

Bárbara Alexandra Guimarães Borges

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO DISPERSIVA
LÍQUIDO-LÍQUIDO NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA
POR PAHs E NITRO-PAHs



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

Doutor Armindo Jorge Alves de Melo

COORIENTAÇÃO DE:

Prof^a Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira
Doutora Catarina Isabel Guerra Rodrigues de Mansilha

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

JULHO/2015

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

PUBLICAÇÕES DESENVOLVIDAS NESTA DISSERTAÇÃO :**Comunicação:**

B. Borges, A. Melo, C. Mansilha, I. Ferreira. ***Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples***. Sessão pública de apresentação de projetos de investigação científica (IJUP'15-8º Encontro de Jovens Investigadores da U.Porto), maio de 2015. (Poster)

Artigo:

B. Borges, A. Melo, I. Ferreira, C. Mansilha. ***Dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples*** (submetido).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador/supervisor Doutor Armindo Jorge Alves de Melo pela extraordinária disponibilidade demonstrada, pelos ensinamentos transmitidos, pelo apoio a todos os níveis, sem o qual não seria possível realizar esta dissertação.

À minha coorientadora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira, cujo apoio, aconselhamento, disponibilidade e preciosas orientações foram fundamentais para a conclusão desta dissertação.

À Doutora Catarina Mansilha, pela ajuda e disponibilidade ao longo deste projeto.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o amor, dedicação e por me ensinarem a não desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado José, pelo amor, carinho, incentivo e por acreditar, incondicionalmente, na minha capacidade e no meu trabalho.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial as minhas colegas e amigas, Cláudia e Rita, por toda a amizade, incentivo, pela paciência com que sempre me ouviram e sobretudo por todos os momentos partilhados.

À minha família, amigos, colegas e professores, por todos os momentos de amizade, companheirismo, incentivo e apoio ao longo destes dois anos.

A todos o meu muito obrigado!

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são um vasto grupo de contaminantes ubiqüitários no meio ambiente. A sua emissão, na maioria dos casos, está associada a processos de combustão de combustíveis fósseis e/ou de biomassa. Os PAHs presentes na atmosfera podem sofrer reações de foto-oxidação com radicais atmosféricos dando origem a compostos como os nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-PAHs). Estes compostos são extremamente mutagénicos e carcinogénicos. No entanto, os PAHs e nitro-PAHs são encontrados em concentrações muito reduzidas em matrizes ambientais, nomeadamente em amostras de água. Por estes motivos, a deteção e quantificação deste tipo de compostos é uma tarefa complexa. Neste contexto, foi desenvolvido um método que permitisse uma eficaz determinação e quantificação de PAHs e nitro-PAHs em diferentes amostras de água. A extração dos compostos em estudo foi realizada pela técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), seguindo-se a determinação a partir da cromatografia gasosa com deteção por espetrometria de massa (GC/MS). A seleção da DLLME como método de extração deveu-se ao facto desta ser uma técnica bastante promissora na extração de poluentes orgânicos com concentrações vestigiais. Comparativamente com as técnicas tradicionais a DLLME, apresenta-se como uma técnica ecológica de elevada versatilidade, com elevados fatores de enriquecimento e percentagens de recuperação satisfatórias.

A otimização da técnica de DLLME foi efetuada através de um método univariado para a seleção do solvente extrator (CCl_3) e do solvente dispersante (acetonitrilo). Relativamente aos outros parâmetros (volumes de solventes e quantidade de NaCl), estes foram otimizados a partir de uma análise multivariada, com recurso a um desenho experimental. As condições ótimas obtidas foram 60 μL de clorofórmio, 200 μL de acetonitrilo e 1000 mg de NaCl. A validação do método foi realizada a partir da análise de diversos parâmetros analíticos. Foram obtidos excelentes resultados que demonstram a precisão e exatidão do método utilizado. Após a otimização e validação do método analítico verificou-se a aplicabilidade do método a partir da determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de diferentes matrizes.

Com o estudo desta dissertação foi possível comprovar que a técnica DLLME é extremamente simples, rápida e eficaz na determinação dos PAHs e nitro-PAHs, podendo no futuro próximo ser aplicada em análises de rotina no controlo de qualidade de águas e de outras matrizes aquosas.

Palavras-chave: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos(PAHs), nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos(nitro-PAHs), microextração líquido-líquido dispersiva(DLLME).

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) belong to a group of ubiquitous environmental pollutants. In most cases, PAHs emissions are associated with the combustion processes of fossil fuels and/or wood. In atmosphere, these compounds can suffer photo-oxidative reactions with atmospheric radicals giving other pollutant materials such as nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs). These classes of organic compounds are highly mutagenic and carcinogenic. However, the PAHs and nitro-PAHs are found with very low concentrations in environmental matrices, for instance in water samples. For these reasons the detection and quantification of these pollutants is a very complex task. In this context, an effective method for the detection/quantification of PAHs and nitro-PAHs in different water samples was developed in this work. The extraction of the compounds studied was carried out by the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography mass-spectrometry (GC/MS) method. The selection of DLLME as method for extraction was due to the fact that this technique is very promise for the extraction of organic pollutants with very low concentrations. When compared to traditional techniques, DLLME is an ecological and versatile method with high enrichment factors as well as good extraction recovery.

The optimization of DLLME technique was carried out by a one variable at a time method for the selection of the extractor (CCl_3) and disperser (acetonitrile) solvents. The other parameters (solvent volumes and amount of NaCl) were optimized using a multivariable analysis through an experimental design (central composite design). The ideal conditions were obtained with 60 μL of chloroform, 200 μL of acetonitrile and 1000 mg of NaCl. The method was validated by the analysis of several analytical parameters. Excellent results were obtained and have showed the high precision and accuracy of the DLLME method. After the optimization and validation process of the analytical method, the applicability of DLLME was verified for the detection and quantification of PAHs and nitro-PAHs in different water matrices.

The work developed in this research project allowed to verify the simplicity, easily and effectively of DLLME for the detection of PAHs and some derivatives, which has demonstrated that this technique can be used in the near future as an important tool in the control of the quality of water and other aqueous matrices.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs); nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons(nitro-PAHs); dispersive liquid-liquid microextraction(DLLME).

ÍNDICE GERAL

| | Página |
|---|---------------|
| Declarações e Publicações desenvolvidas nesta dissertação | II e III |
| Agradecimentos | IV |
| Resumo | V |
| Abstract | VI |
| Índice geral | VII |
| Índice de tabelas | VIII |
| Índice de figuras | IX |
| Lista de abreviaturas | X e XI |
| Capítulo 1. Contextualização geral e objetivos do trabalho | 1 |
| 1.1. Poluentes orgânicos persistentes (POPs) | 4 |
| 1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) | 6 |
| 1.2.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio aquático | 10 |
| 1.3. Nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-PAHs) | 14 |
| 1.4. Metodologias analíticas na determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água | 18 |
| 1.4.1. Extração dos PAHs e Nitro-PAHs | 19 |
| 1.4.2. Separação e determinação de PAHs e nitro-PAHs | 24 |
| Capítulo 2. Materiais e métodos | 28 |
| 2.1. Padrões e reagentes | 29 |
| 2.2. Amostragem | 30 |
| 2.3. Extração de PAHs e nitro-PAHs | 31 |
| 2.3.1. Extração de PAHs por SPE | 31 |
| 2.3.2. Extração de PAHs e nitro-PAHs por DLLME | 31 |
| 2.3.3. Desenho experimental | 32 |
| 2.4. Análise por GC-MS e condições instrumentais | 35 |
| 2.5. Validação do método | 37 |
| Capítulo 3. Resultados e discussão | 38 |
| 3.1. Otimização da técnica DLLME | 39 |
| 3.1.1. Teste dos solventes extrator e dispersante | 40 |
| 3.1.2. Desenho experimental | 43 |
| 3.2. Validação do método analítico | 47 |
| 3.2.1. Método de calibração e gama de trabalho | 48 |
| 3.2.2. Linearidade, sensibilidade e limiares analíticos do método | 48 |
| 3.2.3. Seletividade | 50 |
| 3.2.4. Precisão e exatidão | 51 |
| 3.3. Aplicação do método DLLME na validação da contaminação de águas ambientais | 58 |
| Capítulo 4. Conclusões | 61 |
| Capítulo 5. Referências Bibliográficas | 64 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1.1. Propriedades físico-químicas dos PAHs prioritários (adaptado de Mackay et al., 2006). | 9 |
| Tabela 1.2. Concentração de PAHs (ng/L) na precipitação (adaptado de Manoli et al., 2000). | 12 |
| Tabela 1.3. Concentração de PAHs (ng/L) em águas superficiais em rios da Europa (adaptado de Olivella et al., 2006). | 13 |
| Tabela 1.4. Propriedades físico-químicas dos Nitro-PAHs (adaptado de Chemspider). | 17 |
| Tabela 1.5. Comprimentos de onda de emissão e de excitação dos 16 PAHs prioritários. | 25 |
| Tabela 1.6. Comparação dos limites de deteção de diversas metodologias na determinação de PAHs e/ou nitro-PAHs em amostras de água. | 27 |
| Tabela 2.1. Variáveis independentes e os respetivos níveis codificados utilizados na otimização por CCD. | 34 |
| Tabela 2.2. Desenho experimental obtido por CCD. | 34 |
| Tabela 2.3. Tempos de retenção dos PAHs e nitro-PAHs e iões utilizados para na análise quantitativa por GC-MS. | 36 |
| Tabela 3.1. Resultados da análise ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático na otimização da extração dos PAHs | 44 |
| Tabela 3.2. Resultados da análise ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático na otimização da extração dos nitro-PAHs. | 44 |
| Tabela 3.3. Comparação do valor de resposta previsto com o valor obtido experimentalmente nas condições ótimas para cada composto. | 46 |
| Tabela 3.4. Parâmetros obtidos nas curvas de calibração de cada composto. | 50 |
| Tabela 3.5. Parâmetros obtidos para a precisão (ensaios intra-dia e inter-dia) e exatidão do método. | 53 |
| Tabela 3.6. Resultados obtidos no ensaio de recuperação em amostras reais, fortificadas com concentração 50 ng/L de PAHs e nitro-PAHs (A1-água do rio: Praia fluvial do Areinho, Oliveira do Douro; A2-água do mar: Praia do Castelo do Queijo, Porto; A3-água do rio: Foz do Douro, Porto; A4-água da chuva: Porto). | 55 |
| Tabela 3.7. Resultados obtidos para os ensaios interlaboratoriais Round 484, 464 e 452 das técnicas de SPE e DLLME. | 57 |
| Tabela 3.8. Concentrações obtidas nas amostras de água. (A1-água de rio (1); A2-água do mar; A3-água do rio (2); A4- água da chuva; B1,B2,B3,B4 e B5- água subterrâneas; C1,C2,C3 e C4- águas subterrâneas). | 60 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1.1. Fórmulas químicas dos 12 POPs iniciais: aldrina, dieldrina, endrina, clordano, DDT, heptacloro, hexaclorobenzeno (HCB), mirex e toxafeno, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas (PCDFs) e furanos (PCDDs). | 5 |
| Figura 1.2. Distribuição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente (adaptado de Yu, 2005). | 7 |
| Figura 1.3. Mecanismo geral da nitração dos PAHs na fase gasosa (X representa radical OH ou NO ₃) (adaptado de Jariyasopit, 2013). | 15 |
| Figura 1.4. Estruturas moleculares de alguns dos nitro-PAHs mais abundantes na atmosfera (adaptado de Fu et.al, 2012). | 16 |
| Figura 1.5. Resumo dos métodos de extração, clean-up e determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de águas (adaptado de Manoli & Samara, 1999). | 18 |
| Figura 1.6. Etapas do método 550.1 da EPA (esquerda) e diferentes etapas da técnica de SPE (direita) (adaptado de Almeida, 2010). | 20 |
| Figura 1.7. Representação esquemática de uma seringa de SPME (a) (adaptado de King et al, 2003) e representação da técnica SPME (b) (adaptado de Almeida, 2010). | 22 |
| Figura 1.8. Esquema das diferentes etapas da técnica de DLLME (adaptado de Martins et al, 2012). | 23 |
| Figura 1.9. Esquema da reação de redução dos nitro-PAHs em amino-PAHs (adaptado de Hayakawa,2000). | 26 |
| Figura 2.1. Local de amostragem das diversas amostras de água: A- Porto; B- Serra da Estrela e C- Lisboa. | 30 |
| Figura 2.2. Esquema do procedimento da técnica de DLLME realizado. | 31 |
| Figura 2.3. Exemplo de pontos do método central composite design com três variáveis. | 33 |
| Figura 3.1. Esquema do procedimento inicial aplicado na extração de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água. | 40 |
| Figura 3.2. a)Efeito do tipo de solvente extrator na extração de PAHs em água, b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado. | 41 |
| Figura 3.3. a) Efeito do tipo de solvente extrator na extração de nitro-PAHs em água; b) soma da área de resposta dos nitro-PAHs para cada solvente testado. | 41 |
| Figura 3.4. a) Efeito do tipo de solvente dispersante na extração de PAHs em água, b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado. | 42 |
| Figura 3.5. a) Efeito do tipo de solvente dispersante na extração de nitro-PAHs em água, b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado. | 42 |
| Figura 3.6. Curvas de superfície de resposta estimado a partir CCD do procedimento de extração de PAHs e nitro-PAHs. (A)Combinação do efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator na extração de PAHs. (B)Combinação do efeito da quantidade de NaCl e o volume de solvente extrator na extração de PAHs. (C)Combinação do efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator na extração de nitro-PAHs. (D)Combinação do efeito da quantidade de NaCl e o volume do solvente dispersante na extração de nitro-PAHs. | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| Ace | Acenafteno |
| Acy | Acenaftileno |
| An | Antraceno |
| B[a]A | Benzo[a]antraceno |
| B[a]P | Benzo[a]pireno |
| B[b]F | Benzo[b]fluoranteno |
| B[e]P | Benzo[e]pireno |
| B[g,h,i]P | Benzo[ghi]perileno |
| B[k]F | Benzo[k]fluoranteno |
| C18 | Octadecilsilano |
| CAR | Carboxen |
| CCD | Central composite design |
| CE | Convenção de Estocolmo |
| Chr | Criseno |
| Cin | Concentração de PAHs inicial |
| CL | Detetore de quimiluminescência |
| Csed | Concentração de PAHs na fase sedimentada |
| D[a,h]A | Dibenz[a,h]antraceno |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DI-SPME | Microextração em fase solida de imersão direta |
| DLLME | Microextração líquida-líquida dispersiva |
| DVB | Divinilbenzeno |
| EI | Impacto eletrónico |
| EPA | US- Environmental Protection Agency |
| FIn | Fluoranteno |
| Flu | Fluoreno |
| Fullscan | Varrimento total |
| GC | Cromatografia gasosa |
| GC-FID | Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama |
| GC/MS | Cromatografia gasosa com detetor de espectrometria de massa |
| HCB | Hexaclorobenzeno |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| HPLC-FL | Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência |
| HPLC-UV | Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta |
| HS-SPME | Microextração em fase solida headspace |
| I[1,2,3-cd]P | Indeno[1,2,3-c,d]pireno |
| ICH | International Conference on Harmonization of Technical Requirements |
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| ISO | Organização internacional da normalização |
| Kow | Constante de partição octanol/água |
| LD | Limite de deteção |
| LLE | Extração líquido-líquido |

| | |
|-------------------|---|
| LPME | Microextração em fase líquida |
| LQ | Limite de quantificação |
| 9-NAn | 9-nitroantraceno |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| 7-NB[a]A | 7-nitrobenzo[a]antraceno |
| 6-NChr | 6-nitrocriseno |
| 3-NFln | 3-nitrofluoranteno |
| 2-NFlu | 2-nitrofluoreno |
| Nitro-PAHs | Nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| 1-NPy | 1-nitropireno |
| PA | Poliacrilato |
| PAHs | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| PCBs | Bifenilos policlorados |
| PCDDs | Dioxinas |
| PCDFs | Furanos |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PF | Fator de pré-concentração |
| Phe | Fenantreno |
| POPs | Poluentes orgânicos persistentes |
| Py | Pireno |
| RSD | Desvio padrão relativo |
| RSM | Metodologia de superfície de resposta |
| SDB | Estireno-divinilbenzeno |
| SDME | Microextração com gota única |
| SIM | Ião selecionado |
| SPE | Extração em fase-sólida |
| SPME | Microextração em fase-sólida |
| WWF | World Wide Fund for Nature |

CAPÍTULO 1.

CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL E OBJETIVOS DO TRABALHO

- 1.1. Poluentes orgânicos persistentes (POPs)
- 1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs)
- 1.3. Nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-PAHs)
- 1.4. Metodologias analíticas na determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água

1. CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL E OBJETIVOS DO TRABALHO

A água é um recurso natural de valor incalculável, um bem essencial para a existência humana. É uma das maiores riquezas do planeta, sendo mobilizadora do desenvolvimento económico mundial e utilizada nas mais diversas atividades antropogénicas desde a agricultura, indústria, alimentação, higiene pessoal, entre outras. A água é um recurso natural fundamental não só para o ser humano mas também para a manutenção do equilíbrio dos diversos ecossistemas da Terra. Pelo facto de ser um bem indispensável para a qualidade de vida da população, é necessário adotar medidas preponderantes e sustentáveis em relação à utilização de recursos hídricos, com ênfase para o modo como estes são utilizados e preservados.

A nível mundial, a preocupação relativamente à segurança humana e saúde pública tem aumentado significativamente, abrangendo inúmeros cuidados incluindo a segurança/qualidade das águas. Esta preocupação surgiu no século XIX em que se admitia que havia de facto uma relação direta entre o aparecimento de determinadas epidemias/surtos nos seres humanos com a contaminação e poluição das águas (Hilaco, 2012).

A poluição da água caracteriza-se pela alteração das propriedades físicas, químicas ou biológicas dos corpos de água. As modificações destas propriedades devem-se, na maioria dos casos, à introdução direta ou indireta de substâncias originadas por atividades antropogénicas, resultando numa maior exposição do ser humano a contaminantes orgânicos e inorgânicos que podem ser bastante nocivos para a saúde humana (Carapeto, 1999).

A poluição hídrica teve um grande impacto durante as últimas décadas, isso deve-se ao facto de haver um aumento exponencial da população e, conseqüentemente, ocorrer um aumento de produção de lixo e, maiores taxas de poluição da água. Conseqüentemente, nas últimas décadas também se verificou a introdução da designação de poluentes orgânicos persistentes (Xagorarakí & Kuo, 2008).

Os poluentes orgânicos persistentes incluem inúmeros compostos orgânicos tóxicos que resistem à degradação. Acumulam-se nos organismos vivos, propagam-se pelo ar, pela água e pelas espécies migratórias e acumulam-se nos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são poluentes cuja emissão para o meio ambiente está na maioria dos casos associada a queima de combustíveis fósseis e a queima de madeira. Os PAHs presentes na atmosfera podem sofrer reações de foto-oxidação com radicais atmosféricos dando origem a compostos como os nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-PAHs). Estes compostos são extremamente mutagénicos e carcinogénicos. Contudo, ambientalmente estes compostos encontram-se

em concentrações reduzidas. O número de estudos que visam determinar e quantificar os nitro-PAHs existente e o seu impacto nas águas é muito reduzido. Por todas estas razões é imperativo o desenvolvimento de metodologias de elevada sensibilidade. Tendo em conta esta problemática não só ambiental mas também de saúde pública, esta dissertação teve como principais objetivos:

- otimizar e validar uma técnica de extração inovadora e nunca utilizada em nitro-PAHs : microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) ;

- testar e comparar a técnica DLLME com outra técnica utilizada na extração de PAHs e nitro-PAHs em amostras de águas;

- avaliar o grau de contaminação PAHs e de nitro-PAHs em diferentes amostras de água : água do mar, água de rio, água da chuva e águas subterrâneas.

1.1. POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES (POPs)

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são um subconjunto dos poluentes orgânicos emergentes. O impacto destes poluentes tem sido motivo de preocupação por parte da comunidade científica, principalmente, pelo facto de serem um conjunto de compostos orgânicos com propriedades bastante estáveis ao longo do tempo, tal como o próprio nome sugere.

Os poluentes orgânicos persistentes podem incluir diversas substâncias químicas (na sua maioria são compostos aromáticos) que combinam propriedades físico-químicas de persistência e de bioacumulação no ambiente.

O facto de serem persistentes verifica-se quando estes são introduzidos no meio ambiente podem ser transportados/arrastados através dos ventos, das águas, inclusive através dos animais, espalhando-se por todo o planeta sem sofrerem qualquer tipo de degradação (química, fotolítica e/ou biológica). Este efeito é evidenciado pelo facto de estes poluentes serem distribuídos mesmo em regiões onde nunca foram utilizados (Eljarrat & Barceló, 2003; Rodrigues et al., 2007; Sapota et al., 2009; APA, 2010).

O grande avanço da sua utilização ocorreu posteriormente à Segunda Guerra Mundial, época em que muitos POPs começaram a ser comercializados a grande escala. Estes novos compostos químicos sintéticos eram utilizados essencialmente para controlar/extinguir pragas e determinadas doenças, sendo fundamentais para a agricultura e para a indústria. Ao longo dos tempos tem-se verificado diversos efeitos inesperados, principalmente efeitos nefastos para a saúde do ser humano e para a sustentabilidade da Terra. Um dos exemplos mais citados é o caso do diclorodifeniltricloroetano (DDT) (EPA).

Uma outra característica muito importante que define os POPs é o facto de serem bioacumuláveis, como já foi referido. Isto significa que esta classe de poluentes tem grande tendência a ficar acumulada nos tecidos adiposos dos organismos, nomeadamente no ser humano. Este fenómeno resulta das propriedades hidrofóbicas destes compostos, ou seja, elevada lipossolubilidade. Este fenómeno é agravado à medida que aumenta o nível trófico da cadeia alimentar, contribuindo para um aumento de concentração destes poluentes orgânicos persistentes e por sua vez, incrementando a sua toxicidade (Jones & Voogt, 1999).

Este tipo de compostos pode ser uma grande fonte de poluição, desde poluição atmosférica, poluição dos solos e também da água. Os POPs apresentam propriedades não polares, e podem ser considerados como grandes contaminantes do meio aquático. Isto deve-se ao facto de ficarem adsorvidos nos sedimentos orgânicos contidos nestes meios, para além de se encontrarem nos seres vivos aquáticos.

Com o objetivo de controlar e evitar a contaminação, para uma maior proteção da saúde pública, surgiu a Convenção de Estocolmo (CE). Esta convenção foi um tratado global entre 151 Estados e organizações, onde se abordou a problemática ambiental dos poluentes orgânicos persistentes. Inicialmente foram estabelecidos 12 principais poluentes orgânicos persistentes (**Figura 1.1.**), sendo estes subdivididos em três principais grupos: pesticidas, químicos industriais e POPs produzidos não intencionalmente (Stockholm Convention; APA, 2010).

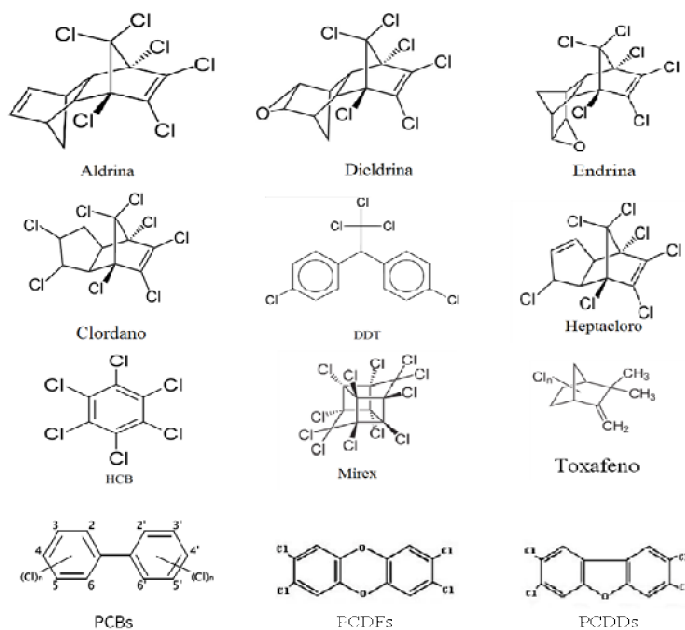


Figura 1.1. Fórmulas químicas dos 12 POPs iniciais: aldrina, dieldrina, endrina, clordano, DDT, heptacloro, hexaclorobenzeno (HCB), mirex e toxafeno, bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas (PCDFs) e furanos (PCDDs).

