

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E DERIVADOS EM ÁGUA SUPERFICIAL ATRAVÉS DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

SANTOS, R. R.*; CARDEAL, Z. L. ; MENEZES, H. C.

*rosii.santos@yahoo.com.br

Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha. Belo Horizonte – MG

Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) fazem parte de uma grande classe de poluentes orgânicos caracterizada por uma estrutura constituída de carbono e hidrogênio que formam dois ou mais anéis aromáticos fundidos sem substituintes. Alguns HPAs são carcinogênicos, seus derivados nitrados e oxigenados podem ser mais tóxicos do que os próprios HPAs. A atmosfera é o meio mais importante de dispersão dos HPAs além de receber a maior parte da carga ambiental desses compostos. A água e os sedimentos dos corpos hídricos também podem ser contaminados pela deposição seca e úmida, além da contaminação por efluentes industriais e domésticos. Essa contaminação se estende aos seres vivos presentes nesses ambientes e também ao ser humano devido ao tratamento de água ineficiente. Portanto é importante o desenvolvimento de novos métodos para análise de HPAs e derivados em água superficial. Neste trabalho foi desenvolvido e otimizado um método para análise de 16 HPAs prioritários, 4 oxi-HPAs, e 4 nitro-HPAs em água superficial através de microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction* - SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry* - GC/MS). Foram otimizados parâmetros que podem influenciar a extração dos analitos através do planejamento fracionário e da superfície de resposta Doehlert. As variáveis significativas foram tempo e temperatura de extração. O método de extração proposto é simples, rápido, eficiente e permitiu a extração e análise de HPAs e derivados de modo simultâneo.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, água superficial, GC/MS.

1.Introdução

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são gerados principalmente durante a combustão incompleta de materiais orgânicos como carvão, óleo, gasolina e madeira (Plaza-Bolanos *et al.*, 2010). As emissões provenientes de atividades antropogênicas são predominantes, mas os HPAs podem se originar de fontes naturais (Baklanov *et al.*, 2007). O impacto dos HPAs na saúde humana depende principalmente da via de exposição, da concentração e da toxicidade relativa. Porém já foi comprovado que os HPAs causam erros na replicação, mutação e carcinogênese (Abdel-Shafy e Mansour, 2016).

Os derivados oxigenados e nitrados dos HPAs são uma classe de contaminantes negligenciada em áreas contaminadas por HPAs, porém isso está sendo reavaliado devido a maior toxicidade desses derivados em relação aos próprios HPAs (Ding *et al.*, 2012). A mutagenicidade e carcinogenicidade dos nitro-HPAs podem ser algumas ordens de magnitude maior do que os HPAs principais, enquanto que os oxi-HPAs têm sido sugeridos como um grupo chave na formação de espécies reativas de oxigênio e assim, causam danos oxidativos nas moléculas biológicas, tais como o DNA e as proteínas (Chung *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010).

A atmosfera é o meio mais importante de dispersão dos HPAs e derivados, além de receber a maior parte da carga ambiental desses compostos (Ravindra *et al.*, 2008). A água e os sedimentos dos corpos hídricos podem ser contaminados pela deposição seca e úmida, além da contaminação por efluentes industriais e domésticos. Essa contaminação se estende aos seres vivos presentes nesses ambientes (Abdel-Shafy e Mansour, 2016). Além disso, o processo de tratamento convencional de água é ineficaz na remoção desses poluentes e conseqüentemente os humanos são contaminados através da ingestão de água potável.

2. Objetivo

desenvolver método para análise de 16 HPAs prioritários, 4 oxi-HPAs e 4 nitro-HPAs em água superficial através de microextração em fase sólida com fibra resfriada (CF-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

