

## **AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BENZO[A]PIRENO EM AMOSTRAS DE ÁGUA POR CLAE/FLU COM REDUÇÃO DE SOLVENTES**

### ***EVALUATION OF EXTRACTION METHODS OF BENZO[A]PYRENE IN WATER SAMPLES BY HPLC/FLU WITH REDUCTION OF SOLVENT***

Vinícius Silveira Guimarães, Luan de Souza Ramos, Eduardo João Agnes<sup>1</sup>  
Alan da Silva Felisbino, Patrícia Aguiar de Amaral<sup>2</sup>  
Maria da Glória da Silva Santos<sup>3</sup>

#### **Resumo**

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são um grupo de mais de 100 substâncias químicas diferentes que são formadas durante a queima incompleta do carvão, petróleo e gás, lixo ou outras substâncias orgânicas. Devido ao potencial de toxicidade, especialmente do benzopireno, este está associado com a causa de vários tipos de câncer pela sua capacidade de provocar mutação genética. Analisou-se os métodos de extração (extração em fase líquida e extração em fase sólida) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência em amostras de água contaminadas por benzopireno, além de avaliar se a redução do volume de solvente afeta a eficiência da técnica de Extração Líquido-Líquido (ELL). Os resultados mostraram uma boa resposta em ambos os métodos, porém a ELL é apropriada para amostras com maiores concentrações de material particulado, e nesta, mesmo reduzindo pela metade a quantidade de solvente empregado, não foi observado alteração significativa no resultado.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, Extração em fase líquida, Extração em fase sólida.

#### **Abstract**

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of over 100 different chemicals that are formed during the incomplete burning of coal, oil and gas, garbage or other organic substances. Due the toxicity potential, especially of the benzo[a]pyrene, this is associated with the cause of the several cancers by its ability to cause gene mutation. Analyzed the extraction methods (liquid phase extraction and solid phase extraction) using high performance chromatography with fluorescence in water samples contaminated for benzo[a]pyrene, and to evaluate if the reduction of the volume of solvent affects the efficiency of the technique of Liquid-Liquid Extraction (LLE). The results showed a good answer for both methods, but the ELL is suitable for samples with higher concentrations of particulate matter, and that, even halving the amount of solvent used, there was no significant change in result.

**Keywords:** Polycyclic aromatic hydrocarbons, Extraction liquid phase, Extraction solid phase.

---

<sup>1</sup> Curso de Farmácia, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Av. Universitária, 1105 - Bairro Universitário C.P. 3167, 88806-000 Criciúma – SC.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Laboratório de Plantas Medicinais (LaPlaM). Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), e-mail: [amaral@unesc.net](mailto:amaral@unesc.net)

<sup>3</sup> Instituto de Pesquisas Ambientais Tecnológicas (IPAT/UNESC) – Rodovia Gov. Jorge Lacerda 1, Km 4,5 - Sangão - Criciúma/SC.

## INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) constituem uma família de compostos orgânicos, representados unicamente por carbono e hidrogênio com estrutura aromática, que possuem dois ou mais anéis condensados, sendo ligados pelo compartilhamento de um par de carbonos adjacentes (NETTO et al., 2000).

As fontes mais importantes geradoras de HPA's são divididas em dois grupos, os de origem antropogênica que são formados pela queima de carvão, gás natural, derivados de petróleo entre outras e os de origem natural derivados da diagênese de precursores naturais, atividades magmáticas em fundo oceânico, erosão de sedimentos continentais e combustão espontânea da biomassa (PEREIRA et al., 2005). Na região de Criciúma ao sul do estado de Santa Catarina, onde ocorre intensa mineração do carvão, pode-se observar através de testes cinéticos a presença de todos os 16 HPA's em elevadas concentrações nos extratos de carvão (LATTUADA et al., 2009).

Os HPAs, na sua maioria, apresentam elevado ponto de fusão e ebulição. São substâncias químicas hidrofóbicas e sólidas à temperatura ambiente, sendo que com o aumento de seu peso molecular sua volatilidade diminui. Possuem a capacidade de se solubilizar em solventes orgânicos e limitada solubilidade em água. Isso faz com que no meio ambiente os HPA's tenham afinidade por material particulado, como: no ar e no solo, adsorvidos por partículas atmosféricas e terrestres; na água, se depositam nos sedimentos. Os HPA's também podem estar presentes nos alimentos, se depositando em grãos, vegetais e frutas, em carnes assadas na brasa, alimentos defumados e em óleos e gorduras (READMAN et al., 2002a; 2002b; 1999c).

De acordo com estudo realizado pela CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2009) os postos de combustíveis destacam-se com 2.279 registros (79% do total), como responsáveis pelas áreas contaminadas, gerando assim um grande impacto ambiental com a contaminação do subsolo e águas subterrâneas com estes hidrocarbonetos, visto que os HPA's estão em maior concentração no óleo diesel (CETESB, 2009).