Atualmente, já se consideram 22 poluentes orgânicos persistentes. Contudo, a tentativa constante de introdução de novos potenciais POPs é bastante dificultada. Isto deve-se ao facto de ser muito difícil avaliar o carácter de persistência, bioacumulação e de toxicidade, uma vez que existe pouca informação e tempo para um melhor reconhecimento destes novos compostos químicos.

Segundo a World Wide Fund for Nature (WWF), em 2005 existia uma lista de 20 grupos de compostos químicos orgânicos potenciais candidatos a serem incluídos na lista elaborada pela comunidade europeia. Alguns destes compostos já foram introduzidos, como por exemplo o composto hexabromobifenilo. No entanto, na sua maioria, ainda está sob investigação criteriosa, como é o caso dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, são um grupo de compostos de extrema importância ambiental, essencialmente pelo facto de serem produzidos no quotidiano a partir de mais diversas atividades do ser humano. Ao longo desta dissertação serão abordadas as propriedades e efeitos nefastos de PAHs no ambiente.

1.2. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAHs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos para além de serem potenciais POPs, apresentam-se como uma classe única, constituídos por inúmeros compostos. Os PAHs caracterizam-se, tal como a própria nomenclatura sugere, por serem compostos orgânicos constituídos no mínimo por 2 anéis aromáticos fundidos. A formação deste tipo de compostos está relacionada com os processos de combustão incompleta de matéria orgânica a elevadas temperaturas. A produção deste tipo de contaminantes está muitas vezes associada a misturas bastante complexas de PAHs, e por conseguinte, o ser humano não está exposto a um único PAH de cada vez, mas sim a misturas destes compostos em diferentes matrizes.

A concentração de PAHs, assim como a composição das misturas de PAHs produzidas está totalmente dependente da fonte emissora. Existem diversos tipos de fontes, podendo ser de origem natural ou antropogénica. As possíveis fontes naturais não contribuem significativamente para a emissão global de PAHs, comparativamente com as fontes antropológicas, das quais se podem destacar as erupções vulcânicas e os incêndios florestais. Relativamente às emissões provenientes das atividades humanas, consideram-se os processos de combustão associados à obtenção de energia, como por exemplo a queima de combustíveis fósseis (fonte petrogénica) e de madeira (origem pirolítica) entre outros, assim como os processos de combustão para eliminação de resíduos como é o caso da incineração (Maliszewska-Kordybach, 1999; Zaghdan et al., 2007; Sapota et al., 2009; Almeida, 2010).

O maior impacto ambiental concentra-se essencialmente nos países industrializados e nas zonas urbanas, sendo que nos meses de inverno a percentagem de PAHs no meio ambiente é significativamente mais elevada. Esta variação sazonal da concentração de PAHs está associada ao facto de no inverno ocorrer uma maior necessidade de obtenção de energia, originando uma emissão mais elevada deste tipo de poluentes. Para além desta evidência, os PAHs são considerados compostos fotossensíveis, isto indica que a sua degradação aumenta expressivamente quando há maior fluxo solar (Maliszewska-Kordybach, 1999; Feilberg, 2000; Zaghdan et al., 2007; Sapota et al., 2009; Almeida, 2010).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser classificados de acordo com o número de anéis aromáticos que apresentam na sua estrutura molecular, PAHs constituídos até quatro anéis condensados são denominados como PAHs “leves”, enquanto que os compostos que apresentam mais de quatro anéis são designados de PAHs “pesados”. A estrutura molecular de cada PAH é muito importante na sua caracterização individual, permitindo compreender /estimar o seu comportamento no meio ambiente após a sua emissão.

De uma forma geral, os PAHs mais pesados são compostos mais estáveis, com menor volatilidade e elevados pontos de fusão, mais lipofílicos e com níveis de toxicidade superiores do que os PAHs leves; no entanto, os PAHs leves apresentam uma solubilidade maior em água (Maliszewska-Kordybach, 1999; Wenzl et al., 2006).

A elevada estabilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos permite a sua distribuição nos diferentes recursos naturais: ar, água e solo; posteriormente a sua emissão para o meio ambiente. Na atmosfera, os PAHs podem estar na forma de vapores, ou podem estar adsorvidos em pequenas partículas. Uma vez neste estado, os PAHs podem ser transportados até longas distâncias, até ocorrer a precipitação, contaminando águas e solos. A maioria dos PAHs não se dissolve facilmente em água, contudo nas águas superficiais é possível encontrar PAHs adsorvidos em pequenos sedimentos; conseqüentemente verifica-se a contaminação dos organismos aquáticos. Os PAHs também estão associados à contaminação dos solos, isto deve-se à grande afinidade existente entre estes compostos e a matéria orgânica característica dos solos.

Por vezes, quando o solo está contaminado acabam por afetar também a qualidade das águas subterrâneas devido às infiltrações de águas. Após a produção de PAHs existe um ciclo de distribuição envolvendo os diferentes tipos de recursos do sistema terra, como se pode observar no esquema da **Figura 1.2.** (Yu, 2005).

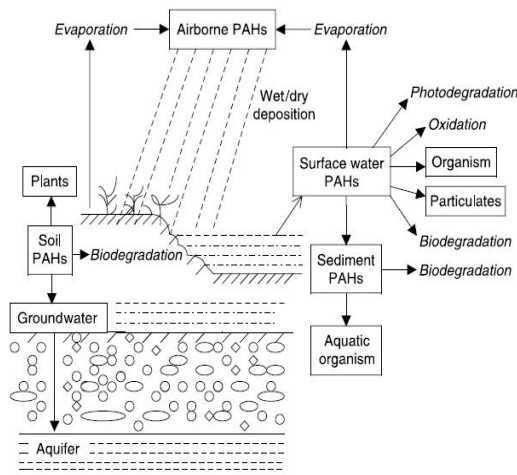


Figura 1.2. Distribuição dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos no meio ambiente (adaptado de Yu, 2005).



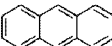
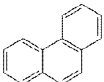

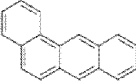
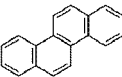
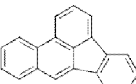
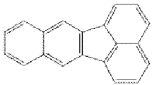
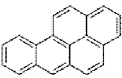
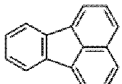
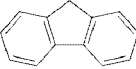
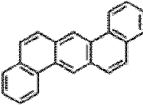
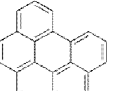
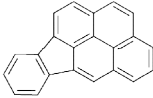
Embora existam mais de 100 compostos considerados como PAHs, a EPA (US-Environmental Protection Agency) considera 16 PAHs como poluentes prioritários, sendo que esta classificação é baseada nos seguintes critérios: toxicidade, potencial de exposição humana, segundo a avaliação de risco e também de acordo com as informações científicas existentes. Na **Tabela 1.1.**, estão descritas as principais características físico-químicas dos 16 PAHs prioritários.

Os PAHs são compostos com tendência a apresentar uma estrutura planar rígida, isto deve-se essencialmente ao facto de serem originados pela condensação de anéis adjacentes. Como também se pode observar na **Tabela 1.1.**, a maioria dos PAHs prioritários apresentam, como seria de esperar, baixos valores de solubilidade em água e valores relativamente altos para a constante de partição octanol/água (K_{ow}). Verifica-se que quanto maior for o número de anéis fundidos (maior massa molecular), menor é a solubilidade em água e conseqüentemente maior é a lipossolubilidade. A constante de partição octanol/água permite averiguar a afinidade dos compostos com a matéria orgânica. Esta avaliação é muito importante para matrizes ambientais, sendo que quanto mais elevado for o valor de $\log K_{ow}$, maior será o seu carácter hidrofóbico.

Com a conjugação destes dois parâmetros, é possível prever que a distribuição de PAHs dissolvidos no ar e na água é mais facilitada fundamentalmente por espécies constituídas com três anéis (maior solubilidade), no entanto a distribuição de PAHs com 4, 5 e 6 anéis ocorre geralmente em aerossóis, partículas e sedimentos.

A permanência destes compostos no meio ambiente também depende da sua massa molecular, uma vez que os compostos de menor massa molecular são mais facilmente degradados e os PAHs mais pesados são considerados mais persistentes sofrendo reações químicas e bioquímicas muito lentas (Manoli et al., 2000; Tavares, 2009; Almeida, 2010).

Tabela 1.1. Propriedades físico-químicas dos PAHs prioritários (adaptado de Mackay et al., 2006).

| Propriedades Físico-Químicas | | | | | | |
|---|---|---------------------|---------------------|------------------------|---|--|
| Composto Químico | Estrutura química | Massa molar (g/mol) | Ponto de fusão (°C) | Ponto de ebulição (°C) | Constante de partição octanol/água (log K _{ow}) | Solubilidade em água (g/m ³) |
| Naftaleno (Na) |  | 128.2 | 80 | 218 | 3.17 | 31.7 |
| Acenaftileno (Acy) |  | 152.2 | 92 | 280 | 4.00 | 16.1 |
| Antraceno (An) |  | 178.2 | 216 | 340 | 4.45 | 0.0698 |
| Fenantreno (Phe) |  | 178.2 | 99 | 340 | 4.46 | 1.29 |
| Pireno (Py) |  | 202.3 | 151 | 404 | 4.88 | 0.133 |
| Benzo[a]antraceno (B[a]A) |  | 228.3 | 161 | 438 | 5.79 | 0.0168 |
| Criseno (Chr) |  | 228.3 | 256 | 448 | 5.73 | 0.00327 |
| Benzo[b]fluoranteno (B[b]F) |  | 252.3 | 168 | 481 | 5.78 | 0.0015 |
| Benzo[k]fluoranteno (B[k]F) |  | 252.3 | 217 | 480 | 5.94 | 0.00109 |
| Benzo[a]pireno (B[a]P) |  | 252.3 | 181.1 | 495 | 5.97 | 0.00182 |
| Fluoranteno (Fln) |  | 202.3 | 110 | 384 | 5.16 | 0.199 |
| Fluoreno (Flu) |  | 166.2 | 115 | 295 | 4.18 | 1.90 |
| Dibenz[a,h]antraceno (D[a,h]A) |  | 278.3 | 269.5 | 524 | 6.50 | N.D. |
| Benzo[ghi]perileno (B[g,h,i]P) |  | 276.3 | 273 | 525 | 6.63 | N.D. |
| Indeno[1,2,3-c,d]pireno (I[1,2,3-cd]P) |  | 276.3 | 162 | N.D. | N.D. | N.D. |

1.2.1. HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NO MEIO AQUÁTICO

A contaminação das águas superficiais com PAHs deve-se essencialmente aos fenómenos de precipitação, assim como aos efluentes industriais e municipais, e derrames petrolíferos. A precipitação tem uma grande relevância para a poluição dos meios aquáticos, estima-se que, por exemplo, a introdução de PAHs nos rios Ebro e Ródano apresenta um valor médio de 1.3 e 5.3 ton/ano, enquanto que a introdução no mar Mediterrâneo apresenta um valor de 47.5 ton/ano. Estima-se também que aproximadamente 10-80% dos PAHs que se encontram nos oceanos deve-se a esta via de poluição. Por este motivo, existem diversos estudos que visam determinar a concentração destes compostos existentes nas águas das chuvas (Manoli & Samara, 1999).

A precipitação atmosférica inclui componentes atmosféricos de deposição seca (gases dispersos em suspensão) e de deposição húmida (chuva); estes conceitos são fundamentais relativamente à parte da amostragem de águas de precipitação, sendo que estas duas vias de deposição permitem uma melhor diferenciação de perfis de PAHs.

Na **Tabela 1.2.** são apresentados os valores obtidos para amostras de águas de precipitação de diferentes locais. A partir desta tabela é possível observar que independentemente da metodologia analítica utilizada para a determinação de PAHs, os compostos que apresentam maior concentração, na maioria dos casos estudados, são: Fluoranteno (*Fln*), Pireno (*Py*) e Fenantreno (*Phe*) (Manoli et al., 2000). A partir destes estudos de quantificação de PAHs nas águas de precipitação, é possível avaliar o impacto desta contaminação nas águas de superfície, recorrendo à comparação das respetivas concentrações. Em muitos casos, como seria de esperar, é possível observar que a concentração de PAHs na chuva é mais elevada que nas massas de água (Manoli & Samara, 1999; Manoli et al., 2000).

Uma outra fonte de poluição muito determinante para valores elevados de PAHs em águas superficiais são os efluentes industriais, dado que a maioria das indústrias químicas (por exemplo indústrias produtoras de solventes, lubrificantes, tintas, entre outros) recorre geralmente a PAHs de baixa massa molecular como o naftaleno, acenaftaleno, fenantreno e fluoreno e, conseqüentemente, originam efluentes com elevado teor de PAHs (Manoli & Samara, 1999).

Relativamente à concentração de PAHs nas águas de superfície, é possível observar a partir da **Tabela 1.3.** que existe uma grande variação entre os diferentes rios da Europa. Na maioria dos casos estudados, apresentam valores mais elevados para o fluoranteno (*Fln*). Contudo, os rios Gregos, apresentam maior concentração em fenantreno (*Phe*) e o

Rio Llobregat em Espanha as concentrações mais elevadas correspondem ao criseno + trifenilo e ao composto benzo[a]antraceno (*B[a]A*).

A qualidade das águas de superfície destinadas ao consumo humano em Portugal é regulada pelo Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto. Segundo este decreto-Lei, o valor máximo admissível para que as águas superficiais possam ser destinadas ao consumo humano não deve ultrapassar 200 ng/L, assim como é estabelecido que para a qualidade mínima das águas de superfície, a soma da concentração dos seis PAHs de referência (*Flu*; *B[b]F*; *B[k]F*; *B[a]P*; *B[g,h,i]P*; *I[1,2,3-cd]P*) não deverá ultrapassar 1×10^5 ng/L.

No que diz respeito às águas subterrâneas, a sua contaminação na maioria dos casos está associada à contaminação das águas superficiais, mas também se deve ao processo de lixiviação de solos poluídos com PAHs. No entanto, as águas subterrâneas sofrem naturalmente fenómenos de filtração com as diversas camadas de solos, devido ao facto destes compostos possuírem características hidrofóbicas, o que possibilita a sua adsorção na matéria orgânica dos solos.

Existem alguns estudos em águas subterrâneas dos Estados Unidos da América que reportam a existência de uma concentração aproximadamente entre 0.2 e 6.9 ng/L, enquanto que a concentração da água superficial correspondente está compreendida entre 0.1 e 800 ng/L. Também foi evidenciado que quando ocorriam fenómenos de precipitação, observava-se um aumento considerável da concentração de PAHs nas águas subterrâneas; tal facto demonstra que estes fenómenos de filtração são relativamente rápidos podendo provocar danos mais severos quando as águas são expostas a elevadas concentrações (Manoli & Samara, 1999).

Tabela 1.2. Concentração de PAHs (ng/L) na precipitação (adaptado de Manoli et al., 2000).

| PAHs | Portland (U.S.A) -Precipitação húmida -PAHs dissolvidos | Portland (U.S.A) -Precipitação húmida -PAH em fase particulada | Ilha Royale (U.S.A) -Precipitação húmida | Alemanha -Precipitação húmida | Chesapeake Bay -Precipitação húmida | Great Lakes -Precipitação húmida | Alemanha -Precipitação húmida | Finlândia -Precipitação húmida -Precipitação seca |
|-----------------------|---|--|---|-------------------------------------|---|--|-------------------------------------|---|
| | [1] | [2] | [3] | [4] | [5] | [6] | [7] | [7] |
| An | 5.1 | - | 0.2 | - | - | - | 0.7-1.82 | 0.2 |
| Phe | 90 | 4.1 ^(Phe+An) | 1.6 | - | 2.0-8.0 | 3.2-11 | 12.2-36 | 9.0 |
| Py | 39 | 4.1 | 1.0 | 84 | - | 2.7-8.2 | 11.6-29 | 6.0 |
| B[a]A | 3.3 | 1.5 | 0.3 | 20 | - | - | 3.0-13.8 | 1.6 |
| Chr | 7.9 | 3.6 | 0.6 ^(Chr+ trifenileno) | 49 | - | - | 6.2-13.8 | 4.0 ^(Chr+ trifenileno) |
| B[b]F | 1.6 | 9.2 | - | 52 | - | - | 6.1-11.9 | 4.3 |
| B[k]F | - | - | - | 25 | - | - | 2.7-5.6 | 1.5 |
| B[a]P | - | 2.8 | 0.5 | 29 | - | - | 3.8-6.9 | 2.2 |
| B[e]P | 0.37 | 3.0 | 1.0 | 46 | 0.5-10 | - | - | - |
| Fln | 48 | 4.4 | 1.3 | 149 | 2.0-3.0 | - | 16.4-56 | 8.4 |
| (D[a,h]A) | - | - | - | 4.0 | - | 2.6-8.2 | 1.2-2.3 | - |
| (B[g,h,i]P) | - | 6.0 | 1.0 | 33 | - | 2.9-5.1 | 1.8-8.2 | 2.7 |
| (I[1,2,3-cd]P) | - | - | 1.0 | 33 | - | - | 2.9-7.4 | 5.5 |

[1] Ligocki et al., 1985^a ; [2] Ligocki et al., 1985^b ; [3] Mcveety & Hites, 1988; [4] Levsen et al., 1991;

[5] Dickhut & Gustafson, 1995; [6] Hoff et al., 1996; [7] Berg & Hjellbrekke, 1988.

Tabela 1.3. Concentração de PAHs (ng/L) em águas superficiais em rios da Europa (adaptado de OLIVELLA et al., 2006).

| PAHs | Rio Danubio (Alemanha) | Rio Aach (Alemanha) | Rio Elba (Alemanha) | Rio Tamisa (Reino Unido) | Rio Severn (Reino Unido) | Rio Trent (Reino Unido) | Rio Loudias (Grécia) | Rio Aliakmon (Grécia) | Rio Sena (França) | Rio Llobregat (Espanha) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| | [1] | [1] | [2] | [1] | [3] | [3] | Media Conc. [4] | Media Conc. [4] | [5] | [6] |
| An | - | - | 0.56-2.5 | - | - | - | <1.7-3.8 | <1.7 | - | 0.3-2.9 |
| Phe | - | - | 4.1-22 | - | - | - | 31-70 | 30-48 | 6.21 | 1.1-8.7 |
| Py | - | - | 7.3-33 | - | - | - | 3.5-20 | 3.3-9.5 | 8-48 | 0.8-10.3 |
| B[a]A | <10-10 | 100-390 | <2-12 | - | - | - | <0.9-9.4 | 5.3-11.3 | 3-21 | 07-21.5 |
| Chr +trifenilo | - | - | 3.5-26 | - | - | - | 0.9-7.4 | 1.2-3.3 | 6.5-35 | 2.3-25.3 |
| B[b]F | <10-20 | 80-360 | <3-30 | 40-120 | - | - | <1-3.1 | <1 | - | 0.6-8.5 |
| B[k]F | <10 | 130-170 | <2-13 | - | 0.8-7.7 | 33-265 | 0.2-0.4 | 0.2-0.3 | 2.3-40 | 0.1-2.1 |
| Fln | 60-110 | 380-760 | 7.6-40 | 140-360 | 15-128 | 83-943 | <14 | <14 | 0.5-50 | 1-9.1 |
| (D[a,h]A) | - | - | 0.53-1.6 | - | - | - | <1.3-1.6 | <1.3 | - | 0.1-1.5 |
| (B[g,h,i]P) | <10 | 40-100 | 2.8-18 | 60-160 | 2-11.3 | 75-688 | <2.1-3.1 | <2.1-2.2 | 5-18 | 0.2-3.8 |
| (I[1,2,3-cd]P) | <10 | 120-220 | 2.3-15 | 50-210 | 3.9-10 | 40-195 | <2.5-3.7 | <2.5 | 0.3-16 | 0.2-2.1 |

[1] Moore & Ramamoorthy, 1984; [2] Gotz, 1998; [3] Sorrell et al., 1980; [4] Manoli et al., 2000;

[5] Fernandes et al., 1997; [6] Olivella et al., 2006.

1.3. NITRO-HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (NITRO-PAHs)

Os nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-PAHs) pertencem ao grupo de compostos classificados como PAHs substituídos, sendo estes caracterizados por possuírem um ou mais grupos nitro na sua estrutura. Os nitro-PAHs são uma classe de poluentes amplamente distribuídos pelo meio ambiente, nomeadamente no solo, água e biota, assim como verifica com os PAHs (Jinhui & Lee, 2001; Cecinato, 2003).

De uma forma geral, e como seria de esperar, esta classe de poluentes apresenta maiores níveis de contaminação em áreas urbanas, no entanto ambientalmente as concentrações de nitro-PAHs são bastante inferior as concentrações de PAHs. Embora estes contaminantes existam em quantidades vestigiais, nos últimos anos têm suscitado alguma preocupação por parte da comunidade científica. Esta preocupação surge pelo facto dos nitro-PAHs apresentarem propriedades mutagénicas e cancerígenas mais elevadas, aproximadamente 100000 e 10 vezes respetivamente, comparando com os PAHs Segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC), alguns nitro-PAHs encontram-se classificados no grupo 2A (prováveis carcinogénicos para o ser humano) como é o caso dos compostos 6-nitrocriseno e 1-nitropireno; e no grupo 2B (possíveis carcinogénicos para o ser humano), neste grupo encontram-se compostos como 2-nitrofluoreno,5-nitroacenaphthene, entre outros (Fu & Saenz, 1999; Hayakawa, 2000; Bamford & Baker, 2003; Albinet et al., 2007^a;Fu et al., 2012).

Analogamente aos seus congéneres PAHs, os nitro-PAHs têm como principal fonte de emissão a combustão incompleta de matéria orgânica, são associados essencialmente à combustão incompleta nos motores de diesel e de gasolina, à queima de combustíveis fósseis para obtenção de energia, fundição de alumínio, entre outros. Após o processo de combustão, os PAHs, a elevadas temperaturas, sofrem reações de substituição eletrofílicas na presença de dióxido de azoto (NO_2) originando nitro-PAHs. Compostos como 1-nitropireno, 9-nitroantraceno, 3-nitrofluoranteno e 2-nitrofluoreno são exemplo de nitro-PAHs emitidos diretamente a partir da câmara de combustão dos motores a diesel (Bamford & Baker,2003; Feilberg et al., 2001; Zielinska & Samy, 2006; Valle-Hernández et al., 2010; Zhang et al., 2011).

Para além destas fontes, os nitro-PAHs podem se formar na atmosfera a partir da degradação química ou biológica dos PAHs. A degradação química dos PAHs ocorre por reações de foto-oxidação com oxidantes atmosféricos, como é o caso dos seguintes radicais: O_3 , NO_2 , N_2O_5 , OH e NO_3 . A reação (esquematizada na **Figura 1.3.**) inicia-se com o ataque radicalar, geralmente dos radicais OH ou NO_3 , na posição de maior densidade do anel aromático, verificando-se a formação dos adutos OH-PAHs ou NO_3 -

PAHs, respetivamente. Após esta etapa sucede-se a adição do radical NO_2 e conseqüentemente ocorre a perda de água ou de HNO_3 dando origem aos diferentes nitro-PAHs como é o caso do 2-nitrofluoranteno e 2-nitropireno. A taxa de formação de nitro-PAHs por esta via está totalmente dependente da concentração existente de PAHs e dos radicais no meio ambiente, entre outros fatores (Bamford & Baker, 2003; Zielinska & Samy, 2006; Feilberg et al., 2001; Zhang et al., 2011; Ringuet et al., 2012; Jariyasopit, 2013; Jariyasopit et al., 2014).

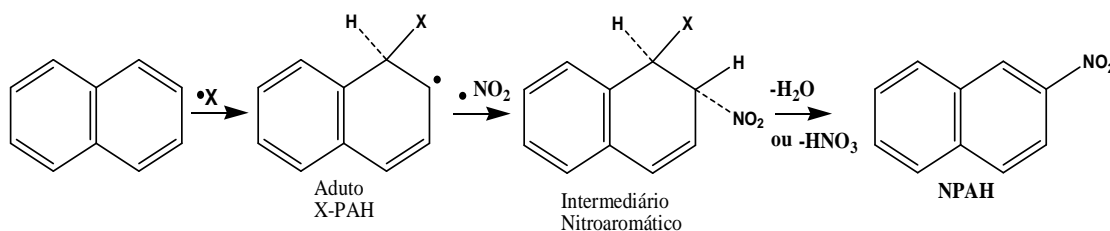


Figura 1.3. Mecanismo geral da nitração dos PAHs na fase gasosa (X representa radical OH ou NO_3) (adaptado de Jariyasopit, 2013).