3. Metodologia

3.1. Reagentes

- Água ultrapura modelo Purelab, Elga (Reino Unido);
- Hélio com 99,999% de pureza, Air Products (Mogi das Cruzes, Brasil);
- Detergente neutro, Cromaline (Diadema, Brasil);
- Tolueno grau HPLC, Sigma Aldrich, (St. Louis USA);
- Acetona grau HPLC, Sigma Aldrich (St. Louis EUA);
- Cloreto de metileno grau HPLC, J.T. Baker (Darmstadt, EUA);
- 9,10-Antraquinona, Supleco (Bellefonte, EUA);
- 5,12-Naftacenoquinona, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 1-Nitropireno, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 9-Nitroantraceno, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 2-Nitrofluoreno, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 3-Nitrofluoranteno, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 9-Fluorenona, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- 2-Metilantraquinona, Sigma Aldrich (St. Louis, EUA);
- Nitrogênio líquido (Belo Horizonte, Brasil);
- Mix CRM 48905 contendo 16 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em clorofórmio/cloreto de metileno, Supelco Inc. (Bellefonte, EUA);
- Sulfato de sódio, Synth (Diadema, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC, JT Baker (Darmstadt, EUA).

3.2. Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso modelo Finnigan Trace DSQ equipado com um espectrômetro de massas do tipo armadilha de íons (*ion trap*) Thermo Scientific (West Palm Beach, USA);
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética modelo 752A da Fisatom (São Paulo, Brasil);
- Freezer 120 litros da Consul (São Bernado do Campo, Brasil);
- Balança analítica modelo AUW220D da Shimadzu (Kioto, Japan);

3.3. Materiais

- Micropipetas de volume variado modelo Finnpiquette da Thermo Scientific (West Palm Beach, Germany);
- Termômetro de mercúrio, escala -10 a 110 °C, resolução 0,5 °C;
- Suporte manual para SPME Supelco (Bellefonte, EUA);
- Fibra de Polimetilsiloxano (PDMS) 100 µm, Supelco (Bellefonte, EUA);
- Fibra de Polimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm, Supelco (Bellefonte, EUA);
- Garrafa para armazenamento de nitrogênio com capacidade de 4 L, modelo MVElab4, Chart Inc. (Georgia, EUA);
- Balão volumétrico de volumes variados, Laborglass (São Paulo, Brasil);
- Bloco de alumínio (.Belo Horizonte, Brasil).

3.4. Preparo de soluções

As soluções estoques dos nitro e oxi-HPAs foram preparadas em cloreto de metileno:tolueno (1:1) com concentrações na faixa de 500,0 a 2000,0 mgL⁻¹. As soluções trabalho foram preparadas pela diluição das soluções estoques em acetonitrila.

As soluções trabalho dos HPAs foram preparadas pela diluição do Mix CRM 48905 em acetonitrila.

3.5. Sistema cromatográfico

O estabelecimento das condições cromatográficas para identificação dos analitos ocorreu através da modificação do método descrito por (Menezes *et al.*, 2015).

As análises cromatográficas foram realizadas e otimizadas em um cromatógrafo à gás Finnigan Trace DSQ acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo armadilha de íons (*ion trap*) produzidos pela Thermo Scientific (West Palm Beach, EUA). Foi utilizada uma coluna capilar de 30 m (0,25 µm x 0,25 mm) contendo 5 % de difenil e 95 % de dimetilpolissiloxano da Agilent Technology Inc. (Santa Clara, EUA).

O programa de temperatura do forno iniciou em 80 °C seguido de aquecimento a uma taxa de 30 °C min⁻¹ até 150 °C; aumento para 210 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹ e patamar de 4 min; aumento para 240 °C a uma taxa de 15 °C min⁻¹; aumento para 280 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹ e patamar de 10 min. O gás de arraste foi hélio (99,999 %) a uma vazão de 1,5 mL min⁻¹. O injetor foi operado a 270 °C no modo splitless

durante 1 min, seguida de razão de divisão de 1/20. O tempo total da corrida cromatográfica foi 28,3 min.

O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto eletrônico (EI) com energia de 70 eV e modo positivo. A temperatura da fonte de íons foi 200 °C, e a temperatura da interface de 300 °C. A análise foi realizada no modo de varredura por segmentos (Segment Scan). A aquisição de dados foi realizada utilizando o programa 1.4 X-Calibur da Thermo Scientific (WestPalm Beach, EUA). Os fragmentos de identificação e o tempo de retenção dos analitos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Tempos de retenção e fragmentos de massas para identificação e quantificação dos analitos.

