matriz sedimento (CCME, 2002).....	04
TABELA 4.1: Principais condições de gradiente testadas para a separação do par acenafteno e fluoreno e os respectivos parâmetros de separação obtidos.....	34
TABELA 4.2: Principais condições de gradiente testadas para a separação do par benzo(g,h,i)perileno e indeno[c,d-1,2,3]pireno e os respectivos parâmetros de separação obtidos.	35
TABELA 4.3: Gradiente otimizado.....	39
TABELA 4.4: Programação dos comprimentos de onda de leitura do detector.....	39
TABELA 4.5: Parâmetros de separação obtidos para os HPAs (Mix HPA 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).....	40
TABELA 4.6: Teste para repetibilidade do procedimento de injeção obtido após cinco injeções consecutivas de uma amostra de sedimento fortificada com 0,80 μg de cada composto.....	44
TABELA 4.7: Resultados do teste de reprodutibilidade da injeção para a amostra fortificada com 0,80 μg de cada composto.	44
TABELA 4.8: Testes das condições de extração empregando amostra 10 e branco.....	50
TABELA 4.9: Avaliação dos métodos de Extração - Percentual de recuperação obtidos para extração das amostras fortificadas	51
TABELA 4.10: Avaliação dos métodos de Extração - Percentual de recuperação obtidos para extração do branco e branco fortificado.	52
TABELA 4.11: Percentual de recuperação (%) obtidos para teste com amostra 10 fortificada com 0,80 μg de cada padrão de HPA.....	53
TABELA 4.12: Resultados da extração da amostra de sedimento fortificada (0,40 μg em 10g sedimento) e limites de detecção e quantificação do método para os 12 HPAs quantificados expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sedimento seco.....	55
TABELA 4.13 Comparação entre a recuperação alcançada ao se fortificar 10g de sedimento com 0,40 μg e 0,80 μg	56
TABELA 5.1: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) de HPAs na amostra 11 de sedimento da Represa São Pedro.	61
TABELA 5.2: Concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) de HPAs nas amostra de solo periférico à Represa São Pedro, distanciadas a 10 m, 50 m e 150 m da margem da Rodovia BR 040, marco quilométrico 791,79.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Estruturas dos 16 HPAs incluídos na lista de poluentes prioritários.....	3
FIGURA 3.1: Coletor de sedimento.....	16
FIGURA 3.2: Detalhes do coletor desenvolvido e sua aplicação em campo. A - Inserção do tubo no sedimento; B - Extrusão do sedimento; C - posição de encaixe da pá sustentação; D - aspecto de uma amostra após a retirada do tubo.....	16
FIGURA 3.3: Localização dos pontos de coleta das amostras de solo periférico à rodovia (pontos 10, 50 e 150 m) e sedimento superficial (pontos 1 a 14) da Represa de São Pedro, Juiz de Fora. Figura adaptada de LATUF (2004).....	17
FIGURA 3.4: Extração das amostras em ultra-som. A - Método com uso do cadinho de Gooch e B - Frasco utilizado para extração seguida de centrifugação do extrato.....	20
FIGURA 3.5: Fluxograma representando a otimização da extração das amostras. A – extração por ultra-som com uso do cadinho de Gooch e B – Extração por ultra-som seguido de centrifugação do extrato.....	21
FIGURA 3.6: Fluxograma representativo do procedimento utilizado para determinação da matéria orgânica extraída.....	21
FIGURA 3.7: Ilustração representando a calibração da coluna para eluição dos compostos estudados com n-hexano:diclorometano (n-HEX:DCM).....	24
FIGURA 4.1: Cromatograma em modo isocrático de uma solução padrão mistura de HPAs. Fase móvel água/ACN (22:78), fluxo 1 ml·min ⁻¹ , detecção 224 nm.	28
FIGURA 4.2: Gradiente exploratório para determinação das condições iniciais de análise. Cromatogramas do gradiente exploratório para detecção em 224 nm (A1) e em 254 nm (A2); Cromatogramas obtido para as condições iniciais com detecção em 224 nm (B1) e com detecção em 254 nm (B2).	29
FIGURA 4.3: Cromatogramas obtidos para MIX HPA com eluição por gradiente com patamar de diferentes percentuais de ACN (B) em água (A), fluxo 1ml/min, detecção 296 nm.....	31
FIGURA 4.4: Cromatogramas de condições de separação por gradiente (A, B, C) obtidos nos testes realizados para separação do par de compostos acenafteno-fluoreno (ace-flu).....	33
FIGURA 4.5: Gradiente utilizado e representação parcial do cromatograma obtido para a condição de separação mais adequada para o par acenafteno-fluoreno (ace-flu).....	34
FIGURA 4.6: Condições de eluição por gradiente, cromatogramas obtidos e valores de resolução alcançados na separação dos compostos Ace/Flu. Leitura em $\lambda=296\text{nm}$ (TABELA 4.1).....	36
FIGURA 4.7: Adequação da programação dos tempos de gradiente de eluição para fase móvel água/ACN. A- Algumas condições testadas 3, B-Condição otimizada.....	37
FIGURA 4.8: Comparação dos sinais obtidos para acenafteno e fluoranteno em 254 nm (canal A) e 224 nm (canal B).....	37
FIGURA 4.9: Cromatogramas obtidos para HPAs com programação dos comprimento de onda (A) e com detecção em 254 nm (B).	38

FIGURA 4.10: Cromatogramas das curvas analíticas obtidas nas concentrações de 0,00; 0,20; 0,40; 0,60 e 0,80 e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA.....	41
FIGURA 4.11-A: Curvas analíticas obtidas na condição otimizada para Naph, Acen, Ace, Flu, Phe e Ant. Todas as curvas foram preparadas em triplicata nas concentrações de 0,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA., sendo o primeiro ponto da curva o solvente empregado na diluição dos padrões.....	42
FIGURA 4.11-B: Curvas analíticas obtidas na condição otimizada para Flu, Pyr, BbF, BkF, BaP e Dib. Todas as curvas foram preparadas em triplicata nas concentrações de 0,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA., sendo o primeiro ponto da curva o solvente empregado na diluição dos padrões.....	43
FIGURA 4.12: Recuperação dos analitos eluídos na primeira fração (14 mL) na coluna de sílica/sulfato de sódio.....	46
FIGURA 4.13: Percentagem da MOE adicionada à coluna (sílica/sulfato de sódio) eluída com mistura n-hexano/diclorometano (8:2).....	47
FIGURA 4.14: Percentual de recuperação média e desvio padrão (acima da barra) para a amostra 10 fortificada - método extração em ultra-som seguida de centrifugação do extrato.....	53
FIGURA 4.15: Percentual da matéria orgânica extraída das 14 amostras de sedimento e do branco da coleta (branco).....	56
FIGURA 4.16: Percentual da matéria orgânica extraída das 3 amostras de solo coletadas a 10m, 50m e 150m de distância da rodovia e do branco da coleta.....	57
FIGURA 4.17: Fluxograma da metodologia analítica utilizada para determinação dos HPAs em amostras de solo e sedimento superficial por HPLC.....	59
FIGURA 5.1: Cromatogramas da mistura padrão HPA 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, branco de coleta, amostra de sedimento (ponto 11) e amostra de solo (10 m).....	63

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são compostos contaminantes amplamente dispersos, produzidos por fontes antrópicas, sendo a mais significativa a queima de combustíveis fósseis e de biomassa os quais liberam estes compostos danosos à saúde para atmosfera. A capacidade dos HPAs se adsorverem à partículas, faz com que matrizes como sedimento e solo sejam as primeiras a apresentarem algum sinal deste tipo de contaminação e seus efeitos.

O presente trabalho teve como objetivo a otimização de metodologia analítica para coleta, extração, separação e determinação dos 16 HPAs prioritários em amostras de sedimentos e solo e em seguida aplicação do método às amostras da Represa de São Pedro e mediações.

Num primeiro momento foi otimizado o método de separação para os 16 compostos por HPLC com detecção por UV empregando-se coluna de fase reversa C-18, para tanto foram estudados parâmetros como a composição e fluxo da fase móvel, eluição isocrática e por gradiente, variação dos comprimentos de onda de detecção, avaliando-se entre outros resolução e simetria dos picos. A separação e quantificação através desta metodologia demonstraram-se eficaz para a determinação de 12 dos 16 compostos estudados.

Ao concluir esta etapa, aplicou-se esta metodologia para os estudos de extração, onde se empregou ultra-som como método de extração e procedimento de tratamento dos extratos obtidos por cromatografia em coluna de sílica. Diferentes técnicas foram avaliadas durante os testes, tais como o uso de centrifugação do extrato, de Cadinho de Gooch para eliminar a etapa de centrifugação e a hidrólise alcalina dos extratos. Os resultados obtidos permitiram a realização de extrações reprodutíveis e com percentuais de recuperação adequados.

Foram coletadas 14 amostras de sedimento da Represa de São Pedro e três amostras de solo próximas à ela e à rodovia BR-040 no intuito de se conhecer os níveis de concentração de HPAs no solo perto da fonte de contaminação e no sedimento deste importante manancial destinado ao abastecimento público de água.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons are important substances that are produced by many antropogenic sources, among that, the most significant is burns of fossil fuels and biomass which releases these compounds to the environment. Sediments and soils are important matrix to study contamination and their effects because they are able to adsorb organic compounds such as PAHs.

The present work aim to optimize a analytical procedure for collection, extraction, separation and detection of 16 priority PAHs in samples of sediments and soil and them apply the method to samples of São Pedro's Dam and vicinity.

At first, the methodology of separation of the standard solution of the 16 compouds was developed in HPLC with UV detection and a RP-C18 column. Many parameters were studied such as the solvent composition, flow rate, isocratic and gradient elution, variation of wavelength detection, resolution and symmetry of the peaks. The separation and quantification through this methodology were able to determinate 12 of the 16 studied compounds.

After that, this methodology was applied for the studies of ultra-sound extraction and clean-up procedure with silica. Different techniques were applied during the improvement procedures, such as the use of centrifuge, the use of crucible of Gooch and the alkaline hydrolysis of the extracts. The obtained results attained to suitable extractions with appropriate recovery rates.

The 14 samples of sediment were obtained in São Pedro's Dam and three soil samples collected closed to it and BR-040 highway to investigate the concentration levels of PHAs.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao intenso crescimento das cidades desde a Revolução Industrial, a população passou a se concentrar preponderantemente nas cidades, e como consequência disto, a urbanização passou a ocupar grande quantidade de áreas de modo que solos férteis, ecossistemas raros e valiosos são perdidos ou alterados (TAUK-TORNISIELO, 1995).

As emissões de automóveis e atividades industriais originam diversos poluentes, amplamente dispersos. Entre os mais danosos ao ambiente e à vida destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os HPAs são compostos pertencentes uma série de hidrocarbonetos que contém anéis aromáticos condensados conectados por um par de átomos de carbono adjacentes (BAIRD, 2002).

Estes compostos são contaminantes originados pelas mais variadas fontes de contaminação antrópicas como a queima de combustíveis, queimada em florestas e lavouras, descarga direta de óleos e seus derivados, escoamento superficial de vias, esgotos, entre outras fontes (MAGALHÃES *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2005; ROSS & OROS, 2004; AMAGAI *et al.*, 1999). A fonte antrópica que contribui de modo mais significativo é a queima de combustíveis fósseis e de biomassa, as quais resultam na liberação de HPAs para a atmosfera (MACDONALD *et al.*, 2000).

A reação química que origina os HPAs durante uma reação de queima pode ser explicada devido à ocorrência repolimerizações, especialmente sob condições deficitárias em oxigênio; geralmente, a velocidade de formação dos HPAs aumenta à medida que a razão oxigênio/combustível diminui. Os fragmentos de moléculas perdem durante a reação, com frequência, uma pequena quantidade de hidrogênio, que por sua vez forma água após combinar-se com oxigênio. Os fragmentos ricos em carbono combinam-se para formar os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, que são moléculas mais estáveis com razão carbono-hidrogênio elevada.

Após serem originados, em contraste com seus análogos de menor peso molecular, os HPAs com mais de quatro anéis benzênicos não permanecem no ar durante longo tempo como moléculas gasosas. Devido à sua baixa pressão de

vapor, condensam-se e são adsorvidos nas superfícies de partículas de fuligem e cinzas. (BAIRD, 2002; RICHTER & HOWARD, 2000).

A análise da dispersão destes poluentes é uma tarefa de difícil execução por serem dependentes de fenômenos complexos como direção das correntes de ventos, entre outros, de forma que são mais bem compreendidos quando estudados através de modelos que considerem as propriedades físico-químicas dos compostos estudados e uma diversidade de parâmetros relacionados ao clima (COUSINS & JONES, 1998; MACDONALD *et al.*, 2000).

A concentração de HPAs na matéria particulada aumenta no inverno devido à redução da pressão de vapor destes compostos frente a temperaturas menores (BODNÁR *et al.*, 2005), não só por isso, mas também pela diminuição da eficiência da reação de combustão devido ao aquecimento lento dos motores. Na primavera e no verão, o aumento do calor, da irradiação UV e a ação de microorganismos podem provocar incrementos na volatilização e uma fotodegradação mais pronunciada dos HPAs. Portanto há a previsão de uma variação sazonal das concentrações de HPAs de duas a dez vezes quando comparados no verão e no inverno (LINTELMANN *et al.*, 2005; JANG, 1997).

Ao se avaliar a fotodegradação *in vitro* em meio contendo sílica como adsorvente, mostrou-se que a degradação dos HPAs pela radiação solar requer longos períodos quando na ausência de catalizadores (XAVIER *et al.*, 2005).

Devido a suspeitas em relação ao poder carcinógeno e mutante destes compostos, os HPAs são incluídos na lista de poluentes prioritários da União Européia. A “United States Environmental Protection Agency” (U.S. EPA) considerou 16 destes compostos (FIGURA 1.1) como poluentes prioritários diante possível ou provável ação carcinogênica para humanos (CAO *et al.*, 2005).

No Brasil, algumas normas apontam alguns HPAs como poluentes de interesse ambiental. A Resolução nº20 de 18 de junho de 1986 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) enquadra as água em classes e estabelece níveis de qualidade a serem seguidos considerando a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, não devendo ser afetados em detrimento da deterioração da qualidade das águas. Estas substâncias deverão ser investigadas sempre que houver suspeita de sua presença em um manancial. Entre as substâncias potencialmente prejudiciais a que se refere esta resolução destaca-se o Benzo(a)pireno.

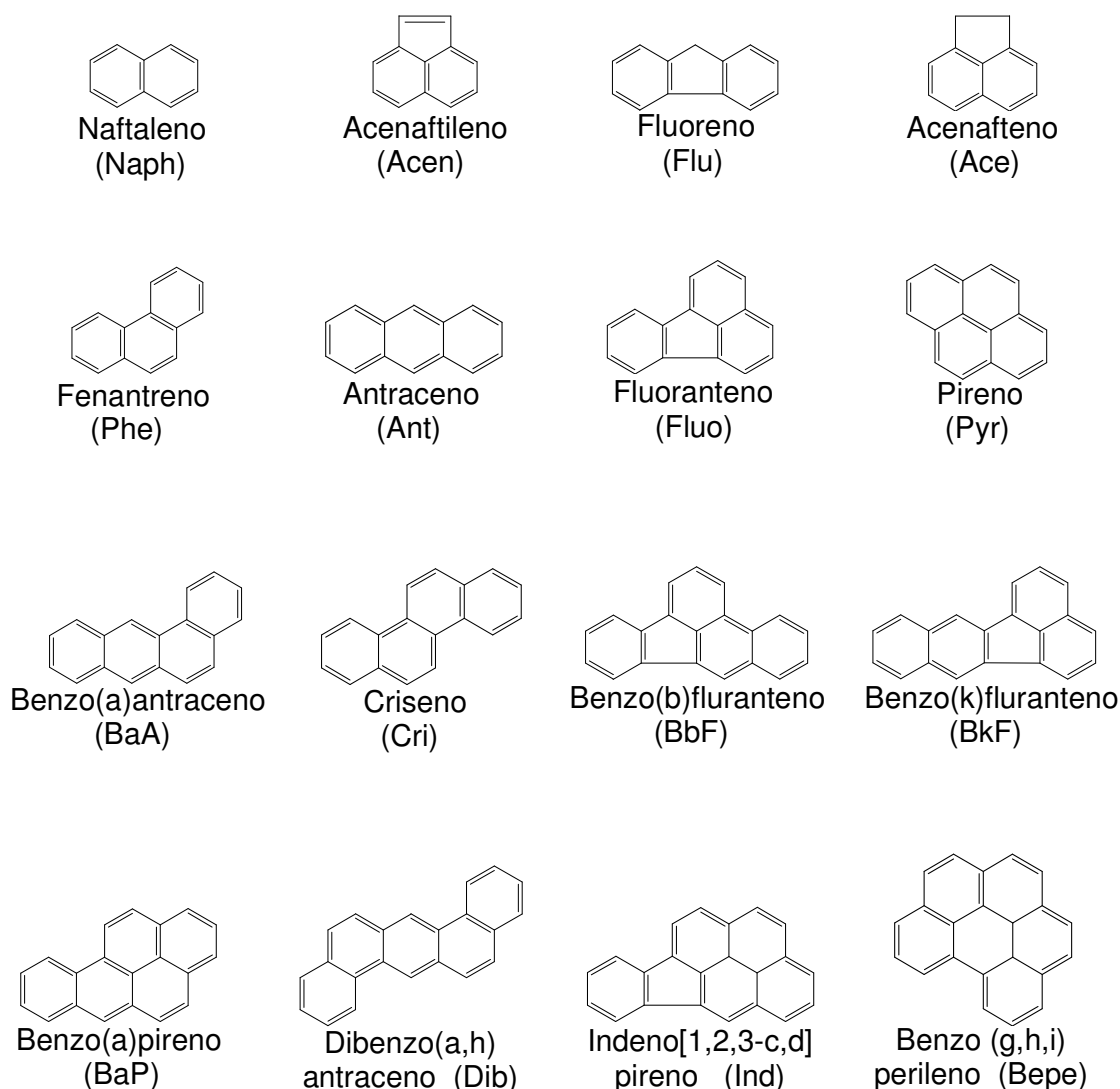


Figura 1.1: Estruturas dos 16 HPAs incluídos na lista de poluentes prioritários.

Uma outra norma nacional que merece destaque encontra-se no Anexo D da classificação de resíduos sólidos feita pela NBR 10.004, a qual aponta HPAs como benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluranteno, benzo(k)fluranteno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, criseno ou fluoranteno como substâncias tóxicas capazes de conferir periculosidade a estes resíduos.

A toxicidade atribuída a alguns destes compostos é explicada pela capacidade de agirem como agentes carcinogênicos indiretos, ou seja, quando absorvidos pelo organismo humano são oxidados tornando-se mais polares e mais solúveis em meio aquoso. Isto facilita a eliminação por excreção renal, entretanto, antes de serem eliminados, epóxidos formados podem agir como carcinógenos (XUE & WARSHANWSKY, 2005; LARINI, 1993). Além disso, por

poderem apresentar altos índices de concentração em centros urbanos populosos e poluídos, sobretudo face ao intenso tráfego de veículos (NIELSEN *et al.*, 1996; BLUMER *et al.*, 1977), estes compostos são alvo de sucessivos estudos que comprovam outras propriedades deletérias como estrogênicas, antiestrogênicas, mutagênicas e imunodepressoras (GHISELLI & JARDIM, 2007; OH *et al.*, 2006; SANTODONATO, 1997; NIELSEN *et al.*, 1996).

Diante da considerável toxicidade apresentada por estes compostos aos seres vivos que habitam no sedimento e no solo, (QUIAO *et al.*, 2006; WESP *et al.*, 2000) parâmetros como lipofilicidade (K_{ow}), adsorção ao solo e solubilidade permitem compreender como ocorrem alguns efeitos tóxicos destes compostos nestes meios. HPAs com alta lipofilicidade não demonstraram toxicidade acentuada nos ensaios realizados por SVERDRUP & NINGKROGH (2002), possivelmente, devido à sua baixa solubilidade em água tornando-se destarte menos disponíveis para absorção pelos organismos. Todavia, compostos com lipofilicidade moderada apresentam uma solubilidade suficiente para sofrerem difusão no meio líquido e ao mesmo tempo estrutura lipofílica o bastante para interagir com a membrana celular de modo a causar efeitos tóxicos por narcose aos invertebrados de vida livre submetidos ao ensaio.

Órgãos ambientais internacionais como o CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) utilizam de índices como PEL (probable effect levels) para se avaliar a toxicidade de alguns HPAs, conforme mostrado na TABELA 1.1. Os valores numéricos de PEL representam a concentração de contaminantes que exibam toxicidade a um grande número de diferentes organismos-teste (CCME, 2002).

TABELA 1.1. Probable Effect Levels (PEL) expressos em $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso seco para matriz sedimento (CCME, 2002).

HPA	PEL
Naftaleno	391
Acenaftileno	128
Acenafteno	88.9
Fluoreno	144
Fenantreno	515
Antraceno	245
Fluoranteno	2355
Pireno	875
Criseno	862
Benzo(a)antraceno	385
Benzo(a)pireno	782
Dibenzo(a,h)antraceno	135

Ao considerar a preocupação com a produção de alimentos destinados a consumo humano, a presença de HPAs no solo também podem contaminar estes alimentos, particularmente quando produzidos em áreas próximas à fontes de emissão (ZOHAIR *et al.*, 2006; MORET *et al.*, 2007), assim como quando presentes no sedimento podem contaminar peixes e provocar alterações reprodutivas e imunológicas nestes animais conforme revisão apresentada por REYNAUD & DESCHAUX (2006).

1.1 HPAs EM SEDIMENTOS DE MANANCIAIS E EM SOLOS PRÓXIMOS ÀS RODOVIAS.

A capacidade dos HPAs se adsorverem às partículas tornam o sedimento e o solo importantes amostras pois frequentemente estas matrizes são as primeiras a apresentarem algum sinal deste tipo de contaminação antrópica e seus efeitos (MACDONALD *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 1999). O acúmulo destes poluentes orgânicos no sedimento de lagos e solo pode ser explicado pela presença de fontes poluidoras próximas às regiões de estudo. (QUIROZ *et al.*, 2005; KALFF, 2003; TOTTEN *et al.*, 2001).

Do ponto de vista do ciclo da matéria e do fluxo de energia, o sedimento é um dos compartimentos mais importantes dos ecossistemas aquáticos continentais. No sedimento ocorrem inúmeros processos em virtude de sua composição química e biológica (restos de animais e vegetais), sendo assim sua análise é de fundamental importância não somente no estudo da evolução histórica, mas também é útil em se conhecer a intensidade e as formas de impactos a que foram submetidos os ecossistemas aquáticos e terrestres adjacentes (ESTEVES, 1988).

Na grande maioria dos ecossistemas distingue-se duas principais camadas no sedimento, uma recente ou biológica e a permanente. A camada recente compreende a parte do sedimento, geralmente com maior concentração de matéria orgânica, que está em contato direto com a coluna d'água. Corresponde à parte do sedimento biologicamente mais ativo, pois nela os microorganismos e organismos bentônicos encontram as condições ambientais mais favoráveis para o seu desenvolvimento. Suas características mais importantes são: o alto teor de matéria orgânica, maior densidade de organismos bentônicos e a grande

atividade microbiana devido a presença de substratos ricos em energia tais como: lipídeos, proteínas e carboidratos. (ESTEVEES, 1988).