Os isómeros de nitro-PAHs obtidos por nitração eletrofilica (emissão direta) são distintos dos nitro-PAHs originados por ataque radicalar (reações atmosféricas), este fenómeno é justificado pelo facto, como já foi referido, de os radicais atmosféricos efetuarem o ataque nos locais de maior densidade de eletrões nos anéis aromáticos dos PAHs. Na **Figura 1.4.** estão esquematizadas as estruturas moleculares de alguns dos isómeros de nitro-PAHs mais abundantes na atmosfera (Feilberg et al, 2001; Bamford & Baker, 2003; Albinet et al, 2007^b; Fu et al., 2012).

O nitro-PAH mais abundante na atmosfera é o 1-nitropireno, este poluente é formado a partir da reação incompleta dos combustíveis de diesel. Adicionalmente, os compostos 9-nitroantraceno, 3-nitrofluoranteno e 2-nitrofluoreno são outros compostos também facilmente encontrados na atmosfera, sendo estes emitidos a partir de motores de diesel (Dimashki, 2000; WHO, 2003; Bamford & Baker, 2003).

O composto 1-nitropireno foi o primeiro nitro-PAH identificado em amostras ambientais. Atualmente estes contaminantes, tal como os PAHs, são analisados em diversas matrizes, das quais se destacam as determinações de nitro-PAHs em gás e partículas atmosféricas, partículas de diesel, alimentos e outras amostras ambientais (Ciganek et al., 1999; Feilberg et al., 2001).

No que diz respeito as propriedades físico-químicas dos seis nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados ao longo deste trabalho, como se pode observar pela **Tabela 1.4.**, são compostos que apresentam uma constante de partição octanol /água mais baixa que os respetivos PAHs, e conseqüentemente maiores valores de solubilidade em água. É possível verificar estas características devido ao efeito da polaridade do grupo

nitro na sua estrutura. Apesar de possuírem uma maior solubilidade em água, são classificados como compostos bastante hidrofóbicos.

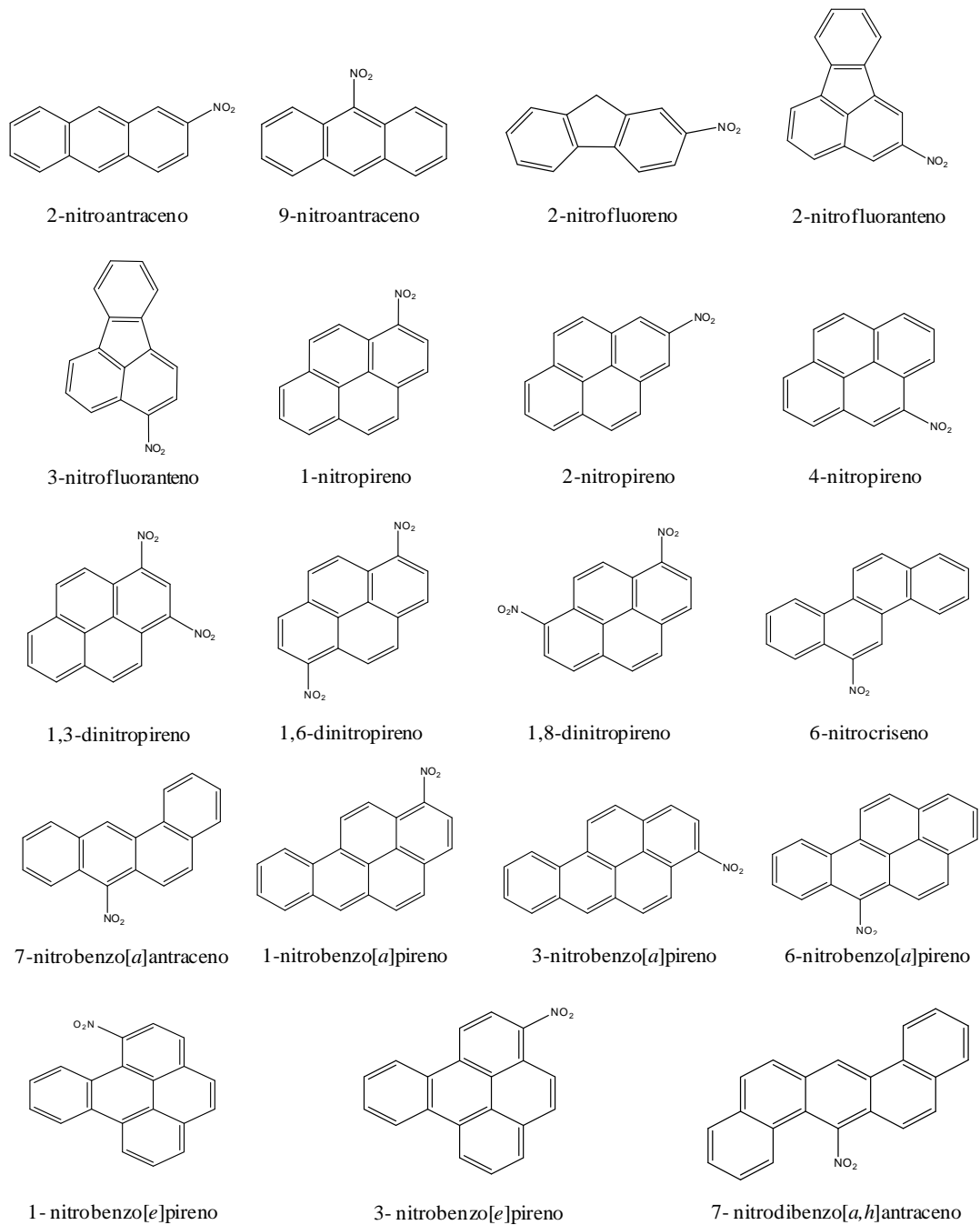
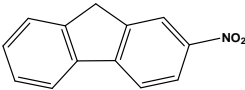
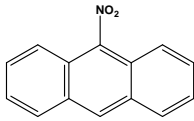
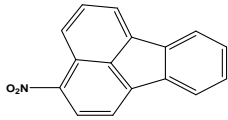
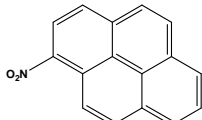
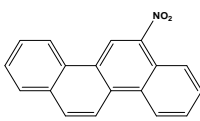
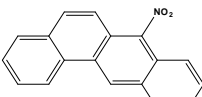


Figura 1.4. Estruturas moleculares de alguns dos nitro-PAHs mais abundantes na atmosfera (adaptado de Fu et al., 2012).

Tabela 1.4. Propriedades físico-químicas dos Nitro-PAHs (adaptado de Chemspider ¹).

| Propriedades Físico-Químicas | | | | | | |
|---|---|---------------------|---------------------|------------------------|---|--|
| Composto Químico | Estrutura química | Massa molar (g/mol) | Ponto de fusão (°C) | Ponto de ebulição (°C) | Constante de partição octanol/água (log K _{ow}) | Solubilidade em água (g/m ³) |
| 2-nitrofluoreno (2-NFlu) |  | 211.2 | 158 | 375 | 1.72 | 1288? |
| 9-nitroantraceno (9-NAn) |  | 223.2 | 146 | 403 | 1.96 | 53.51 |
| 3-nitrofluoranteno (3-NFln) |  | 247.3 | 253 | 587 | 2.55 | 12.46 |
| 1-nitropireno (1-NPy) |  | 247.3 | 155 | 446 | 2.55 | 12.46 |
| 6-nitrocriseno (6-NChr) |  | 273.1 | 215 | - | 5.34 | 0.0153 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno (7-NB[a]A) |  | 273.1 | 266 | 614 | 3.14 | 2.8 |

Assim como se sucede com os PAHs, as características físicas e químicas dos nitro-PAHs influenciam a forma como se distribuem no meio ambiente. A introdução dos nitro-PAHs em ambientes aquáticos deve-se essencialmente a fenômenos de deposição atmosférica e a escoamentos superficiais, no entanto também se pode verificar possivelmente a transformação de PAHs em nitro-PAHs no meio aquático contribuindo para o aumento de contaminação das águas (Qiao et al.,2014).

Como já foi referido, as concentrações desta classe de poluentes são bastante reduzidas em matrizes ambientais. Relativamente às concentrações de nitro-PAHs em amostras de água este problema é mais evidenciado comparativamente a amostras de gás/partículas atmosféricas e a amostras de solos. Por este motivo, o número de estudos sobre nitro-PAHs em águas ambientais é muito escasso, para além disso, apesar de os nitro-PAHs serem considerados como compostos mutagénicos e cancerígenos, não existe

¹ Chemspider : <http://www.chemspider.com/> (acedido em 23/03/2015).

qualquer legislação que estipule valores limites para os níveis de concentração destes poluentes na água. Por estas duas razões é fundamental o desenvolvimento de metodologias de maior sensibilidade e especificidade que permitam determinar mais facilmente e eficazmente os nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas ambientais (Chondo et al., 2013; Qiao et al., 2014).

1.4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS NA DETERMINAÇÃO DE PAHs E NITRO-PAHs EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Ao longo dos últimos anos tem-se verificado um incremento significativo no desenvolvimento de novas metodologias que permitem analisar poluentes orgânicos, como é o caso dos PAHs e nitro-PAHs em amostras ambientais. O grande problema que advém das amostras ambientais é o facto de serem matrizes de elevada complexidade.

A determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e dos nitro-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em águas tem outras dificuldades associadas. A grande problemática que envolve a sua determinação é o facto da concentração de PAHs e nitro-PAHs ser bastante reduzida em água, devendo-se às suas características apolares. Na maioria dos casos esta concentração encontra-se abaixo dos limites de deteção de alguns instrumentos analíticos (Manoli & Samara, 1999; MCGOWIN, 2006; Almeida, 2010).

Para a realizar a determinação de PAHs e nitro-PAHs recomenda-se, inicialmente, a utilização de uma técnica de extração, seguindo-se (caso necessário) o processo de *clean-up* permitindo purificar a amostra e por fim a determinação recorrendo a instrumentos analíticos (**Figura 1.5**).

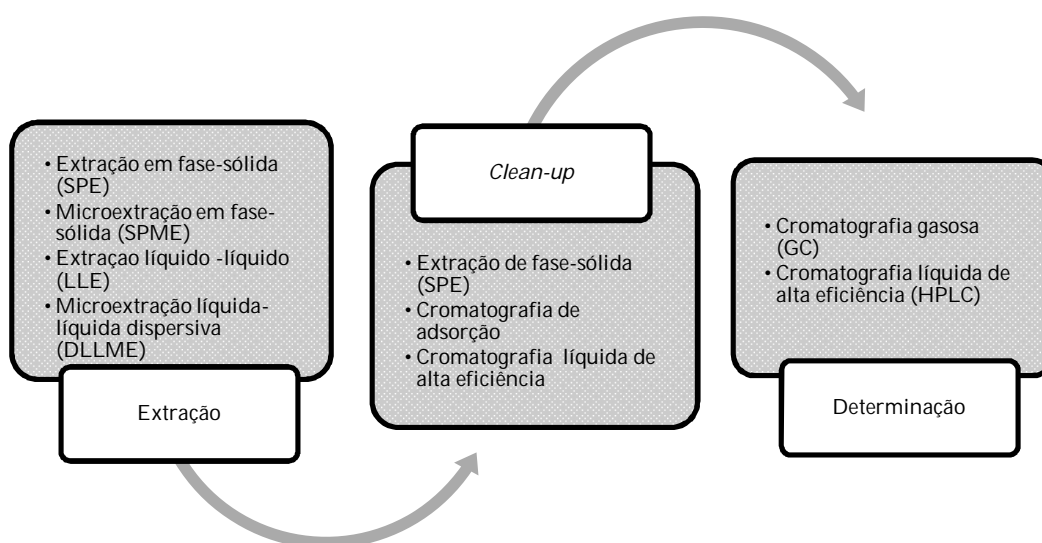


Figura 1.5. Resumo dos métodos de extração, *clean-up* e determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de águas (adaptado de Manoli & Samara, 1999).

1.4.1. EXTRAÇÃO DOS PAHs E NITRO-PAHs

Existe uma grande variedade de métodos de extração de PAHs, mas sem dúvida que os métodos mais utilizados em amostras de água são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração de fase sólida (SPE) (Cavalcante et al., 2007; Mekiki et al., 2005).

Extração líquido-líquido (LLE)

A extração líquido-líquido foi dos primeiros métodos a ser desenvolvidos para a pré-concentração de PAHs em amostras aquosas ambientais. Este método tem a vantagem de não ser bastante dispendioso no que diz respeito a equipamentos, no entanto acarreta inúmeras desvantagens, nomeadamente o facto de ser pouco sustentável a nível ambiental. A extração líquido-líquido baseia-se na partição dos compostos a analisar (neste caso os PAHs e nitro-PAHs) entre uma fase aquosa e um solvente orgânico, sendo estes imiscíveis entre si. Para conseguir com este método baixos limites de deteção era necessário recorrer a grandes volumes de água e conseqüentemente a grandes volumes de solventes orgânicos, que na sua generalidade são bastante tóxicos e inflamáveis, tais como o *n*-hexano, tolueno, benzeno, diclorometano, ciclohexano, entre outros. O grande consumo de solventes orgânicos está associado a elevados custos e à necessidade de muito tempo para executar a extração, envolvendo diversas etapas e, conseqüentemente, perdas dos compostos a analisar e possibilidade de contaminação (Manoli & Samara, 1999; Almeida, 2010; MCGOWIN, 2006).

Extração em fase sólida (SPE)

Atualmente, a extração em fase sólida é uma das técnicas mais utilizadas para extração e pré-concentração de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água. A extração ocorre por adsorção seletiva, onde se estabelece forças físicas e químicas entre os compostos a analisar e a fase sólida estacionária (Almeida, 2010; MCGOWIN, 2006; COCHRAN et al., 2012; MOORE & RAMAMOORTHY, 2013). A fase sólida também é vulgarmente denominada como adsorvente. No caso da extração de PAHs em amostras de águas ambientais, os adsorventes mais indicados são o estireno-divinilbenzeno (SDB), o polidimetilsiloxano (PDMS) e o octadecilsilano (C18), para os nitro-PAHs alguns estudos reportam a utilização de cartuchos C18, cartuchos de SDB e também cartuchos aminopropil (Manoli & Samara, 1999; Barceló & Ferrer, 1999; Almeida, 2010; MCGOWIN, 2006; Toledo et al., 2007; Cavalcante et al., 2007; Qiao et al., 2013; Chondo et al., 2013).

Na **Figura 1.6.** encontra-se representado as diferentes etapas descritas para a determinação de PAHs em água de consumo recorrendo a técnica de SPE, segundo o Método 550.1 estipulado pela EPA em 1990 (Hodgeson et al., 1990).

Relativamente aos nitro-PAHs, não existe nenhum método de SPE de referência, no entanto existem estudos que recorrem essencialmente ao diclorometano como eluente (Toledo et al., 2007; Cochran et al., 2012; Qiao et al., 2013;).

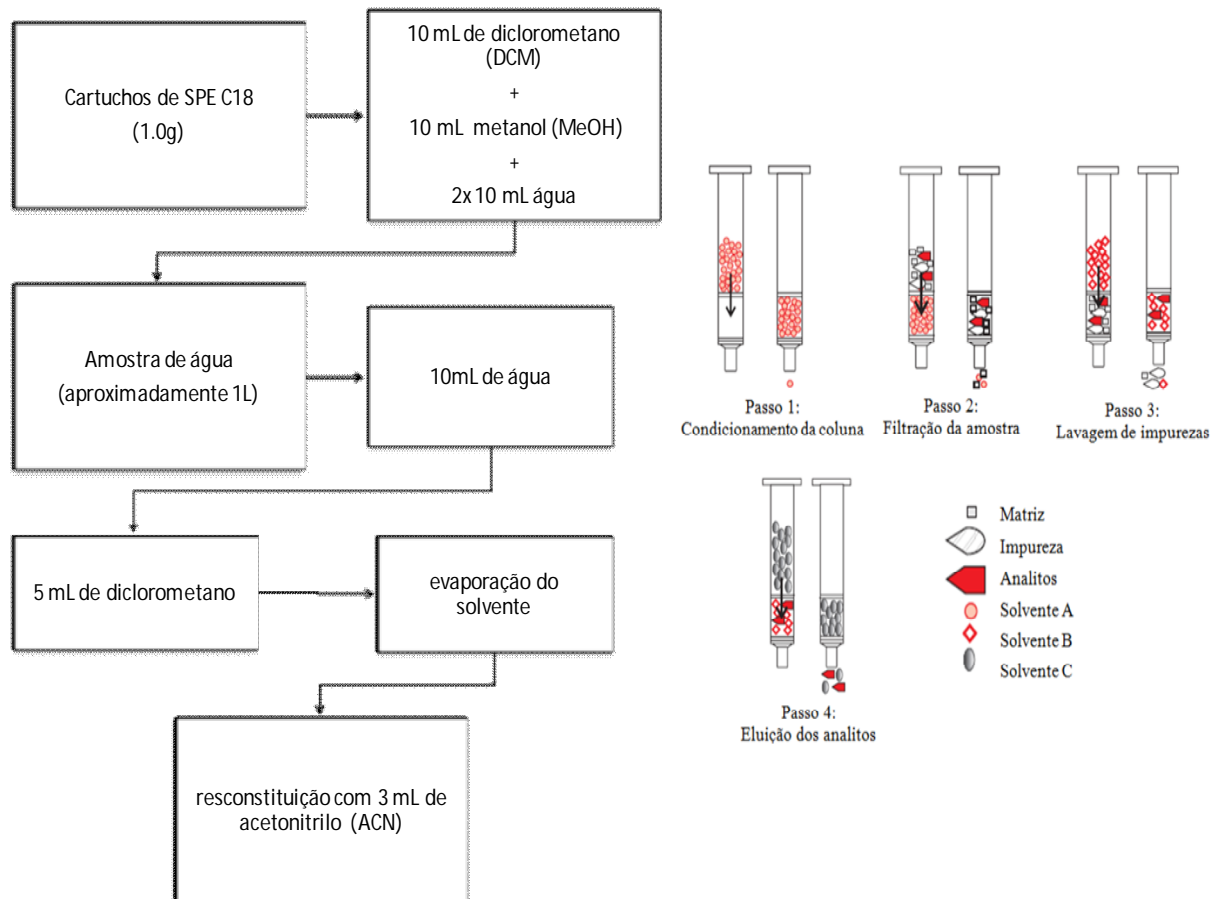


Figura 1.6. Etapas do método 550.1 da EPA (esquerda) e diferentes etapas da técnica de SPE (direita) (adaptado de Almeida, 2010).

Apesar da técnica de SPE ser um método de extração muito utilizado, esta técnica tem como principal desvantagem os elevados custos dos cartuchos de adsorvente. Além disso, não é aconselhada a amostras de todo o tipo de águas, por exemplo, as águas que contenham partículas em suspensão necessitam de uma filtração prévia, podendo ocorrer perda significativa de PAHs e nitro-PAHs adsorvidos nestas mesmas partículas (Manoli & Samara, 1999; Almeida, 2010).

Microextração em fase sólida (SPME)

Apesar das evoluções geradas com o aparecimento da técnica de SPE, algumas das desvantagens foram ultrapassadas com o desenvolvimento do método de microextração em fase sólida (SPME). Este método foi totalmente inovador pelo facto do processo de extração não utilizar nenhum solvente orgânico e também pelo facto de estar adaptado aos níveis vestigiais tanto dos PAHs como dos nitro-PAHs (Rianawati & Balasubramanian, 2009; Almeida, 2010, Mekiki et al., 2006).

A microextração em fase sólida é uma técnica realizada a partir de uma fibra de sílica fundida revestida por polímeros (**Figura 1.7.(a)**) que permitem a adsorção/absorção à sua superfície (Almeida, 2010; MCGOWIN, 2006).

A escolha adequada da fibra é fundamental para uma eficiente extração, esta escolha é efetuada de acordo com as características dos compostos em estudo. Neste caso concreto, os PAHs não apresentam polaridade, como tal a fibra deverá conter um revestimento com polímeros apolares, sendo recorrente a utilização de fibras com polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno (DVB), carboxen (CAR) e poliacrilato (PA), por vezes também se recorre a misturas destes polímeros (King et al, 2003; Almeida, 2010). Relativamente aos nitro-PAHs, alguns autores defendem que a utilização de fibras revestidas com PDMS apresentam maior eficiência de extração para nitro-PAHs de maior peso molecular como é o caso 1-nitropireno, 3-nitrofluoranteno, 6-nitrocriseno e o 7-benzo(a)antraceno. No entanto, para compostos como o 2-nitrofluoreno a melhor opção é a utilização da fibra com revestimento de PDMS/DVB (Mekiki et al., 2006; Hung et al., 2012).

A extração, tal como nas técnicas anteriores, deve-se a um equilíbrio de partição, no entanto, nesta metodologia é possível expor a fibra a dois equilíbrios distintos: a fibra exposta na fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida (amostra) (HS-SPME) ou a fibra exposta através da imersão direta na amostra (DI-SPME). Estas duas vertentes permitem a adsorção dos compostos voláteis e não-voláteis, sendo por isso uma grande vantagem desta técnica. Estas duas formas de extração estão representadas de forma clara na **Figura 1.7.(b)**. Após a adsorção, a fibra é sujeita a uma etapa de desorção através da exposição a altas temperaturas nos equipamentos onde decorrerá a análise. De uma forma geral, recorre-se à técnica de SPME combinada com cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (Almeida, 2010; MCGOWIN, 2006; Gebara et al., 2013).

As desvantagens desta metodologia de extração estão relacionadas com a fibra. Estas fibras são geralmente muito frágeis, ou seja, apresentam baixa resistência mecânica; além disso, o facto de a fibra estar exposta a elevadas temperaturas faz com que esta perca o seu revestimento ao longo do tempo, o que se traduz numa grande variação nos resultados (Almeida, 2010).

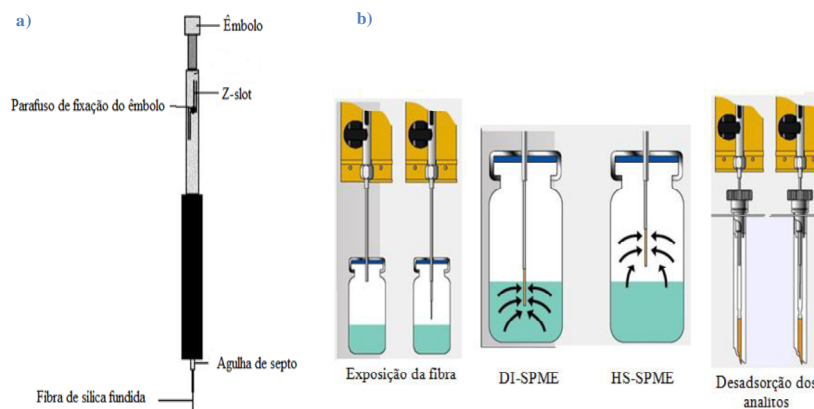


Figura 1.7. Representação esquemática de uma seringa de SPME (a) (adaptado de King et al, 2003) e representação da técnica SPME (b) (adaptado de Almeida, 2010).

Microextração Líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma técnica de extração bastante recente e inovadora, foi desenvolvida em 2006 por Rezaee e seus colaboradores. A DLLME é uma metodologia que se baseia num sistema de solventes ternário, contudo, tal como a LLE, ocorre a partição dos compostos a analisar entre duas fases imiscíveis: uma fase extratora (fase orgânica) e uma fase aquosa (amostra). A grande variante desta metodologia é a introdução de um solvente dispersor; este solvente dispersor, tal como o próprio nome sugere, tem como função dispersar o solvente extrator em inúmeras gotículas na fase aquosa (Rezaee et al., 2006; Almeida, 2010; Zgoła-Grzeskowiak et al., 2011; Martins et al., 2012).

A execução desta metodologia envolve duas principais etapas (**Figura 1.8.**), sendo que a primeira corresponde à mistura do solvente dispersor com o solvente extrator, que posteriormente é injetado rapidamente no tubo de fundo cónico onde se encontra a amostra. Esta introdução repentina promove uma elevada turbulência, dando origem ao aparecimento de pequenas gotículas de solvente extrator na amostra. A formação das gotículas é a grande vantagem desta metodologia, sendo que, com estas gotículas ocorre um aumento significativo da área superficial entre o solvente extrator e a amostra, permitindo assim que o equilíbrio de partição seja atingido muito mais rapidamente e, conseqüentemente, o tempo de extração torna-se muito reduzido. A segunda parte do processo envolve a separação das duas fases a partir da centrifugação desta solução turva. Após a centrifugação, a fase orgânica enriquecida com os PAHs vai formar uma gotícula no fundo do tubo porque o solvente escolhido para extrator tem usualmente uma densidade superior à da água. De seguida recolhe-se essa gotícula (solvente extrator + analito) que poderá ser analisada recorrendo a diversos métodos cromatográficos, tais como a cromatografia gasosa (GC) ou a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

(Zgoła-Grzeskowiak et al., 2011; Rezaee et al., 2010; Almeida, 2010; Herrera-Herrera et al., 2010).