O benzo[a]pireno (B[a]P) é classificado como agente carcinogênico para humanos (grupo 1 da IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer). Esse potencial toxicológico atribuído aos HPA's está relacionado às suas estruturas. O mecanismo de biotransformação do B[a]P está bem esclarecido, neste caso quando o

HPA entra no organismo ele sofre reações metabólicas para torná-lo polar podendo assim ser eliminado por via urinária. Porém durante esse processo ocorre a formação de estruturas nucleofílicas capazes de unir-se ao DNA formando adutos de DNA e posteriormente induzindo a célula a erros de reparação, levando a mutações e ao desenvolvimento de tumores (YILMAZER et al., 2006a; 2006b).

No Brasil, o Ministério da Saúde com a portaria n° 518, de 25 de março de 2004, estipula o padrão de potabilidade da água para consumo humano, com o valor máximo aceitável de B[a]P 0,7 µg/L. Já o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) emprega através da resolução n° 357, de 17 de março de 2005<sup>22</sup>, que o valor máximo aceitável de B[a]P em águas superficiais classe 1 seja de 0,05µg/L. Este mesmo valor também é estipulado para águas subterrâneas através da resolução n° 396, de 3 de abril de 2008 do CONAMA (2008).

Para o controle dos HPA's no meio ambiente são utilizadas diversas técnicas, entre elas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, segundo método 8310 da US-EPA (1986). Já para a concentração e purificação das amostras, normalmente emprega-se a técnica extração líquido-líquido (MARTINEZ et al., 2004) indicada para HPA's totais e a extração em fase sólida (US-EPA, 1996) para HPA's dissolvidos na amostra.

Extração líquido-líquido (ELL) é uma técnica muito utilizada na retirada de HPA's em amostras com alta concentração de sólidos, por não precisar do processo de filtração e possível remoção dos HPA's adsorvidos ao material particulado. No entanto, possui algumas desvantagens como: impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que resulta em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; além da possibilidade de adsorção dos analitos na vidraria (QUEIROZ et al., 2001).

Contudo, a extração em fase sólida (EFS) consiste na passagem da amostra por uma micro-coluna (cartucho) constituída por um sorvente apropriado para a retenção de determinado analito. A eluição (dessorção) deste é realizada por pequenos volumes de solventes apropriados. Essa técnica apresenta vantagens, como: diminuição de tempo de extração das amostras; automação do sistema permitindo que várias amostras sejam

extraídas simultaneamente; diminuição de uso de solventes e não forma emulsão. Entretanto, o custo da técnica pode torná-la menos viável (NETO et al., 2003).

Para verificar o desempenho de um método analítico é fundamental a avaliação dos dados amostrais, tais como, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e linearidade (ANVISA, 2003). Neste estudo analisamos o desempenho das técnicas de extração Líquido-Líquido e Sólido-Líquido do composto benzo(a)pireno B[a]P, em amostras de água, afim de comparar a performance dessas metodologias, bem como, avaliar se a redução do volume de solvente afeta a eficiência da técnica de ELL.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os solventes empregados nos processos de extração foram: metanol grau CLAE (J.T. Baker-USA), diclorometano (DCM) grau CLAE (J.T. Baker-USA) e água deionizada. Para a extração em fase sólida foi usado o cartucho Strata™ C18-E 500 mg/3mL da Phenomenex®. Para análise das amostras foi empregado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (GBC®), acoplado ao *software* WinChrom versão 1.0.

### **Extração em fase sólida (EFS)**

Para o procedimento de extração utilizando o cartucho strata™ C18-E foi realizada uma adaptação do método descrito por Martinez (2004), sendo trocado o acetato de etila por diclorometano e o condicionamento do cartucho feito com metanol e água.

O cartucho foi conectado a um sistema de extração (manifold) marca Varian®, ligado a uma bomba de vácuo onde foram utilizados 500 mL da amostra, sendo que o cartucho foi previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5mL de água deionizada a um fluxo de 1mL/min. A passagem da amostra através do cartucho foi de 6-7 mL/min, seguido de uma secagem a vácuo e eluição do benzo[a]pireno com 5 mL de diclorometano a um fluxo de 1ml/min. O extrato foi evaporado em rota vapor, reconstituído a 1 mL de diclorometano e transferido a um frasco para análise cromatográfica.

### **Extração líquido-líquido (ELL)**

Foram realizados dois processos de extração em fase líquida, sendo que foram feitas adaptações do método da US-EPA (1996). A extração ocorreu adicionando-se 500 mL da amostra em funil de separação seguido da adição de 60 mL de diclorometano e agitou-se por 2 minutos. Aguardou-se 10 minutos para decantar, e recolheu-se a fase orgânica em erlenmeyer, repetiu-se o processo mais duas vezes. Evaporou-se o solvente utilizando rota vapor e avolumou-se para 1 mL com diclorometano.