Alguns fatores permitem compreender a dinâmica destes compostos nas matrizes solo e sedimento. HPAs com um número maior de anéis benzênicos apresentam uma maior tendência a se adsorver ao solo (COUSINS & JONES, 1998). Com o aumento da matéria orgânica do solo pode haver um incremento na concentração de HPAs. De modo semelhante pode-se observar uma diminuição do teor da matéria orgânica nas camadas mais profundas de sedimento observando-se também o declínio nas concentrações destes poluentes (WITT & TROST, 1998). A granulometria do sedimento também é um fator que influi na distribuição destes compostos nesta matriz, isto porque partículas pequenas apresentam grande área efetiva, sendo capazes de adsorver os compostos ali presentes. Sendo assim, sedimentos constituídos por partículas de maior tamanho como aqueles predominantemente arenosos, têm demonstrado uma reduzida capacidade de adsorção dos compostos estudados (MUNIZ *et al.*, 2004; GUINAN *et al.*, 2001; ZANARDI *et al.*, 1999).

A forma com que os HPAs chegam até estas matrizes pode em parte ser explicado por alguns mecanismos. Pela deposição do material particulado contaminado do ar sobre a superfície da água que por conseqüência contribui com a contaminação da coluna d'água e do sedimento (GUINAM *et al.*, 2001).

O material particulado atmosférico depositado sobre o asfalto contém quantidades significativas de HPAs oriundos tanto do petróleo quanto do fenômeno da pirólise. Portanto, a precipitação e o seqüente escoamento superficial destas partículas podem contaminar regiões periféricas importantes (BROWN & PEAK, 2005; AMAGAI *et al.*, 1999) tal qual a Represa São Pedro localizada em Juiz de Fora - MG. Todavia, quando se estudou os HPAs presentes somente na massa asfáltica concluiu-se que pouco contribuíram para a contaminação do entorno da via (BRANDT & GROOT, 2001).

Portanto, regiões que delimitam rodovias de grande fluxo de veículos como a BR040 estarão mais susceptíveis a contaminação por poluentes oriundos da pirólise de combustíveis. De acordo com a literatura, há uma tendência para a diminuição da concentração de HPAs a medida que os pontos de coleta se distanciam da rodovia. Conforme os autores, a relação estatística encontrada diz respeito à distância, demonstrando-se independente de propriedades físico químicas

dos compostos (BROWN & PEAK, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2004; CREPINEAU *et al.*, 2003; BRIS *et al.*, 1999).

Os HPAs se distribuem em dois grupos de acordo com a mudança em sua concentração no solo ao aumentar-se a distância de coleta em relação à rodovia. O primeiro grupo tende ao decréscimo da concentração no solo conforme o aumento da distância e inclui os compostos benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluranteno, benzo(k)fluranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno; em contraste, no segundo grupo, fenantreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno e benzo(g,h,i)perileno, a proporção destes compostos se mantiveram constantes ou aumentaram com o acréscimo da distância. Esta diferença pode ser atribuída a diferentes afinidades dos HPAs pelas partículas a que estão aderidos (TUHACKOVA *et al.*, 2001)

1.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE HPAs

1.2.1 ULTRA-SOM

A extração por ultra-som é relacionada aos efeitos provocados pelo fenômeno de cavitação acústica. Na interface sólido-líquido o colapso das bolhas de cavitação pode levar à formação de microjatos com energia suficiente para causar fragmentação e aumento da área superficial efetiva para extração, além do aparecimento de fissuras, através das quais a solução extratora pode penetrar no interior das partículas aumentando a eficiência do processo de extração (HARDCASTLE *et al.*, 2000; ROLDAN, 2005).

A extração por ultra-som apresenta baixo custo, fácil operação com baixo consumo de solvente, reduzido tempo de extração e de desenvolvimento da metodologia quando comparada a técnicas como agitação mecânica, extração por fluido supercrítico e extração acelerada por solvente (BERSET *et al.*, 1999).

A técnica de extração por Soxhlet em geral exige um tempo mais longo e um volume de solvente maior para o procedimento de extração, entretanto desponta como uma técnica reprodutível, de custo considerado médio, de fácil desenvolvimento, por isso é amplamente utilizada (BERSET *et al.*, 1999). Entretanto, em uma comparação realizada por SUN *et al.* (1998) entre a extração

por Soxhlet e por ultra-som, constatou-se se que esta última foi eficaz para a extração da maioria dos 16 HPAs por apresentar vantagens como um menor consumo de solvente e um menor dispêndio de tempo.

Diante das vantagens apresentadas pela extração por ultra-som, diversos autores relataram a eficácia da metodologia, mostrando-se adequada para análise de HPAs em amostras de sedimento e solo (LOURENÇO, 2003; SONG *et al.*, 2002; AMAGAI *et al.*, 1999; MALDONADO *et al.*, 1999; WITT & TROST, 1998),

1.2.2 TRATAMENTO DOS EXTRATOS

A extração de sedimentos e solo é capaz de fornecer uma série de compostos orgânicos como: hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas, aldeídos e compostos correlatos. O uso de sílica e outros adsorventes como alumina e florissil são eficazes na separação de compostos interferentes na etapa de purificação dos extratos obtidos. E tão importante quanto o adsorvente é o sistema de solventes orgânicos utilizados para eluir o extrato e permitir que fiquem retidos a maior parte dos compostos sem interesse analítico (FILIPKOWSKA *et al.*, 2005; BUCHELLI *et al.*, 2004; LOURENÇO, 2003; NAM *et al.*, 2003; HEADLEY & AKRE 2001).

1.2.3 MÉTODOS DE ANÁLISE

Dentre as técnicas analíticas de separação de HPAs, destaca-se a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) empregada no presente trabalho e a cromatografia a gás.

A quantificação de compostos utilizando análises cromatográficas exige que sejam definidas as condições nas quais as amostras serão injetadas no cromatógrafo de modo que se alcance a separação dos compostos de interesse. Uma diferença a ser destacada entre a cromatografia de fase gasosa e a de fase líquida é que nesta os componentes da amostra interagem com ambas as fases, a estacionária e a móvel, ao contrário, em cromatografia gasosa, a fase móvel comporta-se como um gás ideal e não contribui para o processo de separação. (SKOOG, 2002).

Para compreendermos a diferença entre as duas últimas e compreender o como se desenvolve uma metodologia por HPLC devemos salientar que esta técnica não necessita que os compostos analisados sejam voláteis como na CG, bastando apenas que as amostras sejam solúveis na fase móvel e que possuam alguma interação com a fase estacionária. A partir daí, o controle rigoroso das variáveis que permitirão separar os compostos de uma mistura será crítico, como o tipo de fase estacionária a ser empregada, a mistura dos componentes da fase móvel mais adequada para a separação, a velocidade do fluxo da fase móvel, adequação do sistema de detecção, entre outros (CIOLA, 1999).

A cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) é uma metodologia amplamente utilizada para análise de HPAs em amostras diversas como material particulado, sedimento, solo, amostras de água, aerossol e alguns produtos derivados do petróleo, a qual permite uma separação adequada dos extratos obtidos destas amostras (AMAGAI *et al.*, 1999; ATANASSOVA & BRUMMER 2004; BRANDT & GROOT, 2001; BUSETTI *et al.* 2007; OLIFEROVA *et al.* 2005; WITT & TROST 1999).

Vale destacar que cromatografia líquida pode ser uma técnica adequada para a análise destes compostos a medida que é capaz de separar HPAs que por vezes são de difícil separação em colunas capilares de CG (MORET *et al.*, 2001 *apud* KUPPITHAYANANT *et al.*, 2003).

Algumas técnicas de detecção são amplamente usadas em sistemas cromatográficos a fim de alcançar a identificação e quantificação dos HPAs, duas frequentemente utilizadas são a espectrometria de massas e a fluorescência. Informações obtidas com detecção por fluorescência não permitem identificar a composição molecular das amostras de HPAs como as obtidas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) ou cromatografia líquida de alta eficiência com este mesmo detector (HPLC-EM). Por outro lado, CG-EM não é uma técnica indicada para rotinas onde se analisam diversas amostras em curto período de tempo (BÍCEGO *et al.*, 1996).

O sistema de detecção por ultravioleta (UV) empregado em alguns trabalhos, além de apresentar limites de detecção e quantificação próximos aos apresentados pela detecção por fluorescência, tem a conveniência de ser capaz de responder a compostos que não exibem fluorescência como o acenaftileno (PORTET-KOLTALO *et al.*, 2006 e KUPPITHAYANANT *et al.*, 2003;). Alguns

métodos encontrados na literatura mostraram-se eficazes na determinação de HPAs em solo, água e sedimento, atingindo níveis de concentração da ordem de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (OLIFEROVA *et al.*, 2005; PINO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002). A comparação do tempo de retenção de padrões cromatográficos com os tempos de retenção obtidos para as amostras, associados à determinação dos compostos em dois ou mais comprimentos de onda UV constitui método eficaz para a identificação e quantificação simultânea dos HPAs (ZHANG *et al.*, 2007).

O uso de HPLC e detecção ultravioleta foi relatada na literatura como uma técnica viável para separação e quantificação de HPAs em amostras de sedimento e solo (CLOAREC *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 1998).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DA REPRESA DE SÃO PEDRO

A área onde se aplicou a metodologia desenvolvida foi a Represa de São Pedro e suas adjacências localizadas no município de Juiz de Fora/MG. Também conhecida como Represa dos Ingleses ou Cruzeiro de Santo Antônio e fica a 8 km da malha urbana no Setor Oeste da cidade. A sua criação é datada de 1963, mas apenas em 1967 é que se iniciou a sua operação. Esta represa faz parte da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSP) e constitui um manancial de importância estratégica, pois responde atualmente por cerca de 9% do abastecimento público de água potável da cidade, variando de acordo com o nível da represa. O entorno da Represa São Pedro, também chamado Parque São Pedro, sem dimensão definida, é considerada uma área de especial interesse ambiental e paisagístico de Juiz de Fora (ANUÁRIO, 2007; CESAMA 2007).

A BHCSP foi dividida em três sub-bacias: A, B e C partindo-se de áreas mais à montante em direção às áreas mais à jusante respectivamente, entrecortando diversos bairros até desaguar no Rio Paraibuna. A barragem da represa situa-se a aproximados 849,9m de altitude. Já a rodovia BR-040 posiciona-se entre a barragem e a nascente passando sobre o leito do córrego à montante da represa (LATUF, 2002). É considerada um corpo d'água de Classe 1, ou seja, a água apresenta características adequadas ao consumo bastando apenas tratamento simplificado antes da distribuição, conforme a Resolução nº20 de 18 de junho de 1986 - CONAMA.

A bacia de acumulação da Represa de São Pedro está muito exposta, em termos sanitários, com a existência de vários núcleos habitacionais implantados e em expansão, além da rodovia BR-040, que corta boa parte da bacia com tráfego intenso na região da represa (CESAMA, 2007).

A degradação da qualidade de suas águas ao longo dos últimos anos tem, portanto, impactos altamente negativos. A busca de alternativas para a localização de fontes de abastecimento de água para consumo humano, particularmente nas cidades de médio e grande portes, tem significado investimentos cada vez mais elevados. O tratamento e o efetivo combate à poluição da Bacia do Rio Paraibuna, o que inclui a Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro apresenta-se assim, como uma necessidade inadiável, devendo as ações de caráter local refletir as diretrizes da política nacional de Recursos Hídricos e do Sistema Nacional de Gerenciamento dos Recursos Hídricos (WEISS, 2001).

Diante da ausência de dados relativos a presença destes contaminantes em compartimentos ambientais na região de Juiz de Fora, implantou-se este estudo no sentido de otimizar metodologia analítica para extração e quantificação de HPAs em sedimentos e num segundo momento partiu-se para a aplicação da metodologia em amostras de sedimento da Represa do São Pedro e solo periférico à rodovia BR-040.

A escolha da região de coleta foi motivada em estudos anteriormente discutidos os quais mostraram que análises de solo nas proximidades de rodovias demonstraram elevados índices de HPAs constituindo portanto uma região a qual apresentava indícios de contaminação. Além disso, a possibilidade desses poluentes atingirem o entorno, particularmente o sedimento de um manancial destinado a abastecimento público motivaram a aplicação nestas amostras de solo e sedimento.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a otimização de metodologia analítica para extração e quantificação de HPAs em sedimentos e a aplicação da metodologia em amostras de sedimento da Represa do São Pedro e solo periférico à rodovia BR-040.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Otimizar os parâmetros de separação dos HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV.
- Desenvolver um coletor que permita recolhimento de amostras de sedimentos superficiais e solo, adequado para análise de poluentes orgânicos.
- Otimizar as condições para a extração dos HPAs por ultra-som.
- Otimizar a etapa de tratamento dos extratos por cromatografia em coluna, avaliando-se o uso da sílica como adsorvente.
- Aplicação de metodologia analítica para determinação de HPAs e avaliação dos resultados obtidos para análise de amostras de sedimento superficial e solos periféricos à Represa de São Pedro e à rodovia BR-040.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LIMPEZA DO MATERIAL

Para a execução dos procedimentos foram utilizados materiais metálicos, de vidro ou de porcelana previamente tratados em laboratório. Toda a vidraria e objetos utilizados foram deixados em banho de detergente alcalino (Detertec, Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro) por 8 horas. Após este tempo, todo o material foi enxaguado em água corrente e depois em água destilada e deionizada (Milipore-Mili-Q). Em seguida todo material não volumétrico foi levado à estufa a 150° C e depois de frio foi envolvido em papel alumínio e guardado em ambiente limpo para evitar contato com poeira ou outros contaminantes. No momento da utilização o material foi condicionado com pequenas quantidades de solvente grau HPLC para análise de resíduos de forma a minimizar a possibilidade da inserção de contaminantes orgânicos nas análises.

3.2 MATERIAL E REAGENTES

Já que o objetivo foi analisar traços de compostos através de técnicas cromatográficas utilizou-se apenas solvente com alto grau de pureza, grau HPLC (Tedia Company Inc., USA), em todos os procedimentos de preparo dos reagentes, padrões e amostras.

O sulfato de sódio anidro, a lã de vidro e as bandejas desacetáveis de alumínio foram aquecidos à temperatura de 400° C durante 4 horas com a finalidade de eliminar possíveis interferentes orgânicos. Depois de aquecidos, o sulfato de sódio e a lã de vidro foram armazenados em frascos de vidro e estocados em dessecador a vácuo. As bandejas desacetáveis de alumínio foram embaladas em papel alumínio. A sílica 70-230 mesh (Macherey-Nagel, Alemanha) foi ativada em estufa a 120°C por 2 horas, resfriada em dessecador a vácuo e parcialmente desativada com 5% de água previamente extraída três vezes com n-hexano grau HPLC. Após este tratamento a sílica foi preservada em dessecador à vácuo e utilizada por até 5 dias.

3.3 COMPOSTOS ESTUDADOS E SOLUÇÃO PADRÃO

Os compostos selecionados para análise foram os 16 HPAs listados pela U.S. EPA conforme mostrado na FIGURA 1.1.

As soluções padrão foram preparadas a partir dos padrões individuais e da mistura padrão dos 16 HPAs contendo $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada um dos compostos. A partir desta solução foi preparada uma mistura padrão contendo os 16 HPAs diluídos em metanol obtendo-se a concentração final de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada composto (MIX HPA-20) a qual foi usada para o preparo das demais soluções necessárias. As soluções foram estocadas em ampolas âmbar e lacradas, as quais eram abertas apenas no momento de uso e posteriormente, novamente lacradas. Todas as soluções foram mantidas em freezer.

3.4 AMOSTRAGEM

A coleta das amostras foi fundamentada pelos procedimentos descritos em; BARRA *et al.* (2005), MOTELAY-MASSEI *et al.* (2004), CREPINEAU *et al.* (2003), UNEP (1991), SERICANO (1998) e outros.

3.4.1 DESENVOLVIMENTO DO COLETOR

O coletor (FIGURA 3.1) foi desenvolvido com materiais reciclados e de baixo custo para a coleta do sedimento. O coletor consiste em um tubo de alumínio de 6 cm de diâmetro interno e 1 m de comprimento. Na extremidade inferior do tubo posiciona-se um limitador de profundidade o qual permite a regulagem do comprimento da coluna de sedimento coletada. A pá de sustentação (FIGURA 3.1-B e FIGURA 3.2-C) tem a função de evitar saída do sedimento do interior do tubo para a coluna d'água. Uma haste cilíndrica de madeira com 1,5 m de comprimento e extremidade revestida por aço inox foi utilizada para extrusão do testemunho do tubo e permitir o recolhimento em uma bandeja de alumínio (FIGURA 3.1-C e FIGURA 3.2-B).

3.4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO

A coleta das amostras de sedimento foi realizada em 28 de junho de 2007 entre 9:00h e 17:00h. As amostras de sedimento superficial foram coletadas em 14 pontos em ambas as margens da Represa de São Pedro, partindo da barragem em direção à nascente (FIGURA 3.3). Em cada ponto de coleta o sedimento foi retirado de uma distância entre 40 a 50 cm da margem da represa (FIGURA 3.2-A). Os pontos foram escolhidos de acordo com as condições de acessibilidade ao local e de uma distância mínima de cerca de 20 metros entre cada um. A identificação do local foi feita por meio de fotografias, descrição de marcos do local e distâncias entre pontos adjacentes.

O coletor foi ajustado para retirar um perfil do sedimento submerso de no máximo 10 cm de profundidade a partir da superfície do sedimento (FIGURA 3.2-D). A extrusão do sedimento aderido ao tubo foi feita em uma bandeja de alumínio e apenas os cinco centímetros superficiais foram recolhidos em bandejas descartáveis de alumínio, previamente tratadas (FIGURA 3.2-B). Como resultado, quatro testemunhos para cada ponto de coleta foram obtidos para compor a amostra e estas por sua vez foram identificadas e transportadas até o laboratório.

Um branco de coleta, Na_2SO_4 anidro, também foi armazenado e transportado juntamente com as amostras.

3.4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO

A coleta das amostras de solo foi realizada em 22 de novembro de 2007 entre 10:10h e 11:50h. As amostras foram obtidas em três pontos com distâncias de 10 m, 50 m e 150 m da rodovia BR040 (FIGURA 3.3), em sua porção equivalente ao marco quilométrico 791,79, à margem direita da via quando tomado sentido Belo Horizonte – Rio de Janeiro. Em cada ponto de coleta foi obtida uma amostra composta pela retirada de nove porções do solo que foram adequadamente homogeneizadas e processadas no laboratório.



FIGURA 3.1: Coletor de sedimento.



FIGURA 3.2: Detalhes do coletor desenvolvido e sua aplicação em campo. A - Inserção do tubo no sedimento; B - Extrusão do sedimento; C - posição de encaixe da pá sustentação; D - aspecto de uma amostra após a retirada do tubo.

A coleta das amostras de solo foram feitas com o auxílio da pá descrita na FIGURA 3.1-B, retirando-se a camada superficial do solo a 3 cm de profundidade.

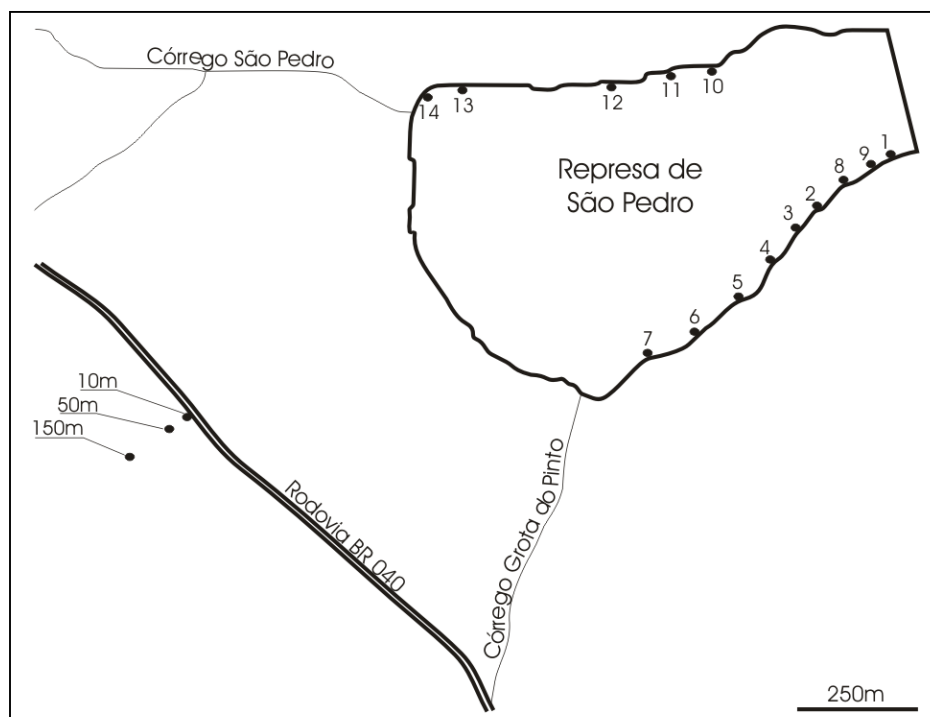


FIGURA 3.3: Localização dos pontos de coleta das amostras de solo periférico à rodovia (pontos 10, 50 e 150 m) e sedimento superficial (pontos 1 a 14) da Represa de São Pedro, Juiz de Fora. Figura adaptada de LATUF (2004).

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de sedimento foram levadas à estufa a 38°C (BERSET *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 1998) até completar a secagem em 48 horas. Em seguida cada amostra foi triturada em almofariz, homogeneizada e transferida para frascos de vidro, previamente tratados (item 3.1), dotados de tampa metálica hermética revestida por papel alumínio.

3.6 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

O procedimento de extração das amostras por ultra-som foi otimizado a partir dos estudos de FILIPKOWSKA *et al.* (2005), OLIVEIRA (2005), ROLDAN (2005), MARTINEZ *et al.* (2004), LOURENÇO (2003), SONG *et al.* (2002), AMAGAI *et al.* (1999), MALDONADO *et al.* (1999), SINGH *et al.* (1998); SUN *et al.*

(1998), WITT & TROST (1998) e MAC.LEOD *et al.* (1986) e WADE *et al.* (1986). Dois procedimentos de extração utilizando o ultra-som foram propostos e estudados: 1) extração com emprego de cadinho de Gooch e 2) extração seguida de centrifugação.

3.6.1 MÉTODO 1: EXTRAÇÃO EM CADINHO DE GOOCH

Foram pesados em balança analítica 5 g do sedimento diretamente no cadinho de Gooch com placa de vidro sinterizado (capacidade 30 mL). O cadinho contendo a amostra (FIGURA 3.4-A) foi inserido em um frasco de vidro com tampa de rosca, onde foram adicionados 27 mL da mistura metanol/diclorometano (DCM) na proporção de 1:1 (v/v). Em seguida a amostra foi levada ao ultra-som de 120 W (Unique) por 30 min. Após este tempo, o extrato foi recolhido em um balão de fundo chato (125 mL) e uma nova porção de solvente foi adicionada ao frasco extrator que foi levado ao ultra-som por mais 30 min. A extração foi realizada em três etapas de 30 min com combinação dos extratos, perfazendo um total de cerca de 81 mL de extrato por amostra (FIGURA 3.5-A).