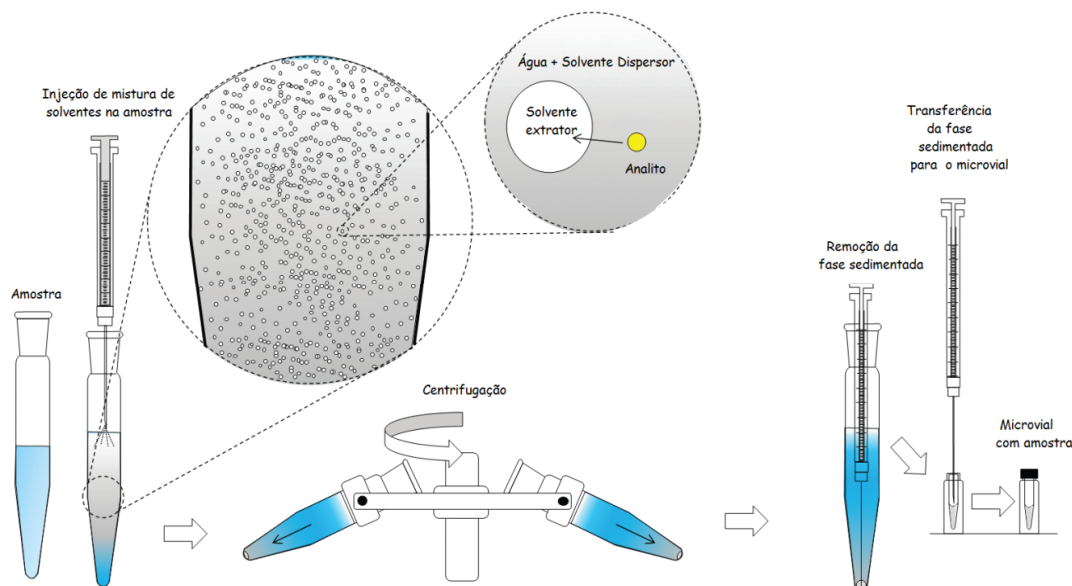


Figura 1.8. Esquema das diferentes etapas da técnica de DLLME (adaptado de Martins et al., 2012).

Otimização das condições da técnica DLLME

O sucesso e eficiência desta metodologia deve-se a diversos fatores, nomeadamente a escolha apropriada dos solventes e das respetivas proporções, assim como a temperatura e a adição de sal. Relativamente ao solvente dispersor, este deve ser miscível quer na amostra (fase aquosa) quer no solvente orgânico, no entanto o solvente extrator deverá ser mais denso que a água e insolúvel na fase aquosa. Devido a estas características, nesta técnica é frequente recorrer a solventes extratores derivados de hidrocarbonetos halogenados, como é o caso do clorofórmio, clorobenzeno, tetracloreto de carbono, tricloroetileno e tetracloroetileno, entre outros. No que diz respeito à seleção do solvente dispersor, uma má escolha poderá comprometer a eficiência da extração, uma vez que a extração é totalmente dependente do grau de dispersão. Quanto maior o grau de dispersão, maior será a formação de gotículas e, conseqüentemente, mais eficaz é a extração. De uma forma geral recorre-se a solventes como a acetona, metanol e acetonitrilo. Embora os solventes tenham estas características bem distintas, ambos devem apresentar pontos de ebulição relativamente elevados (pressões de vapor baixas), de forma a evitar perdas significativas durante a extração (Rezaee et al., 2006; Herrera-Herrera et al., 2010; Rezaee et al., 2010; Almeida, 2010; Martins et al., 2012).

Para além da escolha dos solventes apropriados para a extração, os volumes utilizados, quer para o dispersor, quer para o extrator, podem influenciar o processo. É recomendável a utilização de pequenos volumes de extrator (geralmente inferior a 1 mL) de forma a garantir um elevado fator de pré-concentração (PF), uma vez que quanto maior for o volume do solvente extrator, maior será o volume sedimentado e, conseqüentemente, menor o fator de pré-concentração. O fator de pré-concentração em DLLME, é dado pela razão entre a concentração de PAHs na fase sedimentada (C_{sed}) e a concentração de PAHs inicial (C_{in}) na amostra, como se pode observar na equação **(1)** (Rezaee et al., 2006; Rezaee et al., 2010; Leonga et al., 2010; Martins et al., 2012).

$$PF = \frac{C_{sed}}{C_{in}} \quad (1)$$

O volume do solvente dispersor pode afetar diretamente a capacidade de dispersão do solvente extrator na fase aquosa, e conseqüentemente a eficiência da extração, por isso é recomendável a utilização de volumes que permitam uma boa formação de gotículas (Rezaee et al., 2006; Rezaee et al., 2010; Leonga et al., 2010; Martins et al., 2012).

A adição de NaCl é também um parâmetro importante para eficiência da extração, a adição de sal promove a diminuição da solubilidade do solvente extrator, aumentando assim o volume da fase sedimentada (efeito salting-out), a concentração de sal adicionado varia entre 0.5 e 30% (Leonga et al., 2010; Martins et al., 2012; Tseng et al., 2014).

1.4.2. SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE PAH_s E NITRO-PAH_s

Neste subcapítulo são, resumidamente, abordadas algumas metodologias que visam separar e determinar PAHs e nitro-PAHs em amostras de água. Existe uma grande diversidade de técnicas aplicadas a separação de PAHs em amostras ambientais, das quais se destacam as metodologias cromatográficas, nomeadamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC). Os métodos correntemente utilizados para a determinação dos tradicionais PAHs são a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID), cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detetor ultravioleta (HPLC-UV) e cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FL) (Manoli & Samara, 1999; Martinez et al., 2004; Zielinska et al., 2006; Wenzl et al., 2006; Li-bin et al., 2007).

Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

Há mais de vinte anos que a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada para analisar PAHs, isto deve-se ao facto de ser uma das metodologias mais eficazes na monitorização de PAHs em amostras ambientais. É uma técnica com elevada seletividade e sensibilidade, além disso esta técnica tem a vantagem de poder analisar sem ter em consideração a volatilidade e o peso molecular dos PAHs. Como já foi referido, os detetores mais amplamente utilizados na deteção de PAHs recorrendo ao HPLC são os detetores UV e FL, existem também alguns estudos que em vez de recorrer a detetores de fluorescência utilizam detetores de quimiluminescência (CL). Enquanto que os detetores UV possibilitam uma deteção mais universal dos PAHs, o detetor de fluorescência permite a quantificação de PAHs em amostras mais complexas como é o caso das amostras ambientais. Para além disso, HPLC-FL apresenta maior sensibilidade e seletividade comparativamente HPLC-UV. O elevado grau de especificidade e os baixos limites de deteção alcançados por HPLC-FL devem-se a uma seleção adequada dos comprimentos de onda de excitação e de emissão específicos para cada PAH (**Tabela 1.5.**) (Manoli & Samara, 1999; Li-bin et al., 2007).

Tabela 1.5. Comprimentos de onda de emissão e de excitação dos 16 PAHs prioritários

| PAHs | λ de excitação/emissão | PAHs | λ de excitação/emissão |
|------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| <i>Nph</i> | 276/330 | <i>B[a]A</i> | 270/390 |
| <i>Ace</i> | 276/330 | <i>Chr</i> | 270/390 |
| <i>Flu</i> | 276/330 | <i>B[b]F</i> | 260/430 |
| <i>Acy</i> | - | <i>B[k]F</i> | 290/410 |
| <i>Phe</i> | 250/336 | <i>B[a]P</i> | 290/410 |
| <i>An</i> | 250/402 | <i>D[a,h]A</i> | 290/410 |
| <i>Fln</i> | 270/460 | <i>B[g,h,i]P</i> | 290/410 |
| <i>Py</i> | 270/390 | <i>I[1,2,3-cd]P</i> | 290/470 |

Apesar de esta técnica ser bastante utilizada na determinação de PAHs, esta não pode ser diretamente aplicada para a análise de nitro-PAHs, uma vez que estes compostos apresentam baixa intensidade de fluorescência. Esta adversidade pode ser ultrapassada através da derivatização dos nitro-PAHs em amino-hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (amino-PAHs) a partir de várias reações de redução (**Figura 1.9.**). Os amino-PAHs são compostos que apresentam fluorescência intensa podendo ser utilizados em análises vestigiais. A grande desvantagem da aplicação de HPLC-FL é o facto da pré-redução dos nitro-PAHs ser uma etapa bastante trabalhosa, sendo difícil a sua utilização em análises de rotina (Hayakawa, 2000; García-Alonso et al., 2012).

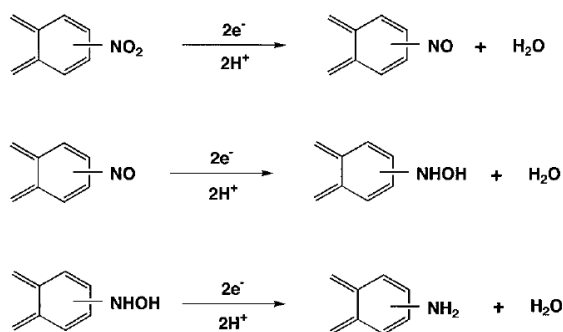


Figura 1.9. Esquema da reação de redução dos nitro-PAHs em amino-PAHs (adaptado de Hayakawa,2000).

Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais comuns de separação de PAHs em amostras ambientais. A preferência da utilização do GC relativamente a outras metodologias como por exemplo o HPLC deve-se a fatores como maior resolução, seletividade e sensibilidade. A combinação do GC com detetores de espectrometria de massa (MS) melhora significativamente a robustez e a seletividade da identificação e quantificação de compostos orgânicos. Tal como se verifica na análise por HPLC-UV, a metodologia GC-FID permite a deteção universal dos PAHs. Comparativamente ao GC-MS, esta apresenta menor precisão uma vez que o GC-MS permite minimizar o efeito da coeluição de interferentes devido à seletividade do detetor.

A técnica GC-MS é extremamente poderosa permitindo obter limites de deteção mais baixos que a maioria das técnicas de determinação de PAHs e nitro-PAHs, como se pode observar na **Tabela 1.6.** De uma forma geral, a deteção de PAHs em matrizes ambientais é realizada a partir de GC-MS recorrendo ao impacto eletrónico (EI) como método de ionização. Comparando os PAHs com outros poluentes orgânicos este método de ionização produz iões moleculares intensos e com pouca fragmentação. Uma das grandes vantagens desta técnica é a possibilidade de utilizar o modo de monitorização por ião selecionado (SIM) em alternativa ao varrimento total (*fullscan*), este modo consiste em selecionar iões específicos para cada PAH e nitro-PAH diminuindo assim o sinal de interferências a partir da redução do número de iões do varrimento da análise. A sua utilização permite melhorar significativamente a qualidade da análise, verificando um aumento da sensibilidade e conseqüentemente a diminuição dos limites de deteção, verifica-se também um aumento da linearidade e diminuição do sinal do ruído (Manoli & Samara, 1999; Poster et al.,2006 ; Zielinska et al.,2006; Li-bin et al., 2007; Coelho et al., 2008; Pandey et al., 2011). Relativamente à análise de nitro-PAHs em amostras de água, o número de estudos que recorrem à técnica GC-MS é mais abundante, isto deve-se ao facto

desta metodologia ser sem dúvida a mais vantajosa, comparativamente as outras metodologias apresentadas (Mekiki et al., 2005; Hung et al., 2012).

Tabela 1.6. Comparação dos limites de detecção de diversas metodologias na determinação de PAHs e/ou nitro-PAHs em amostras de água.

| Composto | Metodologia | Limite de detecção (ng/L) | Referência |
|-------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------|
| PAHs | GC-FID | 7,0-30,0 | Rezaee, M. et al, 2006 |
| PAHs | GC-FID | 60,0-500,0 | Coelho et al., 2008 |
| PAHs | HPLC-FL | 0,10-2,00 | Pena et al., 2009 |
| PAHs | GC-MS | 3,70-39,10 | Lee et al., 2011 |
| PAHs | GC-MS | 1,0-10,0 | Song et al., 2011 |
| PAHs + Nitro-PAHs | GC-MS | 0,02-6,83 | Quiao et al., 2013 |
| Nitro-PAHs | GC-MS | 0,03-0,20 | Hung et al., 2012 |
| Nitro-PAHs | GC-MS | 4,0-60,0 | Mekiki et al., 2005 |
| Nitro-PAHs | HPLC-CL | 3,6-41,0 | Chondo et al., 2013 |

CAPÍTULO 2.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Padrões e reagentes

2.2. Amostragem

2.3. Extração de PAHs e nitro-PAHs

2.4. Análise por GC-MS e condições instrumentais

2.5. Validação do método

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os procedimentos e metodologias experimentais utilizadas neste trabalho, descrevendo a forma como foi realizado o processo da amostragem e a aquisição de dados. Como foi mencionado no capítulo anterior, existem diversos métodos de extração e determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água. Neste estudo foi explorada a utilização da técnica DLLME, prosseguindo-se a análise dos PAHs e nitro-PAHs por GC-MS.

2.1. PADRÕES E REAGENTES

Para a realização da parte experimental desta dissertação foi utilizada uma solução padrão comercial de uma mistura de 16 PAHs de concentração 10µg/mL em acetonitrilo (naftaleno (*Na*); acenafteno (*Ace*); acenaftileno (*Acy*); antraceno (*An*); fenantreno (*Phe*); pireno (*Py*); benzo[*a*]antraceno (*B[a]A*); criseno (*Chr*); benzo[*b*]fluoranteno (*B[b]F*); benzo[*k*]fluoranteno (*B[k]F*); benzo[*a*]pireno (*B[a]P*); fluoranteno (*Fln*); fluoreno (*Flu*); dibenz[*a,h*]antraceno (*D[a,h]A*); benzo[*ghi*]perileno (*B[g,h,i]P*) e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno (*I[1,2,3-cd]P*)). Esta solução mix foi adquirida a partir da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Foram também utilizados os seguintes compostos: 2-nitrofluoreno (≥98%); 9-nitroantraceno (≥93%); 3-nitrofluoranteno (≥90%) e 1-nitropireno (≥99%) adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e os compostos 6-nitrocriseno 50µg/mL em tolueno e 7-nitrobenzo[*a*]antraceno (≥99.5%) a partir de LGC-Standards. Como padrão interno recorreu-se a uma mistura comercial de 5 PAHs deuterados (naftaleno-*d*₈, acenafteno-*d*₁₀, fenantreno-*d*₁₀, criseno-*d*₁₂ e perileno-*d*₁₂) de concentração 1000 mg/L, foi adquirido à LGC-Standards. Os solventes metanol, acetonitrilo e acetona utilizados tinham um grau de pureza específico para HPLC (HPLC-grade LiChorsolv), sendo estes adquiridos a partir da Merk (Darmstadt, Alemanha).

Recorreu-se à utilização de água ultrapura purificada por um sistema de gradiente Milli-Q (18.2 mΩcm⁻¹) a partir de Millipore (Milford, MA, USA). Os solventes clorofórmio, clorobenzeno, tricloroetileno e tetracloroetileno eram de elevada pureza e foram obtidos pela Fluka para análise por HPLC. O cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido à Riedel-de-Haën (Buchs, Suíça).

A solução padrão stock de nitro-PAHs foi preparada em acetonitrilo por pesagem exata das substâncias de elevada pureza, cada solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar com tampa. A mistura de nitro-PAHs também foi preparada em acetonitrilo contendo 1 mg/L de cada composto. As soluções de trabalho foram as misturas de

concentração adequadas, sendo que estas soluções eram preparadas semanalmente e armazenadas a uma temperatura de 4°C ao abrigo da luz.

Durante a calibração foram preparadas soluções com concentrações entre 5 ng/L e 150 ng/L pela adição de diferentes volumes das soluções-misturas em 10 mL de água, antes de cada extração.

2.2. AMOSTRAGEM

As diversas amostras de água utilizadas para a realização desta dissertação foram recolhidas em três locais distintos, nomeadamente na zona do Porto, marcadas na região A da **Figura 2.1.**, Serra da Estrela (região B) e Lisboa (região C).

Foi possível a recolha de diversos tipos de água, mais concretamente águas subterrâneas, águas de superfície, água do mar e a água da chuva. Na região do Porto foram recolhidas amostras na praia fluvial do Areinho em Oliveira do Douro (A₁), na praia do Castelo do Queijo (A₂), foz do rio Douro (A₃) e água da chuva (A₄). As águas subterrâneas recolhidas na região da Serra da Estrela e de Lisboa, foram obtidas a partir de poços perfurados. As amostras foram recolhidas em recipientes de vidro borosilicato de um litro. Após a recolha filtraram-se 500 mL de cada amostra de água com o auxílio de um filtro de vidro (Whatman, GF/F 47 mm, Maidstone, Inglaterra). As amostras foram mantidas a uma temperatura de aproximadamente 4°C em frascos de vidro âmbar até serem analisadas.

Localização esquemática dos pontos de amostragem



Figura 2.1. Local de amostragem das diversas amostras de água: A- Porto; B- Serra da Estrela e C- Lisboa.

2.3. EXTRAÇÃO DE PAHs E NITRO-PAHs

2.3.1. EXTRAÇÃO DE PAHs POR SPE

Nesta dissertação foi utilizada a técnica de SPE para a extração de PAHs em amostras água. O objetivo da utilização desta técnica é exclusivamente a comparação com da aplicação da técnica DLLME.

Antes de iniciar o processo de extração por SPE, adicionou-se previamente 0,5 µg/L do Mix de PAHs deuterados (padrão interno) em 500 mL de amostra. Para o condicionamento do cartucho fizeram-se passar 20 mL de diclorometano e de seguida 20 mL de metanol e por fim 20 mL de água. Após o condicionamento passou-se os 500 mL de amostra, seguindo-se a lavagem com 5 ml de solução metanol/água (50:50). Posteriormente, realizou-se a eluição dos PAHs com 6 mL de diclorometano para um tubo. Depois desta etapa, evaporou-se o volume obtido a partir da eluição através do evaporador rotativo e por fim reconstituiu-se com acetonitrilo. O extrato obtido foi posteriormente analisado por GC-MS.

2.3.2. EXTRAÇÃO DE PAHs E NITRO-PAHs POR DLLME

A extração de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água foi realizada a partir da técnica de DLLME. Inicialmente, foi adicionada a 10mL de amostra, uma concentração de 0.025µg/L de padrão interno (PAHs deuterados), seguindo-se a adição de 200 µL de acetonitrilo (solvente dispersor), 1000 mg de NaCl e 60 µL de clorofórmio (solvente extrator). De seguida, os tubos foram agitados manualmente até à dissolução do NaCl, originando uma solução turva com inúmeras gotículas, após este passo os tubos foram centrifugados durante sete minutos a 2000 rpm com uma temperatura de 4° C. Posteriormente a esta fase de centrifugação, a gota depositada foi recolhida com uma pipeta de Pasteur de vidro e transferida para um microinsert de 100µL e por fim analisada por GC-MS.

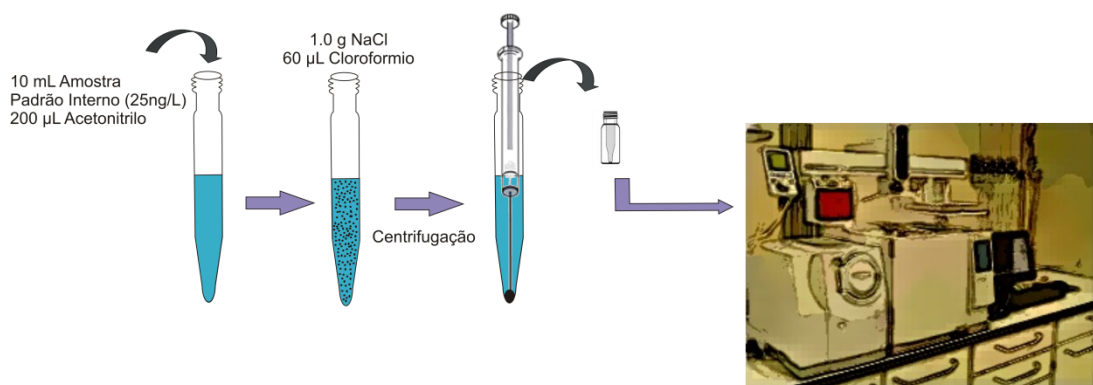


Figura 2.2. Esquema do procedimento da técnica de DLLME realizado.

A escolha do solvente dispersor foi realizada a partir de várias extrações utilizando três diferentes solventes dispersores: acetonitrilo, metanol e acetona. Relativamente à seleção do solvente extrator mais apropriado foram realizadas também diversas extrações recorrendo a quatro solventes, entre eles o clorofórmio, o tetracloroetileno, o clorobenzeno e o tricloroetileno. No que diz respeito à escolha das quantidades referidas para os solventes e para o sal recorreu-se ao desenho experimental.

2.3.3. DESENHO EXPERIMENTAL

Como já foi mencionado nesta dissertação existem diversos fatores que podem influenciar a eficiência da extração de PAHs e nitro-PAHs por DLLME, destacando-se a escolha dos solventes e os respetivos volumes e ainda a quantidade de sal utilizada.

A seleção de solventes (extrator e dispersor) foi realizada a partir de uma análise univariável, isto é, foram realizadas diversas extrações recorrendo a solventes distintos e mantendo as restantes condições da extração. No entanto, a otimização dos restantes parâmetros foi realizada a partir da metodologia de superfície de resposta (RSM).

Contrariamente à análise convencional (univariável), a metodologia de superfície de resposta pode ser uma ferramenta muito vantajosa na otimização de um sistema multivariável, como é o caso da extração por DLLME. A otimização a partir do método univariável não garante a obtenção das verdadeiras condições ótimas do sistema, uma vez que esta não permite compreender as interações entre os parâmetros a ser otimizados. A abordagem por RSM com base num desenho experimental, para além de ter a vantagem de necessitar de um menor número de experiências comparativamente à abordagem convencional, permite o conhecimento global de todo o domínio de resposta. Em contraste, com o outro método são estudados apenas os pontos específicos onde foram realizadas as experiências. Atualmente já existem alguns estudos que recorrem ao desenho experimental para a otimização de métodos analíticos (Breraton, 2007; Ferreira et al., 2007; Stalikas et al., 2009; Leordi, 2009).

Foram selecionadas três variáveis independentes: o volume do solvente extrator (X_1), o volume do solvente dispersor (X_2) e a quantidade de NaCl (X_3). As experiências foram realizadas de acordo com a sequência de um desenho experimental obtido a partir do central composite design (CCD).

O método central composite design é um dos métodos de superfície de resposta frequentemente utilizados para a otimização, uma vez que, comparativamente ao método design fatorial de nível dois, apresenta a adição de mais pontos de forma a obter superfícies mais significativas. Para a máxima eficiência do método de CCD são adicionados pontos "axiais" (vulgarmente designados por pontos estrela). Estes pontos

devem estar localizados a uma distância específica no exterior do intervalo fatorial, como se pode observar no exemplo da **Figura 2.2.** A distância a partir do centro do domínio de resposta para um ponto cúbico é de ± 1 unidade para cada um dos fatores, a distância a partir do centro do domínio do ponto axial é de $|\alpha| > 1$. O valor exato de α depende do número de fatores que estão envolvidos no desenho experimental (Breraton, 2007; Ferreira et al., 2007).