Analitos	Tempo de retenção (min)	Fragmentos de quantificação (m/z)	Fragmentos de identificação (m/z)
Naftaleno	3,06	128	129,102
Acenaftileno	4,90	152	150,153
Acenafteno	5,18	153	154,152
Fluoreno	6,04	166	165,167
9-Fluorenona	7,46	180	152,151
Fenantreno	7,87	178	176,179
Antraceno	7,97	178	176,179
9,10-Antraquinona	9,90	208	152,180
Fluoranteno	11,23	202	200,203
2-Metilantraquinona	11,99	222	165,194
2-Nitrofluoreno	12,05	165	211,164
Pireno	12,14	202	200,203
9-Nitroantraceno	12,65	223	176,193
Benzo(a)antraceno	16,29	228	229,227
Criseno	16,39	228	229,227
3-Nitrofluoranteno	17,21	247	217,189
1-Nitropireno	17,71	217	247,201
5,12-Naftacenoquinona	18,29	258	202,230
Benzo(k)fluoranteno	19,11	252	250,253
Benzo(b)fluoranteno	19,17	252	250,253
Benzo(a)pireno	19,99	252	250,253
Indeno(123cd)pireno	24,17	276	274,277
Dibenzo(ah)antraceno	24,38	278	276,279
Benzo(ghi)perileno	25,33	276	274,277

3.6. Otimização da extração

Foram avaliadas as variáveis que podem afetar a eficiência da extração dos analitos estudados por SPME. Algumas variáveis tiveram que ser avaliadas através da otimização univariada e as demais através da otimização multivariada com um planejamento fracionário e superfície Doehlert.

3.7. Escolha do revestimento da fibra de SPME

Foi avaliado dois tipos de revestimentos da fibra, sendo um contendo polidimetilsiloxano (PMDS) 100 μm e o outro contendo polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (DVB) 85 μm . Os experimentos foram realizados em triplicata através da imersão das fibras em frasco contendo 20,0 mL de solução aquosa fortificada com os 26 analitos na concentração aproximada de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, as demais variáveis foram mantidas constantes.

3.8. Seleção das variáveis significativas

O planejamento fatorial fracionário foi utilizado devido ao alto número de variáveis, o que demandaria um número grande de experimento e um longo tempo. Foi realizado um planejamento 2^{7-4} com 3 pontos centrais para obter uma estimativa do erro experimental. As variáveis e os níveis avaliados estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Variáveis e seus respectivos níveis avaliados no planejamento fracionário 2^{7-4} .

Variável	Nível inferior (-1)	Ponto central (0)	Nível superior (+1)
Temperatura de adsorção ($^{\circ}\text{C}$)	25	50	75
Tempo de adsorção (min)	30	45	60
Tempo de dessorção (min)	5	7,5	10
Temperatura de dessorção ($^{\circ}\text{C}$)	250	260	270
Nível de agitação (rpm)	540	960	1380
Tempo ultrassom (min)	2	6	10
Teor de sal (%)	0	1,25	2,5

3.9. Obtenção das condições ótimas de extração

Para determinar as melhores condições de extração dos analitos um planejamento Doehlert foi proposto. Duas variáveis foram selecionadas para essa etapa, tempo e temperatura de extração, as demais variáveis foram mantidas constantes. Nessa

etapa foram realizados 9 experimentos sendo 3 pontos centrais para obter uma estimativa do erro experimental. A matriz de experimentos utilizada nessa etapa está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Experimentos realizados no planejamento Doelhart.

Experimento	Temperatura de extração	Tempo de extração
1	70 (-0,87)*	45 (-0,5)*
2	70 (-0,87)	55 (0,5)
3	75 (0)	60 (1,0)
4	80 (0,87)	55 (0,5)
5	80 (0,87)	45 (-0,5)
6	75 (0)	40 (-1,0)
7	75 (0)	50 (0)

*Os valores indicados entre parênteses se referem aos valores codificados.

A otimização multivariada foi realizada em água ultrapura fortificada com os 26 analitos na concentração aproximada de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0 (Tulsa, EUA).