3.6.2 MÉTODO 2: EXTRAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO

Foram pesados em balança analítica 5 g do sedimento num frasco de vidro com tampa de rosca, em seguida foram adicionados 10 mL da mistura metanol/diclorometano (1:1). Os frascos foram fechados (FIGURA 3.4-B) e levados ao ultra-som por 30 minutos. Após este tempo, os extratos foram recolhidos com auxílio de pipeta Pasteur para tubos de centrífuga. A extração foi feita em três etapas no ultra-som com combinação dos extratos, perfazendo um total de 30 mL de extrato por amostra. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e o líquido sobrenadante foi recolhido (FIGURA 3.5-B).

3.7 DETERMINAÇÃO DA MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (MOE)

Os extratos obtidos foram concentrados até 10,0 mL em evaporador rotativo com banho termostaticado a 55^o C. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e transferida para recipientes de alumínio, previamente

pesados. Em seguida, os recipientes contendo as alíquotas foram levados ao dessecador à vácuo até a secura do solvente e obtenção de valores de massa constante. A outra porção do extrato (9,0 mL) foi concentrada e reservada para a cromatografia em coluna (FIGURA 3.6). O teor de MOE expressa na forma de percentual foi realizada conforme a EXPRESSÃO 3.1:

$$MOE(\%) = \frac{[Mr_{(g)} \times V_{ext}] \times 100}{[Ma_{(g)} \times Va]} \quad (\text{Expressão 3.1})$$

MOE(%): percentual de matéria orgânica extraída.

Mr: massa do resíduo após evaporação do solvente (g).

Vext: Volume total do extrato (mL)

Ma: massa da amostra (g)

Va: volume da alíquota retirada para determinação da MOE (mL)

3.8 ESTUDOS PARA A PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS

O objetivo do purificação dos extratos (*clean up*) foi reduzir o número de compostos interferentes como o excesso de material biogênico. Para tanto foi utilizada a técnica de cromatografia por adsorção em coluna de sílica (70-230 mesh) aplicada aos extratos concentrados em evaporador rotativo, com e sem tratamento alcalino. Quatro experimentos foram realizados nesta etapa a fim de selecionar o procedimento mais adequado:

- 1) Cromatografia em coluna sem tratamento alcalino do extrato
- 2) Cromatografia em coluna após tratamento alcalino do extrato (1 hora e 6 horas)
- 3) Tratamento alcalino na coluna de sílica

3.8.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA SEM TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO

Este procedimento foi utilizado para os extratos com emprego de cadinho e para a técnica da centrifugação (itens 3.6.1 a 3.6.2). Os extratos foram purificados por cromatografia de adsorção em coluna de vidro (0,5 cm de diâmetro interno) com torneira de teflon contendo uma primeira camada de lã de vidro, seguida de

2,00 g de sílica 70-230 mesh ativada por 2 horas a 120°C e parcialmente desativada a 5% com água (previamente extraída com n-hexano); e sobre esta última foi adicionada uma camada superior de sulfato de sódio anidro em quantidade correspondente a 1 cm de altura na coluna. Os extratos concentrados foram eluídos da coluna com 12 mL de uma mistura n-hexano/diclorometano (8:2). O eluato foi recolhido diretamente em um balão de fundo chato que em seguida foi levado a etapa final de redução de volume e troca do solvente no evaporador rotativo. A fração concentrada foi transferida para um balão volumétrico de 1,00 mL e o volume final foi completado com metanol.

3.8.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO (1 HORA E 6 HORAS)

O tratamento químico em meio alcalino foi utilizado para a eliminação de interferentes, principalmente materiais biogênicos susceptíveis à reação em meio básico, tornando-os quimicamente mais polares e capazes de serem separados no processo de extração. Este método é capaz de quebrar ligações orgânicas poliméricas de estruturas de compostos orgânicos como os ácidos húmicos através da hidrólise de ligações tipo éster (BERSET *et al.*, 1999). Os testes foram realizados à temperatura ambiente por um período de 1 h e por 6 h. A hidrólise alcalina do extrato foi realizada mediante adição de 3 mL KOH 6% em metanol grau HPLC ao extrato previamente concentrado a 1,00 mL no evaporador rotativo. Após o período de 1h ou 6h, adicionou-se 2 mL de água previamente extraída com n-hexano e na seqüência, a extração foi realizada com três porções de 3 mL de n-hexano. A fase orgânica foi recolhida em um balão para se proceder a uma nova etapa de redução de volume e em seguida a eluição do concentrado na coluna de sílica.

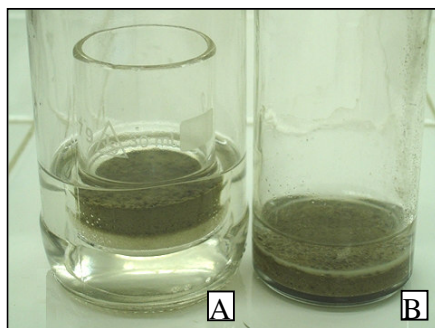


FIGURA 3.4: Extração das amostras em ultra-som. A - Método com uso do cadinho de Gooch e B - Frasco utilizado para extração seguida de centrifugação do extrato.

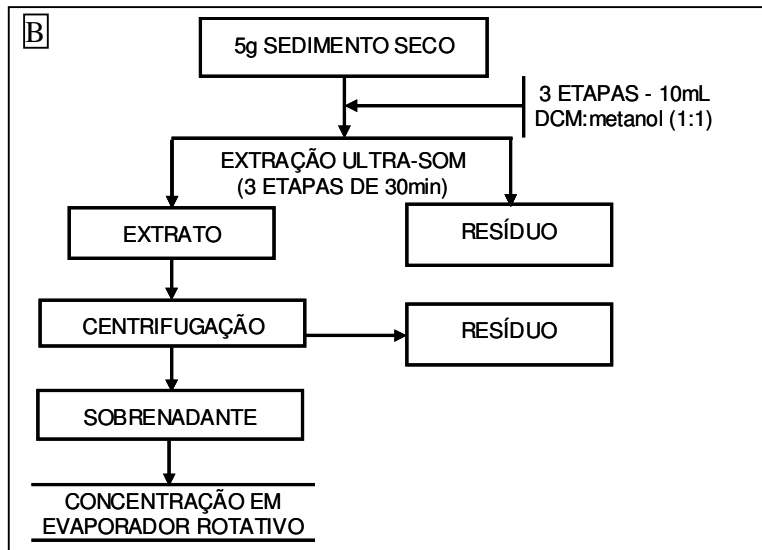
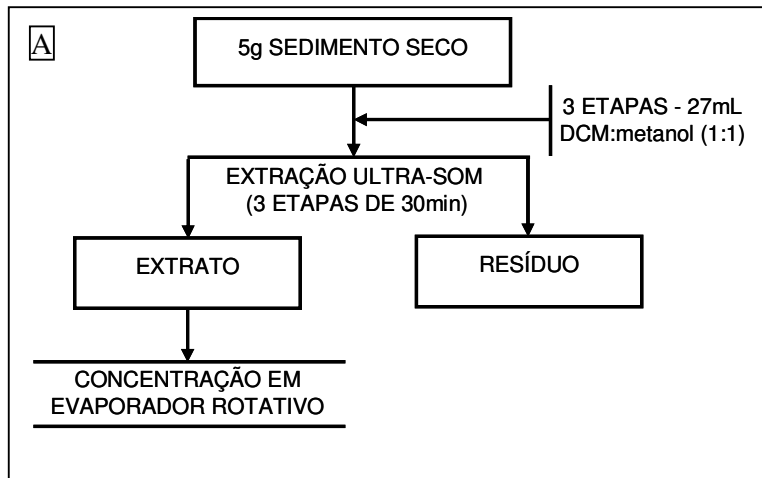


FIGURA 3.5: Fluxograma representando a otimização da extração das amostras. A – extração por ultra-som com uso do cadinho de Gooch e B – Extração por ultra-som seguido de centrifugação do extrato.

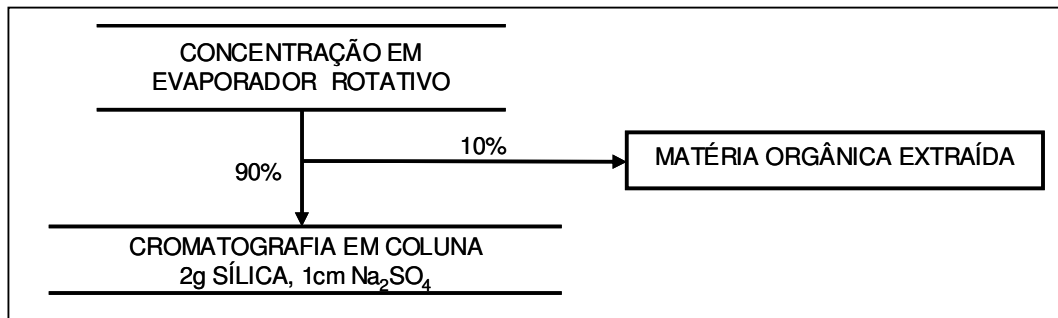


FIGURA 3.6: Fluxograma representativo do procedimento utilizado para determinação da matéria orgânica extraída

3.8.3 TRATAMENTO ALCALINO NA COLUNA DE SILICA

Neste procedimento a coluna foi preparada com um leito composto de 3 camadas: lã de vidro na base, seguida por 1,4 g de sílica parcialmente desativada a 5% (m/v) com água, uma porção de 0,6 g de sílica impregnada com KOH 33% (m/m) e por fim, preencheu-se o topo da coluna com sulfato de sódio anidro. A eluição da coluna foi realizada conforme procedimento anteriormente descrito para o extrato sem hidrólise alcalina.

3.9 CALIBRAÇÃO DA COLUNA DE CROMATOGRAFIA PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS & MOE

3.9.1 TESTE PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS

Após a definição do leito adsorvente empregado na coluna, foi realizado estudo para determinação do volume ideal de solvente para a eluição dos analitos (FIGURA 3.7). Nesta etapa foi selecionada a mistura n-hexano/diclorometano (8:2) com base nos estudos relatados por LOURENÇO (2003)

O procedimento consistiu no preparo de duas colunas contendo sílica e Na_2SO_4 anidro sendo logo em seguida uma delas eluída com branco (B) e a outra com branco fortificado (BF). O branco foi eluído na coluna com a mistura de solvente hexano/diclorometano (20 mL). O branco fortificado foi obtido através da eluição da coluna com 20 mL da mistura de solvente hexano/diclorometano, após adição de 40 μL do MIX HPA 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ na coluna. Três frações consecutivas foram recolhidas: 14 mL (Fração 1), 3 mL (Fração 2) e 1 mL (Fração 3). Todas as frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotativo, até cerca de 2mL, sendo adicionada porção de 3mL de metanol seguido por nova etapa em evaporador rotativo para se efetuar a troca do solvente n-hexano:DCM para metanol. Este procedimento foi necessário pois a mistura n-hexano:DCM é imiscível na fase móvel acetonitrila:água usada na separação por HPLC. Após a redução de volume, o concentrado foi transferido para balão volumétrico de 1,00 mL e o volume final foi completado com metanol. Posteriormente, as amostras foram injetadas no cromatógrafo.

3.9.2 TESTE PARA ELUIÇÃO DA MOE

Em uma terceira coluna foi eluída o extrato de uma amostra (ponto 10), sendo recolhidas 9 frações consecutivas de 2 mL em recipientes de alumínio previamente pesados. Os recipientes contendo as alíquotas foram levados ao dessecador à vácuo até a secagem do solvente e obtenção de peso constante. A massa do resíduo obtido, após evaporação do solvente, representou a fração da matéria orgânica extraída eluída na coluna. O total de MOE da amostra foi obtida conforme o item 3.7. Por diferença foi possível determinar a fração da MOE que ficou retida na coluna, ou seja, que foi removida do extrato da amostra.

3.10 ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS

A recuperação dos métodos testados foi avaliada mediante a extração e análise de réplicas da amostra de sedimento (amostra 10) e réplicas da mesma amostra adicionadas de 40 µL do MIX HPA 20 µg·mL⁻¹ denominadas de amostras fortificadas, além do branco. Cada método de extração foi testado em duplicata e teve como objetivo a avaliação do método da extração (cadinho de Gooch e extração seguida de centrifugação) e a avaliação do emprego de hidrólise alcalina para tratamento do extrato, conforme itens 3.6.1; 3.6.2; 3.8.1 e 3.8.2.

3.11 ESTUDOS DE SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC

A metodologia para a separação e quantificação dos HPAs foi otimizada em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC Agilent 1100 Series) com programa específico para aquisição dos dados e integração dos picos obtidos (Agilent Chemstation LC Systems). Para os estudos de separação foi empregada uma coluna de fase reversa com recheio de octadecilsilano, C-18 (ZORBAX ODS 150,0 mm x 4,6 mm D.I. e partículas de 5 µm), coluna de guarda, injetor manual com alça de injeção de 20 µL e detector de múltiplos comprimentos de onda (MWD).

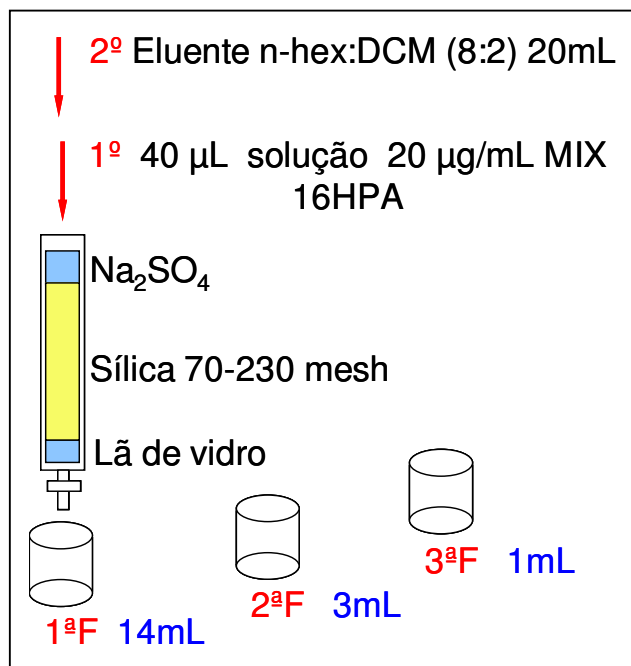


FIGURA 3.7: Ilustração representando a calibração da coluna para eluição dos compostos estudados com n-hexano:diclorometano (n-HEX:DCM)

3.12 AVALIAÇÃO DO MÉTODO OTIMIZADO

3.12.1 CURVA ANALÍTICA

A identificação dos compostos foi baseada nos respectivos tempos de retenção obtidos para injeção de padrões externos de HPA, bem como comparação dos sinais obtidos em diferentes comprimentos de onda. Para a quantificação dos compostos foram feitas curvas analíticas a partir da mistura de padrões de HPAs. Foram injetados 20 µL das soluções padrões de trabalho da mistura dos 16 HPAs na faixa de concentração até 0,20 a 1,00 µg.mL⁻¹ diluídos a partir do MIX HPA-20 µg.mL⁻¹ e solvente (0 µg.mL⁻¹). Para construção da curva analítica foram utilizados os níveis de concentração dentro da faixa de linearidade do detector e faixa estimada para os níveis de concentração das amostras (0,0: 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,00 µg.mL⁻¹). A avaliação das curvas analíticas para cada composto foi associada ao coeficiente de Pearson (r), que deve ser igual o superior a 0,995 (SERICANO,1998).

3.12.2 LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção do método¹ (LDM) e o limite de quantificação do método (LQM) foram estabelecidos mediante a extração de 5 réplicas da amostra 10 fortificada com 0,40 µg de cada composto em 10 g de sedimento. O limite de detecção foi calculado como 3 vezes o desvio padrão da análise e o limite de quantificação em 10 vezes o desvio padrão (THOMPSON *et al.*, 2002, RIBANI *et al.*, 2004 e NOAA, 1994).

3.12.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO MÉTODO

A avaliação do método e o controle de qualidade foram feitos através dos resultados obtidos na extração de duplicatas do branco e branco adicionado de padrões, aqui denominadas de branco fortificado; da extração de 6 réplicas de uma amostra e 6 réplicas da amostra adicionada de padrões, aqui denominadas de amostra fortificada e branco de coleta. As amostras foram fortificadas através da adição de 40µL do MIX HPA 20 µg·mL⁻¹ a cada uma das réplicas antes do procedimento de extração. Os parâmetros de qualidade para avaliação dos resultados foram estabelecidos conforme critérios propostos por SERICANO (1998):

1) Branco não deve apresentar mais do que 3 picos estranhos cujo tempo de retenção coincida com algum analito e seu nível de concentração deve ser menor que 3 vezes o limite de detecção do método. Caso a concentração do analito na amostra seja maior que 10 vezes o limite de detecção do método pode-se considerar o valor do branco desprezível.

2) O branco fortificado deve conter no mínimo 80% dos compostos e recuperação entre 50 e 120%, conforme estabelecido pelo órgão NOAA.

3) A matriz fortificada deve conter no mínimo 80% dos HPAs com recuperação entre 50 e 120% (NOAA).

4) Desvio Padrão Relativo (DPR) menor ou igual a 30% conforme estabelecido pelos órgãos NOAA e USF&W.

¹ Environmental Protection Agency (1984). Definition and Procedure for the Method Detection Limits, Federal Register, 49, pp 198-199.

A repetibilidade e a reprodutibilidade da injeção das amostras foram avaliadas por meio da determinação de uma solução final obtida através da extração da amostra fortificada. A avaliação da repetibilidade foi feita através da injeção de uma mesma solução repetidas vezes em um mesmo dia, já a reprodutibilidade foi medida através de injeções de uma mesma solução realizada em dias alternados.

A repetibilidade do método também foi avaliada através da extração de 6 replicas de 10g de amostras fortificadas com 0,80 µg de cada HPA, utilizadas no teste de recuperação, realizadas em um mesmo dia. Já a reprodutibilidade foi feita através da comparação entre o resultado obtido para este teste de recuperação, com o resultado obtido para o teste de limite de detecção do método (LDM). O teste de LDM fora realizado em dia diferente do teste de recuperação e empregou 5 replicas de 10g de amostras fortificadas com 0,40 µg de cada composto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDOS DE SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC

Para a análise dos compostos é desejável estabelecer condições de análise que promovam a melhor separação, em termos de resolução e eficiência. Para tanto, foram testadas primeiramente as condições de separação por eluição isocrática e em seguida por gradiente. As condições iniciais para separação por gradiente foram estabelecidas pelo gradiente exploratório. O sistema de solvente escolhido para os testes foram acetonitrila (ACN) e água, e metanol como modificador de fase móvel.

A escolha da condição de análise mais adequada foi fundamentada pela obtenção de fator de simetria², fator de retenção (k') (EXPRESSÃO 4.1 e EXPRESSÃO 4.2), resolução (R) (EXPRESSÃO 4.3). Valores não adequados de fator de simetria comprometem a reprodutibilidade do tempo de retenção,

² O fator de simetria dos picos calculado conforme (AGILENT, 2001) e leva em consideração a altura do pico, a altura dos pontos de inflexão e 4 valores de áreas parciais dois antes e dois após o ápice do pico. Este cálculo envolve diversas expressões e foi obtido pelo *software* Agilent Chemstation usado para aquisição dos dados durante as análises.

aumentam a imprecisão da quantificação, além de interferir nos cálculos da resolução e do número de pratos teóricos, portanto é conveniente que seus valores estejam entre 0,9 e 1,3. Além disso, valores de fator de simetria maiores que 1,5 podem indicar a necessidade de se trocar a coluna cromatográfica. Os valores de fator de retenção (k') indicam tempos de separação demasiadamente curtos ou longos, portanto devem ser mantidos entre 2 e 20 para o primeiro e último composto a eluir, respectivamente. A análise dos valores de resolução entre os pares de compostos devem ser acompanhados quando se pretende obter uma medida quantitativa da separação realizada. O valor de resolução ideal desejada neste tipo de análise deve ser superior a 2, devendo-se evitar valores abaixo de 1 para picos de difícil separação. (SNYDER, 1997).

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (\text{Expressão 4.1}), \text{ onde } t_r \text{ é o tempo}$$

de retenção do composto estudado e t_0 é o tempo morto (SNYDER, 1997), o qual pode ser obtido da seguinte forma:

$$t_0 = \frac{V_m}{F} \quad (\text{Expressão 4.2}), \text{ onde } V_m \text{ é o}$$

volume de fase móvel contido no interior da coluna, indicado pelo fabricante e F é a taxa de fluxo da fase móvel.

$$R = \frac{(2.35/2)(tr_b - tr_a)}{W_{1/2a} + W_{1/2b}} \quad (\text{Expressão 4.3}), \text{ onde } tr_b \text{ e}$$

tr_a são os tempos de retenção do segundo e primeiro compostos a eluir, respectivamente; $W_{1/2a}$ e $W_{1/2b}$ são a largura do pico à meia altura para o primeiro e segundo composto a eluir respectivamente (ASTM 2001).

Após o desenvolvimento da condição mais adequada de separação partiu-se para a programação do detector de múltiplos comprimentos de onda na região do ultravioleta, dessa forma foi possível obter melhoria da sensibilidade de detecção dos compostos estudados, sendo um método mais eficiente que a leitura em apenas um único comprimento de onda.

4.2 CONDIÇÕES DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICAS

Foram testadas as condições isocráticas com fase móvel composta de acetonitrila (ACN) e água: 50%, 60%, 70% e 80% de ACN.

As condições de menor força de eluição, 50% e 60% de ACN apresentaram tempo de separação demasiadamente longo. Ao se utilizar 70% de acetonitrila, mostrou-se que o tempo de separação ainda poderia ser reduzido através do aumento do percentual deste solvente. Entretanto quando usados 80% de ACN as eluições eram excessivamente rápidas para os primeiros picos.

Ao aplicar condições intermediárias entre 70% e 80% de ACN em água, a separação melhorou consideravelmente. O método isocrático mais eficaz encontrado foi o que empregou 78% de acetonitrila (FIGURA 4.1), mesmo assim não foi capaz de separar o par bepe-ind, enquanto o par ace-flu foi separado. Os primeiros compostos a eluirm, naftaleno e acenafileno apresentaram tempos de retenção consideravelmente pequenos e valores de k' abaixo de 2,0, portanto não desejados. O tempo de retenção dos 16 compostos ficou entre 3,7 (Naph) e 25,2 minutos (Bepe).

A separação do par Ind-Bepe não foi alcançada por metodologia isocrática, entretanto o pico que representava ambos os compostos apresentou um ombro, indicando valor de resolução diferente de zero. Não foi obtida nenhuma melhoria na separação dos compostos benzo(a)antraceno e criseno após a comparação dos cromatogramas obtidos durante os estudos de separação isocrática.

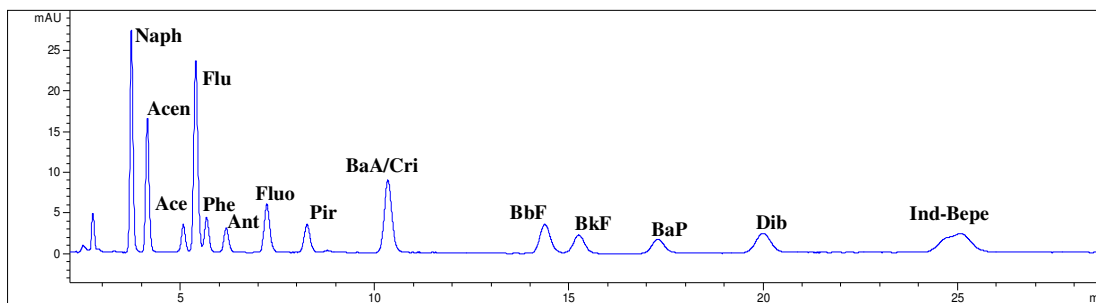


FIGURA 4.1: Cromatograma em modo isocrático de uma solução padrão mistura de HPAs. Fase móvel água/ACN (22:78), fluxo $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, detecção 224 nm.