O número total de experiências (N) a realizar é obtido pela equação (2), sendo esta expressão totalmente dependente do número de variáveis (k) a considerar e também do número de pontos centrais (n_0).

$$N=2^k+2k+n_0 \quad (2)$$

O CCD aplicado neste trabalho consistiu em 19 experiências independentes, correspondendo a 2^3 – fatorial completo como pontos cúbicos, com seis pontos axiais a uma distância de $\alpha = 1,682$ do centro do cubo ($\alpha = [2^k]^{1/4}$) e cinco pontos centrais (n_0). A resposta usada no desenho experimental foi as áreas dos picos de PAHs e de nitro-PAHs. As análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao software Design Expert Versão 7-trial (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

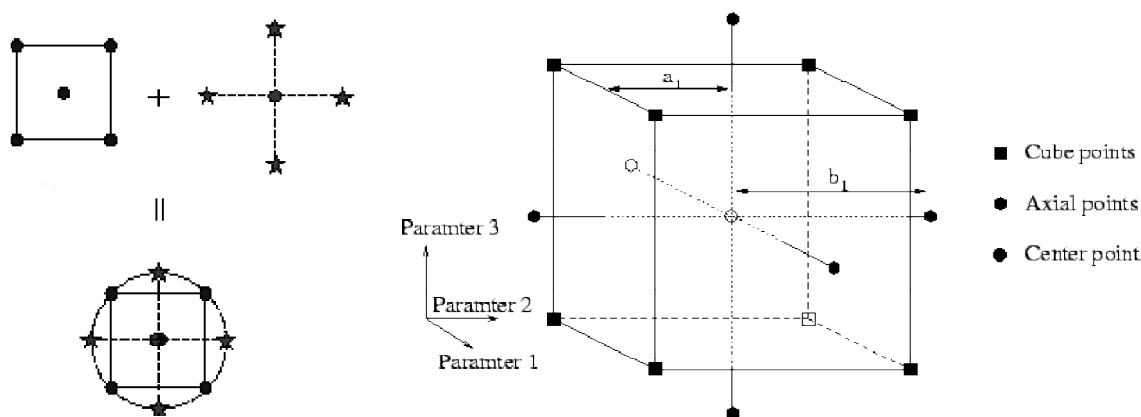


Figura 2.3. Exemplo de pontos do método central composite design com três variáveis.

Os níveis dos fatores independentes variavam entre 60 μL a 90 μL para o volume de solvente extrator, de 200 μL a 750 μL para o volume de solvente dispersante e de 1000 mg a 20000 mg para a quantidade de NaCl, estes parâmetros podem ser observados detalhadamente na **Tabela 2.1.**

Posteriormente, os dados experimentais obtidos por CCD foram analisados por um modelo polinomial quadrático, equação **(3)** :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2 + \beta_{3,3} X_3^2 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (3)$$

onde Y corresponde à soma da área dos picos dos PAHs e nitro-PAHs; X_1, X_2 e X_3 representam as variáveis independentes selecionadas; β_0 é um coeficiente constante; β_1, β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; $\beta_{1,1}, \beta_{2,2}$ e $\beta_{3,3}$ são coeficientes quadráticos; $\beta_{1,2}, \beta_{1,3}$ e $\beta_{2,3}$ são coeficiente de interação e por fim ε representa o erro experimental.

Tabela 2.1. Variáveis independentes e os respetivos níveis codificados utilizados na otimização por CCD.

| Variável independente | Unidades | Símbolo | Níveis codificados | | | | |
|---------------------------|---------------|---------|--------------------|------|------|------|--------|
| | | | -1,682 | -1 | 0 | +1 | +1,682 |
| Volume solvente extrator | μL | X_1 | 49,8 | 60 | 75 | 90 | 100,2 |
| Volume solvente dispersor | μL | X_2 | 12,5 | 200 | 475 | 750 | 937,5 |
| Quantidade de NaCl | mg | X_3 | 659,1 | 1000 | 1500 | 2000 | 2340,9 |

As experiências foram realizadas de forma aleatória com diferentes combinações destes parâmetros utilizando estatisticamente o desenho experimental. A **Tabela 2.2.** apresenta as condições experimentais obtidas para as 19 corridas.

Tabela 2.2. Desenho experimental obtido por CCD.

| Nº da corrida | Solvente extrator (μL) | Solvente dispersor (μL) | Quantidade de NaCl (mg) |
|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|
| 3 | 60,0 | 200,0 | 1000,0 |
| 8 | 90,0 | 200,0 | 1000,0 |
| 1 | 60,0 | 750,0 | 1000,0 |
| 11 | 90,0 | 750,0 | 1000,0 |
| 7 | 60,0 | 200,0 | 2000,0 |
| 2 | 90,0 | 200,0 | 2000,0 |
| 17 | 60,0 | 750,0 | 2000,0 |
| 14 | 90,0 | 750,0 | 2000,0 |
| 19 | 49,8 | 475,0 | 1500,0 |
| 18 | 100,2 | 475,0 | 1500,0 |
| 9 | 75,0 | 12,5 | 1500,0 |
| 5 | 75,0 | 937,5 | 1500,0 |
| 4 | 75,0 | 475,0 | 659,1 |
| 13 | 75,0 | 475,0 | 2340,9 |
| 10 | 75,0 | 475,0 | 1500,0 |
| 15 | 75,0 | 475,0 | 1500,0 |
| 16 | 75,0 | 475,0 | 1500,0 |
| 12 | 75,0 | 475,0 | 1500,0 |
| 6 | 75,0 | 475,0 | 1500,0 |

2.4. ANÁLISE POR GC-MS E CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

A análise dos PAHs e dos nitro-PAHs foi realizada utilizando o equipamento Shimadzu GC-MS QP2010, equipado com um autoinjector de modelo AOC-5000. As injeções de 1 μ L foram realizadas no modo de splitless com um tempo de purga de 1 minuto e a temperatura do injetor utilizada foi de 280°C. Como gás de arraste foi usado o hélio com 99,9999% de pureza, recorreu-se a um caudal constante de 1,5 mLmin⁻¹. As amostras foram analisadas utilizando uma coluna capilar de sílica fundida Zebron ZB-5MS W/Guardian (Phenomenex) revestidas com 5% polisilarileno e 95% de polidimetilsiloxano (30mx 0,25 milímetros ID, 0,25 mm de espessura de filme) com 10 metros de coluna capilar Guardian sem a fase estacionária.

O programa de temperatura do forno utilizada na análise dos PAHs e nitro-PAHs começou a uma temperatura de 70°C (mantendo-se a esta temperatura durante 2 minutos), aumentou-se 25°C por minuto até atingir os 180°C (durante 2 minutos foi mantida a esta temperatura). De seguida utilizou-se o gradiente de 15°C por minuto até atingir os 208°C, novamente fixou-se esta temperatura durante 2 minutos, por fim fez-se aumentar a temperatura 10°C por minuto até aos 300°C (manteve-se esta temperatura durante 5 minutos). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 30 min.

O GC foi diretamente interligado ao quadrupolo do espectrómetro de massa, com uma temperatura de interface de 280°C e de ionização por impacto de eletrões de 70 eV. A fonte de ionização foi aquecida a 200°C. Os fragmentos dos iões positivos (m/z- razão massa/carga do ião) foram analisados no intervalo de 50 a 500 m/z, inicialmente foi utilizado o modo varrimento total (FullScan) para a determinação dos tempos de retenção dos compostos a analisar, de seguida recorreu-se ao modo de monitorização dos iões selecionados (SIM). Na **Tabela 2.3.** estão apresentados os fragmentos dos iões positivos (m/z) selecionados para a identificação e quantificação dos compostos e os respetivos tempos de retenção.

O controlo do equipamento e a aquisição de dados obtidos por espetrometria de massa foram controlados por um software LabSolutions GCMS (versão 2.50 SU3).

Tabela 2.3. Tempos de retenção dos PAHs e nitro-PAHs e iões utilizados para na análise quantitativa por GC-MS.

IS-padrão interno; Rt-tempo de retenção

| Compostos | Classe Química | Cas | SIM | R _t (min) | Iões (m/z) | | |
|----------------------------|----------------|------------|---------|----------------------|------------|---------------------|---------------|
| | | | | | Molecular | Identificação | Quantificação |
| Naftaleno-d ₈ | IS | 1146-65-2 | 4-6,5 | 5,748 | | 68;136;137 | 136 |
| Naftaleno | PAH | 91-20-3 | | 5,771 | 128 | 127;128;129 | 128 |
| Acenaftileno | PAH | 208-96-8 | 6,5-9,5 | 7,571 | 152 | 151;152;153;154 | 152 |
| Acenafteno-d ₁₀ | IS | 15067-26-2 | | 7,783 | | 162;164;165 | 164 |
| Acenafteno | PAH | 83-32-9 | | 7,828 | 154 | 151;152;153;154 | 154 |
| Fluoreno | PAH | 86-73-7 | | 8,766 | 166 | 165;166;167 | 166 |
| Fenantreno-d ₁₀ | IS | 1517-22-2 | 9,5-11 | 10,617 | | 94;188;189 | 188 |
| Fenantreno | PAH | 85-01-8 | | 10,663 | 178 | 176;178;179 | 178 |
| Antraceno | PAH | 120-12-7 | | 10,76 | 178 | 176;178;179 | 178 |
| Fluoranteno | PAH | 206-44-0 | 11-14 | 12,892 | 202 | 101;202;203 | 202 |
| 2-Nitrofluoreno | Nitro-PAH | 607-57-8 | | 13,161 | 211 | 194;211 | 165 |
| Pireno | PAH | 129-00-0 | | 13,281 | 202 | 101;202;203 | 202 |
| 9-Nitroantraceno | Nitro-PAH | 602-60-8 | | 13,332 | 223 | 193;176 | 223 |
| Benzo(a)antraceno | PAH | 56-55-3 | 14-16 | 15,367 | 228 | 226;228;229 | 228 |
| Criseno-d ₁₂ | IS | 1719-03-5 | | 15,378 | | 120;240;241 | 240 |
| Criseno | PAH | 218-01-9 | | 15,43 | 228 | 226;228;229 | 228 |
| 3-Nitrofluoranteno | Nitro-PAH | 892-21-7 | | 15,921 | 247 | 217;200 | 247 |
| 1-Nitropireno | Nitro-PAH | 5522-43-0 | | 16,321 | 247 | 217;201 | 247 |
| Benzo(b)fluoranteno | PAH | 205-99-2 | | 16-18,5 | 17,619 | 252 | 126;252;253 |
| Benzo(k)fluoranteno | PAH | 207-08-9 | 17,687 | | 252 | 126;252;253 | 252 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | Nitro-PAH | 20268-51-3 | 17,882 | | 215 | 243;226 | 273 |
| Benzo(a)pireno | PAH | 50-32-8 | 18,35 | | 252 | 126;252;253 | 252 |
| Perileno-d ₁₂ | IS | 1520-96-3 | 18,5-22 | 18,47 | | 260;264;265 | 264 |
| 6-Nitrocriseno | Nitro-PAH | 7496-02-8 | | 18,807 | 243 | 244;121 | 215 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | PAH | 193-39-5 | | 20,945 | 276 | 138;139;276;277;278 | 276 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | PAH | 53-70-3 | | 21,048 | 278 | 138;139;276;277;278 | 278 |
| Benzo(ghi)pirileno | PAH | 191-24-2 | | 21,642 | 276 | 138;139;276;277;278 | 276 |

2.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Após a otimização das condições da extração por DLLME e da seleção das condições cromatográficas para a detecção de PAHs e nitro-PAHs, procedeu-se à validação do método com o objetivo de avaliar a eficácia e a reprodutibilidade da metodologia aplicada. A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes estabelecidas pela *International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH)*, recorrendo à determinação de diversos parâmetros analíticos de elevada fiabilidade tais como a exatidão, precisão, linearidade, gama de trabalho, limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e recuperação (ICH, 1994).

A calibração foi realizada através do método da curva de calibração em matriz com adição de padrão interno. Este método consiste na combinação da matriz dos padrões de calibração com a matriz da amostra. A preparação consistiu na adição de diferentes quantidades de padrão na amostra antes de realizar a extração. As curvas de calibração foram estabelecidas recorrendo ao modelo dos mínimos múltiplos quadrados, utilizando a proporção entre a área de cada PAHs e nitro-PAHs com os respetivos padrões internos em função da concentração dos compostos. Neste trabalho a curva de calibração foi construída utilizando sete pontos de calibração (5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/L) para os PAHs e seis pontos de calibração (10,25,50,75,100 e 150 ng/L) para os nitro-PAHs, recorrendo a soluções padrão de 16 PAHs e soluções padrão de 6 nitro-PAHs. A preparação foi realizada sob as condições previamente otimizadas. Para cada teste realizaram-se pelo menos cinco experiências independentes.

O cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) baseou-se nos parâmetros obtidos pelas curvas de calibração. LD é calculado a partir da interceção da regressão linear mais três vezes o desvio padrão residual da curva de calibração ($S_{y/x}$) e o LQ é calculado também pela interceção da regressão linear mais dez vezes $S_{y/x}$ (Magnusson et al., 2014; Miller & Miller, 2005).

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 3.1. Otimização da técnica DLLME
- 3.2. Validação do método analítico
- 3.3. Aplicação do método DLLME na avaliação da contaminação de águas ambientais

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos para a otimização e validação do método de DLLME na extração de PAHs e nitro-PAHs em água, assim como os resultados obtidos na sua aplicação em amostras de água ambientais. Para além disso é efetuada uma comparação entre a técnica de SPE e a técnica de DLLME na extração de PAHs em amostras de água.

3.1. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DLLME

Como já foi referido no Capítulo 1, a eficácia da extração por DLLME depende de diversos fatores. Durante a parte prática desta dissertação foram otimizados diversos parâmetros tais como o tipo de solvente extrator, solvente dispersante, volumes dos respetivos solventes e ainda a quantidade de sal a utilizar na extração dos dezasseis PAHs prioritários e seis nitro-PAHs selecionados em água.

O desenvolvimento de um novo método analítico, a adaptação ou implementação de um método conhecido, requer um processo prévio de validação que avalie a sua eficiência na rotina do laboratório. Só assim podeream ser obtidos dados analíticos que sejam aceites na sua generalidade. Um método analítico é considerado validado se as suas características estiverem de acordo com os parâmetros de validação estabelecidos e aceites comumente.

3.1.1. TESTE DOS SOLVENTES EXTRATOR E DISPERSANTE

A escolha do solvente extrator e do solvente dispersante são fatores preponderantes na eficiência da extração. A seleção dos solventes mais adequados para a extração de PAHs e nitro-PAHs foi realizado numa fase inicial, sendo que este teste teve como base um procedimento previamente estudado (**Figura 3.1.**).

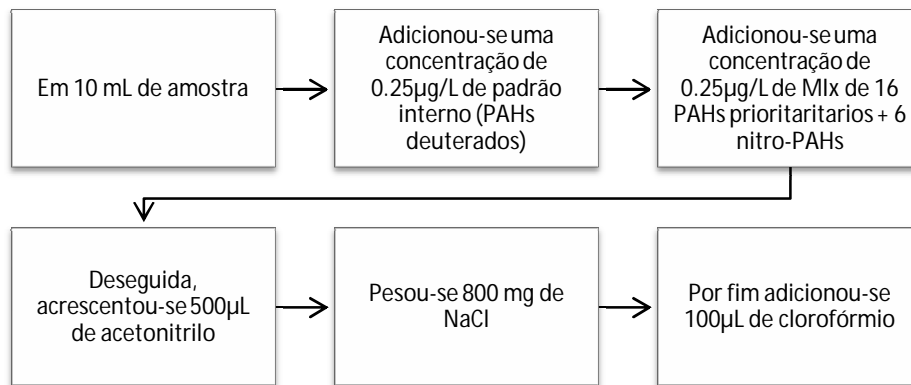


Figura 3.1. Esquema do procedimento inicial aplicado na extração de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água.

As experiências preliminares foram realizadas em 10 mL de água ultrapura e com uma concentração de adição de padrão final, dos diferentes compostos em estudo, de 0.25 µg/L de cada padrão, também foram adicionados 500 µL de acetonitrilo e 800 mg de NaCl. Neste teste fez-se variar 100 µL de solvente extrator.

Na escolha do solvente extrator é necessário ter em consideração vários fatores, nomeadamente: o solvente deverá ter densidade superior à da água, deve apresentar baixa solubilidade em água e deve demonstrar boa capacidade de extração dos compostos em estudo (Rezaee et al, 2006; Herrera-Herrera et al, 2010). Tendo em conta este pressupostos, testaram-se quatro diferentes solventes: clorofórmio (CHCl_3), tetracloretileno (C_2Cl_4), clorobenzeno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$) e tricloroetileno (C_2HCl_3). O efeito da seleção do solvente na extração foi averiguado a partir da construção de gráficos que relacionam a área do pico obtido para cada composto recorrendo aos diferentes solventes. Como se pode observar na **Figura 3.2.**, o clorofórmio foi o solvente que apresentou uma maior soma das áreas de pico dos diferentes PAHs em água. No que diz respeito à extração de nitro-PAHs (**Figura 3.3.**) pode-se constatar que o clorobenzeno apresenta uma maior soma das áreas de pico do que na extração o clorofórmio, no entanto não se verificou uma boa extração com clorobenzeno para todos nitro-PAHs como é o caso do 3-

nitrofluoranteno. O solvente que apresentou menor soma das áreas de pico foi o tricloroetileno, verificou-se que este solvente conseguiu extrair apenas o 2-nitrofluoreno e o 9-nitroantraceno.

Numa forma geral, os resultados revelam que o clorofórmio apresenta maior eficiência de extração em comparação com o C_2Cl_4 , C_6H_5Cl e C_2HCl_3 . Deste modo, o clorofórmio foi o solvente selecionado para as posteriores extrações de PAHs e nitro-PAHs.

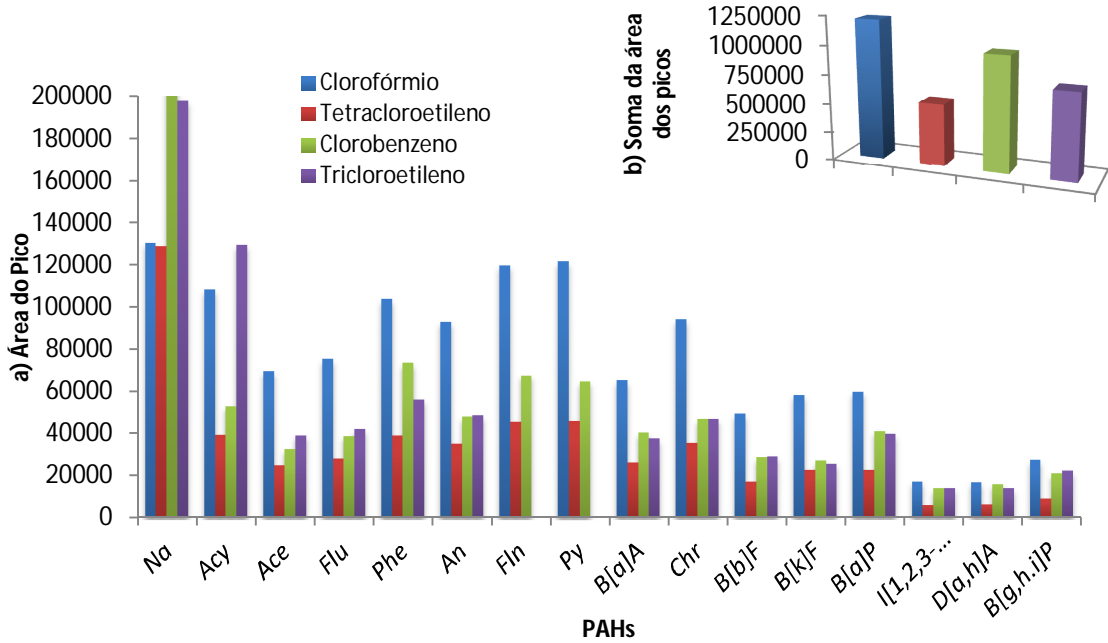


Figura 3.2. a) Efeito do tipo de solvente extrator na extração de PAHs em água; b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado.

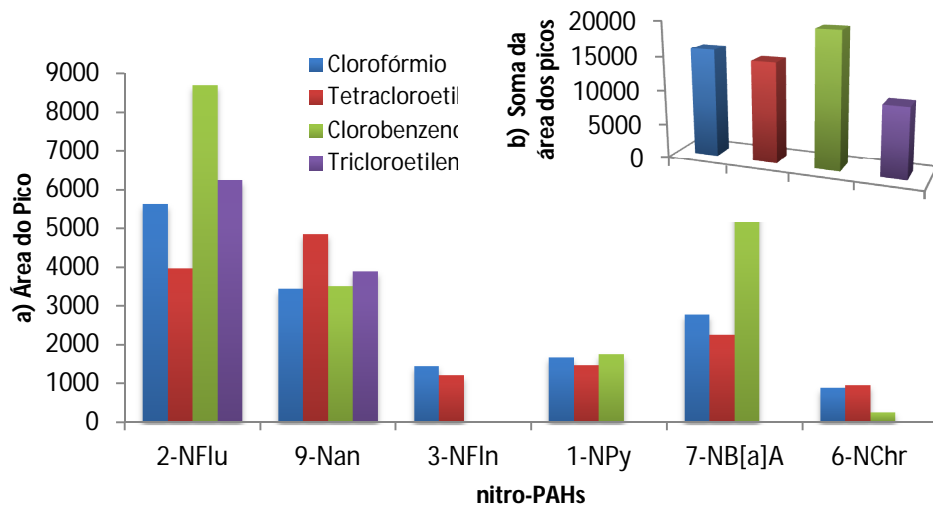


Figura 3.3. a) Efeito do tipo de solvente extrator na extração de nitro-PAHs em água; b) soma da área de resposta dos nitro-PAHs para cada solvente testado.

Para a escolha do solvente dispersante foram realizadas experiências nas condições anteriores, recorrendo-se a 100 μ L de clorofórmio e fez-se variar 500 μ L do solvente dispersante. A miscibilidade em água e na fase orgânica é uma característica fundamental na escolha dos solventes dispersantes a testar (Rezaee et al., 2006; Herrera-Herrera et al., 2010). Neste trabalho foi investigado o efeito de três solventes dispersantes na extração nomeadamente o acetonitrilo, o metanol e a acetona. Tal como se sucedeu com o teste do solvente extrator, para comparar os diferentes solventes construiu-se um gráfico onde se estabeleceu a relação entre a área do pico de cada composto obtido através dos cromatogramas determinados por GC/MS e os três solventes dispersantes (**Figura 3.4.** e **Figura 3.5.**).

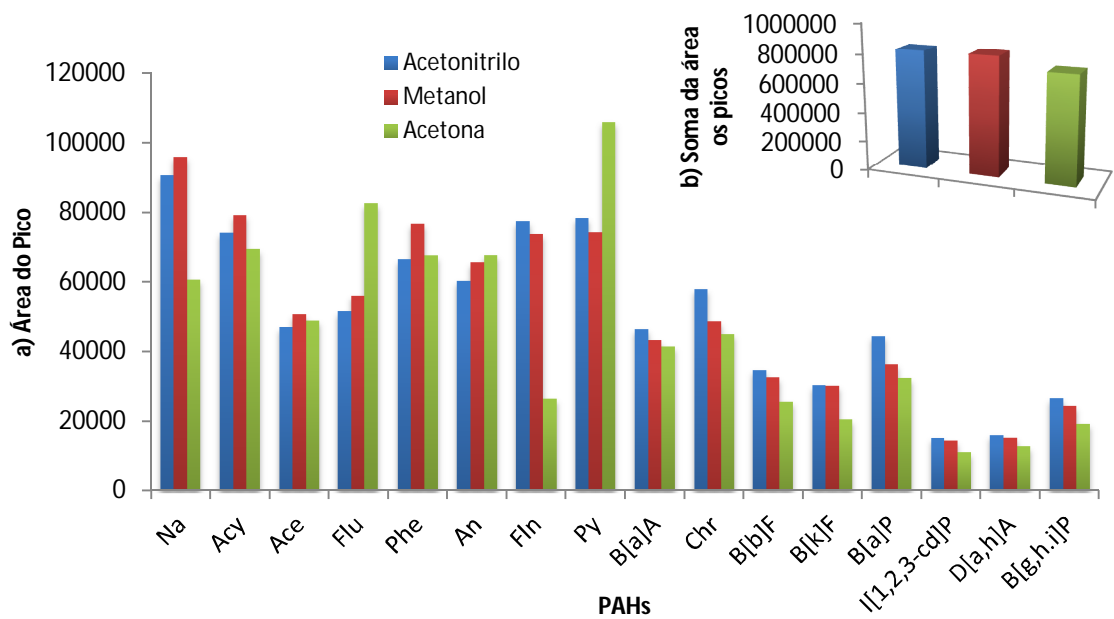


Figura 3.4. a) Efeito do tipo de solvente dispersante na extração de PAHs em água, b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado.