4. Resultados e discussão

4.1. Sistema cromatográfico

O modo de varredura *segment scan* apresentou melhores resultados em relação ao modo *full scan* (varredura completa) e SIM (*Selected Ion Monitoring*). No modo *segment scan* as faixas de fragmentos são monitoradas, sendo a intensidade de varredura avaliada de acordo com a quantidade de íons em cada faixa. A tabela 4 apresenta os dados utilizados no método proposto. As faixas e as intensidades foram escolhidas de acordo com os fragmentos dos analitos e a quantidade desses fragmentos.

Tabela 4. Faixas de massas e intensidades de varredura utilizadas no modo *segment scan*.

Faixa de fragmentos (m/z)	Intensidade de varredura (%)
50-100	50
101-200	1000
201-300	1000

Cabe ressaltar que foi possível desenvolver um método cromatográfico simultâneo e adequado para HPAs, HPAs nitrados e oxigenados. A maioria dos trabalhos realizam análises cromatográficas separadas onde os HPAs são analisados por EI enquanto que os nitro e oxi-HPAs são analisados com outro método por ionização química negativa (NCI).

4.2. Escolha do revestimento da fibra de SPME

O revestimento da fibra de SPME é um parâmetro importante que deve ser avaliado, pois é através dele que os analitos serão extraídos. Desse modo os analitos deverão ter afinidade pelo revestimento da fibra. A Figura 1 apresenta os resultados da comparação entre os dois tipos de fibra PDMS (vermelha) e PDMS/ DVB (rosa).