4.3 ELUIÇÃO POR GRADIENTE.

No intuito de melhorar a separação do par bepe-ind e de aumentar os valores de k' para os compostos de menor tempo de retenção como Naph, Acen, Ace e Flu, foram realizados experimentos com emprego de eluição por gradiente.

Gradiente exploratório descrito em SNYDER (1997), é uma ferramenta útil para calcular as condições iniciais de separação por gradiente onde se considera o primeiro e o último composto a eluir. A execução do gradiente exploratório consistiu na variação linear da proporção do solvente orgânico, partindo de 5% até atingir 100% em 60 minutos de análise (FIGURA 4.2-A1 e A2). Após obter o cromatograma nestas condições, determinou-se o tempo de retenção do primeiro e do último composto a eluir no teste de gradiente exploratório, Naph e Bepe, respectivamente. Através de valores tabelados foram definidos os percentuais inicial e final de solvente orgânico utilizados (FIGURA 4.2-B). O tempo de gradiente foi estabelecido pela EXPRESSÃO 4.4. O cromatograma obtido nas condições desenvolvidas através do gradiente exploratório são mostradas na FIGURA 4.2 B.

$$TG = \frac{25 \times V_m}{F} \quad (\text{Expressão 4.4})$$

- TG = tempo de gradiente
- Vm = volume da fase móvel no interior da coluna
- F = fluxo da fase móvel.

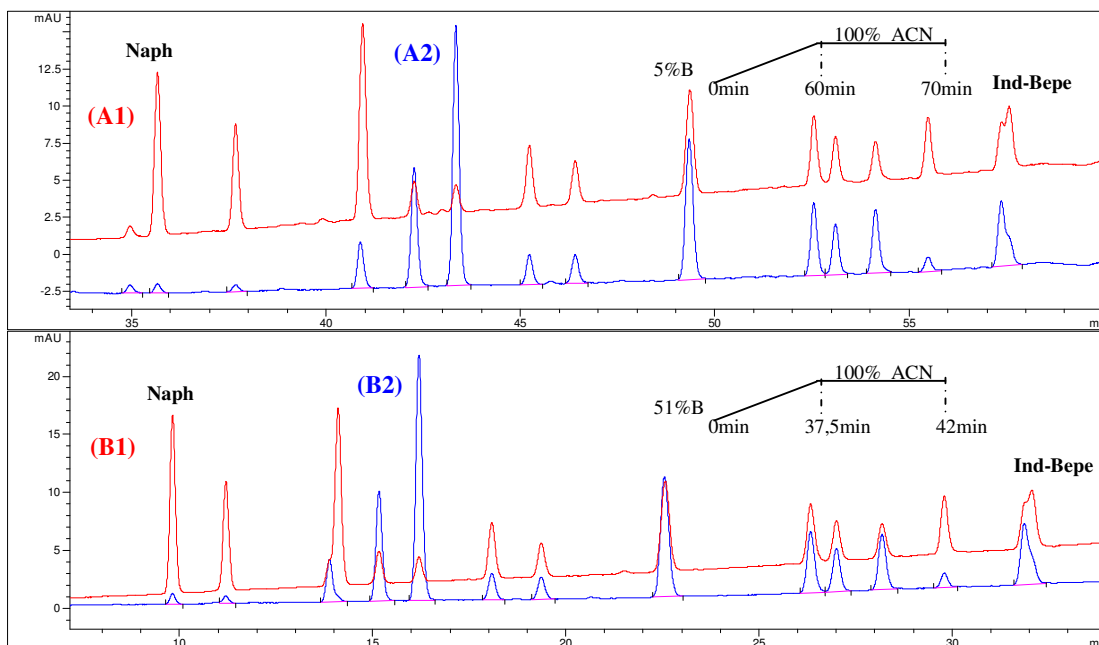


FIGURA 4.2: Gradiente exploratório para determinação das condições iniciais de análise. Cromatogramas do gradiente exploratório para detecção em 224 nm (A1) e em 254 nm (A2); Cromatogramas obtidos para as condições iniciais com detecção em 224 nm (B1) e com detecção em 254 nm (B2).

A condição proposta por KUPPITHAYANANT *et al.* (2003) para uma coluna de C-18 de 25 cm de comprimento também foi testada a fim de obter melhorias no procedimento de separação. A coluna utilizada no presente trabalho possuía dimensões menores, 15 cm comprimento o que proporcionou uma separação em um tempo menor que o alcançado pelo referido autor. O gradiente usado partia de 48% ACN em 0 min atingindo 90% ACN em 23 min (cerca de 1,82 %ACN/min) mantendo-se a proporção constante até 40 min. Ao testar este gradiente, os compostos de difícil resolução Ace/Flu; BaA/Cri e Ind/Bepe não foram separados.

Uso de metanol como modificador orgânico em pequena proporção na fase aquosa, pode melhorar a separação dos compostos que co-eluem (KUPPITHAYANANT *et al.*, 2003). O metanol funciona como um modificador orgânico, pois é capaz de alterar a superfície da fase estacionária pela adsorção lipofílica dos grupos metila sobre a superfície da coluna de separação em fase reversa (CIOLA, 1999).

Portanto, no intuito de melhorar a separação, adicionou-se metanol na proporção de 10 % na água utilizada na fase móvel. A partir daí o gradiente foi desenvolvido da mesma maneira que o anterior para efeito de comparação. Nos cromatogramas obtidos com metanol como modificador houve uma diminuição de cerca de 2% dos tempos de retenção dos analitos, em contrapartida houve uma discreta redução da resolução compostos. A redução ou incremento da taxa de fluxo da fase móvel também não foram capazes de melhorar a separação dos compostos, sendo adotada, portanto a taxa de fluxo de 1mL/min.

Para solucionar os problemas de separação e a subida da linha de base foram introduzidos patamares com valores fixos de proporção ACN (solvente B) nas regiões de coeluição do cromatograma. Portanto, foram estabelecidos patamares em concentrações variadas de acetonitrila, 71%, 77% e 82% de ACN, no intuito de melhorar a resolução insuficiente dos pares de compostos até então não resolvidos Ace/Flu e Ind/Bepe (FIGURA 4.3). A melhor condição foi obtida para 82% de ACN

4.4 TESTES PARA A SEPARAÇÃO DOS PARES ACE/FLU E BEPE/IND.

Para facilitar o desenvolvimento dos estudos foram preparadas duas misturas de soluções contendo apenas os compostos que apresentavam co-

eluição Ace/Flu e Bepe/Ind, ambas na concentração de $0,20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada composto.

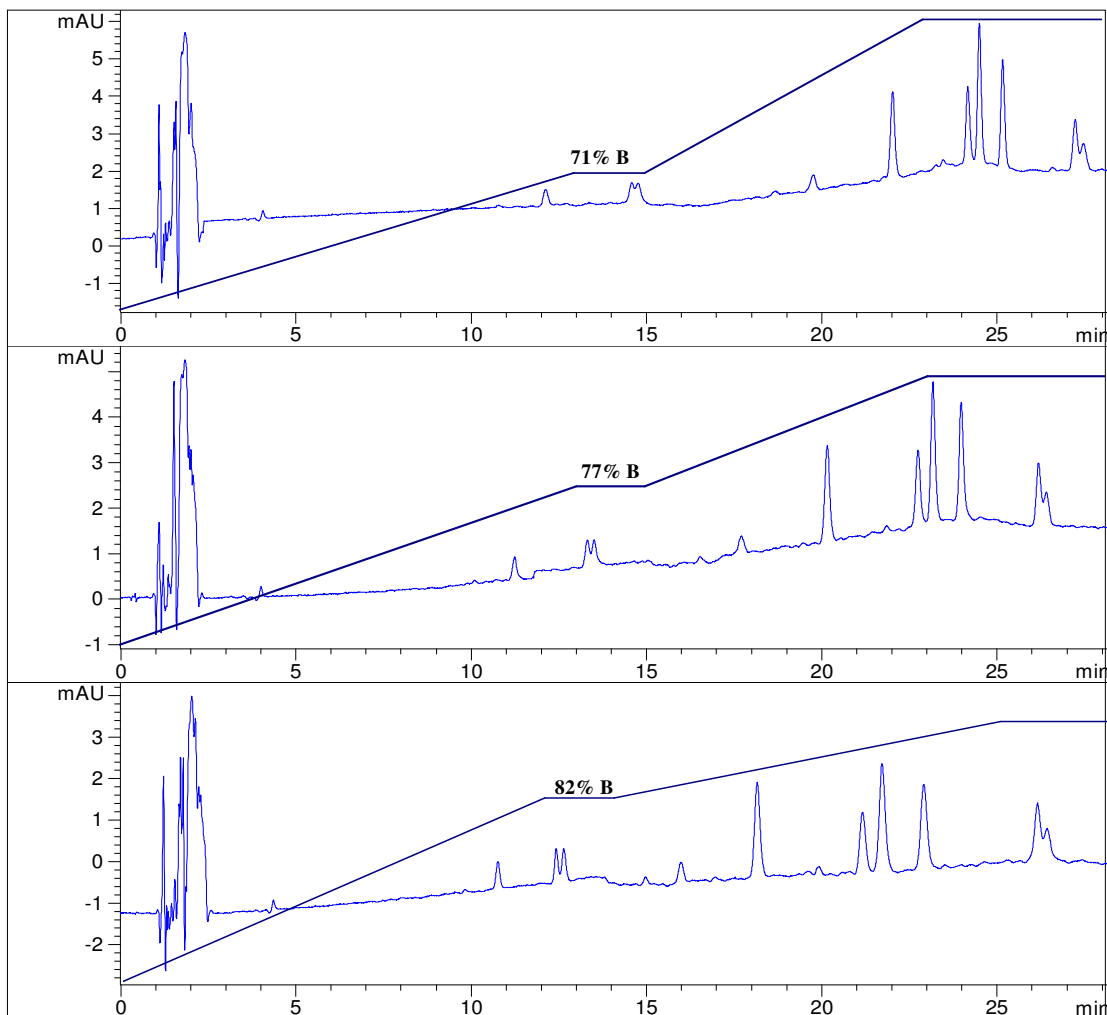


FIGURA 4.3: Cromatogramas obtidos para MIX HPA com eluição por gradiente com patamar de diferentes percentuais de ACN (B) em água (A), fluxo 1ml/min, detecção 296 nm.

Primeiramente foram executados experimentos em diferentes condições de gradiente para o primeiro par a eluir, ace/flu. Após se obter as melhores condições para o primeiro par, estas foram utilizadas para os estudos de separação do outro par Ind/Bepe. A aplicação desta estratégia foi útil para economia de solvente, tempo e padrões à medida que a separação de uma solução contendo apenas os compostos de acenafteno e fluoreno era realizada em 15 min, ao passo que as soluções contendo todos os compostos cerca de 35 min.

A separação dos compostos Ace/Flu e Bepe/Ind foi analisada no comprimento de onda de 296 nm o qual permitiu obter intensidades de sinal semelhantes entre os pares estudados quando utilizada solução de mesma concentração.

4.4.1 SEPARAÇÃO DO PAR ACENAFTENO-FLUORENO

A mistura dos padrões de ace-flu foram injetadas em diferentes condições de gradiente com a intenção de obter melhoria em sua separação (FIGURA 4.4). Ao partir-se de 55% de ACN e ao chegar-se a aproximadamente 82% deste mesmo solvente em 4 minutos (FIGURA 4.4-C) acarretou-se um repentino aumento da linha de base, causando o chamado “dryfting” (SNYDER, 1997). Sendo assim, para obter uma melhor estabilização da linha de base, aumentou-se gradativamente o percentual de ACN desde o início da corrida para que a rampa de gradiente se tornasse mais suave (FIGURA 4.4-A e FIGURA 4.4B).

Entre as condições testadas (TABELA 4.1 e FIGURA 4.6), a que mais mereceu atenção foi a condição 4: 62% de ACN (tempo: 0 min) e 74% de ACN (tempo: 7 a 12 min). Ao comparar com os experimentos anteriores, esta foi a condição que apresentou simetria satisfatória para os picos Ace (1,06) e Flu (0,90) e o segundo melhor valor de resolução obtido (1,135), muito embora este apresentava-se próximo ao melhor valor obtido (1.149). Salienta-se que a condição 1 não foi escolhida em virtude da variação da linha de base por “drifting”, sendo portanto, escolhida a condição 4 por possuir valor de resolução muito próximo ao melhor obtido e não apresentar variação da linha de base (FIGURA 4.5 e FIGURA 4.6).

4.4.2 SEPARAÇÃO DO PAR BENZO(g,h,i)PERILENO E INDENO[c,d-1,2,3]PIRENO

Os compostos benzo(g,h,i)perileno e indeno[c,d-1,2,3]pireno também apresentaram co-eluição. A análise da mistura padrão dos dois compostos em diferentes condições de gradiente não apresentaram diferenças significativas de resolução e simetria (TABELA 4.2). O melhor resultado até então foi obtido com o patamar em 74% e em 94% de ACN, condição 10, o qual apresentou-se

adequada para a separação não só do par Ind-Bepe, mas também do par Ace-Flu (FIGURA 4.7-A). Foi utilizado um patamar de 100% de ACN nos 3 minutos finais da separação para eluir possíveis espécies fortemente retidas na coluna.

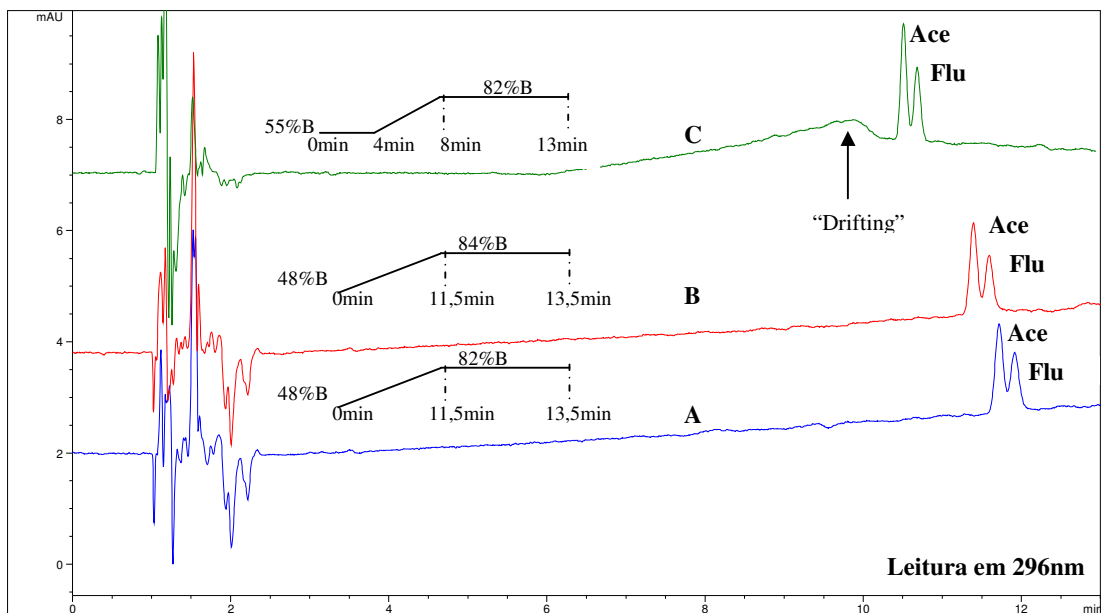


FIGURA 4.4: Cromatogramas de condições de separação por gradiente (A, B, C) obtidos nos testes realizados para separação do par de compostos acenafteno-fluoreno (ace-flu).

A última alternativa testada foi a possibilidade de se diminuir o tempo da análise em 2 minutos mediante a alteração dos tempos de 12, 24, 29, 30 e 33 min (condição 10), para 10, 22, 27, 28, 31 minutos, respectivamente obtendo-se por fim o gradiente otimizado (FIGURA 4.7-B e TABELA 4.3). Esta alteração apresentou uma redução do tempo de eluição sem trazer prejuízo à separação dos compostos.

O cromatograma obtido para as condições otimizadas permitiu a separação satisfatória de 12 dos 16 dos compostos estudados (FIGURA 4.9). Os compostos BaA e Cri coeluram e os compostos Ind e Bepe não apresentaram resolução satisfatória nos testes realizados.

4.5 PROGRAMAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA PARA DETECÇÃO.

A variação dos comprimentos de onda para detecção visou o aumento da intensidade do sinal, por conseguinte foi possível melhorar os limites de detecção e quantificação instrumentais. Esta metodologia mostrou-se mais eficiente quando comparada às técnicas onde se emprega apenas um comprimento de onda de leitura. A programação empregada para o detector levou em consideração os comprimentos de onda onde havia máxima absorção dos analitos. A aquisição dos cromatogramas pelo aparelho foi feita em cinco canais, quatro destes destinados aos comprimentos de onda 224, 235, 254, 296 nm e o quinto canal à obtenção do cromatograma com a programação simultânea dos quatro comprimentos de onda selecionados. Os comprimentos de onda e os respectivos intervalos programados são mostrados na TABELA 4.4.

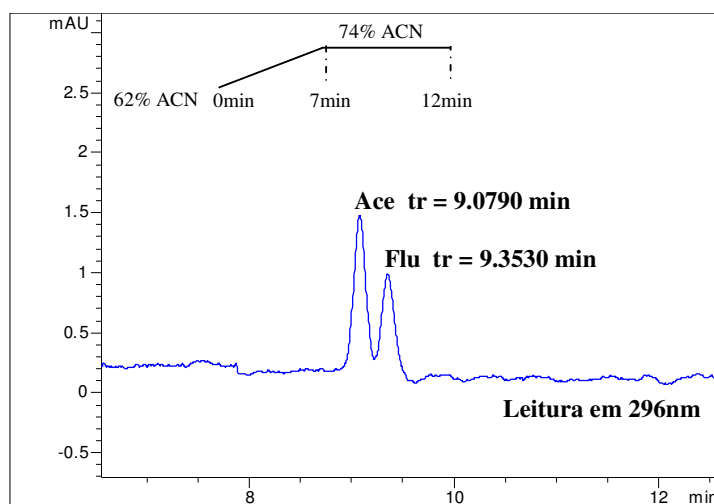


FIGURA 4.5: Gradiente utilizado e representação parcial do cromatograma obtido para a condição de separação mais adequada para o par acenafteno-fluoreno (ace-flu).

TABELA 4.1: Principais condições de gradiente testadas para a separação do par acenafteno e fluoreno e os respectivos parâmetros de separação obtidos.

Condição	*tr _a ace	tr _b flu	W _{1/2} (min) ace	W _{1/2} (min) flu	Resolução ¹	Simetria ² ace/flu
1	10,4910	10,6630	0,0852	0,0907	1,149	0,91/0,90
2	9,7100	10,0260	0,1683	0,1807	1,063	1,02/0,88
3	9,7250	10,0060	0,1539	0,1592	1,054	1,02/1,01
4	9,0790	9,3530	0,1400	0,1437	1,135	1,06/0,90
5	8,4250	8,6890	0,1365	0,1465	1,096	1,10/0,76
6	8,1340	8,4060	0,1365	0,1452	1,135	1,08/0,87
7	8,7310	8,9890	0,1393	0,1538	1,034	1,00/0,83

*W_{1/2} (min) largura a meia altura (50% da altura) expressa em minutos.

*tr: tempo de retenção do composto expresso em minutos.

TABELA 4.2: Principais condições de gradiente testadas para a separação do par benzo(g,h,i)perileno e indeno[c,d-1,2,3]pireno e os respectivos parâmetros de separação obtidos.

Condição nº	tr _a Ind	tr _b Bepe	W _{1/2(a)} (min) Ind	W _{1/2(b)} (min) Bepe	Resolução	Simetria Ind/Bepe
8	26,877	27,092	0,1625	0,2028	0,692	1,58/0,90
9	25,441	25,608	0,1615	0,1594	0,611	0,28/0,5
10	24,902	25,104	0,1517	0,1972	0,680	1,59/0,90
11	26,081	26,303	0,2021	0,1896	0,398	0,65/0,61

W_{1/2} (min) largura a meia altura (50% da altura) expressa em minutos.
tr: tempo de retenção do composto expresso em minutos.

A pequena separação obtida entre acenafteno e fluoreno (resolução 1,26) dificultou a programação do comprimento de onda para esta região do cromatograma. Para a determinação do acenafteno (Ace) foi escolhido o comprimento de onda de 254 nm minimizando-se assim a interferência do sinal do fluoreno (Flu) por ele apresentar menor absorvidade neste comprimento de onda. No entanto, para a determinação do fluoreno foi utilizado o sinal obtido no canal em 224 nm, comprimento de onda o qual observou-se uma sensibilidade consideravelmente maior que a apresentada pelo acenafteno (FIGURA 4.8).

O cromatograma originado a partir dos comprimentos de onda mais adequados é mostrado na FIGURA 4.9. Ao se utilizar a programação de comprimentos de onda de leitura do detector foi possível obter maior sensibilidade no sinal ao se comparar com a leitura em comprimento de onda fixo de 254 nm (FIGURA 4.9).

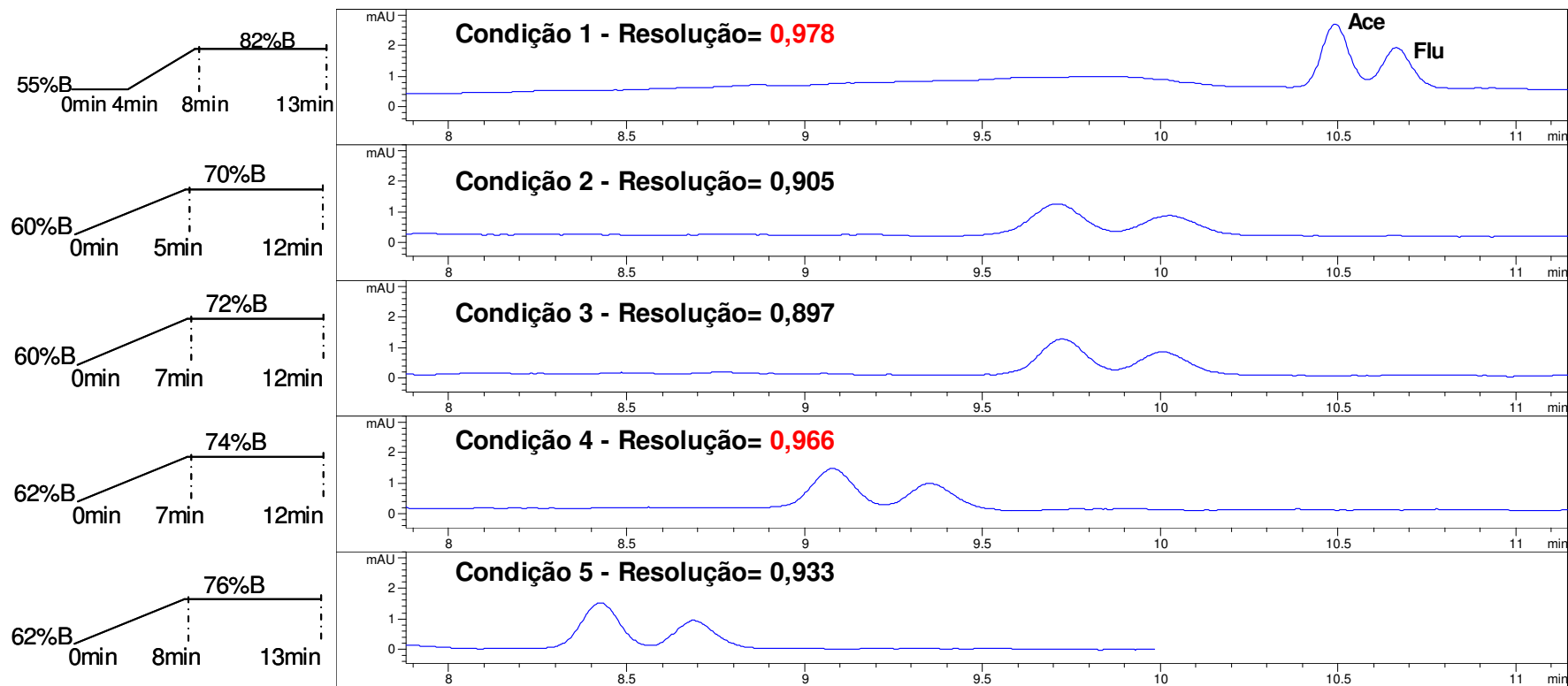


FIGURA 4.6: Condições de eluição por gradiente, cromatogramas obtidos e valores de resolução alcançados na separação dos compostos Ace/Flu. Leitura em $\lambda=296\text{nm}$ (TABELA 4.1).