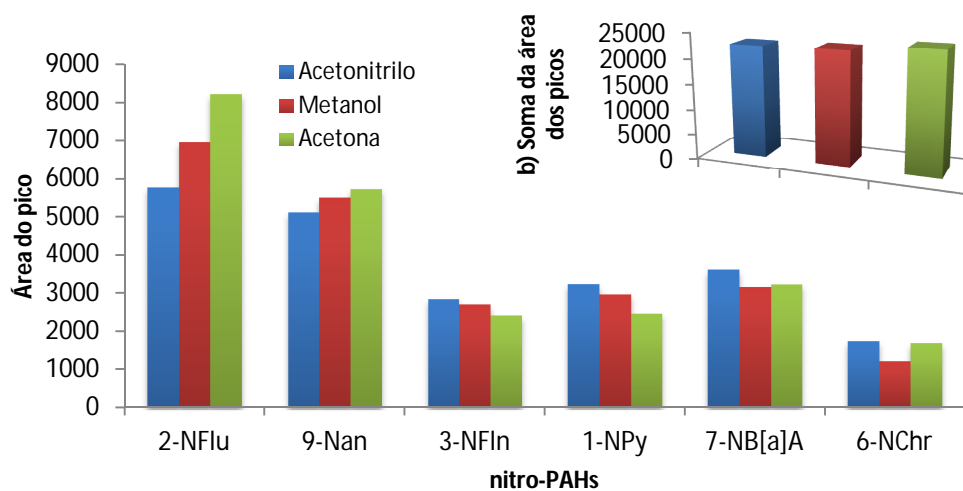


Figura 3.5. a) Efeito do tipo de solvente dispersante na extração de nitro-PAHs em água, b) soma da área de resposta dos PAHs para cada solvente testado.

Como se pode observar na **Figura 3.4.**, no caso dos PAHs com dois e três anéis aromáticos, o solvente dispersante com maior resposta é o metanol. No entanto para os compostos mais pesados o solvente com melhor resposta é o acetonitrilo. Relativamente aos nitro-PAHs (**Figura 3.5.**) verificou-se que para os compostos 2-nitrofluoreno e 9-nitroantraceno o solvente com maiores áreas de resposta foi a acetona, para os restantes nitro-PAHs o acetonitrilo também demonstrou uma boa capacidade de dispersão. Para além destas observações, a partir dos gráficos das soma das áreas dos picos pode se verificar que apesar das pequenas diferenças entre o acetonitrilo e o metanol, é o acetonitrilo que apresenta no total um valor de soma superior que os restantes solventes. De acordo com estes resultados, o acetonitrilo foi selecionado como o solvente dispersante.

3.1.2. DESENHO EXPERIMENTAL

Após a otimização dos tipos de solventes de extração e dispersão, a otimização das restantes condições da extração (volume dos solventes e quantidade de sal) de PAHs e nitro-PAHs foi realizada pelo desenvolvimento um desenho experimental, com recurso a um *central composite design* (CCD). Inicialmente foram definidas as variáveis que seriam sujeitas a otimização, como é o caso de o volume do solvente extrator (X_1), o volume do solvente dispersante (X_2) e a quantidade de NaCl (X_3). As experiências foram concebidas estatisticamente e realizadas de forma aleatória com diferentes combinações das variáveis. No total foram realizadas 19 combinações, como fator de resposta foi utilizado a soma da área dos picos de PAHs e de nitro-PAHs.

A análise da regressão foi realizada de forma a ajustar a função de resposta, e foi obtido o modelo final. A significância do modelo foi avaliada por análise de variância (ANOVA), a partir do teste F de Fisher (**Tabela 3.1.** e **Tabela 3.2.**). O modelo que obteve melhor ajuste para a superfície de resposta foi o modelo de interação quadrática, com valores de F de 24.10 e 55.69 para os PAHs e nitro-PAHs, respetivamente. Estes valores indicam a elevada significância do modelo para os compostos em estudo. Com este modelo quadrático, os valores de R^2_{pred} e R^2_{adj} obtidos para os PAHs foram de 0.8608 e 0.9203, respetivamente. Para os nitro-PAHs obtiveram--se valores de 0.9266 e 0.9647, respetivamente. O sinal alcançado para as razões de ruído foram 15.19 para os PAHs e 22.79 para os nitro-PAHs, estes valores indicam um sinal adequado do desenho.

Os termos significativos para cada resposta apresentam um valor de Prob.>F menor que 0,05. No caso dos PAHs os termos significativos foram: o volume do solvente extrator (X_1), o volume do solvente dispersante (X_2), a quantidade de NaCl (X_3), a interação entre o volume do solvente extrator e a quantidade de sal (X_1X_3), o efeito

quadrático do volume do solvente extrator (X_1^2) e o efeito quadrático do volume do solvente dispersante (X_2^2), para os nitro-PAHs foram X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_1^2 , X_2^2 e X_3^2 . Com este estudo foi também avaliado o valor de "falta de ajuste" para todas as respostas. Verificou-se um valor Prob.>F de 0,8876 e 0,7437 para PAHs e nitro-PAHs, respetivamente, indicando que a falta de ajuste não é significativa ($p > 0,05$). Este conjunto de valores permite concluir que o modelo aplicado é válido para o presente estudo.

Tabela 3.1. Resultados da análise ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático na otimização da extração dos PAHs.

| Fonte | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F | Valor p Prob.> F | |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|----------|------------------|---------------|
| Modelo | 2,97E+11 | 9 | 3,30E+10 | 24,10007 | <0.0001 | significativo |
| X_1 | 1,59E+11 | 1 | 1,59E+11 | 116,5011 | <0.0001 | significativo |
| X_2 | 1,06E+10 | 1 | 1,06E+10 | 7,770087 | 0.0211 | significativo |
| X_3 | 5,60E+10 | 1 | 5,60E+10 | 40,93806 | 0.0001 | significativo |
| X_1X_2 | 3,68E+07 | 1 | 3,68E+07 | 0,026882 | 0.8734 | n.s. |
| X_1X_3 | 2,41E+10 | 1 | 2,41E+10 | 17,59164 | 0.0023 | significativo |
| X_2X_3 | 4,94E+09 | 1 | 4,94E+09 | 3,608921 | 0.0899 | n.s. |
| X_1^2 | 1,71E+10 | 1 | 1,71E+10 | 12,49494 | 0.0064 | significativo |
| X_2^2 | 2,99E+10 | 1 | 2,99E+10 | 21,86555 | 0.0012 | significativo |
| X_3^2 | 3,48E+09 | 1 | 3,48E+09 | 2,546673 | 0.1450 | n.s. |
| Resíduo | 1,23E+10 | 9 | 1,37E+09 | | | |
| Falta de ajuste | 3,40E+09 | 5 | 6,79E+08 | 0,304943 | 0.8876 | n.s. |
| Erro puro | 8,91E+09 | 4 | 2,23E+09 | | | |
| Total | 3,09E+11 | 18 | | | | |

n.s.- não significativo

Tabela 3.2. Resultados da análise ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático na otimização da extração dos nitro-PAHs.

| Fonte | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | Valor F | Valor p Prob.> F | |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------|----------|------------------|---------------|
| Modelo | 1,01E+09 | 9 | 1,13E+08 | 55,69025 | <0.0001 | significativo |
| X_1 | 6,24E+08 | 1 | 6,24E+08 | 308,6228 | <0.0001 | significativo |
| X_2 | 1,41E+07 | 1 | 1,41E+07 | 6,97952 | 0.0268 | significativo |
| X_3 | 1,77E+08 | 1 | 1,77E+08 | 87,35576 | <0.0001 | significativo |
| X_1X_2 | 1,04E+07 | 1 | 1,04E+07 | 5,123351 | 0.0499 | significativo |
| X_1X_3 | 3,09E+07 | 1 | 3,09E+07 | 15,30128 | 0.0036 | significativo |
| X_2X_3 | 3,36E+05 | 1 | 3,36E+05 | 0,166017 | 0.6932 | n.s. |
| X_1^2 | 1,08E+08 | 1 | 1,08E+08 | 53,32151 | <0.0001 | significativo |
| X_2^2 | 6,80E+07 | 1 | 6,80E+07 | 33,62928 | 0.0003 | significativo |
| X_3^2 | 1,68E+07 | 1 | 1,68E+07 | 8,308586 | 0.0181 | significativo |
| Resíduo | 1,82E+07 | 9 | 2,02E+06 | | | |
| Falta de ajuste | 7,33E+06 | 5 | 1,47E+06 | 0,538969 | 0.7437 | n.s. |
| Erro puro | 1,09E+07 | 4 | 2,72E+06 | | | |
| Total | 1,03E+09 | 18 | | | | |

n.s.- não significativo

As superfícies de resposta obtidas pelo desenho experimental permitiram prever a resposta, neste caso a soma da área dos picos dos PAHs e dos nitro-PAHs, com base nos efeitos das três variáveis em estudo (**Figura 3.6.**). A curva de superfície de resposta da **Figura 3.6. (A)** demonstra o efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator na extração de PAHs, na **Figura 3.6. (B)** apresenta o efeito da quantidade de NaCl e do volume do solvente extrator. A terceira variável em cada um dos casos (quantidade de sal e volume de solvente dispersante, respetivamente) foi mantida constante ao nível mais elevado na função de resposta. De acordo com este estudo de otimização, a resposta mais elevada verificou-se com o menor volume de solvente extrator (60µL) e para a menor quantidade de NaCl (1000 mg), no entanto pode-se constatar que para o volume de solvente dispersante obteve-se uma maior área de extração tanto para o volume mais pequeno (200µL) como para o volume maior (750µL). Estas observações são coerentes com os pressupostos da técnica de DLLME, uma vez que por exemplo, quanto menor for o volume do solvente extrator menor o volume da gota sedimentada resultando num maior fator de pré-concentração, ou seja maior será a eficiência da extração. No caso da quantidade de sal, também não é desejável que este ultrapasse determinados valores, uma vez que quando maior for a quantidade de sal maior será o efeito salting-out, aumentando consequentemente o volume da gota sedimentada. No que diz respeito ao volume do solvente dispersor, como já foi mencionado em capítulos anteriores, este depende do volume da fase aquosa assim como do volume do solvente extrator (Rezaee et al, 2006; Herrera-Herrera et al,2010). Pela **Figura 3.6.** de facto foi possível verificar que o comportamento do solvente dispersor modifica com a variação do volume do solvente dispersor.

As curvas de superfície de resposta para otimização da extração de nitro-PAHs estão ilustradas nas **Figuras 3.6. (C)** e **(D)**. Na extração dos nitro-PAHs a resposta apresenta a mesma tendência que a extração dos PAHs, onde a **Figura 3.6. (C)** demonstra o efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator. Relativamente à **Figura 3.6. (D)** é apresentado o efeito da quantidade de sal e do volume do solvente dispersor, a terceira variável, tal como ocorreu com os PAHs, foi mantida constante a um nível elevado na função de resposta. A resposta mais elevada foi alcançada a partir do menor volume de solvente extrator enquanto que para o solvente dispersante o valor máximo de resposta correspondeu ao volume mais elevado e ao volume mais pequeno do solvente dispersante, observou-se também que a maior área dos pico dos nitro-PAHs é obtida quando a quantidade de sal é a mais pequena.

Com base na análise das superfícies de resposta foi possível obter as condições ótimas de extração: 60 µL de solvente extrator, 200µL de solvente dispersante e 1000 mg de NaCl. Esta é uma das possíveis combinações que permitem obter uma melhor resposta

para todos os compostos em estudo. Estas condições ótimas foram testadas experimentalmente, e como se pode verificar na **Tabela 3.3.** a resposta obtida experimentalmente para cada grupo de compostos está de acordo com o valor de resposta previsto pelo modelo.

Tabela 3.3. Comparação do valor de resposta previsto com o valor obtido experimentalmente nas condições ótimas para cada composto.

| | Soma da área dos picos | |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | PAHs | nitro-PAHs |
| Valor previsto da resposta | 473329 | 26318 |
| Valor experimental da resposta | 462536 | 27879 |
| Desvio-Padrão experimental | 23037 | 2153 |

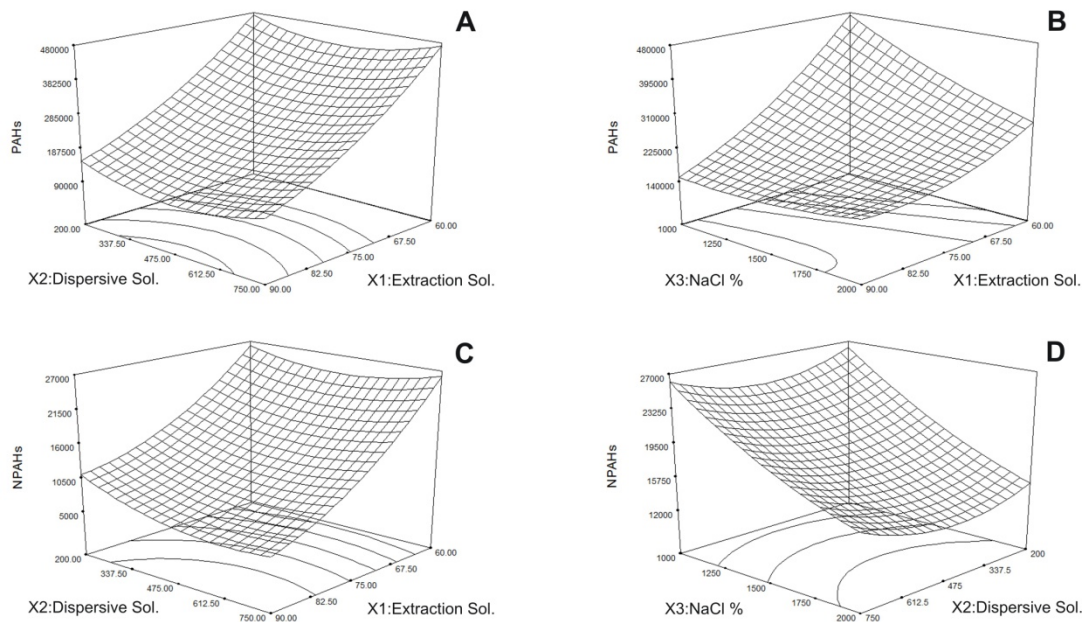


Figura 3.6. Curvas de superfície de resposta estimado a partir CCD do procedimento de extração de PAHs e nitro-PAHs. **(A)** Combinação do efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator na extração de PAHs. **(B)** Combinação do efeito da quantidade de NaCl e o volume de solvente extrator na extração de PAHs. **(C)** Combinação do efeito do volume do solvente dispersante e do volume do solvente extrator na extração de nitro-PAHs. **(D)** Combinação do efeito da quantidade de NaCl e o volume do solvente dispersante na extração de nitro-PAHs.

3.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Após a otimização da técnica de DLLME para a extração de PAHs e nitro-PAHs, foi necessário assegurar que o método desenvolvido apresenta resultados de elevada fiabilidade e também verificar se o método é adequado para a aplicação em análise de rotina. O desempenho do método foi averiguado através do estudo de validação tendo por base a determinação e avaliação de diversos parâmetros analíticos, tais como a seletividade, linearidade, gama de trabalho, limites de deteção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermédia) e exatidão. Os resultados obtidos no processo de validação do método otimizado encontram-se descritos nos seguintes subcapítulos.

3.2.1. MÉTODO DE CALIBRAÇÃO E GAMA DE TRABALHO

Como já foi referido no Capítulo 1 as amostras ambientais na maioria das vezes são amostras com matrizes de elevada complexidade, por isso foi necessário recorrer a um método que permitisse compensar o provável efeito de matriz. Optou-se por utilizar um método de calibração em matriz com adição de padrão interno. As curvas de calibração foram obtidas a partir da razão entre a área de pico de cada padrão com a área de pico do respetivo padrão interno (A_p/A_{pi}) em função da concentração expressa em ng/L.

Relativamente aos PAHs foram realizados ensaios para a gamas entre 5 e 150 ng/L, com vários pontos intermédios. No caso dos nitro-PAHs, inicialmente também se testou uma faixa de trabalho de 5 a 150 ng/L, no entanto verificou-se que para a concentração de 5 ng/L a intensidade do sinal era muito reduzida, resultando consequentemente num erro relativo percentual muito elevado (%ER). Para análises por GC/MS, não é aceitável uma percentagem de erro superior a 20% (Mansilha et al., 2010). Como tal não se verificou, decidiu-se reduzir a gama de trabalho dos nitro-PAHs para 10 a 150 ng/L.

3.2.2. LINEARIDADE, SENSIBILIDADE E LIMIARES ANALÍTICOS DO MÉTODO

O estudo da linearidade foi realizada por intermédio da construção de curvas de calibração para cada padrão de PAHs e nitro-PAHs. Como foi referido anteriormente, para os PAHs construíram-se curvas com concentrações de 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/L, e para os nitro-PAHs utilizaram-se concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/L.

Como se pode observar a partir dos valores do coeficiente de correlação (r^2) apresentados na **Tabela 3.4.**, obteve-se uma excelente resposta linear em toda a gama de trabalho para todos os compostos em estudo, no geral o coeficiente de correlação variou entre 0,9996 e 1,000. Apesar de este parâmetro apresentar valores bastante satisfatórios, por si só é um fraco indicador de linearidade, uma vez que, como se verificou para o caso dos nitro-PAHs, é possível coexistir excelentes valores de coeficiente de correlação com percentagens significativas de erros na extremidade inferior da curva de calibração (5 ng/L) (AMC, 1988; Mulholland & Hibbert, 1997). Para um melhor estudo da linearidade foi necessário determinar o desvio padrão residual ($S_{y/x}$), assim como o desvio padrão do declive (S_b) e o desvio padrão da ordenada na origem (S_a) (**Tabela 3.4**). Os parâmetros S_a e S_b permitiram estimar os limites de confiança da ordenada da origem e do declive, respetivamente, da curva de calibração. Os limites de confiança são determinados por: $b \pm t_{(n-2)}S_b$ e por $a \pm t_{(n-2)}S_a$, onde o valor de t adota um nível de confiança de 95% com $(n-2)$ graus de liberdade, no caso dos PAHs tem $(n-2)=5$ graus de liberdade e para os nitro-PAHs $(n-2)=4$ graus de liberdade (Miller & Miller, 2005; Mansilha et al., 2010).

Para além destes parâmetros também foi calculado o somatório dos erros relativos percentuais, como se pode observar na **Tabela 3.4.** os nitro-PAHs apresentam menores erros percentuais que os PAHs, provavelmente está relacionado ao facto dos nitro-PAHs apresentarem uma gama de trabalho inferior à dos PAHs.

Relativamente à sensibilidade da metodologia, o termo sensibilidade está relacionada com a variação mínima que é necessária impor à concentração para se obter uma variação significativa na intensidade do sinal, a sensibilidade também pode ser expressa pelos declives das respetivas curvas de calibração. Como se pode observar, o método apresenta uma sensibilidade superior para os PAHs comparativamente aos nitro-PAHs.

No que diz respeito aos limiares analíticos, segundo ICH o limite de deteção (LD) corresponde à quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) corresponde, por sua vez, à quantidade mais baixa de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com a precisão e exatidão apropriadas (ICH,1994). Existem várias expressões que permitem calcular os limite de deteção e de quantificação, no entanto segundo Miller é possível calcular estes limiares baseando se em parâmetros da curva de calibração e nas medidas de dispersão (Miller e Miller, 2005). O limite de deteção foi calculado pela expressão: $LD = \frac{3 \times Sy/x}{b}$. Na **Tabela 3.4.** também se encontram os valores de LD e de LQ obtidos. Para os PAHs os limites de deteção variaram entre 0,623 ng/L e 3,479 ng/L; para os nitro-PAHs obtiveram-se valores de LD entre 0,824 e 3,374 ng/L.

O limite de quantificação para cada composto foi calculado a partir da expressão: $LQ = \frac{10 \times Sy/x}{b}$, como se pode observar na **Tabela3.4.** os LQs variaram entre 2,076 ng/L e 11,60 ng/L para os PAHs e entre 2,746 ng/L a 11,25 ng/L para os nitro-PAHs (Miller & Miller, 2005).

Tabela 3.4. Parâmetros obtidos nas curvas de calibração de cada composto.

| Compostos | $b \pm t(n-2)S_b$ | $a \pm t(n-2)S_a$ | S _{y/x} | r ² | LD (ng/L) | LQ (ng/L) | Σ%ER |
|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|--------------|--------------|------|
| PAHs | | | | | | | |
| Naftaleno | 0,0578 ± 0,0006 | 0,2071 ± 0,05 | 0,0317 | 0,9999 | 0,9999 | 1,64 | 5,48 |
| Acenaftileno | 0,0843 ± 0,0008 | 0,1852 ± 0,06 | 0,0392 | 0,9999 | 0,9999 | 1,40 | 4,65 |
| Acenafteno | 0,0539 ± 0,0010 | 0,5695 ± 0,07 | 0,0491 | 0,9998 | 0,9998 | 2,73 | 9,10 |
| Fluoreno | 0,0484 ± 0,0004 | 0,0262 ± 0,03 | 0,0191 | 0,9999 | 0,9999 | 1,18 | 3,94 |
| Fenantreno | 0,0518 ± 0,0006 | 0,5005 ± 0,05 | 0,0321 | 0,9999 | 0,9999 | 1,86 | 6,20 |
| Antraceno | 0,0498 ± 0,0002 | 0,0428 ± 0,02 | 0,0103 | 0,9999 | 0,9999 | 0,62 | 2,08 |
| Fluoranteno | 0,0574 ± 0,002 | 0,1595 ± 0,07 | 0,0466 | 0,9998 | 0,9998 | 2,44 | 8,13 |
| Pireno | 0,0628 ± 0,0005 | 0,1822 ± 0,04 | 0,0243 | 0,9999 | 0,9999 | 1,16 | 3,87 |
| Benzo(a)antraceno | 0,0420 ± 0,0005 | -0,0368 ± 0,04 | 0,0269 | 0,9999 | 0,9999 | 1,92 | 6,39 |
| Criseno | 0,0356 ± 0,0008 | 0,0726 ± 0,06 | 0,0393 | 0,9996 | 0,9996 | 3,32 | 11,1 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0,0519 ± 0,0006 | -0,0588 ± 0,04 | 0,0285 | 0,9999 | 0,9999 | 1,65 | 5,50 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0,0306 ± 0,0004 | 0,0225 ± 0,03 | 0,0208 | 0,9999 | 0,9999 | 2,04 | 6,80 |
| Benzo(a)pireno | 0,0463 ± 0,0008 | -0,0289 ± 0,06 | 0,0386 | 0,9998 | 0,9998 | 2,51 | 8,35 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 0,0285 ± 0,0004 | 0,0398 ± 0,03 | 0,0183 | 0,9999 | 0,9999 | 1,93 | 6,42 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 0,0299 ± 0,0004 | 0,0610 ± 0,03 | 0,0216 | 0,9998 | 0,9998 | 2,17 | 7,22 |
| Benzo(ghi)pirileno | 0,0360 ± 0,0008 | 0,1742 ± 0,06 | 0,0418 | 0,9996 | 0,9996 | 3,48 | 11,6 |
| nitro-PAHs | | | | | | | |
| 2-Nitrofluoreno | 0,0072 ± 0,00005 | 0,0543 ± 0,004 | 0,0020 | 0,9999 | 0,9999 | 0,82 | 2,75 |
| 9-Nitroantraceno | 0,0036 ± 0,00009 | 0,0329 ± 0,008 | 0,0038 | 0,9997 | 0,9997 | 3,21 | 10,7 |
| 3-Nitrofluoranteno | 0,0021 ± 0,00002 | -0,0029 ± 0,002 | 0,0009 | 0,9999 | 0,9999 | 1,35 | 4,50 |
| 1-Nitropireno | 0,0045 ± 0,0001 | -0,0053 ± 0,01 | 0,0051 | 0,9996 | 0,9996 | 3,37 | 11,3 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | 0,0102 ± 0,0002 | 0,0162 ± 0,01 | 0,0066 | 0,9999 | 0,9999 | 1,94 | 6,48 |
| 6-Nitrocriseno | 0,0229 ± 0,0003 | -0,0531 ± 0,03 | 0,0132 | 0,9999 | 0,9999 | 1,73 | 5,77 |

b- declive; a- ordenada na origem; S_b- desvio padrão do declive; S_a- desvio padrão da ordenada na origem; S_{x/y}- desvio padrão residual; r- coeficiente de correlação; LD- limite de detecção; LQ- limite de quantificação; Σ%ER – somatório do erro relativo percentual.

3.2.3. SELETIVIDADE

A seletividade foi um dos parâmetros estudados para a validação do método. A seletividade de um método define-se como a capacidade de identificar e quantificar, de forma inequívoca, vários compostos de interesse na presença de substâncias que podem interferir na sua determinação numa amostra de matriz complexa. A avaliação da seletividade procedeu-se a partir da comparação do cromatograma da matriz em branco (amostra de água ultrapura) com o cromatograma de uma solução aquosa contendo os compostos em estudo com concentração próxima do limite de quantificação.

A partir da análise dos cromatogramas verificou-se uma boa separação dos picos cromatográficos, e além disso não se observou a presença de interferências significativas no tempo de retenção dos PAHs e nitro-PAHs selecionados.

3.2.4. PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão e a exatidão são parâmetros muito importantes no estudo da validação do método, a precisão e a exatidão foram determinadas segundo as normas estipuladas pela ICH (ICH, 1994).