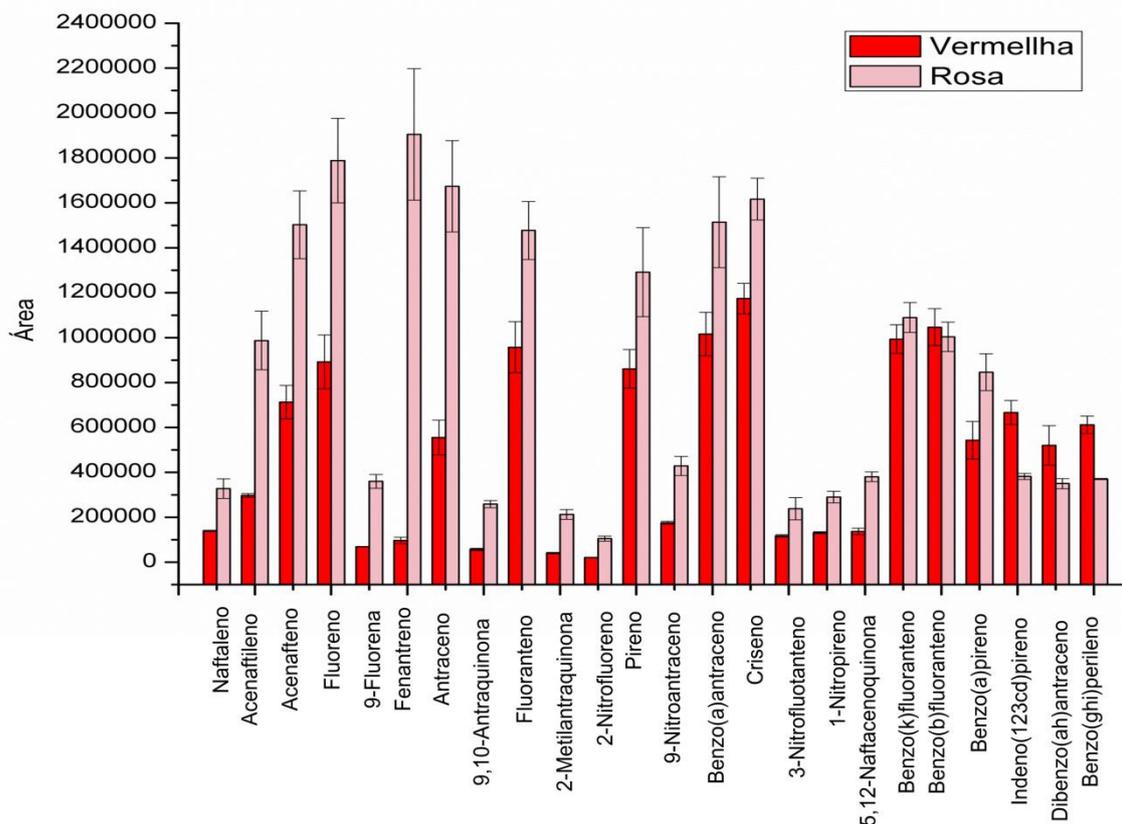


Figura 1. Comparação entre dois tipos de revestimento da fibra após a extração dos analitos a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em água ultra pura ($n=3$).

De maneira geral a fibra PDMS/DVB apresentou melhores resultados, o que pode ser explicado pela interação π - π entre os HPAs e derivados e o DVB (Aguinaga *et al.*, 2007). Entretanto para os analitos indeno(123cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno e o benzo(ghi)perileno a fibra de PDMS apresentou melhores resultados mostrando que as interações hidrofóbicas prevaleceram sobre as interações π - π . Como a fibra PDMS/DVB foi mais eficiente para a maioria dos analitos ela foi escolhida para ser utilizada no método.

4.3. Seleção das variáveis significativas

Para a otimização multivariada foram selecionadas algumas variáveis que poderiam influenciar na eficiência da extração, são elas: tempo de extração, temperatura de extração, rotação, teor de sal, temperatura do injetor, tempo no injetor. O tempo de extração está relacionado com o tempo necessário para a extração atingir o equilíbrio, vale lembrar que essa técnica de extração não é exaustiva. A temperatura de extração pode diminuir o tempo de extração, pois a transferência de massa ocorrerá mais

rapidamente em temperaturas maiores, entretanto o uso de temperaturas altas pode causar a perda de analitos mais voláteis.

A rotação é importante para a transferência de massas dos analitos, desse modo ela não deve ser muito baixa o que irá dificultar a transferência e nem muito alta, pois o agitador magnético pode danificar a fibra. O teor de sal está relacionado com o efeito *salting out*, que poderá forçar a saída dos analitos apolares do meio aquoso. A temperatura do injetor deve ser adequada para a dessorção e a volatilização de todos os analitos. E o tempo de exposição da fibra no injetor deve ser suficiente para ocorrer a dessorção dos analitos e a limpeza da fibra, tornando-a adequada para a próxima extração. E por fim o tempo no ultrassom foi avaliado para que houvesse uma homogeneização entre a água ultrapura e os analitos.

A Figura 2 apresenta o gráfico de Pareto obtido através do planejamento fracionário. Nela é possível observar que as variáveis significativas (p -valor menor que 0,05) no domínio experimental avaliado foram tempo e temperatura de extração e tempo no injetor em níveis superiores. Ou seja, maiores tempo e temperaturas de extração e temperatura no injetor promovem maior eficiência na extração.

As variáveis significativas serão avaliadas em mais níveis através de uma superfície de resposta Doelhart. Entretanto a temperatura no injetor não poderá ser avaliada em níveis maiores, pois o limite de uso da fibra PDMS/DVB é de 270 °C, ou seja o nível superior do planejamento fracionário já correspondia a essa temperatura.