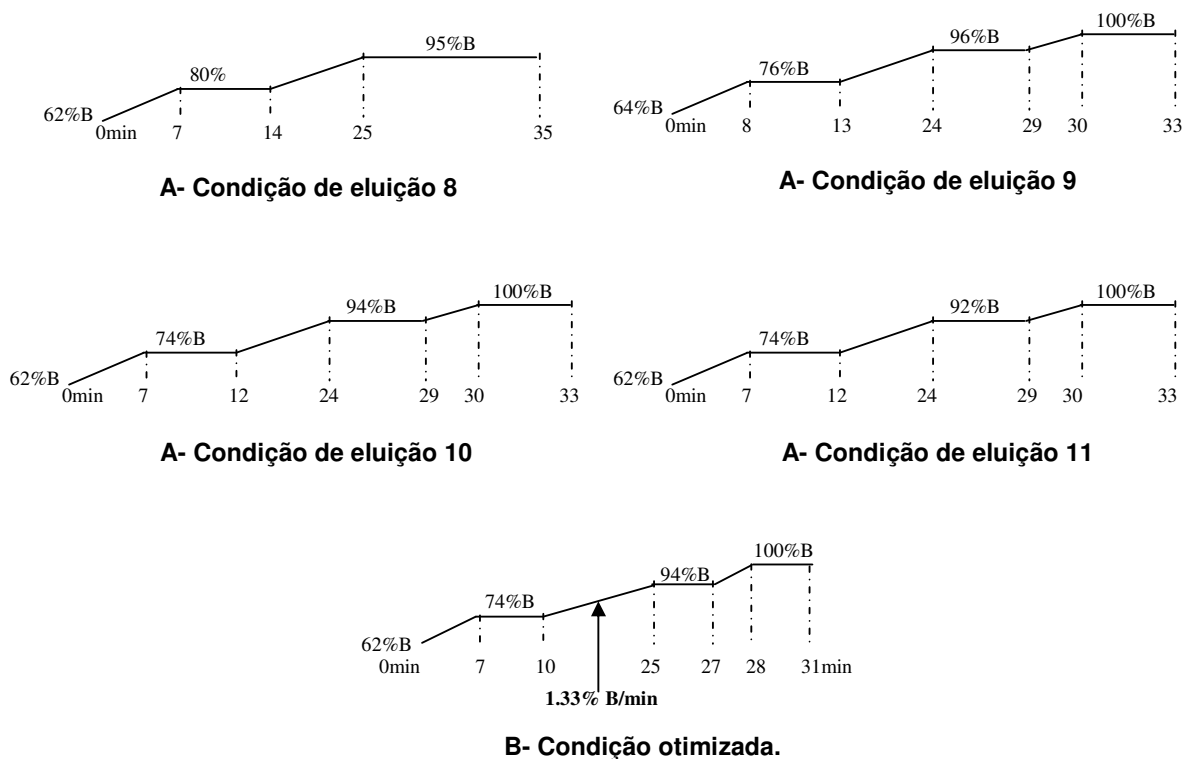


FIGURA 4.7: Adequação da programação dos tempos de gradiente de eluição para fase móvel água/ACN. A- Algumas condições testadas 3, B-Condição otimizada.

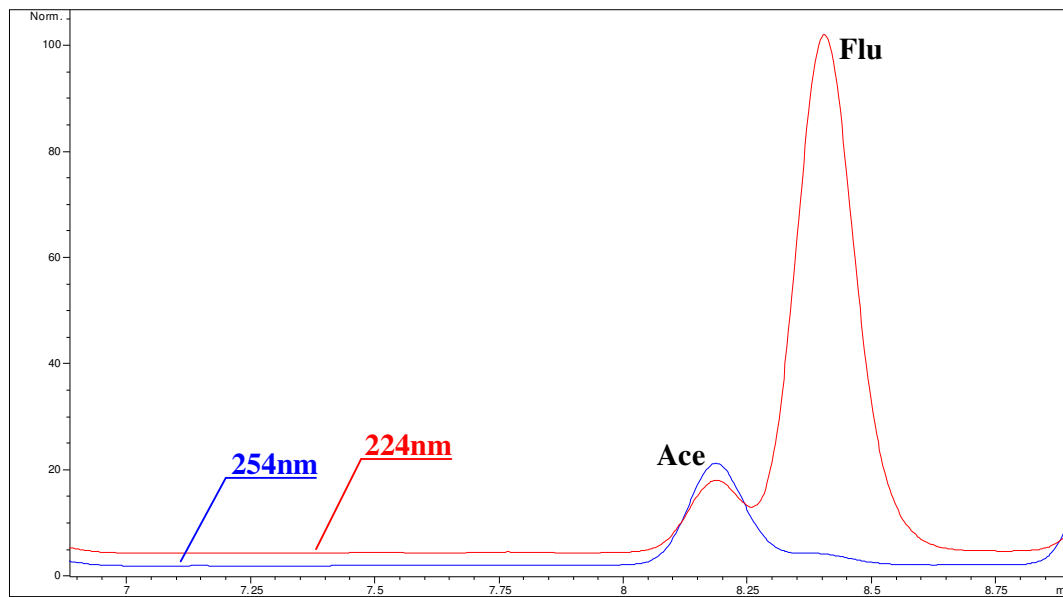


FIGURA 4.8: Comparação dos sinais obtidos para acenafteño e fluoranteno em 254 nm (canal A) e 224 nm (canal B).

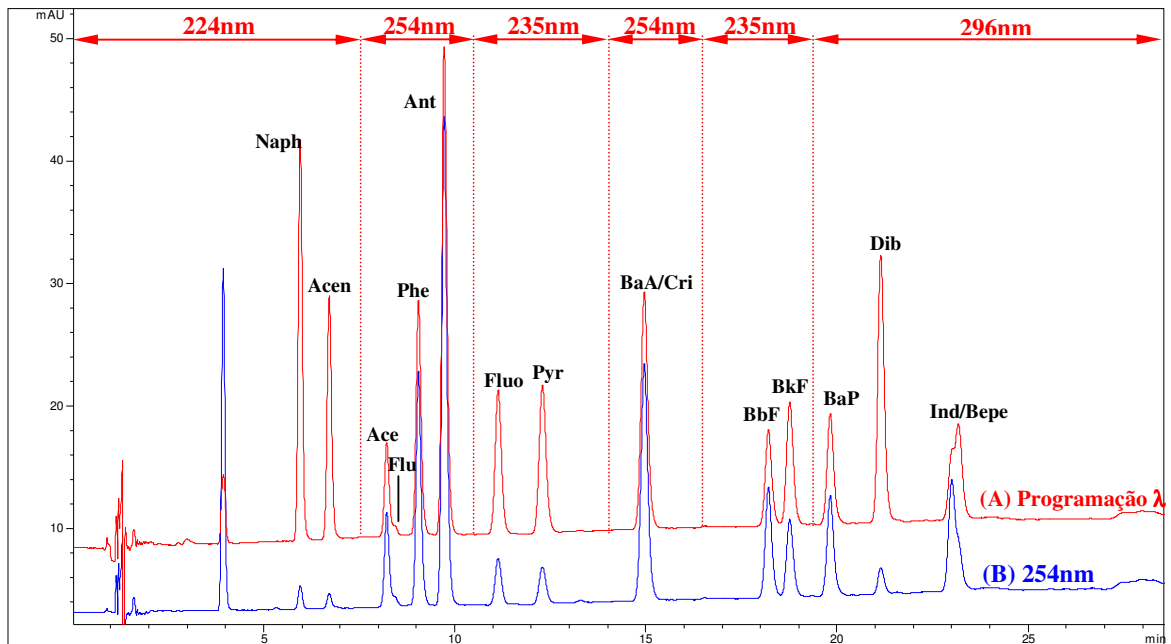


FIGURA 4.9: Cromatogramas obtidos para HPAs com programação dos comprimento de onda (A) e com detecção em 254 nm (B).

4.6 CONDIÇÃO OTIMIZADA PARA ANÁLISE NO HPLC

As condições finais empregadas para análise dos HPAs foram:

Coluna: Fase reversa octadecilsilano, C-18
(ZORBAX-ODS 150,0 mm x 4,6 mm I.D. e partículas de 5 µm)
Fase móvel: Água/acetonitrila
Fluxo: 1 mL·min⁻¹

TABELA 4.3: Gradiente otimizado.

% ACN inicial	Tempo inicial (min)	% ACN final	Tempo final (min)	Taxa (%·min ⁻¹)
62	0	74	7	1,71
74	7	74	10	
74	10	94	25	1,33
94	25	94	27	
94	27	100	28	6
100	28	100	31	

TABELA 4.4: Programação dos comprimentos de onda de leitura do detector.

Compostos eluídos no intervalo.	Intervalo (min)	Comprimento de onda (nm)
Naph, Acen	0 a 7,5	224
Ace, Flu, Phe, Ant.	7,5 a 10,5	254
Fluo, Pyr	10,5 a 14,0	235
BaA/Cri	14,0 a 16,4	254
BbF, BkF	16,4 a 19,3	235
BaP, Dib, Ind, Bepe.	19,3 a 31,0	296

Tempo total de análise: 31 min

A TABELA 4.5 apresenta os parâmetros cromatográficos e a respectiva ordem de eluição obtidos para análise dos 16 HPAs na condição final de análise.

Os valores de simetria variaram de 0,90 a 0,97 e mostraram-se em conformidade com a faixa de valores aceitáveis (0,9 a 1,3) descrita por SNYDER (1997). O número de pratos teóricos variou entre 18270 para Naph e 87277 para Dib enquanto os tempos de retenção situaram-se entre 6.13 (Naph) e 23.61 (Bepe) ao considerar todos os compostos estudados. Os fatores de retenção obtidos variaram de 2.61 (Naph) a 12,93 (Bepe), portanto são considerados adequados por se situarem entre 2 e 20 (SNYDER, 1997).

A resolução dos pares de compostos ficaram entre 0,63 para o par Ace/Flu e 10,09 para o par BaA-Cri/BbF.

Os compostos resolvidos, ao considerar valores de resolução maiores que a unidade ($R > 1$) foram: Acen, Ace, Flu, Phe, Ant, Fluo, Pyr, BbF, BkF, BaP e Dib. O composto Naph teve seu valor de resolução calculado em relação ao Acen (4,17) (TABELA 4.5), como não foi identificado nenhum pico com tempo de retenção inferior ao Naph a separação deste composto também foi considerada satisfatória. Os compostos que apresentaram resolução menor que a unidade ($R < 1$) Ind-Bepe e aqueles que coeluíram, BaA-Cri, não foram quantificados (SNYDER, 1997).

TABELA 4.5: Parâmetros de separação obtidos para os HPAs (Mix HPA 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

ANALITO	Tempo de retenção (min)	Fator de Retenção	Resolução	Simetria	Número de pratos Teóricos
Naftaleno	6,13	2,61	-	0,90	18270
Acenaftileno	6,91	3,08	4,17	0,90	20193
Acenafteno	8,51	4,02	7,85	0,97	25676
Fluoreno	8,78	4,18	1,26	0,93	26163
Fenantreno	9,35	4,52	2,55	0,93	25958
Antraceno	10,01	4,95	3,04	0,91	26210
Fluoranteno	11,57	5,83	5,44	0,90	24245
Pireno	12,83	6,57	4,06	0,90	25715
Benzo(a)Antraceno e Criseno	15,47	8,14	8,24	0,90	36802
Benzo(b)Fluoranteno	18,71	10,04	10,09	0,91	56646
Benzo(k)Fluoranteno	19,27	10,36	1,80	0,89	63459
Benzo(a)Pireno	20,35	11,00	3,50	0,95	68243
Dibenzo(a,h)antraceno	21,55	11,71	3,97	0,94	87277
Indeno[1,2,3-cd]pireno	23,40	12,80	6,26	1,27	98103
Benzo(g,h,i)perileno	23,61	12,93	0,63	0,87	62852

Resolução e simetria calculadas como indicado para as TABELAS 4.1 e 4.2.

4.7 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

4.7.1 CURVA ANALÍTICAS

Os gráficos (FIGURA 4.11A e B) das curvas analíticas para os 12 compostos resolvidos são mostrados conforme a ordem de eluição. Os gráficos representam a média dos valores de três curvas autênticas obtidas para cada composto. Neste caso foi preparada e injetada três replicas de cada nível de concentração da curva de calibração. Como critério para avaliação, as curvas

analíticas devem apresentar coeficientes de correlação $r \geq 0,9950$. Os coeficientes de correlação para os 12 compostos resolvidos variou entre 0,9963 (fluoreno) e 0,9981 (naftaleno). Cromatogramas das curvas analíticas são mostrado na FIGURA 4.10.

4.7.2 REPETIBILIDADE & REPRODUTIBILIDADE DO PROCEDIMENTO DE INJEÇÃO

Repetibilidade do procedimento de injeção (TABELA 4.6) foi avaliada através de cinco injeções consecutivas de uma das amostras (10,0000 g) fortificadas com 40,0 μL do MIX HPA 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Para a reprodutibilidade (TABELA 4.7) foram avaliados os resultados obtidos de injeções em 5 dias alternados de uma amostra fortificada. Com exceção dos compostos Ind e Bepe, os valores desvios-padrão relativos (DPR) obtidos variaram de 1,0₆% (Flu) a 3,2₃% (BkF) para o teste de repetibilidade e de 3,1₇% (Phe) a 7,9₀% (Flu) para o teste de reprodutibilidade. Os valores de concentração expressos nas tabelas referem-se a concentração da solução final obtida e injetada no cromatógrafo.

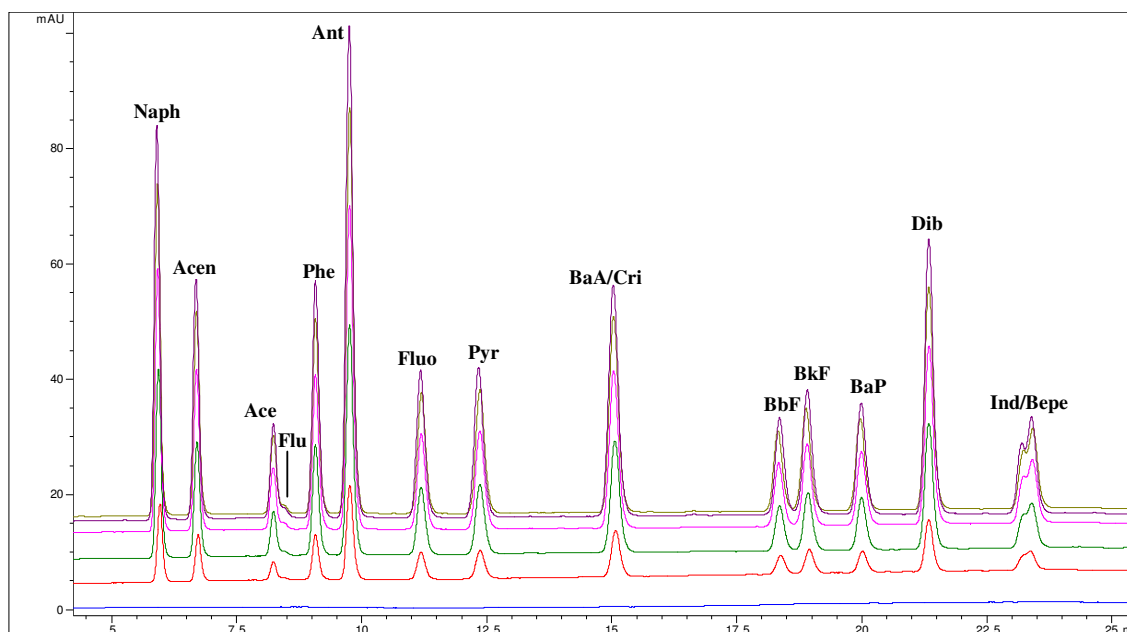


FIGURA 4.10: Cromatogramas das curvas analíticas obtidas nas concentrações de 0,00; 0,20; 0,40; 0,60 e 0,80 e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA.

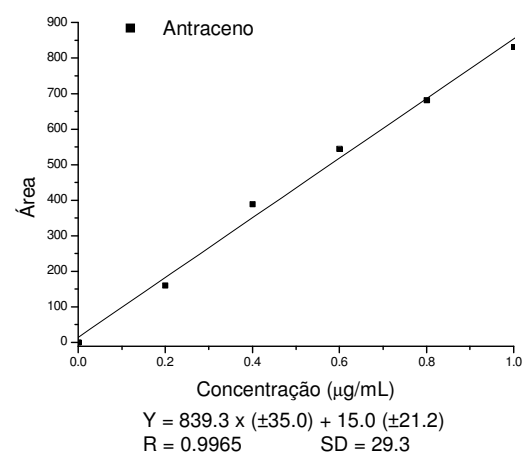
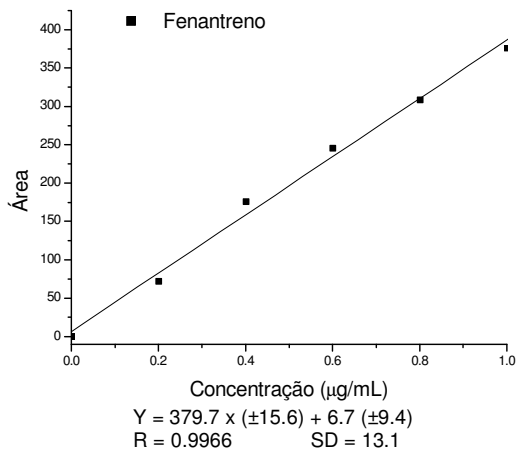
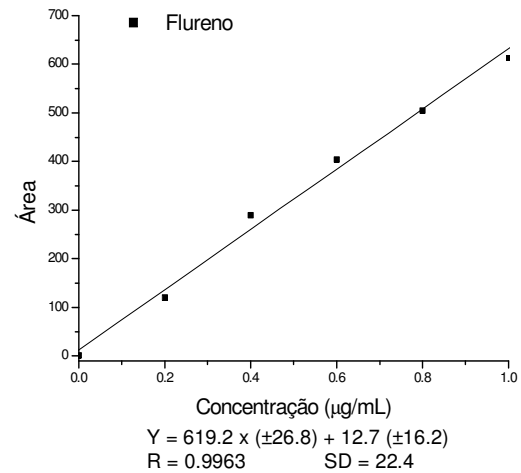
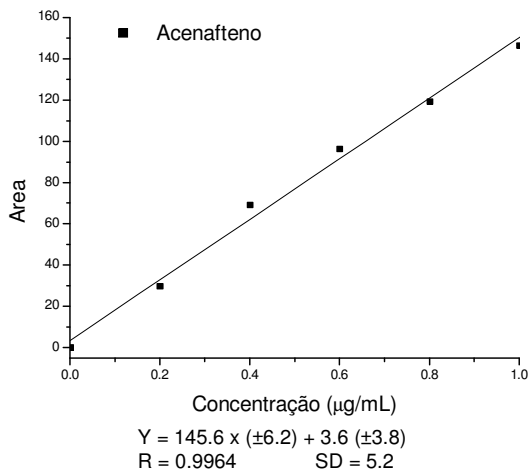
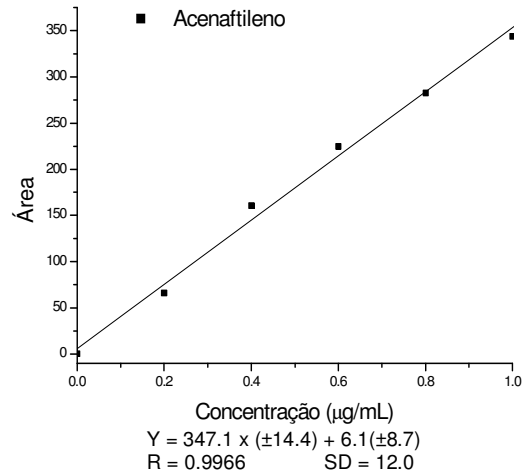
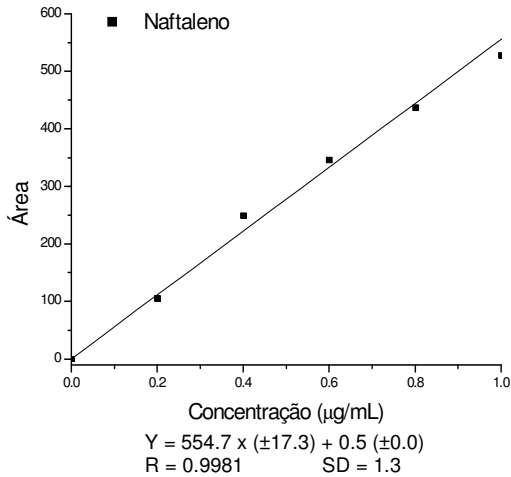


FIGURA 4.11-A: Curvas analíticas obtidas na condição otimizada para Naph, Acen, Ace, Flu, Phe e Ant. Todas as curvas foram preparadas em triplicata nas concentrações de $0,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $1,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA., sendo o primeiro ponto da curva o solvente empregado na diluição dos padrões.