A precisão de um método analítico é definida, segundo a ICH, como o grau de concordância (ou grau de dispersão) entre os valores obtidos. A precisão do método foi avaliada a vários níveis, a partir do estudo da repetibilidade (ensaio intra-dia); da precisão intermédia (ensaio inter-dia) e da reprodutibilidade (ensaio intra-laboratorial) (Hartmann et al., 1998).

O estudo da repetibilidade (ensaio intra-dia) consistiu na análise de nove determinações realizadas no mesmo dia, ou seja, efetuaram-se três repetições para três diferentes concentrações (5, 50 e 150 para os PAHs e 10, 50 e 150 para os nitro-PAHs). Os resultados da avaliação da repetibilidade foram expressos pelo coeficiente de variação (%CV), o %CV foi determinado pela seguinte expressão da equação (4):

$$\%CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100 \quad (4)$$

onde σ é o desvio padrão absoluto e μ é a média aritmética das determinações.

Relativamente ao estudo da precisão intermédia (ensaios inter-dia), este permite avaliar a importância das variações dentro do mesmo laboratório tais como a análise em diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos. No âmbito desta dissertação a avaliação da precisão intermédia realizou-se a partir de uma determinação em três dias diferentes para as três concentrações, no total foram executadas nove determinações, como se encontra estipulado pelo ICH. Os resultados obtidos pelos ensaios inter-dia foram também expressos pelo %CV (ICH, 1994; Hartmann et al., 1998).

Os resultados encontram-se demonstrados na **Tabela 3.5.** Deste modo, pode-se observar, como seria de esperar, que para a concentração mais baixa obtiveram-se valores de %CV superiores que as restantes concentrações, isto verifica-se tanto nos ensaios intra-dia como nos ensaios inter-dia. De uma forma geral, é possível verificar que %CV dos PAHs são inferiores comparativamente aos %CV dos nitro-PAHs.

Os critérios de aceitação segundo a conferência de Washington e segundo a ANVISA, estipula que os coeficientes de variação devem apresentar valores $\leq 15\%$ para os

pontos intermédios (concentração nominal de 50 e 150 ng/L), exceto para o ponto inferior (no caso dos PAHs 5 ng/L, e para os nitro-PAHs 10 ng/L), cujo o valor de %CV deverá ser $\leq 20\%$ (Hartmann et al., 1994; ANVISA, 2003; Mansilha et al., 2010). Os coeficientes de variação obtidos para os PAHs variaram entre 0,446% a 19,29% para a repetibilidade e 0,381% a 18,96% para a precisão intermédia dos PAHs. No que diz respeito aos nitro-PAHs os valores de %CV obtidos variaram entre 1,240% a 19,54% e de 1,571% a 19,62% para os ensaios intra-dia e inter-dia, respetivamente. Estes resultados indicam que o método apresenta uma precisão aceitável.

Para além da precisão, como já foi referido, foi avaliada a exatidão do método. Segundo ICH, a exatidão do método define-se como o grau de concordância entre o valor obtido na análise e um valor de referência considerado como valor verdadeiro. A organização internacional da normalização (ISO) estabelece que a exatidão corresponde à combinação dos erros sistemáticos (%Bias) e erros aleatórios (precisão). Contudo, na maioria das vezes recorre-se à exatidão para descrever o erro sistemático, ou seja para determinar o valor da %Bias (Hartmann et al., 1994; ICH,1994; Hartmann et al., 1998). A avaliação foi realizada pela adição de uma quantidade conhecida de padrões na matriz em três níveis diferentes de concentrações, recorreu-se aos mesmos níveis de concentração utilizados na avaliação da precisão.

O valor da %Bias foi obtido através da comparação entre a concentração obtida (Conc. Obtida) e a concentração teórica ou nominal (Conc. Nominal). A expressão da equação (5) utilizada para calcular %Bias é a seguinte:

$$\%Bias = \frac{Conc.Nominal - Conc.Obtida}{Conc.Nominal} \times 100 \quad (5)$$

Tal como está estabelecido para a precisão, o valor da %Bias é considerada como aceitável quando é inferior a 15% nos pontos intermédios e inferior a 20% na concentração nominal mais baixa. Na **Tabela 3.5.** estão apresentados os valores %Bias dos ensaios intra-dia e dos ensaios inter-dia. A %Bias obtida nos ensaios intra-dia variou entre -15,43% e 19,29% para os PAHs e de -16,27% a 15,69% para os nitro-PAHs, para os ensaios inter-dias obteve-se valores entre -13,53% a 19,20% e de -13,12% a 10,23% para os PAHs e nitro-PAHs, respetivamente.

Tabela 3.5. Parâmetros obtidos para a precisão (ensaios intra-dia e inter-dia) e exatidão do método.

| Compostos | Intra-dia | | | | | | Inter-dia | | | | | |
|--------------------------|-----------------|-------|-------|------------------|--------|--------|-----------------|-------|-------|------------------|--------|--------|
| | Precisão (% CV) | | | Exatidão (%Bias) | | | Precisão (% CV) | | | Exatidão (%Bias) | | |
| Conc. Nominal (ng/L) | 5 | 50 | 150 | 5 | 50 | 150 | 5 | 50 | 150 | 5 | 50 | 150 |
| PAHs | | | | | | | | | | | | |
| Naftaleno | 2,282 | 4,306 | 3,486 | 2,117 | 0,001 | -4,338 | 17,22 | 6,901 | 5,068 | -9,356 | -3,665 | -0,809 |
| Acenaftileno | 0,446 | 12,68 | 3,464 | -6,282 | 5,904 | 8,169 | 18,96 | 1,252 | 9,848 | -16,14 | 14,51 | 14,58 |
| Acenafteno | 19,29 | 7,454 | 13,80 | -16,38 | 4,764 | 10,57 | 17,40 | 13,13 | 9,244 | 5,349 | 10,33 | -0,727 |
| Fluoreno | 9,221 | 1,835 | 3,048 | 1,100 | -1,684 | 2,610 | 18,40 | 5,362 | 1,052 | -8,880 | 0,538 | -0,151 |
| Fenantreno | 3,316 | 2,871 | 0,967 | 5,531 | 5,980 | 3,507 | 17,48 | 0,381 | 3,605 | 19,20 | 2,887 | 0,226 |
| Antraceno | 10,15 | 12,16 | 13,94 | 3,137 | 9,607 | 3,386 | 12,07 | 13,40 | 9,548 | -7,016 | 2,669 | 0,916 |
| Fluoranteno | 6,906 | 5,175 | 2,193 | 20,15 | -4,781 | 0,881 | 12,11 | 5,000 | 1,300 | -1,624 | -4,659 | -0,632 |
| Pireno | 14,68 | 14,07 | 1,738 | 9,018 | -0,016 | 13,97 | 14,30 | 7,412 | 5,875 | -0,016 | -9,862 | 1,430 |
| Benzo(a)antraceno | 10,28 | 9,319 | 3,857 | 5,197 | 2,033 | 6,827 | 11,53 | 2,399 | 1,392 | 10,15 | -7,119 | 3,420 |
| Criseno | 1,432 | 10,12 | 9,820 | -3,826 | -4,013 | -10,16 | 7,015 | 8,647 | 10,88 | 6,472 | 4,027 | 1,408 |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,499 | 11,12 | 1,716 | -15,43 | 13,95 | 14,05 | 2,741 | 11,25 | 9,099 | -13,53 | -5,627 | 2,141 |
| Benzo(k)fluoranteno | 7,006 | 0,979 | 3,806 | -11,08 | 2,101 | 2,387 | 5,981 | 7,554 | 8,780 | -12,96 | -2,470 | -4,126 |
| Benzo(a)pireno | 7,252 | 8,509 | 1,982 | -4,005 | -1,705 | 10,04 | 12,64 | 6,242 | 8,362 | 5,217 | -0,453 | -10,47 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 9,364 | 5,296 | 2,983 | 16,17 | -11,48 | 3,988 | 18,76 | 7,247 | 4,419 | 3,089 | 0,512 | 0,629 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 5,968 | 3,217 | 4,916 | 19,29 | 11,83 | -6,862 | 11,87 | 8,445 | 6,141 | 0,660 | 0,532 | -1,106 |
| Benzo(ghi)pirileno | 6,352 | 8,606 | 3,605 | -13,95 | -8,526 | -5,740 | 2,709 | 9,743 | 3,696 | -2,008 | 10,92 | 1,042 |
| nitro-PAHs | | | | | | | | | | | | |
| 2-Nitrofluoreno | 14,03 | 8,906 | 2,327 | -14,24 | -3,509 | -2,273 | 9,215 | 2,327 | 0,428 | -9,089 | 2,853 | 6,829 |
| 9-Nitroantraceno | 19,54 | 5,612 | 13,29 | 6,097 | 1,595 | 5,524 | 19,62 | 13,29 | 10,68 | 6,097 | -6,549 | -12,03 |
| 3-Nitrofluoranteno | 10,39 | 9,359 | 9,958 | -16,27 | 0,198 | 1,538 | 19,44 | 9,958 | 11,62 | -12,44 | 0,761 | -5,194 |
| 1-Nitropireno | 3,720 | 1,240 | 4,123 | 15,69 | 11,04 | -9,824 | 9,673 | 4,123 | 7,251 | 7,427 | 8,884 | 10,23 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | 3,212 | 7,840 | 1,571 | -11,24 | -11,24 | 5,076 | 4,159 | 1,571 | 5,547 | -3,599 | -0,501 | -6,980 |
| 6-Nitrocriseno | 19,79 | 6,332 | 5,309 | 2,088 | 2,088 | 8,474 | 13,90 | 5,309 | 9,746 | -15,03 | -13,12 | 2,792 |

Existe vários métodos que visam avaliar a exatidão de um método analítico, apesar de ser frequentemente avaliado pelo cálculo do valor de %Bias. Por si só este parâmetro pode ser insuficiente para comprovar a exatidão de um método, uma vez que avalia apenas a contribuição dos erros sistemáticos nas medições. No âmbito deste estudo, procedeu-se a uma análise da exatidão recorrendo ao cálculo da percentagem de recuperação e também pela participação de ensaios interlaboratoriais.

Os ensaios de recuperação baseiam-se na fortificação da amostra com uma concentração definida de padrões, seguindo-se a determinação da concentração do composto adicionado. De uma forma geral os ensaios de recuperação traduzem a quantidade de um determinado analito recuperado no processo, relativamente à quantidade real presente na amostra. A fortificação foi realizada em amostras reais (A1,A2,A3 e A4) com uma concentração de 50 ng/L de PAHs e nitro-PAHs. Os ensaios foram executados em amostras de água reais de forma a confirmar que não se verifica o efeito da matriz nas determinações dos compostos em estudo. Para efetuar o cálculo da percentagem de recuperação (%RE) utilizou-se expressão da equação (6):

$$\%RE = \frac{Conc.Obt. - Conc.Adi.}{Conc.Adi.} \times 100 \quad (6)$$

onde Conc.Obt. corresponde à concentração obtida e Conc.Adi é a concentração dos padrões adicionados (Mansilha et al., 2010) . A percentagem de recuperação é considerada como aceitável quando os resultados obtidos estão de preferência contidos na gama de 70% e 120%.

Na **Tabela 3.6.** são apresentados os resultados obtidos para este ensaio. Como se pode comprovar, verificaram-se boas percentagens de recuperação para quase todas as amostras, exceto para os compostos: criseno (68,9 %) e 3-nitrofluranteno(146,9%) nas amostras A1 e A4, respetivamente, estes dois valores estão fora dos critérios de aceitação utilizados nesta validação, mas não colocam em causa o estudo de validação deste método pois são dois valores casuais. Para os restantes PAHs a %RE variou entre 70,96% e 119,2%, para os demais nitro-PAHs verificou-se %RE de 82,5% e 116,7%. Estes resultados evidenciam a elevada aplicabilidade do método proposto, uma vez que a técnica apresenta valores bastante satisfatórios para a recuperação (exatidão) em amostras de água com diferentes matrizes.

Tabela 3.6. Resultados obtidos no ensaio de recuperação em amostras reais, fortificadas com concentração 50 ng/L de PAHs e nitro-PAHs (A1-água do rio: Praia fluvial do Areinho, Oliveira do Douro; A2-água do mar: Praia do Castelo do Queijo, Porto; A3-água do rio: Foz do Douro, Porto; A4-água da chuva: Porto).

| Compostos | Amostras | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|----------|------------|-------|--------|------------|-------|--------|------------|-------|--------|------------|-------|
| | A1 | | | A2 | | | A3 | | | A4 | | |
| | Conc. | Conc. Exp. | % RE | Conc. | Conc. Exp. | % RE | Conc. | Conc. Exp. | % RE | Conc. | Conc. Exp. | % RE |
| | (ng/L) | 50 | 50 | (ng/L) | 50 | 50 | (ng/L) | 50 | 50 | (ng/L) | 50 | 50 |
| PAHs | | | | | | | | | | | | |
| Naftaleno | <LD | 42,22 | 81,62 | <LQ | 34,25 | 71,25 | <LQ | 37,58 | 74,89 | <LQ | 44,78 | 79,51 |
| Acenaftileno | <LD | 40,50 | 81,00 | <LD | 31,38 | 71,56 | <LD | 37,90 | 75,79 | <LQ | 38,61 | 70,32 |
| Acenafteno | <LD | 59,61 | 119,2 | <LD | 40,21 | 80,41 | <LD | 55,73 | 111,5 | <LD | 51,23 | 102,5 |
| Fluoreno | <LD | 60,11 | 112,5 | 11,86 | 50,78 | 77,84 | 11,52 | 62,63 | 102,2 | 11,90 | 57,02 | 90,24 |
| Fenantreno | <LD | 28,04 | 73,55 | 18,67 | 46,93 | 70,96 | <LD | 46,51 | 90,07 | 13,70 | 52,53 | 77,66 |
| Antraceno | 6,67 | 59,60 | 105,9 | <LQ | 39,58 | 77,03 | <LD | 41,49 | 82,97 | <LD | 39,13 | 78,25 |
| Fluoranteno | <LD | 42,00 | 86,13 | <LQ | 42,97 | 75,71 | <LD | 44,18 | 88,35 | <LD | 40,73 | 81,47 |
| Pireno | <LD | 37,12 | 74,25 | <LD | 38,24 | 76,48 | <LD | 39,96 | 79,93 | <LD | 35,13 | 70,27 |
| Benzo(a)antraceno | <LD | 43,54 | 87,08 | <LQ | 47,01 | 88,40 | <LQ | 47,46 | 90,08 | <LQ | 50,20 | 94,64 |
| Criseno | <LD | 32,97 | 68,88 | <LD | 36,05 | 72,03 | <LD | 40,76 | 82,20 | <LD | 35,09 | 70,78 |
| Benzo(b)fluoranteno | <LQ | 44,82 | 85,62 | <LD | 49,63 | 99,26 | <LD | 46,76 | 93,52 | <LD | 54,83 | 109,7 |
| Benzo(k)fluoranteno | <LD | 42,36 | 84,72 | <LD | 45,41 | 90,83 | <LD | 42,98 | 85,95 | <LD | 44,92 | 90,91 |
| Benzo(a)pireno | <LD | 46,16 | 92,31 | <LD | 49,34 | 98,68 | <LD | 48,95 | 97,89 | <LQ | 48,45 | 89,16 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | <LD | 49,29 | 96,05 | <LQ | 52,04 | 99,68 | <LD | 43,97 | 88,00 | <LD | 37,43 | 74,85 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | <LD | 51,53 | 103,1 | <LD | 55,96 | 109,2 | <LD | 46,36 | 92,71 | <LD | 36,29 | 72,57 |
| Benzo(ghi)pirileno | <LD | 54,88 | 109,8 | <LD | 54,61 | 109,4 | <LD | 47,95 | 102,6 | <LD | 39,19 | 78,38 |
| nitro-PAHs | | | | | | | | | | | | |
| 2-Nitrofluoreno | <LD | 52,11 | 103,7 | <LD | 53,52 | 106,0 | <LD | 54,90 | 109,3 | <LD | 50,00 | 99,41 |
| 9-Nitroantraceno | 29,08 | 79,80 | 101,3 | 12,48 | 69,21 | 113,3 | 38,90 | 87,83 | 97,73 | 37,85 | 81,66 | 87,50 |
| 3-Nitrofluoranteno | <LD | 58,44 | 116,6 | <LD | 58,47 | 116,7 | <LD | 54,04 | 107,9 | <LD | 86,20 | 146,9 |
| 1-Nitropireno | 23,06 | 64,58 | 82,46 | <LD | 52,38 | 105,2 | 20,31 | 68,23 | 95,16 | <LQ | 65,40 | 104,7 |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | <LD | 47,81 | 94,79 | <LD | 55,52 | 107,1 | <LD | 53,35 | 105,8 | <LD | 54,21 | 107,5 |
| 6-Nitrocriseno | <LD | 56,39 | 112,0 | <LQ | 60,48 | 114,3 | <LD | 56,25 | 111,7 | <LD | 45,15 | 89,80 |

Conc.- concentração da amostra; Conc.Exp.-concentração experimental; %RE- percentagem de recuperação.

Para além da realização dos estudos da %CV, %Bias e %RE, participou-se em ensaios interlaboratoriais com a utilização de materiais de referência certificados. Estes ensaios também permitiram avaliar a precisão (reprodutibilidade) e a exatidão do método. Os materiais de referência certificados possibilitam a rastreabilidade dos resultados, simulando a análise de uma amostra vulgar permitindo o controlo da exatidão da metodologia. Os ensaios interlaboratoriais também permitiram avaliar a reprodutibilidade, isto é, permitiram analisar o grau de concordância dos resultados obtidos a partir do mesmo método e para a mesma amostra, mas realizados em laboratórios diferentes.

O ensaio interlaboratorial Round 484 foi entregue no dia 11 de maio de 2015, sendo que também se efetuou os ensaios interlaboratoriais Round 464 e 452. Todos os ensaios foram realizados pela AQUACHECK PT Scheme. Além destes ensaios também se comparou a técnica de DLLME com a técnica de SPE na extração de PAHs.

Os resultados relativos a estes estudos encontram-se na **Tabela 3.7.** Como se pode constatar, os resultados obtidos para os três Rounds encontram-se entre os valores definidos nos intervalos satisfatórios. Como é possível observar, a maioria dos resultados encontram-se dentro dos intervalos satisfatórios, no entanto para alguns compostos obteve-se resultados que não satisfazem o respetivo intervalo. Avaliando conjuntamente os valores de %Bias, %RE e os resultados obtidos no ensaio interlaboratorial, é possível comprovar que de facto o método apresenta uma boa exatidão.

Recorreu-se ao ensaio interlaboratorial para a análise da precisão e da exatidão, no entanto este também permitiu realizar a comparação entre a técnica de SPE e DLLME. A escolha da técnica SPE deveu-se essencialmente ao facto de ser, atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para extrair PAHs e nitro-PAHs em amostras de água (Mansilha, 2014). Como se pode verificar na **Tabela 3.7.**, os resultados obtidos pela técnica de SPE são muito similares aos valores obtidos para a técnica de DLLME. Apesar de os resultados não serem muito distintos, sem dúvida que a técnica mais vantajosa é a DLLME comparativamente a SPE. Como vários estudos indicam, a técnica SPE necessita de grandes volumes de amostra e de solventes orgânicos, enquanto que a técnica de DLLME é bastante mais ecológica pelo facto de recorrer a volumes extremamente pequenos (60 μ L) de solventes orgânicos e o tempo de extração é praticamente instantâneo (Almeida, 2010). Todas estas características poderão possibilitar a futura aplicabilidade da técnica DLLME em análises de rotina em substituição da técnica de SPE.

No que diz respeito aos Nitro-PAHs esta avaliação com materiais de referência certificados não foi possível, pois, que seja do nosso conhecimento, estes materiais com estes compostos ainda não estão disponíveis comercialmente. Sendo assim, esta comparação entre SPE e DLLME para os Nitro-PAHs não foi efetuada.

Tabela 3.7. Resultados obtidos para os ensaios interlaboratoriais Round 484, 464 e 452 das técnicas de SPE e DLLME.

| Compostos | Ensaio interlaboratorial | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------|---------------------|------------------------|-------|-----------|-------|---------------------|------------------------|-------|-----------|-------|---------------------|------------------------|-------|
| | Round 484 | | | | | Round 464 | | | | | Round 452 | | | | |
| | Resultado | | Valor de referência | Intervalo satisfatório | | Resultado | | Valor de referência | Intervalo satisfatório | | Resultado | | Valor de referência | Intervalo satisfatório | |
| | SPE | DLLME | ng/L | Máx. | Min. | SPE | DLLME | ng/L | Máx. | Min. | SPE | DLLME | ng/L | Máx. | Min. |
| ng/L | ng/L | ng/L | | Máx. | Min. | ng/L | ng/L | | ng/L | Máx. | Min. | ng/L | | ng/L | ng/L |
| PAHs | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naftaleno | 14,49 | 13,86 | 14,78 | 18,78 | 10,78 | 18,52 | 25,07 | 21,91 | 17,53 | 26,29 | 16,18 | 24,31 | 20,97 | 16,78 | 25,16 |
| Acenaftileno | 14,52 | 14,94 | 13,00 | 17,00 | 9,00 | 27,59 | 19,28 | 17,85 | 13,85 | 21,85 | 24,91 | 15,38 | 13,49 | 9,49 | 17,49 |
| Acenafteno | 11,28 | 12,22 | 14,09 | 18,09 | 10,09 | 10,81 | 11,53 | 13,61 | 9,61 | 17,61 | 15,42 | 12,44 | 13,02 | 9,02 | 17,02 |
| Fluoreno | 14,81 | 14,71 | 14,43 | 18,43 | 10,43 | 18,99 | 16,49 | 13,23 | 9,23 | 17,23 | 20,77 | 15,39 | 11,81 | 7,81 | 15,81 |
| Fenantreno | 5,97 | 5,81 | 6,21 | 10,21 | 2,21 | 15,72 | 17,00 | 16,90 | 12,90 | 20,90 | 29,40 | 21,95 | 22,16 | 17,73 | 26,59 |
| Antraceno | 27,56 | 24,37 | 23,75 | 28,50 | 19,00 | 10,04 | 9,84 | 8,58 | 4,58 | 12,58 | 28,22 | 23,65 | 23,78 | 19,02 | 28,54 |
| Fluoranteno | 29,40 | 47,02 | 39,90 | 47,90 | 31,90 | 15,38 | 28,73 | 26,70 | 21,40 | 32,00 | 29,34 | 39,22 | 34,90 | 27,90 | 41,90 |
| Pireno | 15,99 | 25,51 | 23,16 | 28,01 | 10,21 | 16,94 | 22,31 | 25,06 | 20,05 | 30,07 | 13,40 | 18,15 | 16,56 | 12,56 | 20,56 |
| Benzo(a)antraceno | 8,87 | 7,08 | 7,17 | 11,17 | 3,17 | 8,22 | 7,39 | 6,31 | 2,31 | 10,31 | 20,84 | 28,34 | 24,62 | 19,70 | 29,54 |
| Criseno | 21,10 | 11,1 | 13,51 | 17,51 | 9,51 | 34,69 | 17,60 | 17,82 | 13,82 | 21,82 | 28,15 | 8,52 | 14,90 | 10,90 | 18,90 |
| Benzo(b)fluoranteno | 15,20 | 18,67 | 19,89 | 23,89 | 15,89 | 11,77 | 16,45 | 15,44 | 11,44 | 19,44 | 13,30 | 16,63 | 5,64 | 1,74 | 9,74 |
| Benzo(k)fluoranteno | 8,07 | 10,46 | 18,56 | 22,56 | 14,56 | 7,92 | 15,44 | 18,71 | 14,71 | 22,71 | 0,95 | 2,42 | 5,74 | 1,74 | 9,74 |
| Benzo(a)pireno | 9,90 | 9,40 | 11,26 | 13,51 | 9,01 | 2,38 | 4,47 | 4,40 | 3,40 | 5,40 | 5,67 | 7,42 | 9,07 | 7,26 | 10,88 |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 18,70 | 16,74 | 20,53 | 24,64 | 16,42 | 24,99 | 20,71 | 21,52 | 17,46 | 26,18 | 27,04 | 15,83 | 16,77 | 12,77 | 20,77 |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 19,40 | 17,47 | 20,22 | 24,26 | 16,18 | 12,43 | 8,19 | 9,71 | 5,71 | 13,71 | 11,47 | 8,79 | 8,62 | 4,62 | 12,62 |
| Benzo(ghi)pirileno | 22,60 | 17,06 | 21,40 | 27,68 | 17,12 | 7,41 | 8,40 | 8,80 | 4,80 | 12,80 | 9,18 | 7,78 | 7,70 | 3,70 | 11,70 |

3.3. APLICAÇÃO DO MÉTODO DLLME NA AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS AMBIENTAIS

Após a otimização e validação, o método proposto foi aplicado na análise de amostras de água com o objetivo de avaliar o grau de contaminação das amostras por PAHs e nitro-PAHs. No total analisaram-se de 13 amostras: 9 amostras de água subterrânea, 2 de água de rio, 1 de água do mar e 1 de água da chuva. A análise dos PAHs e nitro-PAHs foi realizada nas condições experimentais otimizadas e validadas. Alguns dos resultados obtidos encontram-se na **Tabela 3.8**.