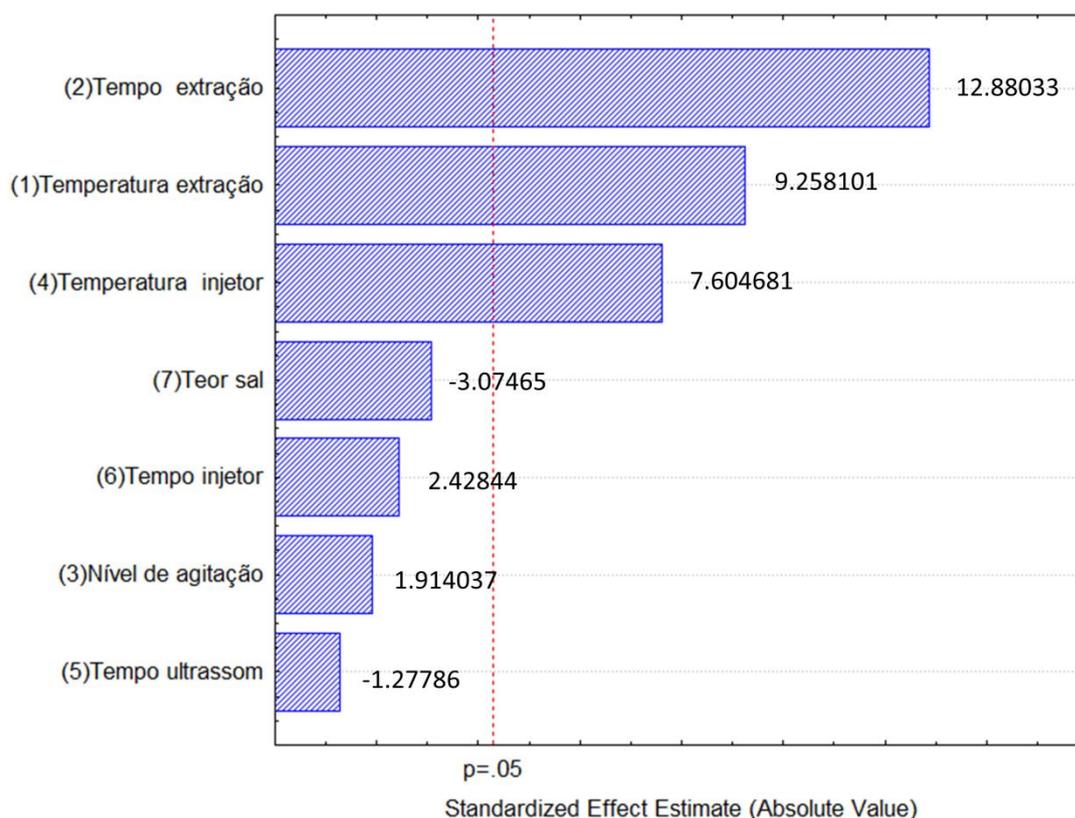


Figura 2. Gráfico de Pareto obtido através do planejamento fracionário.

4.4. Obtenção das condições ótimas de extração

Para otimizar as variáveis tempo e temperatura de extração simultaneamente foi utilizada a superfície de resposta Doehlert. Essa superfície permite avaliar o domínio experimental em mais níveis e permite a realização de menores números de experimentos em relação às demais superfícies de resposta.

Para atingir as condições ótimas para a extração dos analitos estudados dentro do domínio experimental, foi necessário agrupar as superfícies de respostas obtidas a partir dos modelos de regressão em uma função de desejabilidade. Esta função pode ser utilizada para combinar múltiplas respostas, através da média geométrica, em uma única resposta. Valores próximos de zero são indesejáveis, enquanto valores que se aproximam de um, representam as respostas ideais (Jancic-Stojanovic *et al.*, 2009).

A Figura 3 apresenta a superfície de resposta obtida através da função desejabilidade para as variáveis estudadas. As condições ótimas indicadas pela função desejabilidade foram: tempo de extração 45 min e temperatura de extração de 70 °C.