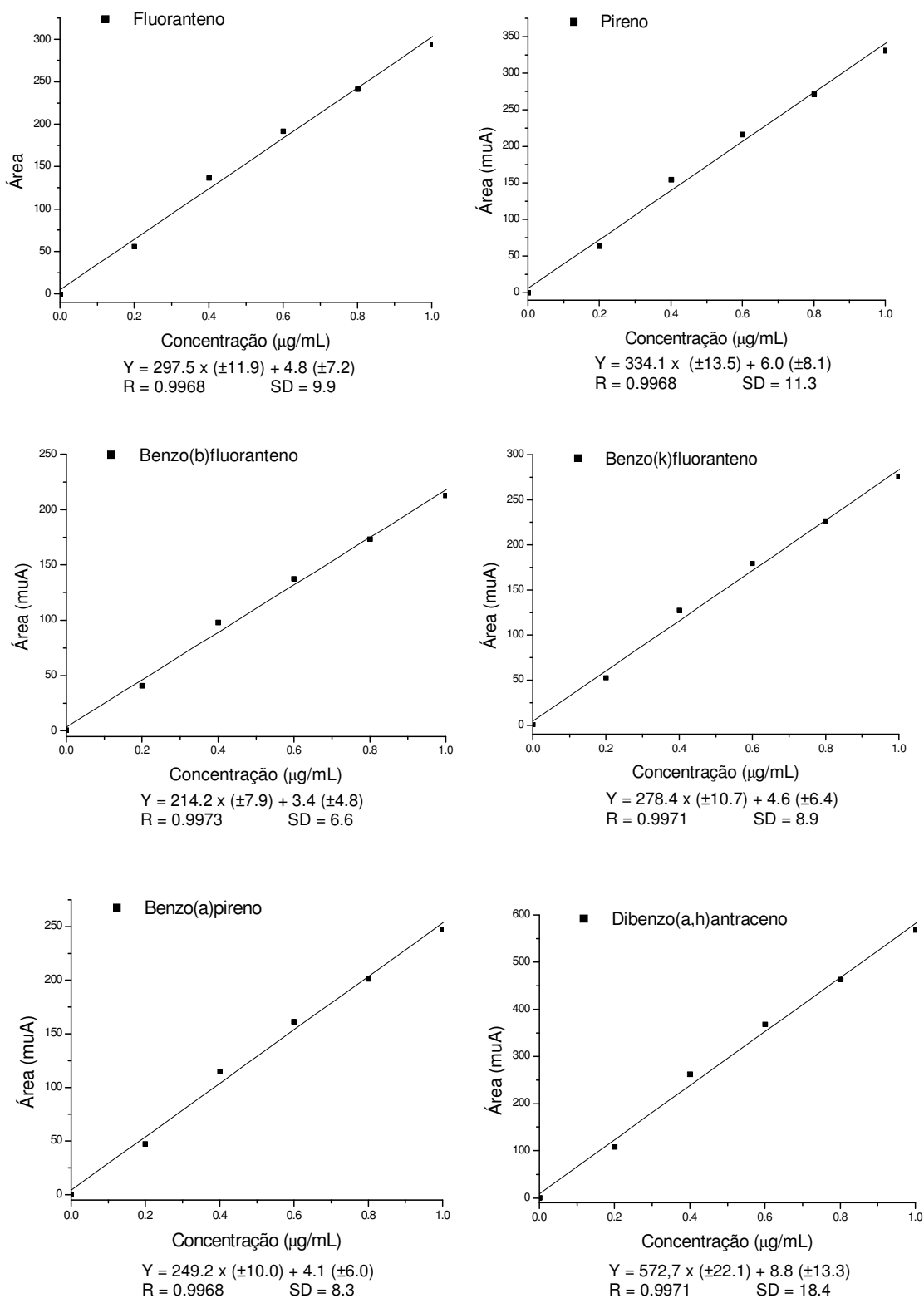


FIGURA 4.11-B: Curvas analíticas obtidas na condição otimizada para Fluo, Pyr, BbF, BkF, BaP e Dib. Todas as curvas foram preparadas em triplicata nas concentrações de 0,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 0,80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do Mix 16 HPA., sendo o primeiro ponto da curva o solvente empregado na diluição dos padrões.

TABELA 4.6: Teste para repetibilidade do procedimento de injeção obtido após cinco injeções consecutivas de uma amostra de sedimento fortificada com 0,80 µg de cada composto.

Analito	Concentração média Obtida (µg·mL ⁻¹)	Desvio-padrão	DPR (%)
Naftaleno	0,43	0,008	1,7 ₃
Acenaftileno	0,67	0,019	2,9 ₃
Acenafteno	0,63	0,014	2,1 ₆
Fluoreno	0,53	0,006	1,0 ₆
Fenantreno	0,68	0,013	1,8 ₆
Antraceno	0,65	0,010	1,5 ₂
Fluoranteno	0,65	0,019	2,9 ₁
Pireno	0,66	0,015	2,2 ₃
Benzo(a)Antraceno e Criseno	0,65	0,016	2,4 ₀
Benzo(b)Fluoranteno	0,64	0,015	2,3 ₀
Benzo(k)Fluoranteno	0,56	0,018	3,2 ₃
Benzo(a)Pireno	0,59	0,014	2,4 ₄
Dibenzo(a,h)antraceno	0,60	0,010	1,7 ₄
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,47	0,018	3,7 ₃
Benzo(g,h,i)perileno	0,55	0,019	3,5 ₅

DPR, desvio padrão relativo.

TABELA 4.7: Resultados do teste de reprodutibilidade da injeção para a amostra fortificada com 0,80 µg de cada composto.

ANALITO	Concentração média Obtida (µg·mL ⁻¹)	Desvio-padrão	DPR (%)
Naftaleno	0,33	0,014	4,2 ₃
Acenaftileno	0,57	0,040	7,0 ₆
Acenafteno	0,56	0,022	3,9 ₄
Fluoreno	0,50	0,040	7,9 ₀
Fenantreno	0,63	0,020	3,1 ₇
Antraceno	0,63	0,028	4,4 ₄
Fluoranteno	0,67	0,036	5,3 ₂
Pireno	0,66	0,031	4,7 ₂
Benzo(a)Antraceno e Criseno	0,65	0,043	6,6 ₃
Benzo(b)Fluoranteno	0,67	0,037	5,5 ₃
Benzo(k)Fluoranteno	0,64	0,036	5,5 ₃
Benzo(a)Pireno	0,57	0,026	4,6 ₃
Dibenzo(a,h)antraceno	0,57	0,038	6,7 ₀
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,42	0,085	19,7
Benzo(g,h,i)perileno	0,52	0,040	7,6 ₉

DPR, desvio padrão relativo.

4.8 CROMATOGRÁFIA EM COLUNA APÓS TRATAMENTO ALCALINO DO EXTRATO POR 1 HORA E TRATAMENTO ALCALINO NA COLUNA DE SÍLICA.

As análises destes testes foram executadas em coluna de fase reversa octilsilano, C-8 (XDB-OS 4,6 mm x 150 mm x 5 µm). O método de separação empregados nestes estudos foi desenvolvido anteriormente neste laboratório para sete dos 16 compostos estudados: Naph, Fluo, BaA, BbF, BkF, BaP e Ind. A separação empregou eluição por gradiente em 20 minutos.

O uso de cromatografia em coluna após tratamento alcalino do extrato por 1 hora (item 3.8.2) e o tratamento alcalino na coluna sílica (item 3.8.3) não se mostraram eficientes na análise das amostras por apresentarem maiores perdas que o procedimento em que se utiliza hidrólise com 6 h de duração.

Como estes dois procedimentos citados não foram eficazes, foram utilizados dois outros procedimentos nos testes com amostras fortificadas: cromatografia em coluna após tratamento alcalino do extrato por 6h e cromatografia em coluna sem tratamento alcalino do extrato.

4.9 CALIBRAÇÃO DA COLUNA DE CROMATOGRÁFIA PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS & MOE

4.9.1 TESTE PARA ELUIÇÃO DOS COMPOSTOS

Um estudo realizado com a adição de quantidade conhecida da mistura padrão à coluna de sílica apresentou bons resultados quanto à recuperação após a sua eluição com uma mistura n-hexano/diclorometano (8:2) usada para o tratamento dos extratos. Neste teste observou-se que todos estes compostos eram recolhidos numa primeira fração de 12mL de forma que não foram detectados na segunda e terceira frações de 3mL e 1mL respectivamente. Como ainda havia a possibilidade serem eluídos compostos na segunda fração em quantidade não detectável, por segurança, 2/3 do volume da segunda fração foram somados ao volume da primeira fração de 12mL, totalizando portanto 14mL como o volume da primeira fração a ser recolhida.

Ao analisar uma primeira fração recolhida de 14mL foram obtidos percentuais de recuperação entre 88,5 % (acenafteno) e 99,7% (fenanteno) com

uma média de 93,1% (FIGURA 4.12). Nenhum composto foi detectado nas frações restantes de 3mL, 1mL e nem no branco da coluna.

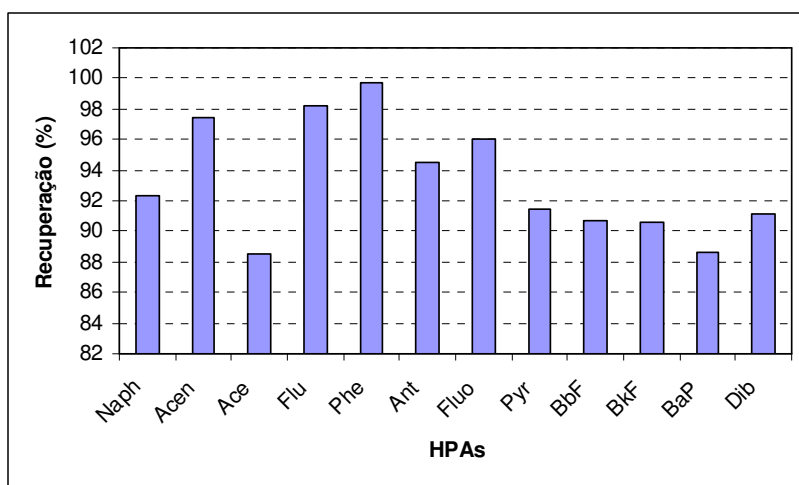


FIGURA 4.12: Recuperação dos analitos eluídos na primeira fração (14 mL) na coluna de sílica/sulfato de sódio.

4.9.2 TESTE PARA ELUIÇÃO DA MOE

Exatamente 10 % do extrato concentrado obtido da amostra 10 foi retirado para determinar o teor de MOE e os 90 % restantes foram novamente concentrados no evaporador rotativo e eluídos na coluna de sílica/sulfato de sódio com mistura de n-hexano/diclorometano (8:2). As frações foram recolhidas de 2 em 2 mL em recipientes previamente pesados. A FIGURA 4.13 mostra o percentual da matéria orgânica extraída obtida em cada fração recolhida.

Ao considerar a massa total pesada da amostra, o percentual de matéria orgânica extraída foi de 0,0707 % (0,0063 g). As condições de eluição permitiram que 92 % do total da matéria orgânica adicionada à coluna ficasse retida no leito adsorvente até os primeiros 14 mL recolhidos. Desta maneira apenas cerca de 7,9 % da MOE da amostra foi injetada no cromatógrafo.

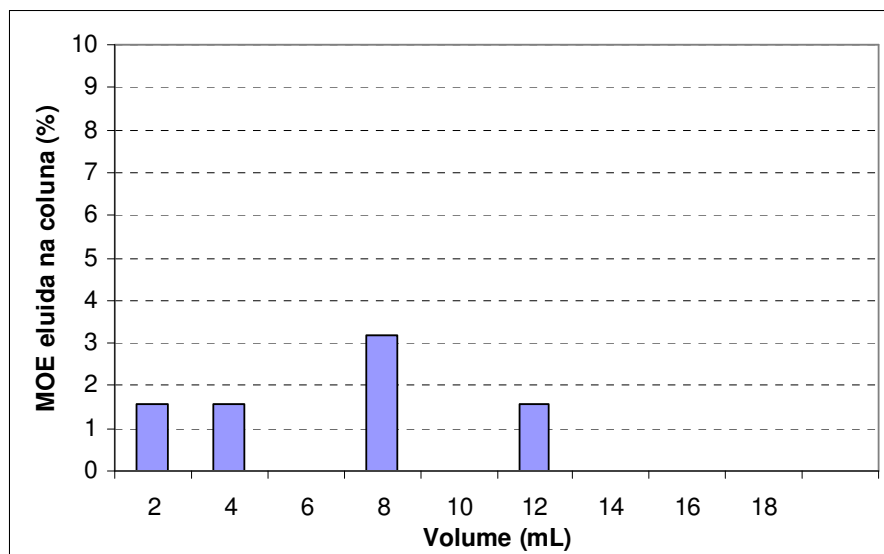


FIGURA 4.13: Percentagem da MOE adicionada à coluna (sílica/sulfato de sódio) eluída com mistura n-hexano/diclorometano (8:2).

4.10 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

4.10.1 ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE AMOSTRAS FORTIFICADAS.

A uma massa de cerca de 5,0000 g da amostra 10 foi adicionada de 40 μL do MIX HPA-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e em seguida esta amostra fortificada foi submetida ao procedimento de extração por ultra-som por diferentes técnicas, conforme a TABELA 4.8. A análise das amostras por HPLC foi realizada nas condições finais otimizadas para a quantificação de 12 dos 16 compostos estudados, relacionados no item 4.6, conforme êxito obtido no procedimento de separação cromatográfica.

Antes dos procedimentos de fortificação a amostra 10 foi analisada em duplicata, sem fortificação, para que se conhecesse seus níveis de concentração de HPAs. Estas análises foram realizadas utilizando-se dos métodos de extração seguida de centrifugação do extrato, extração em cadinho de Gooch e extração em cadinho de Gooch seguida de hidrólise alcalina do extrato. As amostras de sedimento sem fortificação apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método para todos os compostos estudados.

Os resultados obtidos nestes testes realizados em duplicata são mostrados na TABELA 4.9. Ao comparar os resultados obtidos para as amostras fortificadas, alguns motivos fundamentam a escolha do método que emprega a extração no

ultra-som seguida de centrifugação do extrato. Tanto os valores individuais quanto a média da recuperação (84,4 %) dos analitos para a amostra extraída por esta técnica foram satisfatórios. Além disto, o percentual de recuperação das amostras extraídas seguida de centrifugação apresentou o menor desvio padrão relativo (22 %) ao considerar as médias de recuperação entre compostos. Demonstrando menor dispersão dos valores entre os compostos analisados. O volume total de solvente empregado neste método também foi o menor utilizado, sendo 30mL, em contraste com os 81mL usados na técnica do cadinho de Gooch.

Portanto a aplicação do método onde se utilizou a centrífuga gerou menos resíduos por necessitar de menor quantidade de solvente, 30mL, trouxe portanto uma maior economia para o processo, tanto de solvente, quanto de tempo para a primeira etapa de concentração no evaporador rotativo.

Este melhor desempenho foi confirmado ao se analisar os resultados obtidos ao extrair o branco fortificado em duplicata para cada método. O método ao qual se empregou a centrifugação do extrato apresentou menores valores de desvio padrão relativo (DPR) quando comparados aos obtidos para o método em que se empregou o Cadinho de Gooch (TABELA 4.10). Portanto, ao considerar os critérios de qualidade estabelecidos conforme descrito no item 3.12.3, o DPR para o branco fortificado do laboratório (BFL) apresentou valores abaixo de 30 % com variação entre 1 e 17 %. O branco do laboratório não apresentou nenhum pico coincidente com os tempos de retenção dos compostos estudados.

Portanto, o método escolhido foi o da extração no ultra-som seguida da centrifugação do extrato, sem o emprego de hidrólise alcalina. Para confirmar os valores de recuperação obtidos nos testes realizados em duplicata, partimos para o teste de recuperação feito com 6 replicas, contudo aumentando-se a massa da amostra para 10,0000 g já que nenhum composto foi quantificado na extração de de 5,0000 g da amostra.

4.10.2 TESTE DE RECUPERAÇÃO PARA AMOSTRA FORTIFICADA

O teste de recuperação foi realizado para a amostra 10 em 6 replicas, mediante a adição de 40 μL de solução MIX HPA-20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o que corresponde à adição de 0,80 μg de cada um dos 16 HPAs distribuídos em 10,0000 g da amostra. Foram analisadas 6 replicas desta amostra sem adição de padrão,

sendo que nenhum dos compostos pesquisados foi detectado (concentração < LDM). Os resultados obtidos neste experimento são apresentados na TABELA 4.11.

A matriz adicionada deve conter 80% dos analitos com recuperação entre 50 e 120% (item 3.12.3). A recuperação média obtida para cada compostos entre as amostra fortificada e duplicata analisadas variaram de 50,9 (Naph) a 91,6 % (Flu) (FIGURA 4.14). Os valores de recuperação média variaram de 73,6 % a 91,6% enquanto que o conteúdo recuperado médio foi de 81,9 % para 11 dos 12 compostos resolvidos, com exceção do Naph.

4.10.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PARA O MÉTODO

Os valores dos limites de detecção do método (LDM) e limite de quantificação do método (LQM), conforme procedimento de extração pormenorizado a seguir (item 4.12), foram calculados para matriz de sedimento através da fortificação de 10 g de amostra com 0,40 µg de cada HPA estudado. Os resultados obtidos estão dispostos na TABELA 4.12. Os valores de LDM variaram entre 0,004 µg·g⁻¹ e 0,006 µg·g⁻¹ enquanto os valores de LQM variaram de 0,013 µg·g⁻¹ a 0,020 µg·g⁻¹. Com exceção do Dib, todos os compostos apresentaram LQM abaixo dos respectivos valores de *probable effect levels* (PEL) (TABELA 1.1). Portanto, os valores de LQM alcançados demonstram-se adequados para determinação de HPAs em amostras de sedimentos.

TABELA 4.8: Testes das condições de extração empregando amostra 10 e branco.

	Branco	Branco fortificado e duplicata	Branco fortificado e duplicata	Amostra e duplicata	Amostra e duplicata	Amostra e duplicata
Método de extração	Cadinho de Gooch	Tubo de centrífuga	Cadinho de Gooch	Tubo de centrífuga	Cadinho de Gooch	Cadinho de Gooch
Volume de solvente*	3x27mL	3x10 mL	3x27mL	3x10mL	3x27mL	3x27mL
Hidrólise alcalina 6h	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Matriz	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10

*Mistura de solvente utilizado na extração: Metanol/diclorometano (1:1)

Continuação da TABELA 4.8.

	Amostra fortificada E duplicata	Amostra fortificada e duplicata	Amostra fortificada e duplicata
Método de extração	Tubo de centrífuga	Cadinho de Gooch	Cadinho de Gooch
Volume de solvente*	3 x 10mL	3x27mL	3x27mL
Hidrólise alcalina 6h	Não	Não	Sim
Matriz	Amostra 10	Amostra 10	Amostra 10

*Mistura de solvente utilizado na extração: Metanol/diclorometano (1:1)

TABELA 4.9: Avaliação dos métodos de Extração - Percentual de recuperação obtidos para extração das amostras fortificadas

Composto.	Recuperação (%) dos Métodos para extração amostra e amostra fortificada								
	Centrífuga			Cadinho			*Cadinho hidrólise		
	A	B	Média	A	B	Média	A	B	Média
Naph	95,5	23,6	59,5	54,2	30,5	42,4	18,7	22,5	20,6
Acen	117,1	42,4	79,7	71,4	50,3	60,9	50,6	45,5	48,1
Ace	96,9	54,8	75,8	86,6	56,5	71,5	69,8	60,4	65,1
Flu	100,1	34,0	67,0	98,6	43,4	71,0	51,9	47,7	49,8
Phe	128,9	68,6	98,7	76,2	55,7	66,0	99,0	101,7	100,3
Ant	90,6	77,6	84,1	87,5	74,3	80,9	97,4	80,3	88,9
Fluo	99,5	129,8	114,7	107,4	102,4	104,9	110,6	114,8	112,7
Pyr	96,9	102,4	99,6	104,4	100,3	102,1	109,0	113,6	111,3
BbF	89,4	138,8	114,1	103,2	104,2	103,7	110,0	123,3	116,7
BkF	87,1	106,5	96,8	102,0	102,8	102,4	114,0	126,9	120,4
BaP	79,2	106,7	93,0	82,6	81,5	82,1	81,1	104,8	93,0
Dib	79,5	76,0	77,7	81,3	83,7	82,5	94,8	111,4	103,1
Média	-	-	88,4	-	-	80,9	-	-	85,8
Desvio-padrão	-	-	17,4	-	-	19,8	-	-	32,3
DPR (%)	-	-	22	-	-	24	-	-	31

Centrífuga: amostras em duplicata A e B extraídas pelo método de extração seguido de centrifugação, sem uso de hidrólise alcalina.

Cadinho: amostras em duplicata A e B extraídas pelo método com cadinho de Gooch, sem hidrólise alcalina.

Cadinho hidrólise: amostras em duplicata A e B extraídas pelo método com cadinho de Gooch, com hidrólise alcalina.

DPR: desvio padrão relativo.

TABELA 4.10: Avaliação dos métodos de Extração - Percentual de recuperação obtidos para extração do branco e branco fortificado.

ANALITO	Recuperação (%) dos Métodos para extração do branco e branco fortificado									
	Centrífuga		Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Cadinho		Média	Desvio Padrão	DPR (%)
	A	B				A	B			
Naph	72,8	74,2	73,5	1,0	1	20,2	37,5	28,8	12,2	42
Acen	80,6	82,9	81,8	1,6	2	80,4	48,2	64,3	22,7	35
Ace	81,9	86,1	84,0	3,0	4	20,8	59,1	39,9	27,1	68
Flu	82,9	88,8	85,9	4,2	5	112,1	80,9	96,5	22,1	23
Phe	87,7	99,9	93,8	8,7	9	54,5	92,2	73,4	26,7	36
Ant	81,8	87,9	84,9	4,3	5	47,3	55,2	51,2	5,6	11
Fluo	80,7	93,5	87,1	9,1	10	79,0	55,2	67,1	16,8	25
Pyr	80,9	94,3	87,6	9,49	11	80,5	56,1	68,3	17,3	25
BbF	78,6	98,2	88,4	13,9	16	90,7	55,5	73,1	24,9	34
BkF	80,3	99,4	89,9	13,6	15	90,4	56,0	73,2	24,3	33
BaP	82,3	105,0	93,7	16,1	17	85,5	57,5	71,5	19,8	28
Dib	81,3	99,5	90,4	12,9	14	91,2	56,2	73,7	24,8	34
Média	-	-	86,8	8,1	9	-	-	65,1	20,3	33

Centrífuga: amostras em duplicata A e B extraídas pelo método de extração seguido de centrifugação, sem uso de hidrólise alcalina.

Cadinho: amostras em duplicata A e B extraídas pelo método com cadinho de Gooch, sem hidrólise alcalina.

DPR: desvio padrão relativo.

TABELA 4.11: Percentual de recuperação (%) obtidos para teste com amostra 10 fortificada com 0,80µg de cada padrão de HPA.