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 3.8**., pode-se constatar que nas amostras de água do rio Douro (A1 e A3), como esperado, a concentração obtida dos compostos 9-nitroantraceno e de 1-nitropireno é bastante similar (valor médio de 28 ng/L), no entanto, na amostra A1 foi encontrada a presença de antraceno e no caso da amostra A3 verificou-se a presença de fluoreno. Na amostra A2 (água do mar) verificou-se a contaminação por fluoreno, fenantreno e 9-nitroantraceno. Relativamente à amostra da água da chuva (A4) também se constatou a presença destes três compostos, no entanto, as concentrações obtidas foram inferiores. Estes resultados não estão de acordo com os estudos reportados no Capítulo 1 (**Tabela 1.2**.). Seria de esperar que as concentrações de PAHs e nitro-PAHs em águas de precipitação fossem mais elevadas comparativamente com a concentração nas águas de superfície (Manoli & Samara, 1999; Manoli et al., 2000). No entanto, isso não se verificou, este facto estará possivelmente relacionado com as condições de precipitação ocorridas no mês em que se procedeu a amostragem. A recolha da amostra A4 ocorreu após vários dias de chuva, o que se traduz numa redução significativa de partículas em suspensão contendo PAHs e nitro-PAHs. No que se refere à concentração de nitro-PAHs em água, a sua concentração é muito reduzida. Existe um estudo que revela uma concentração entre 5.2 e 7.5 ng/L em águas do rio, existe um outro estudo em rios Japoneses, o qual demonstra que a concentração de nitro-PAHs varia entre 22 ng/L a 482 ng/L (Hung et al., 2012; Chondo et al., 2013). Os resultados obtidos para os nitro-PAHs encontram-se coerentes com estes dois estudos, no entanto, é de salvaguardar que a concentração destes compostos em água está dependente de inúmeros fatores pelo que esses resultados não devem ser comparados diretamente.

No que diz respeito à análise de águas subterrâneas, de uma forma geral verificou-se que as águas não estavam contaminadas. Apesar do método conseguir detetar alguns compostos não foi possível quantificar. Este resultado já era esperado, uma vez que as águas subterrâneas sofrem naturalmente fenómenos de filtração a partir das diversas camadas de solo (Manoli & Samara, 1999; Manoli et al., 2000). Este processo é muito importante para a manutenção da qualidade das águas subterrâneas devido à afinidade

entre PAHs e nitro-PAHs com a matéria orgânica característica dos solos. Por este facto os PAHs e os nitro-PAHs podem ser adsorvidos na matéria orgânica.

Segundo o Decreto-Lei nº236/98 de 1 de agosto, o valor máximo admissível de PAHs em águas superficiais destinadas ao consumo humano é de 200 ng/L. Foi também estabelecido que para a qualidade mínima das águas de superfície, a soma da concentração de seis PAHs de referência (Flu; B[b]F; B[k]F; B[a]P; B[g,h,i]P; I[1,2,3-cd]P), não deverá ultrapassar 100 µg/L. De acordo com os resultados obtidos é possível afirmar que todas as amostras estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pelo Decreto-Lei. Por outro lado, segundo o anexo II da diretiva sobre normas de qualidade ambiental (Diretiva 2008/105 / CE), também conhecida como a substâncias prioritárias, os PAHs foram considerados substâncias perigosas prioritárias, sendo colocados como sob vigilância contínua, pois apresentam um risco significativo para o ambiente a nível da União Europeia (UE), numa tentativa de reduzir os riscos de contaminação por este tipo de compostos. Assim são essenciais métodos analíticos como o desenvolvido, de forma a tornar esta monitorização mais fácil e acessível. No entanto, o grau de contaminação por nitro-PAHs não foi possível estabelecer um termo de comparação, uma vez que, como já foi referido, ainda não se encontram valores estabelecidos para estes compostos em águas. Por este motivo, há um elevado interesse na monitorização contínua destes compostos, de forma a verificar e averiguar os seus níveis constantemente, de forma a contruir bases de dados das suas variações quantitativas, quer ao longo do tempo e matrizes. De forma a tentar encontrar algumas correlações com os efeitos observáveis a nível ambiental.

Tabela 3.8. Concentrações obtidas nas amostras de água. (A1-água de rio(1);A2-água do mar; A3-água do rio (2); A4- água da chuva; B1,B2,B3,B4 e B5- água subterrâneas; C1,C2,C3 e C4- águas subterrâneas).

| Compostos | Amostras | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------|-------|------------------|-------|-------|-------|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Concentração (ng/L) | | | | | | | | | | | | | | |
| | Porto | | Serra da Estrela | | | | | Lisboa | | | | | | | |
| LD | LQ | A1 | A2 | A3 | A4 | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | C1 | C2 | C3 | C4 | |
| PAHs | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naftaleno | 1,64 | 5,48 | <LD | <LQ | <LQ | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Acenaftileno | 1,40 | 4,65 | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Acenafteno | 2,73 | 9,10 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Fluoreno | 1,18 | 3,94 | <LD | 11,86 | 11,52 | 11,90 | <LD | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LQ | <LQ | <LQ | <LD |
| Fenantreno | 1,86 | 6,20 | <LD | 18,67 | <LD | 13,70 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Antraceno | 0,62 | 2,08 | 6,67 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Fluoranteno | 2,44 | 8,13 | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Pireno | 1,16 | 3,87 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Benzo(a)antraceno | 1,92 | 6,39 | <LD | <LQ | <LQ | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Criseno | 3,32 | 11,06 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Benzo(b)fluoranteno | 1,65 | 5,50 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ |
| Benzo(k)fluoranteno | 2,04 | 6,80 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Benzo(a)pireno | 2,50 | 8,35 | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 1,93 | 6,42 | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Dibenzo(a,h)antraceno | 2,17 | 7,22 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| Benzo(ghi)pirileno | 3,48 | 11,60 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| nitro-PAHs | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-Nitrofluoreno | 0,82 | 2,75 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| 9-Nitroantraceno | 3,21 | 10,69 | 29,08 | 12,48 | 38,90 | 37,85 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| 3-Nitrofluoranteno | 1,35 | 4,50 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LQ | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| 1-Nitropireno | 3,37 | 11,25 | 23,06 | <LD | 20,31 | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| 7-nitrobenzo(a)antraceno | 1,94 | 6,48 | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |
| 6-Nitrocriseno | 1,73 | 5,77 | <LD | <LQ | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD | <LD |

**CAPÍTULO 4.
CONCLUSÕES**

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a otimização e validação da técnica de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) combinada com determinação por GC/MS para a extração e quantificação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de água ambiental. Comparou-se também a técnica desenvolvida com a técnica SPE, uma vez que esta última é apresentada como umas das técnicas mais utilizadas, atualmente, na extração de PAHs e nitro-PAHs em águas. Por fim, averiguou-se a aplicabilidade da técnica DLLME em amostras de águas reais.

Na otimização do método, verificou-se que as condições ótimas da técnica DLLME foram obtidas utilizando clorofórmio como solvente extrator, acetonitrilo como solvente dispersante com volumes de 60 μ L e de 200 μ L, respetivamente, e com 1000 mg de NaCl.

No estudo da validação do método desenvolvido obtiveram-se excelentes resultados, concluindo que o método é preciso e exato. Neste trabalho o método apresentou uma repetibilidade entre 0,45% a 19,29% e uma precisão intermédia entre 0,381% a 18,96% para os PAHs. No que diz respeito aos nitro-PAHs obtiveram-se intervalos entre 1,24% a 19,54% e 1,57% a 19,62% para a repetibilidade e a precisão intermédia, respetivamente. Para o estudo da exatidão, as %RE variaram entre 70,96% e 119,23% para os PAHs e nitro-PAHs, a %*Bias* nos ensaios intra-dia variaram entre -16,27% e 19,29% e nos ensaios inter-dia variaram entre -13,55% a 19,20% para os PAHs e nitro-PAHs. Para além destes parâmetros constatou-se uma excelente resposta linear para todos os compostos em estudo na gama de 5-150 ng/L para os PAHs e de 10-150 ng/L para os nitro-PAHs, verificando-se coeficientes de correlação entre 0,9996 e 1,000. Os limites de quantificação dos 16 PAHs analisados variaram entre 2,076 ng/L e 11,60 ng/L e para os 6 nitro-PAHs variaram entre 2,746 ng/L a 11,25 ng/L.

Além dos diversos testes de validação, realizaram-se ensaios interlaboratoriais. Estes ensaios permitiram confirmar a exatidão do método e também possibilitou comparar a técnica de DLLME com a técnica de SPE. Verificaram-se respostas idênticas, no entanto, a técnica DLLME é mais vantajosa pelo facto de ser uma técnica mais ecológica, fácil e rápida comparativamente a SPE.

Após validação da técnica de DLLME otimizada, procedeu-se a uma avaliação da contaminação de amostras de águas ambientais. As concentrações das amostras variaram entre 6,67 e 38,90 ng/L, no entanto, nas amostras de água subterrânea foram detetados alguns compostos mas não foi possível quantificar.

Atendendo aos objetivos desta dissertação, os resultados apresentados demonstraram uma elevada aplicabilidade do método de extração desenvolvido. Com esta dissertação foi demonstrado que a determinação de PAHs e nitro-PAHs em amostras de

águas ambientais foi realizada de forma bastante satisfatória recorrendo a uma técnica de DLLME otimizada e validada. Para além disso, esta técnica demonstrou ser inovadora, ecológica, rápida, simples e eficaz, podendo futuramente ser aplicada em análises de rotina no controlo de qualidade de águas.

CAPÍTULO 5.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências Bibliográficas

- Agência Portuguesa Do Ambiente (APA). Plano Nacional de Implementação da Convenção de Estocolmo; 2010. Disponível em: http://www.apambiente.pt/_zdata/LRA/PNIPOP.pdf [acedido em 20 de janeiro de 2014)].
- Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. Sampling precautions for the measurement of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. *Atmospheric Environment*; 2007^a; 41: 4988–4994.
- Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the Marseilles area (South of France): Concentrations and sources. *Science of the Total Environment*; 2007^b; 384: 280–292.
- Almeida C. Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas por microextração em fase líquida associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Universidade Nova de Lisboa; 2010; Cap I.
- Analytical Methods Committee (AMC). Uses (proper and improper) of correlation coefficients. *Analyst*; 1988; 113: 1469-1471.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29/05/2003; 2003.
- Bamford HA, Baker JE. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region. *Atmospheric Environment*; 2003; 37: 2077–2091.
- Barceló D, Ferrer I. Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*; 1999; 18(3): 180-192.
- Berg T, Hjellbrekke AG. Heavy metals and POPs within the ECE region. Supplementary data for 1989±1996 EMEP Co-operative Programme for Monitoring and Evaluation of the Long range Transmission of Air Pollutants in Europe. EMEP/CCC-Report 7/98, O-95038; 1988.
- Brereton RG. *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
- Carapeto C. Poluição das águas: causas e efeitos. Universidade Aberta; 1999; Cap 1.
- Cavalcante RM, Filho NS, Viana RB, Oliveira IR, Nascimento RF, Silveira ER, Freire GS. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais, *Química Nova*; 2007; 30 (3): 560-564.
- Cecinato A. Nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in ambient air in Italy. A brief overview. *Journal of Separation Science*; 2003; 26:402–408.

- Chondo Y, Li Y, Makino F, Tang N, Toriba A, Kameda T, Hayakawaa K. Determination of Selected Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 2013; 61: 1269–1274.
- Ciganek M, Neča J, Machala M, Raszyk J. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives in farm road and barn dust. *Toxicological and Environmental Chemistry*; 1999; 72: 183-194.
- Cochran RE, Dongari N, Jeong H, Beránek J, Haddadi S, Shipp J, Kubátová A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products. *Analytica Chimica Acta*; 2012; 740: 93– 103.
- Coelho E, Ferreira C, Almeida C. Analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons by SPME-GC-FID in environmental and tap waters. *Journal of the Brazilian Chemical Society*; 2008; 19(6): 1084-1097.
- Decreto-Lei nº. 236/98 de 1 de agosto. Disponível em: <http://dre.pt/pdf1s/1998/08/176A00/36763722.pdf> [acedido em 7 de julho de 2014].
- Dickhut R, Gustafson K. Atmospheric washout of polycyclic aromatic hydrocarbons in the southern Chesapeake bay region. *Environmental Science and Technology*; 1995; 29: 1518-1525.
- Dimashki M, Harrad S, Harrison R. Measurements of nitro-PAH in the atmospheres of two cities. *Atmospheric Environment*; 2000; 34: 2459-2469.
- Eljarrat E; Barceló D. Priority lists for persistent organic Pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*; 2003; 22(10): 655-665.
- Environmental Protection Agency (EPA): Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs). Disponível em: <http://www.epa.gov/ppcp/faq.html> [acedido em 20 de janeiro de 2014].
- Feilberg A. Atmospheric Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds with Special Emphasis on Nitro Derivatives. Risø National Laboratory, Roskilde; 2000; Cap. 1.
- Feilberg A, Poulsen M, Nielsen T, Skov H. Occurrence and sources of particulate nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in Denmark. *Atmospheric Environment*; 2001; 35: 353-366.
- Ferreira S, Bruns R, Silva E, Santos W, Quintella C, David J, et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*; 2007; 1158: 2–14.
- Fernandes M, Sicre M, Boireau A, Tronszynski J. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin*; 1997; 34: 857– 867.

- Fu P, Saenz D. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons: A class of genotoxic environmental pollutants. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*; 1999, 17(1): 1-43.
- Fu P, Xia Q, Sun X, Yu H. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*; 2012; 30:1–41.
- García-Alonso S, Barrado-Olmedo A, Pérez-Pastor R. An analytical method to determine selected nitro-pahs in soil samples by HPLC with fluorescence detection. *Polycyclic Aromatic Compounds*; 2012; 32:669– 682.
- Gebara S, Ré-Poppi N, Nascimento A, Junior J. Métodos para análises de HPA e BTEX em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: um estudo de caso em Campo Grande, MS, Brasil. *Química Nova*; 2013; 36(7): 1030-1037.
- Gotz R, Bauer O, Friesel P, Roch K. Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg: Part II. *Chemosphere*; 1998;36: 2103-2118.
- Hartmann C, Massart D, McDowall R. An analysis of the Washington Conference Report on bioanalytical method validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 1994; 12: 1337–1343.
- Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart D, McDowall R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 1998; 17: 193–218.
- Hayakawa K. Chromatographic methods for carcinogenic/mutagenic nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. *Biomedical Chromatography*; 2000; 14: 397–405.
- Herrera-Herrera A, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado M. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trends in Analytical Chemistry*; 2010; 29(7): 728-251.
- Hilaco S. Implementação do Plano de Segurança da Água para consumo humano em Portugal, [Dissertação]. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa;2012.
- Hodgeson J, Bashe W, Baker T. Method 550.1 Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. Environmental monitoring systems laboratory office of research and development U.S. Environmental Protection Agency, Ohio, 45268; 1990.
- Hoff R, Strachan W, Sweet C, Chan C, Shackleton M, Bidleman T, Brice K, Burniston D, Cussion S, Gatz D, Harlin K, Schroeder W. Atmospheric deposition of toxic chemicals to the Great Lakes: a review of data through 1994. *Atmospheric Environment*; 1996; 30: 3505-3527.

- Hung C, Ho H, Lin M, Chen C, Shu Y, Lee M. Purge-assisted headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of trace nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*; 2012; 1265: 1-6.
- Jariyasopit N. *The Atmospheric Chemistry of Particulate-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Concentration, Prediction, Laboratory Studies, and Mutagenicity*. Oregon States University; 2013; Cap.1.
- Jariyasopit N, McIntosh M, Zimmermann K, Arey J, Atkinson R, Cheong P, Carter R, Yu T, Dashwood R, Simonich S. Novel Nitro-PAH Formation from Heterogeneous Reactions of PAHs with NO₂, NO₃/N₂O₅, and OH Radicals: Prediction, Laboratory Studies, and Mutagenicity. *Environmental Science & Technology*; 2014; 48: 412-419.
- Jones KC, Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*; 1999; 100: 209-221.
- Jinhui X, Lee F. Analysis of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons, *Chemosphere*; 2001; 42: 245-250.
- King A, Readman J, Zhou J. The application of solid-phase micro-extraction (SPME) to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Geochemistry and Health*; 2003; 25: 69–75.
- Lee H, Guo L. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*; 2011; 1218: 5040– 5046.
- International Conference on Harmonisation (ICH). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*; 1994.
- Leari R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*; 2009; 652: 161-172.
- Leonga M, Changa C, Fuhb M, Huang S. Low toxic dispersive liquid–liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*; 2010; 1217: 5455–5546.
- Levsen K, Behnert S, Winkeler H. Organic compounds in precipitation, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*; 1991; 340: 665-671.
- Li-bin L, Yan L, Jin-ming L, Ning T, Kazuichi H, Tsuneaki M. Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences*; 2007; 19: 1-11.
- Ligocki M, Leuenberge R, Pankow J. Trace organic compounds in rain-II. Gas scavenging of neutral organic compounds. *Atmospheric Environment*; 1985^a ; 19: 1069-1617.

- Ligocki M, Leuenberger C, Pankow J. Trace organic compounds in rain-III, Particle scavenging of neutral organic compounds. *Atmospheric Environment*; 1985^b; 19: 1619-1626.
- Mackay D, Shiu W, Ma K, Lee S. *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*, 2^o Edition, CRC Press LLC; 2006; 1 : 617-919.
- Maliszewska-Kordybach B. Sources, Concentrations, Fate and Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Environment. Part A: PAHs in Air. *Polish Journal of Environmental Studies*; 1999; 8(3): 131-136.
- Manoli E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chemistry*; 1999; 18(6): 417-428.
- Manoli E, Samara C, Konstantinou I, Albanis T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere*; 2000; 41: 1845-1855.
- Mansilha C, Melo A, Rebelo H, Ferreira I, Pinho O, Domingues V, Pinho C, Gameiro P. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography–tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. *Journal of Chromatography* ; 2010; 1217: 6681-6691.
- Mansilha C, Carvalho A, Guimarães P, Marques J. Water Quality Concerns Due to Forest Fires: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) Contamination of Groundwater From Mountain Areas. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*; 2014; 77:806–815.
- Martinez E, Gros M, Lacorte S, Barceló D. Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A*. 2004; 1047: 181–188.
- Martins M, Primel E, Caldas S, Prestes O, Adaimé M, Zanella R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*; 2012; 4: 35-51.
- Mcgowin A. *Chromatographic Analysis of the Environment: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. 3^o Edition. CRC Press LLC; 2006; Cap.15: 555-616.
- Mcveety B, Hites R. Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons to water surfaces: a mass balance approach. *Atmospheric Environment*; 1988; 22: 511-536.
- Mekiki D, Kalogerakis N, Psillakis E. Application of Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water. *Chromatographia*; 2006; 63: 85-89.
- Miller J, Miller J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5th ed. Pearson Education Limited; 2005.

- Moja S, Mtunzi F. Application of solid phase extraction (SPE) method in determining polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river water samples. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*; 2013; 5: 278-283.
- Moore J, Ramamoorthy S. Organic chemicals in natural waters, Applied monitoring and impact assessment. New York: Springer-Verlag; 1984.
- Moreira JC, Barek J. Analysis of carcinogenic nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon – A review. *Quimica Nova*; 1995;18(4):362-367.
- Mulholland M, Hibbert D. Linearity and the limitations of least squares calibration. *Journal of Chromatography A*; 1997; 762:73-82.
- Olivella M, Ribalta T, Febrer A, Mollet J, Heras F. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after Mediterranean forest fires. *Science of the Total Environment*; 2006; 355:156– 166.
- Pandey S, Kim K, Brown R. A review of techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in air. *Trends in Analytical Chemistry*; 2011; 30(11):1716-1739.
- Pena M, Casais M, Mejuto M, Cela R. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*; 2009; 1216: 6356– 6364.
- Poster D, Schantz M, Sander L, Wise S. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 2006; 386:859–881.
- Qiao M, Qi W, Liu H , Qu J. Oxygenated, nitrated, methyl and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers of Haihe River System, China: Occurrence, possible formation, and source and fate in a water-shortage area. *Science of the Total Environment*;2014; 481 : 178–185.
- Qiao M, Qi W, Liu H , Qu J. Simultaneous determination of typical substituted and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in water and solid matrix by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*; 2013; 1291: 129– 136.
- Reisen F, Arey J. Atmospheric reactions influence seasonal PAH and Nitro-PAH concentrations in the Los Angeles basin. *Environmental Science & Technology*; 2005; 39: 64-73.
- Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*; 2006; 1116: 1–9.
- Rezaee M, Yamini Y , Moradi M, Saleh A, Faraji M, Naeeni M. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction as a sensitive and

- efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples. *The Journal of Supercritical Fluids*; 2010; 55: 161–168.
- Rianawati E, Balasubramanian R. Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater. *Physics and Chemistry of the Earth*; 2009; 34: 857–865.
- Ringuet J, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E, Albinet A. Particle size distribution of nitrated and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (NPAHs and OPAHs) on traffic and suburban sites of a European megacity: Paris (France). *Atmospheric Chemistry and Physics*; 2012; 12: 8877–8887.
- Rodrigues A, Araújo E, Ciccotti L, Souza L, Grillo R, Leite S. Química das águas “Poluentes e Fontes: Orgânicos”, Universidade De São Paulo – Instituto De Química; 2007.
- Sapota G, Wojtasik B, Burska D, Nowiński K. Persistent organic pollutants (POPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from selected fjords, tidal plains and lakes of the North Spitsbergen. *Polish Polar Research*; 2009; 30(1): 59-76.
- Song X, Li J, Liao C, Chen L. Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Combined with Low Solvent Consumption for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seawater by GC–MS. *Chromatographia*; 2011; 74:89–98.
- Sorrell R, Brass H, Reding R. A review of occurrences and treatment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environment International*; 1980; 4: 245– 254.
- Stalikas C, Fiamegos Y, Sakkas V, Albanis T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *Journal of Chromatography A*; 2009; 1216: 175–189.
- Stockholm Convention: Protecting Human Health And The Environment From Persistent Organic Pollutants, What are POPs. Disponível em: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx> [acedido em 20 de janeiro de 2014].
- Tavares J. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente de um túnel rodoviário. Universidade de Aveiro: Departamento de Ambiente e Ordenamento; 2009.
- Tseng W, Huang S, Chen P. Optimization of two different dispersive liquid–liquid microextraction methods followed by gas chromatography–mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. *Talanta*; 2014; 120: 425–432.

- Toledo M, Lanças F, Carrilho E. Solid-phase extraction of nitro-PAH from aquatic samples and its separation by reverse-phase capillary liquid chromatography. *The Journal of Brazilian Chemical Society*; 2007; 18: 1004-1010.
- Valle-Hernández B, Mugica-Álvarez V, Salinas-Talavera E, Amador-Muñoz O, Murillo-Tovar MA, Villalobos-Pietrini R, De Vizcaya-Ruíz A. Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern Mexico City. *Science of the Total Environment*; 2010; 408: 5429–5438 2010.
- Wenzl T, Simon R, Kleiner J, Anklam E. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*; 2006; 25(7): 716-725.
- World Health Organization (WHO). *Environmental Health Criteria 229: Selected nitro- and nitrooxy-polycyclic aromatic hydrocarbons*. 2003.
- Xagorarakis I, Kuo D. *Water Pollution: Emerging Contaminants Associated with Drinking Water*. Michigan State University, Elsevier; 2008; 539-550.
- Yu M. *Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants*. 2^o Edition. CRC Press LLC; 2005; Cap. 11.4: 178-184.
- Zaghden H, Kallel M, Elleuch B, Oudot J, Saliot A. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*; 2007; 105: 70- 89.
- Zgoła-Grzeskowiak A, Grzeskowiak T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*; 2011; 30(9): 1382-1399.
- Zhang Y, Yang B, Gan J, Liu C, Shu X, Shu J. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxyl PAHs) with NO₃ radicals. *Atmospheric Environment*; 2011; 45: 2515-2521.
- Zielinska B, Samy S. Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 2006; 386: 883–890.