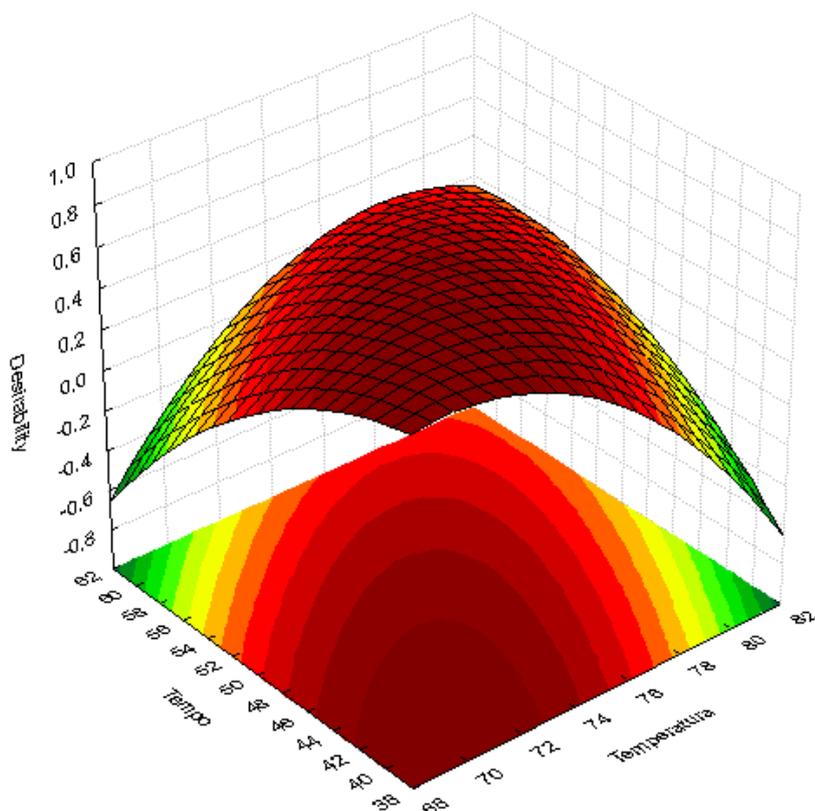


Figura 3. Superfície de resposta da desejabilidade obtida no planejamento Doehlert.

4.5. Condições de extração

Após a otimização as condições finais de extração foram: 2 min no ultrassom, 70 °C de extração durante 40 min a uma rotação de 1600 rpm, a dessorção foi realizada no injetor a 270 °C durante 7 minutos. As otimizações foram realizadas com água ultrapura fortificada com os analitos a uma concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

5. Conclusão

O método cromatográfico desenvolvido possibilitou a análise adequada e simultânea dos 16 HPAs e de seus derivados através da ionização por impacto de elétrons.

O revestimento da fibra contendo PDMS/DVB permitiu melhores valores de extração em relação a fibra de PDMS. A otimização multivariada possibilitou uma extração eficiente dos 16 HPAs e seus derivados em água. As variáveis que se mostraram mais significativas no domínio experimental avaliado foram temperatura e tempo de extração. O método desenvolvido será validado e aplicado em amostras de águas superficiais.

Agradecimentos

Ao CNPQ e ao Ministério da Saúde pelo apoio financeiro, e a Rede Mineira de Cromatografia Avançada (RMCA).

Referências bibliográficas

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016. ISSN 1110-0621. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110062114200237> >.

AGUINAGA, N. et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 596, n. 2, p. 285-290, Jul 2007. ISSN 0003-2670. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248469100013 >.

BAKLANOV, A. et al. Integrated systems for forecasting urban meteorology, air pollution and population exposure. *Atmospheric Chemistry and Physics*, v. 7, p. 855-874, Feb 2007. ISSN 1680-7316. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244395800002 >.

CHUNG, M. Y. et al. Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. *Environmental Science & Technology*, v. 40, n. 16, p. 4880-4886, Aug 2006. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239684900016 >.

DING, C.; NI, H. G.; ZENG, H. Parent and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in rice and implications for human health in China. *Environmental Pollution*, v. 168, p. 80-86, Sep 2012. ISSN 0269-7491. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306034900011 >.

JANCIC-STOJANOVIC, B. et al. Chemometrical evaluation of ropinirole and its impurity's chromatographic behavior. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 8, p. 1263-1269, Feb 2009. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263740300007 >.

MENEZES, H. C. et al. Magnetic N-doped carbon nanotubes: A versatile and efficient material for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 873, n. 0, p. 51-56, 2015.

PLAZA-BOLANOS, P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 41, p. 6303-6326, Oct 2010. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282491000001 >.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VAN GRIEKEN, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, v. 42, n. 13, p. 2895-2921, 2008. ISSN 1352-2310. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231007011351>>.

YANG, X. Y. et al. Indirect- and direct-acting mutagenicity of diesel, coal and wood burning-derived particulates and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 695, n. 1-2, p. 29-34, Jan 2010. ISSN 1383-5718. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274874300006 >.