Composto	Recuperação (%) das mostras fortificada						Média	Desvio padrão	DPR ¹
	A	B	C	D	E	F			
Naph	56,6	59,1	48,9	46,6	43,6	50,6	50,9	5,9	11,6
Acen	79,1	83,7	74,5	70,9	73,4	74,8	76,1	4,6	5,9
Ace	88,1	90,8	82,2	83,3	70,6	74,7	81,7	7,7	9,4
Flu	103,1	98,2	86,4	86,8	81,7	93,2	91,6	8,1	8,8
Phe	90,8	95,6	94,5	86,9	80,0	79,2	87,8	7,1	8,0
Ant	80,0	82,5	81,6	78,3	82,3	81,7	81,0	1,6	2,0
Fluo	82,0	84,4	85,3	83,1	89,9	89,6	85,7	3,3	3,9
Pyr	82,4	83,9	84,9	82,3	86,9	85,5	84,3	1,8	2,2
BbF	86,3	88,1	86,9	74,9	88,5	85,2	85,0	5,1	6,0
BkF	84,0	84,2	83,8	79,0	82,9	81,2	82,5	2,0	2,5
BaP	74,4	73,1	74,7	71,1	73,8	74,8	73,6	1,4	1,9
Dib	74,8	75,8	75,2	74,5	78,9	78,8	76,3	2,0	2,6

¹DPR: desvio padrão relativo

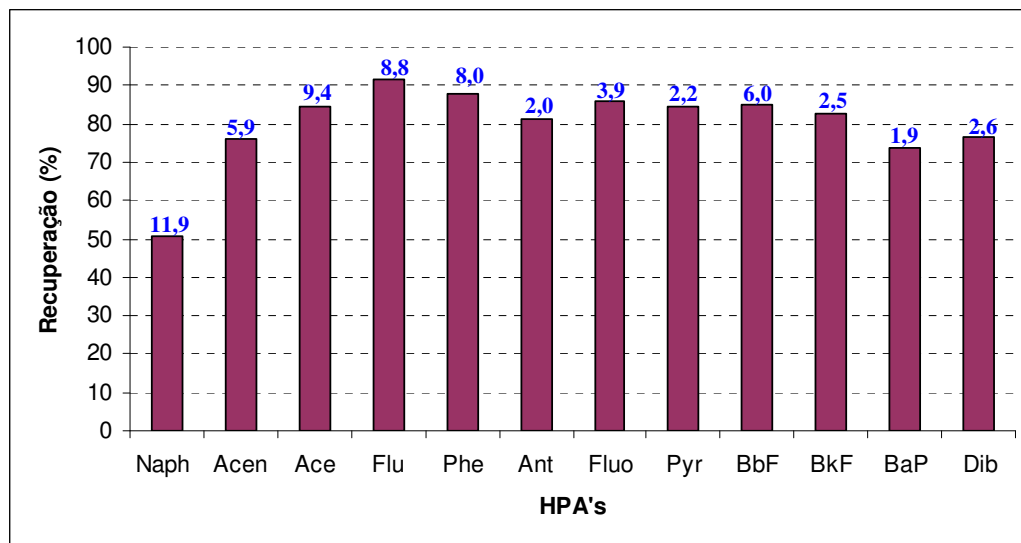


FIGURA 4.14: Percentual de recuperação média e desvio padrão (acima da barra) para a amostra 10 fortificada - método extração em ultra-som seguida de centrifugação do extrato.

4.10.4 REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

A extração de uma mesma amostra repetidas vezes em um mesmo dia mostrou-se repetível ao considerar o nível de fortificação de 0,80µg de cada HPA em 10,0000g de amostra. Os valores de desvio padrão mostraram-se adequados conforme discutido no item 4.10.2.

A reprodutibilidade do método mostrou-se adequada à medida que foram obtidos percentuais de recuperação semelhantes, em dias diferentes e em diferentes níveis de fortificação testados, 0,80 µg e 0,40 µg para 10,0000g da amostra 10 (TABELA 4.13). O desvio padrão relativo para 10,0000 g de amostra fortificada com 0,40 µg em variou entre 4,0% (Pyr) a 9,9% (Naph) com um percentual médio de recuperação de 73,7 % ao considerar os 12 compostos separados. Para a amostra fortificada com 0,80 µg o desvio padrão variou de 1,9 % (BaP) a 11,6 %(Naph), atingindo-se um percentual médio de recuperação de 79,7% ao considerar todos 12 os compostos quantificados.

4.11 PERCENTUAL DA MATÉRIA ORGÂNICA EXTRAÍDA (%MOE)

Os resultados obtidos para determinação da matéria orgânica extraída (MOE) para as amostras de sedimento são apresentados na FIGURA 4.15 e para solo na FIGURA 4.16. Os valores de MOE (% m/m) variaram de 0,0001% a 0,0026% para sedimento e de 0,0005% a 0,0009% para solo. Os valores de MOE% para as amostras de sedimento 12, 13 e 14; 0,0020%, 0,0021% e 0,0026% respectivamente, são consideravelmente maiores que a média (0,0009%). O valor de MOE obtido para o branco da coleta de solo e branco da coleta de sedimento foi de 0,0001% para ambos.

TABELA 4.12: Resultados da extração da amostra de sedimento fortificada (0,40 µg em 10g de sedimento) e limites de detecção e quantificação do método para os 12 HPAs quantificados expressos em µg·g⁻¹ de sedimento seco.

Composto	Réplicas da amostra 10 fortificada (µg·g ⁻¹ peso seco)						Desvio padrão	LDM (µg·g ⁻¹ peso seco)	LQM (µg·g ⁻¹ peso seco)
	1	2	3	4	5	Média			
Naph	0,018	0,014	0,018	0,015	0,017	0,016	0,002	0,005	0,016
Acen	0,025	0,022	0,025	0,024	0,026	0,024	0,001	0,004	0,014
Ace	0,032	0,030	0,034	0,032	0,034	0,033	0,002	0,006	0,019
Flu	0,025	0,022	0,027	0,023	0,025	0,024	0,002	0,006	0,020
Phe	0,037	0,035	0,034	0,036	0,039	0,036	0,002	0,006	0,019
Ant	0,029	0,027	0,030	0,027	0,032	0,029	0,002	0,006	0,020
Fluo	0,033	0,035	0,033	0,035	0,038	0,035	0,002	0,006	0,020
Pyr	0,032	0,033	0,033	0,032	0,036	0,033	0,001	0,004	0,013
BbF	0,032	0,035	0,037	0,035	0,036	0,035	0,002	0,006	0,019
BkF	0,031	0,034	0,036	0,033	0,035	0,034	0,002	0,006	0,019
BaP	0,030	0,029	0,031	0,029	0,034	0,031	0,002	0,006	0,019
Dib	0,030	0,031	0,030	0,030	0,034	0,031	0,002	0,006	0,019

LDM: Limite de detecção do método.

LQM: Limite de quantificação do método.

TABELA 4.13 Comparação entre a recuperação alcançada ao se fortificar 10g de sedimento com 0,40 µg e 0,80 µg.

HPA	Percentual de recuperação alcançado para fortificação em dois níveis de concentração para 10g de sedimento.			
	0,40 µg		0,80 µg	
	Média n=5	DPR ¹	Média n=6	DPR ¹
Naftaleno	39,3	9,9	50,9	11,6
Acenaftileno	57,8	5,8	76,1	5,9
Acenafteno	77,6	5,8	81,7	9,4
Fluoreno	87,5	8,3	91,6	8,8
Fenantreno	87,3	5,3	87,8	8,0
Antraceno	68,0	7,0	81,0	2,0
Fluoranteno	82,1	5,8	85,7	3,9
Pireno	79,3	4,0	84,3	2,2
Benzo(b)Fluoranteno	82,2	5,5	85,0	6,0
Benzo(k)Fluoranteno	79,1	5,7	82,5	2,5
Benzo(a)Pireno	71,4	6,2	73,6	1,9
Dibenzo(a,h)antraceno	72,8	6,1	76,3	2,6
Média	73.7	6.3	79.7	5.4

¹DPR: Desvio padrão relativo.

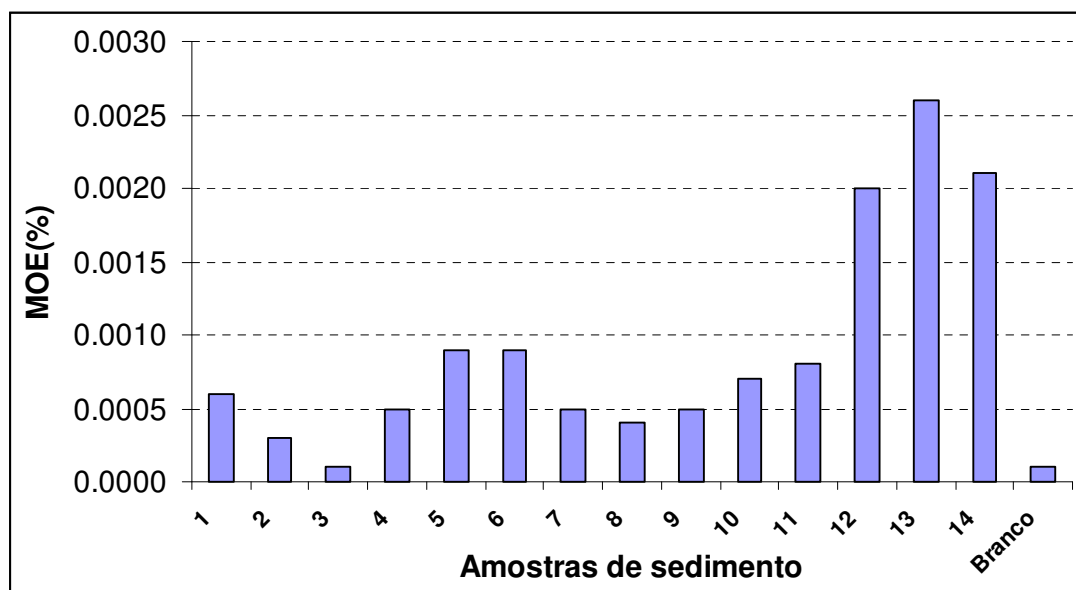


FIGURA 4.15: Percentual da matéria orgânica extraída das 14 amostras de sedimento e do branco da coleta (branco).

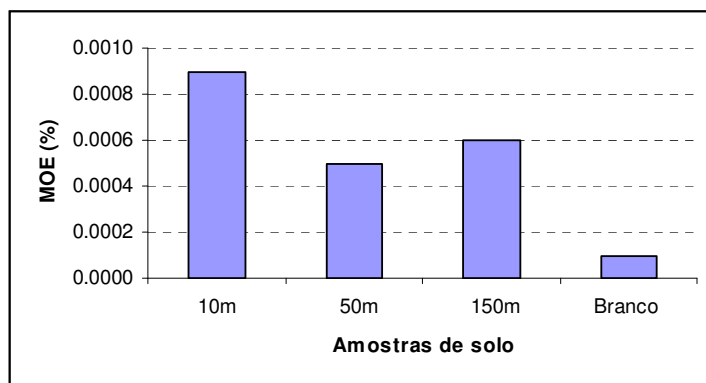


FIGURA 4.16: Percentual da matéria orgânica extraída das 3 amostras de solo coletadas a 10m, 50m e 150m de distância da rodovia e do branco da coleta.

4.12 TÉCNICA OTIMIZADA PARA EXTRAÇÃO DE HPAs EM SOLOS E SEDIMENTOS

Extração e tratamento dos extratos: foram pesados 10 g de solo/sedimento num frasco de vidro e em seguida foram adicionados 10mL da mistura metanol:diclorometano (1:1). Os frascos foram fechados e levados ao ultra-som por 30 minutos. Terminada a aplicação do ultra-som, os extratos foram recolhidos com auxílio de pipeta Pasteur para tubos de centrífuga. A extração foi feita em três etapas com combinação dos extratos, perfazendo um total de 30mL extrato por amostra. O extrato obtido foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e o líquido sobrenadante recolhido para um balão.

Procedeu-se então à redução de volume dos extratos até 10 mL em evaporador rotativo com banho termostatizado entre 50°C a 55°C. Deste volume foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para recipientes de alumínio para determinação da matéria orgânica extraída. A outra porção do extrato (9 mL) foi concentrada a cerca de 1 mL e reservada para a cromatografia em coluna.

Os extratos foram tratados por cromatografia de adsorção em coluna (0,5 cm de diâmetro interno e torneira de teflon) contendo leito de 2,00 g de sílica desativada a 5%. Os extratos (1 mL) foram então eluídos com 14 mL de uma mistura n-hexano:diclorometano (8:2), sendo recolhidos num balão e levados a etapa final de redução de volume e troca do solvente no evaporador rotativo. O extrato concentrado foi transferido para balão volumétrico de 1 mL e o volume

completado com metanol. As amostras foram então injetadas no HPLC. Após a análise as amostras foram armazenadas em ampolas de vidro âmbar.

A seqüência de testes propostos buscou uma melhor adaptação do esquema analítico buscando a redução do gasto de solvente, maior rapidez no processo e a separação de possíveis interferentes na análise. A FIGURA 4.17 apresenta o fluxograma da metodologia de extração otimizada.

4.13 RESULTADOS E AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DO COLETOR

O coletor desenvolvido com materiais reciclados e de baixo custo, construído conforme item 3.4.1, permitiu a escolha da profundidade de coleta, de 5 a 10 cm, devido à possibilidade de ajuste do limitador de profundidade (FIGURA 3.1-A). Vale salientar que marcações de profundidades com dimensões maiores que 10 cm podem ser grafadas na superfície externa do tubo sem, contudo se alterar os detalhes construtivos do conjunto.

O manuseio do equipamento durante a coleta foi rápido, obtendo-se como resultado quantidades de sedimento suficientes para diversas análises e testes preliminares.

A possibilidade de se retirar o sedimento ainda coeso, mesmo após a extrusão (FIGURA 3.2-D), possibilitou uma medição mais detalhada da profundidade real a ser recolhida de amostra. Tal característica se demonstrou reprodutível durante as 56 manobras de coleta de sedimento realizadas (4 para cada uma das 14 amostras de sedimento).

O tipo de construção usada permite-se se desmontar todo o sistema da haste, limitador de profundidade e extremidade dá pá (FIGURA 3.2) de modo a facilitar os procedimentos de limpeza e descontaminação prévia do equipamento. O coletor não apresentou danos ao longo do uso, nem houve a necessidade de substituição de peças, portanto pode-se dizer que sua estrutura apresentou resistência suficiente para a realização das operações de coleta.

Em matrizes mais densas e de difícil penetração do tubo, o que não foi o caso das amostras colhidas no presente trabalho, pode-se adaptar um haste na extremidade superior do tubo (onde se manuseia) no intuito de facilitar a manobra de coleta. Tal adaptação pode ser feita com uso de barras cilíndricas de alumínio e abraçadeiras de aço inox.

A matriz ambiental a ser recolhida com este coletor entrou em contato somente com as partes metálicas de alumínio ou aço inox, sendo assim, este equipamento pode ser utilizado na coleta de outros poluentes orgânicos e não somente os HPAs.

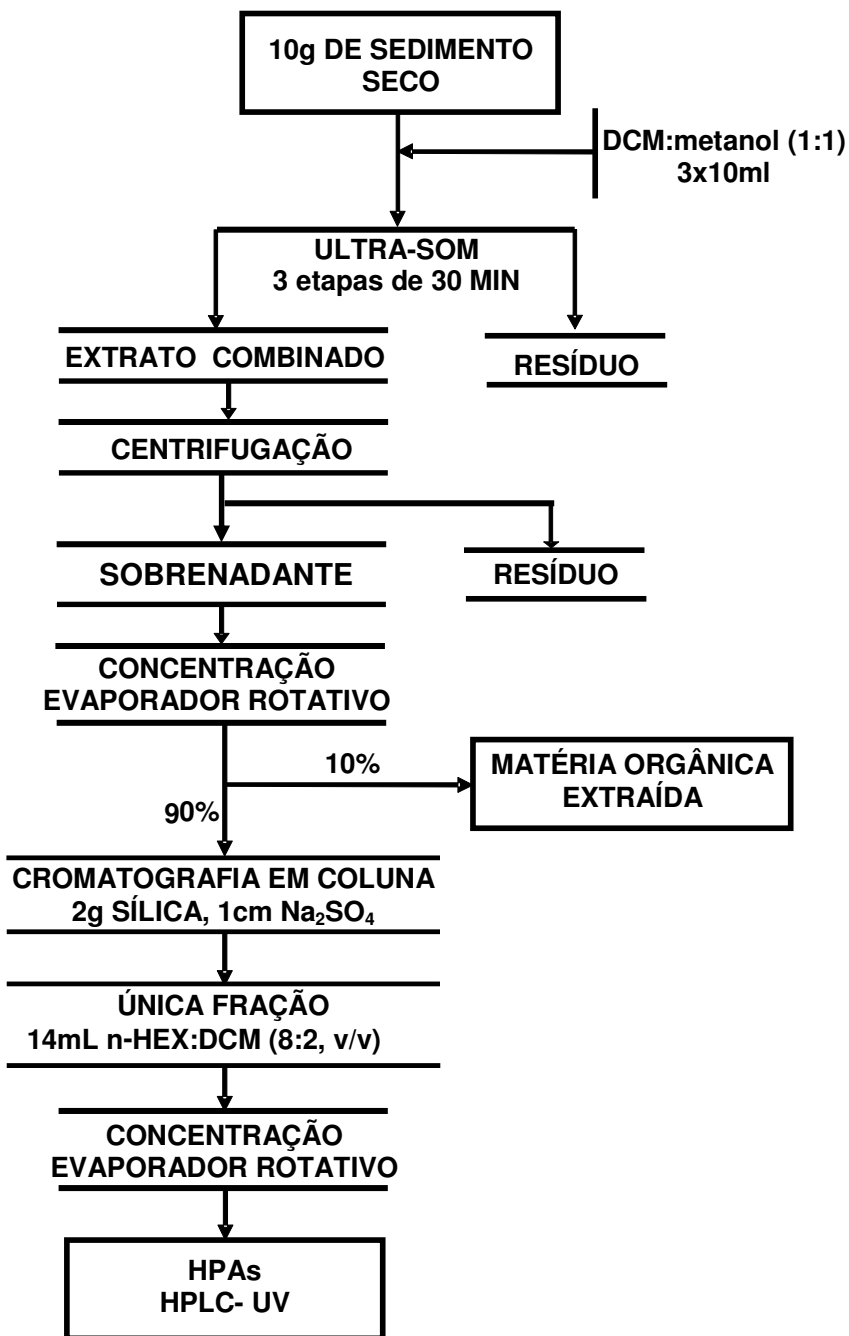


FIGURA 4.17: Fluxograma da metodologia da analítica utilizado para determinação dos HPAs em amostras de solo e sedimento superficial por HPLC.

5 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NAS AMOSTRAS DE SEDIMENTO E SOLO.

A metodologia otimizada foi aplicada a análise das amostras de sedimentos e solos periféricos à Represa São Pedro.

Inicialmente o método foi aplicado a análise de 10 g de sedimento, todas as amostras foram analisadas em duplicata e apresentaram valores abaixo do limite de detecção estabelecido para o método para todos os HPAs estudados.

A quantidade de amostra extraída foi então aumentada para 20 g. Nesta condição, apenas o fenantreno foi quantificado na amostra 11, sendo o valor encontrado, $0,019 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco, muito próximo do valor do limite de quantificação de $0,013 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco estabelecido para este composto. O fluranteno também foi detectado, apresentado um sinal acima do LDM, porém abaixo do LQM para este composto (TABELA 5.1). Todas as outras amostras de sedimento apresentaram valores abaixo do limite de detecção estabelecido para o método. Ao considerar que todos os compostos (exceto Dib) apresentaram LQM abaixo dos respectivos valores de *probable effect levels* (PEL) recomendado por *Canadian Environmental Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life* (TABELA 1.1), pode-se inferir que as amostras de sedimento analisadas apresentavam baixos níveis de concentração de HPAs.

Os resultados obtidos para análise das amostras de solo são apresentados na TABELA 5.2. De uma maneira geral, estas amostras apresentaram valores de concentração abaixo do limite de detecção ou quantificação do método. Apesar de alguns compostos terem sido detectados, principalmente na amostra 10 m, observa-se que os valores encontrados foram muito próximos dos valores de limite de quantificação (TABELA 4.11). Apenas a amostra a 10 metros da rodovia apresentou alguns compostos com concentrações acima do limite de quantificação, sendo eles fenantreno (Phe), fluoranteno (Fluo), pireno (Pyr) nas respectivas concentrações médias expressas em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, peso seco (desvio padrão): Phe 0,025 (0,005); Fluo 0,027 (0,004); (Pyr) 0,037 (0,006). Os valores de DPR foram 20% (Phe), 16% (Fluo) e 15 % (Pyr). Os compostos Naph, Ace, BbF, BkF e BaP foram encontrados em concentrações acima do LDM e abaixo de LQM. A FIGURA 5.1 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise de uma

mistura padrão de HPAs, branco de laboratório, amostra de sedimento e amostra de solo.

Ao comparar o resultado obtido para amostra de solo mais próxima à rodovia apresentou maiores concentrações destes compostos.

TABELA 5.1: Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) de HPAs na amostra 11 de sedimento da Represa São Pedro.

Analito	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco)				
	LDM	LQM	Amostra 11	Desvio Padrão (n=2)	DPR (%)
Naftaleno	0,002	0,008	< LDM	-	-
Acenaftileno	0,006	0,019	< LDM	-	-
Acenafteno	0,004	0,014	< LDM	-	-
Fluoreno	0,002	0,006	< LDM	-	-
Fenantreno	0,004	0,013	0,019	0,0029	15,3
Antraceno	0,003	0,010	< LDM	-	-
Fluoranteno	0,006	0,019	< LQM	-	-
Pireno	0,004	0,015	< LDM	-	-
Benzo(b)Fluoranteno	0,004	0,015	< LDM	-	-
Benzo(k)Fluoranteno	0,005	0,018	< LDM	-	-
Benzo(a)Pireno	0,004	0,014	< LDM	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	0,003	0,010	< LDM	-	-

DPR: desvio padrão realtivo

TABELA 5.2: Concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) de HPAs nas amostra de solo periférico à Represa São Pedro, distanciadas a 10 m, 50 m e 150 m da margem da Rodovia BR 040, marco quilométrico 791,79.

Analitos	Concentração mostra de solo						
	10 m		Média/desvio padrão	50 m		150 m	
	A	B		A	B	A	B
Naph	< LDM	< LQM	-	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Acen	< LDM	< LDM	-	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Ace	<LQM	<LQM	-	< LDM	< LDM	< LDM	<LQM
Flu	< LDM	< LDM	-	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Phe	0,028	0,021	0,025/0,005	<LQM	<LQM	< LDM	<LDM
Ant	< LDM	<LDM	-	< LDM	< LDM	< LDM	< LDM
Fluo	0,030	0,024	0,027/0,004	< LDM	< LDM	< LQM	<LQM
Pyr	0,041	0,033	0,037/0,006	<LDM	< LDM	0,55	< LDM
BbF	< LQM	< LQM	-	< LQM	< LQM	< LDM	<LQM
BkF	< LQM	< LQM	-	<LDM	< LQM	< LDM	<LDM
BaP	< LQM	< LQM	-	<LQM	< LDM	< LDM	<LDM
Dib	< LDM	<LDM	-	<LDM	< LDM	< LDM	<LDM

LDM: limite e detecção do método

LQM: limite de quantificação do método

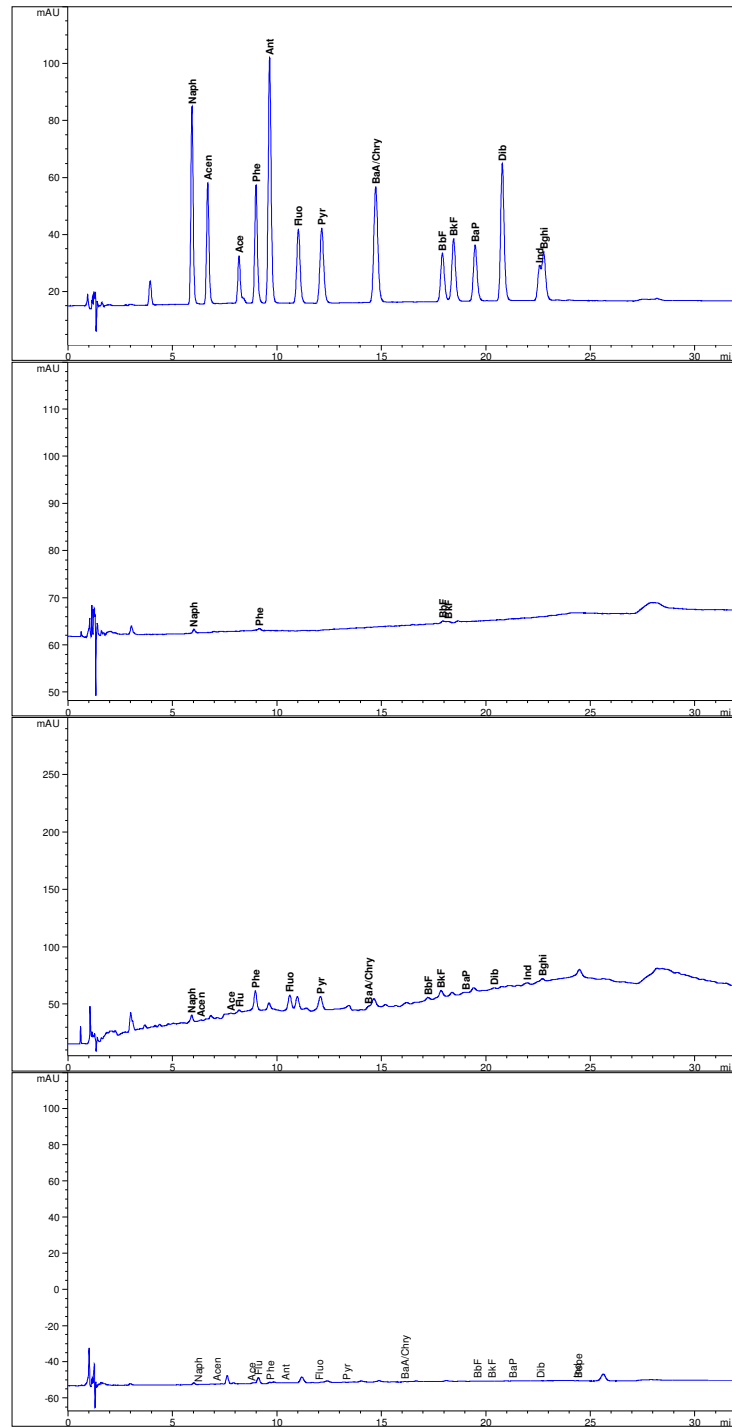


FIGURA 5.1: Cromatogramas da mistura padrão HPA $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, branco de coleta, amostra de sedimento (ponto 11) e amostra de solo (10 m).

6. CONCLUSÃO

Com este trabalho buscou-se otimizar e aplicar uma metodologia para coleta, extração, tratamento dos extratos, separação e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência, dos 16 HPAs prioritários conforme a U.S. EPA. A metodologia otimizada foi aplicada à análise de 14 amostras de sedimento coletadas na Represa de São Pedro e de 3 amostras de solo periférico à rodovia BR-040, também próximas à represa.

A coleta das amostras foi realizada com aparato constituído por um tubo coletor, uma pá e uma haste para extrusão do sedimento, construídos com materiais reciclados e de baixo custo. O sistema de coleta desenvolvido mostrou-se eficiente e permitiu a realização da retirada de uma camada de 5 cm de sedimento da margem da represa e a coleta de amostras de solo a uma profundidade de 3 cm.

O método para a separação dos HPAs por cromatografia líquida de alta eficiência foi delineado levando-se em consideração parâmetros como fator de retenção, resolução entre os picos, assimetria dos mesmos, estabilidade da linha de base e aumento da proporção de solvente orgânico no final da separação para eluição de compostos fortemente retidos.

Os estudos de separação cromatográfica em coluna C18 de fase reversa resultaram em uso de eluição por gradiente e foi capaz de separar 12 dos 16 compostos estudados 31 minutos. Possibilitando assim a determinação dos seguintes compostos: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e dibenzo(a,h)antraceno. Os compostos benzo(a)antraceno e criseno coeluíram e os compostos indeno[1,2,3-c,d]pireno e benzo(g,h,i)perileno não apresentaram resolução satisfatória nas condições avaliadas.

A programação do sinal de detecção permitiu a variação do comprimento de onda em um dos canais de detector, em quatro valores distintos 224 nm, 254 nm, 235 nm e 296 nm no decorrer da análise. Proporcionou-se assim, o aumento da sensibilidade do método para os compostos analisados quando comparado à detecção feita em apenas um comprimento de onda. A avaliação dos sinais obtidos nos canais programados com um único comprimento de onda auxiliou na confirmação dos resultados obtidos na análise das amostras.

O método de extração por ultra-som foi escolhido por ser um método de menor custo, permitir a extração em batelada, além de apresentar um baixo consumo de solvente e demandar pouco tempo de extração. Tais vantagens foram confirmadas ao longo dos testes realizados. O método de extração otimizado empregou 10 g de solo ou sedimento, 3 porções de 10 mL de uma mistura de solvente diclorometano/metanol (1:1) em três etapas de 30 minutos totalizando meia hora de extração por amostra.

Entre os procedimentos testados, a extração sem o emprego de hidrólise alcalina e centrifugação do extrato apresentou melhores resultados quando comparado ao método que utilizou o cadinho de Gooch com e sem a hidrólise alcalina do extrato. O tratamento dos extratos em coluna de sílica mostrou-se eficiente, removendo cerca de 94% da matéria orgânica extraída nas amostras, diminuindo as possíveis interferências da matriz.

Conforme critérios de qualidade estabelecidos, as porcentagens de recuperação dos compostos obtidos para amostras fortificadas foram satisfatórias. A média de recuperação entre os compostos resolvidos foi de 81,9%, com exceção do naftaleno que apresentou recuperação de 50,9%. Em todos os casos avaliados, o desvio padrão relativo não ultrapassou valor de 30,0% estabelecido como critério.

Como resultado, os limites de detecção e quantificação do método tornaram viáveis a aplicação da metodologia a amostras de reais de solo e sedimento. Os valores dos limites de detecção, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco, variaram entre 0,004 e 0,006 enquanto os valores dos limites de quantificação, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco, variaram de 0,013 a 0,020.

As amostras de sedimentos apresentaram, em sua maioria, valores abaixo do limite de detecção estabelecido no método. Entretanto, a amostra 11 apresentou fenantreno na concentração de $0,019 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco. Apenas a amostra de solo coletada a distância mais próxima da rodovia, 10 m, teve compostos fenantreno, fluoranteno e pireno quantificados. Todas as outras amostras apresentaram valores abaixo dos limites de quantificação. As concentrações, expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ em peso seco, para fenantreno, fluoranteno e pireno nesta amostra foram respectivamente 0,024; 0,027 e 0,040.

Portanto a amostra de solo colhida a 10 metros da rodovia, devido à proximidade da fonte de emissão apresentou maiores concentrações destes compostos.

Com exceção do Dib, todos os compostos apresentaram LQM abaixo dos respectivos valores de probable effect levels (PEL) recomendado por Canadian Environmental Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Portanto, todas as amostras e sedimento e solo analisadas apresentaram baixos valores de concentração.

De acordo com critérios estabelecidos por USF&W, NOAA e CCME, a metodologia analítica implementada mostrou-se eficiente, reproduzível e adequada para análise de HPAs em amostras de solo e sedimento.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Ao considerar os resultados alcançados com este trabalho, torna-se possível à adaptação da metodologia para a quantificação destes compostos em outras matrizes ambientais ou alimentos.

Pesquisa de HPAs em solos e resíduos industriais em áreas susceptíveis à contaminação tornar-se-á útil para monitorar os níveis destes poluentes. Este método pode também ser aplicado ao monitoramento das concentrações de HPAs em solos e sedimentos contaminados por acidentes com derivados do petróleo seja por transporte rodoviário ou por tubulações.

Diante da natureza química destes compostos e das freqüentes queimadas que ocorrem atualmente no Brasil, o monitoramento ambiental de áreas degradadas por queimadas também poderá ser levado a efeito ao empregar-se a técnica descrita neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (1987). Resíduos sólidos - classificação. NBR 10004, Rio de Janeiro p. 1-48
- Agilent Technologies, (2001). Understanding Your Chemstation. Ed. 08/01 Wldbronn, Germany, p. 241-259.
- Amagai, T., Takahashi, Y., Matsushita, H., Morknøy, D., Sukasem, P., Tabucanon T. (1999) A survey on polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soil in Chiang-Mai, Thailand. *Environment International*, vol. 25, no. 5, p. 563-572.
- Anuário Estatístico de Juiz De Fora (2007). Coordenador: Prof. Marcos Alberto Patronis, Centro de Pesquisas Sociais da Universidade Federal de Juiz de Fora. CD ROM.
- ASTM – American Society for Testing Materials (2001). Annual Book of ASTM Standards. Section E 682 – 93, vol 14.01.
- Atanassova, I; Brummer, G.W (2004), Polycyclic aromatic hydrocarbons of anthropogenic and biopedogenic origin in a colluviated hydromorphic soil of Western Europe, *Geoderma*, nº 120, p. 27-34.
- Azevedo, D., Gerchon, E., Reis, E., (2004). Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do sul river, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 15, nº 2, p. 292-299.
- Baird, C., (2002). *Química ambiental*; Traduzido por Angeles M. L. R. E Carrera L C M. – 2ªed. – Porto alegre: Bookman, 2002.
- Barra, R., Popp P., Quiroz, R., Bauer C., Cid H., Tumpling W., (2005) Persistent toxic substances in soils and waters along an altitudinal gradient in the Laja River Basin, Central Southern Chile *Chemosphere* 58, p. 905–915.
- Berset, J.D., Ejem M., Holzer R., Lischer P. (1999) Comparison of different drying, extraction and detection techniques for the determination of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in background contaminated soil samples *Analytica chimica acta* 383, p. 263-275.
- Bícego, M. C., Weber, R. R., Ito, R., G., (1996). Aromatic hydrocarbons on surface waters of ad Ralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 32, no. 7, p. 549-553.
- Blumer, M., Blumer, W., Reich, T. (1977). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil of a Mountain Valley: Correlation with Highway Traffic and Cancer Incidence. *Environmental Science & Technology*, vol. 11, nº12, p. 1082-1084.
- Bodnar E., Polyak. K., Hlavay, J. (2005) Material transport between the atmosphere and sediment of the lake Balaton. *Microchemical Journal* 79, p. 221-230.
- Bris, F. J., Garnauda, S., Apperrya, N., Gonzaleza, A., Chebbob, J-M. M. G., Daniel R. Thevenota D. R. (1999). A street deposit sampling method for metal and hydrocarbon contamination assessment. *The Science of the Total Environment* Vol.235, p. 211-220.

- Brandt. H. C. A., Groot P. C. (2001). Aqueous leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from bitumen and asphalt. *Water Research* 35, nº17, p. 4200-4207.
- Brown, N. B., Peake, B. M., (2005). Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff. *Science of the Total Environment*, article in press.
- Buchelli T. D., Blum F, Desaulles A., Gustafsson O. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland *Chemosphere* 56, p. 1061 – 1076.
- Buseti F., Heitz A., Cuomo M., Badoer S., Traverso P. (2006). Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A* 1102, p. 104-115.
- Cao, Z., Wang, Y., Mab, Y., Xua, Z., Shi, G., Zhuang, Y., Zhua, T., (2005). Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in reclaimed water and surface water of Tianjin, China. *Journal of hazardous materials*, 122, p. 51-59.
- CCME – Canadian Council of Ministers of the Environment (2002). *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*, Winnipeg, p.1-6.
- CESAMA,2007. http://www.cesama.com.br/rep_sao_pedro.php Acesso em: 17/05/2007.
- Chen Z. L., Megharaj M., Naidu R. (2002). Comparison of Adsorbents for on-line solid phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons before liquid chromatography with UV detection. *Chromatographia* 56, p. 105-108.
- Ciola, R., 1999. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho*, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo: [s.n.], p. 49-52.
- Cloarec O., Gonzalez C., Touraud E., Thomas O.. (2002) Improvement of UV spectrophotometry methodology for the determination of total polycyclic aromatic compounds in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta*, 453, p. 245-252.
- Cousins, I. T., Jones, K. C., (1998) Air-soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCS) in the UK. *Environmental Pollution* 102, p. 105-118.
- Crépineau, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E., Laurent, F., (2003). Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH'S) in the vicinity of a highway, France. *J. Agric. Food chem.* 51, p. 4841-4845.
- Esteves, F. A., (1988). *Fundamentos de limnologia*. 2ª edição, Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro, RJ, p.88-92, 301-311.
- Filipkowska, A., Lubecki, L., Kowalewska, G., (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different Matrices of the marine environment. *Analytica chimica Acta* 547, p. 243-254.
- Ghiselli G., Jardim W. F.. (2007) Interferentes endócrinos no ambiente *Quim. Nova*, vol. 30, no. 3, p. 695-706.
- Google Earth, 2007, Digital Globe. Programa de computador de captura de imagens de satélite, versão livre e registrada por European Technologies.

Guinan, J., Charlesworth, M., Service, M., Oliver, T. (2001). Sources and geochemical constraints of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Sediments and Mussels of two Northern Irish Sea-loughs. *Marine Pollution Bulletin*, 42, nº11, p 1073 – 1081.

Hardcastle J. I., Ball J. C., Hong G., Marken F., Compton R. G., Bull S. D., Davies S. G. (2000). Sonoelectrochemical and sonochemical effects of cavitation: Correlation with interfacial cavitation induced by 20 khz ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry* 7, p. 7-14.

Headley, J. V., Akre, C. (2001). Preliminary characterization and source assessment of PHA's in tributary sediments of the Athabasca River, Canada. *Environmental forensics* 2, p. 335-345.

Jang, M. (1997). Products of benz[a]anthracene photodegradation in the presence of known organic constituents of atmospheric aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, p. 1046-1053.

Kalff, J. (2003). *Limnology. Inland Water Ecosystems*, 2nd edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, NJ, p. 511.

Kuppithayanant, N., Rayanakorn, M. Wongpornchai, S., Prapamontol T., Deming, R.L. (2003). Enhanced sensitivity and selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons using sequential simplex optimization, the addition of an organic modifier and wavelength programming. *Talanta* 61, p. 879-888.

Latuf, M. O. Diagnóstico das águas superficiais do Córrego São Pedro, Juiz de Fora-MG. *Geografia - Londrina*, vol. 13, nº1, jan/jul 2004. *Revista eletrônica*. Disponível em: <<http://www.geo.uel.br/revista/v13n1eletronica/2.pdf>>. Acesso em 06 jul 2006.

Larini, L. 1993. *Fundamentos de toxicologia*.

Lintelmann, J., Fischer, K., Karg, E., Schroppel, A., (2005). Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 381, p. 508-519.

Lourenço, R. A., (2003). Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos sedimentos – hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróis e alquenonas. *Dissertação (Mestrado Oceanografia Química e Geológica)* - Instituto Oceanográfico da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Macdonald R. W., Barrie L. A., Bidleman T. F., Diamond M. L., Gregor D. J., Semkin R. G., Strachan W. M. J., Li Y. F., Wania F., Alae M., Alexeeva L. B., Backus S. M., Bailey R., Bowers J. M., Gobeil C., Halsall C. J., Harner T., Hoff J. T., Jantunen, L. M. M., Lockhart W. L., Mackay D., Muir D. C. G., Pudykiewicz J., Reimer K. J., Smith J. N., Stern G. A., Schroeder W. H., Wagemann, R., Yunker M. B. (2000). Contaminants in the canadian arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *The science of the total environment* 254, p. 93-234.

MacLeod Jr., W. D., Brown D. W., Friedman, A. J., Burrows, D. G.; Maynes, O., Pearce, R. W., Wigren, C. A.; Bogar, R. G. (1986). Extractable toxic organic compounds, Standard Analytical Procedure of the NOAA National Analytical Association, 1985-1986 (Revised).

Magalhães D., Bruns R. E., Vasconcellos P. C. (2007). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: Uma abordagem estatística. *Quim. Nova*, vol. 30, no. 3, p. 577-581.

Maldonado, C., Bayona, J., Bodineau, L., (1999). Sources, distribution, and water column processes of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in the northwestern black sea water. *Environmental Science & Technology* Vol. 33, N^o. 16, p. 2693-2702.

Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., Barcelo, D., (2004). Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of chromatography a*, 1047, p. 181-188.

Moret S., Purcaro G., Conte L. S. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties. *Science of the Total Environment* 386, p. 1-8.

Motelay-Massei, A., Ollivonb, D., Garbanb, B., Chevreurilb M. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters *A. Atmospheric Environment*. Vol.37, p. 3135-3146.

Muniz, P., Danulat, E., Yannicelli, B., Alonso, G. J., Medina, G., Bicego, M. C., (2004). Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environment International* 29, p. 1019-1028.

Nam, J. J., B.H. Song , K.C. Eom , S.H. Lee , A. Smith (2003). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere* 50, p. 1281-1289.

NOAA (1994) Technical Memorandum NOS ORCA 7. Wade T.L. & CANTILLO, Y. Use of standards and Reference Materials in the measurement of chlorinated hydrocarbon residues.

Nielsen, T., Jørgensen H. E., Larsenb J. C., Poulsenb M., (1996). City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *The Science of the Total Environment* 189, p. 41-49.

Oh E., Im H., Kang H., Jung W., Won N., Lee E., Sul D., (2006). Comparison of immunological and genotoxicological parameters in automobile emission inspectors exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21, p. 108-117.

Oliferova L., Statkus M., Tsygin G., Shpigun O., Zolotov Y. (2005). On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents. *Analytica Chimica Acta* 538, p. 35-40.

Oliveira, E. C., (2005) – Extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de sedimentos do Arroio Engenho/Lajeado/RS – In: Encontro Nacional De

Química Analítica E 1ºCongresso Ibero-Americano De Química Analítica, 12 a 16 setembro de 2005, Niterói – RJ, CD-ROM.

Pino, V., Ayala J. H., Afonso A. M., González V., (2001). Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments. *Talanta* 54, p.15-23.

Portet-Koltalo, F., Oukebdane, K., Robin, L., Dionnet, F., Desbene, P.L., (2006). Quantification of volatile PAH's present at trace levels in air flow by aqueous trapping-SPE and HPLC analysis with fluorimetric detection. *Talanta* (NO PRELO).

Quiao, M., Wang C., Huang S., Wang D., Wang Z., (2006). Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Environment International* 32, p. 28-33.

Quiroz, R., Popp, P., Urrutia R., Bauer C., Araneda A., Treutler H-C., Barra R., (2005). PAH fluxes in the Laja Lake of south central Chile Andes over the last 50 years: Evidence from a dated sediment core. *Science of the Total Environment*. Vol. 349, p. 150-160.

Resolução nº20 de 18 de junho de 1986. Conama, Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html, acesso em 07 fev 08.

Reynaud S., Deschaux P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology* 77, p. 229-238.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos; *Química Nova*, 27, p. 771-780.

Richter H., Howard J. B. (2000). Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways. *Progress in Energy and Combustion Science* 26, p. 565-608.

Roldan, P. S., (2005). Efeito da sonicação sobre a morfologia e a granulometria de partículas de solos e sedimentos em métodos de extração assistida por ultrassom. In: Encontro Nacional de Química Analítica e 1ºCongresso Ibero-Americano de Química Analítica, 12 a 16 setembro de 2005, Niterói – RJ, CD-ROM.

Ross, I. R. M.; Oros, D. R. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the San Francisco Estuary water column: sources, spatial distributions, and temporal trends (1993-2001). *Chemosphere* 57, p. 909-920.

Santodonato, J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, vol. 34, no. 4, p. 835-848.

Sericano, J. L. (1998). Quantitative determination of chlorinated hydrocarbons by gás chromatography/electron capture detection in Geochemical and Environmental Research Group. Standard Operating Procedures, SOP-9810, revision nº1, October 29, 1-21.

Singh, A. K., Spassova, D., White, T. (1998). Quantitative analysis of polychlorinated biphenyls, organochlorine insecticides, polycyclic aromatic

hydrocarbons, polychlorinated hydrocarbons and polynitrohydrocarbons in spiked samples of soil, water and plasma by selected-ion monitoring gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 706 p. 231–244.

Skoog, D. A., Holler F. J., Nielman T. A. (2002). *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição, Artmed Editora S. A., Porto Alegre RS, p. 655.

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

Song, Y.F., Jing, X., Fleischmann, S., Wilke, B.M. (2002) Comparative study of extraction methods for determination of PHA's from contaminated soils and sediments. *Chemosphere*, vol.48, p. 993-1001.

Sun F., Littlejohn, D., Gibson M. D., (1998) Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of U.S. EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Analytica Chimica Acta* 364, p. 1-11.

Sverdrup, T. N.; Ningkrogh, P. (2002). Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science Technology*, 36, p. 2429-2435.

Tauk-Tornisielo, S. M; Gobbi, N, Fowler, H. G (1995). *Análise ambiental: uma visão multidisciplinar*. 2ª Edição, Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP, p.114 e 120.

Totten, L., Brnciak, P., Gigliotti, C., Dachs, J., Glenniv, T. R., Nelson, E., Eisenreich, A. J. (2001). Dynamic air-water exchange of polychlorinated biphenyls in the New York-New Jersey Harbor Estuary. *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35, 3834-3840.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. (2002) Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report); *International Union of Pure And Applied Chemistry*, 74, p. 835-855.

Tuhackova J., Cajthaml T., Novak K., Novotny C., Mertelik J., Sasek V. (2001) Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution* 113, p. 255-262.

UNEP (1991) Sampling of selected marine organisms and sample preparation for the analysis of chlorinated hydrocarbons. *Reference Methods For Marine Pollution Studies, Regional Seas*, nº12, rev 2.

USP – The United States Pharmacopeia XX (2001). Revision, pp 943 -945.

Xavier L. F. W., Moreira I. M. N. S., Higarashi M. M., Moreira J. C., Ferreira L. F. V., Oliveira A. S. (2005). Fotodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em placas de sílica impregnadas com dióxido de titânio. *Quim. Nova*, vol. 28, no. 3, p. 409-413.

Xue W., Warshawsky D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, p. 73-93

Wade, T. L., Brooks, J. M., Kennicutt II, M. C., McDonald T. J., Sericano J. L., Jackson T.J., (1986). Method used by Geochemical and Environmental Research Group (GERG), Texas A&M University, for trace organic analyses of sediments and tissues.

Weiss, D. B., 2001. Elaboração de textos técnicos e científicos. Material didático para o curso de Geografia. Juiz de Fora, 2001. p70.

Wesp H. F., Tang X., Edenharder R. (2000). The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils: Contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the salmonella/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in Human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. Mutation research 472 (2000) p.1-21.

Witt, G., Trost E., (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in sediments of the Baltic Sea and of the german coastal waters. Chemosphere, Vol. 38, No. 7, 1603-1614.

Zanardi, E., Bicego, M. C., Miranda, L. B., Weber, R. R., (1999). Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in São Sebastião, SP, Brazil. USA Marine Pollution Bulletin vol. 38, no. 4, 261-267.

Zhang, C., Zhang, X., Yang, J., Liu, Z., (2007). Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in heavy products derived from coal and petroleum by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1167, p. 171 – 177.

Zohair A., Salim A., Soyibo A. A., Beck A. J. (2006). Residues of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs), Polychlorinated biphenyls (pcbs) and organochlorine pesticides in organically-farmed vegetables. Chemosphere 63, p. 541-553.