O segundo processo foi realizado conforme o anterior, porém com uma redução na metade do volume de diclorometano, ao invés de 60 mL foram utilizados 30 mL por extração.

### **Método de análise por CLAE/FLU**

Para quantificação do benzo[a]pireno e conseqüentemente avaliação do desempenho dos métodos de extração foi empregado o método 8310 da US-EPA (1986), adaptado conforme as seguintes condições: a fase móvel foi constituída por uma eluição isocrática de 100% metanol, a um fluxo de 0,7 mL/min por 20 minutos, a temperatura ambiente. O volume injetado foi de 20 µL e o detector de fluorescência foi ajustado no comprimento de onda de excitação em 260 nm e emissão 420 nm.

### **Avaliação dos dados analíticos**

Para a avaliação do desempenho dos métodos de extração foi realizada, mediante experimentos, a verificação da seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, e a linearidade dos mesmos (MARTINEZ et al., 2004).

**Seletividade:** a forma de avaliar a seletividade foi comparando uma amostra real de água subterrânea sem o composto de interesse e a matriz adicionada com essa substância, ou seja, foram realizadas extrações da amostra de água subterrânea isenta do benzo[a]pireno e amostra fortificada com uma solução mãe de 10 mg.L<sup>-1</sup>, obtendo uma concentração de 0,02 ug.L<sup>-1</sup>.

**Precisão e exatidão do método:** a exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação, o qual consistiu na fortificação da água deionizada com 0,02 ug/L de benzo[a]pireno, já a precisão foi determinada por medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições. Para o cálculo da recuperação foi utilizada a fórmula: Rec (%) =

(valor obtido/valor real)x100 e para a precisão foi calculado o coeficiente de variação (CV).

**Limites de Quantificação e Detecção:** o limite de detecção e quantificação foram determinados baseando-se em dados da curva analítica, onde foram usadas as fórmulas:  $LOD = 3,3 \times s/S$  e  $LOQ = 10 \times s/S$  (ANVISA, 2003).

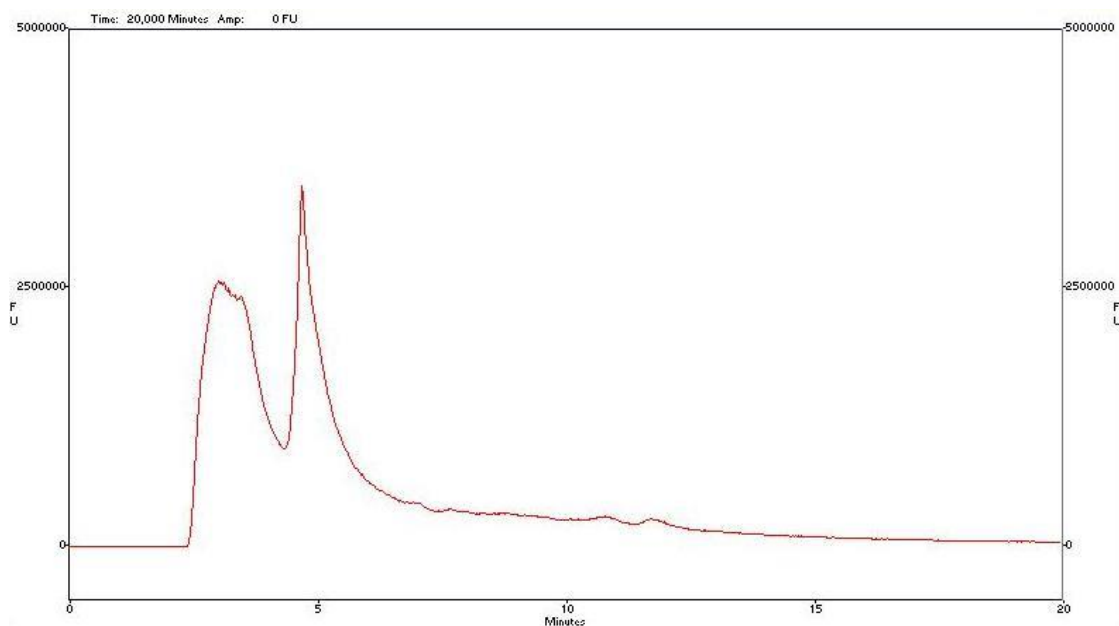
**Linearidade:** a linearidade do método foi determinada por regressão de “área do pico cromatográfico *versus* concentração do composto” por injeção direta dos padrões. Foram preparados cinco níveis de concentrações a partir de uma solução mãe de 10 mg L<sup>-1</sup>, obtendo-se: 10, 20, 50, 75, 100 µg/L.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

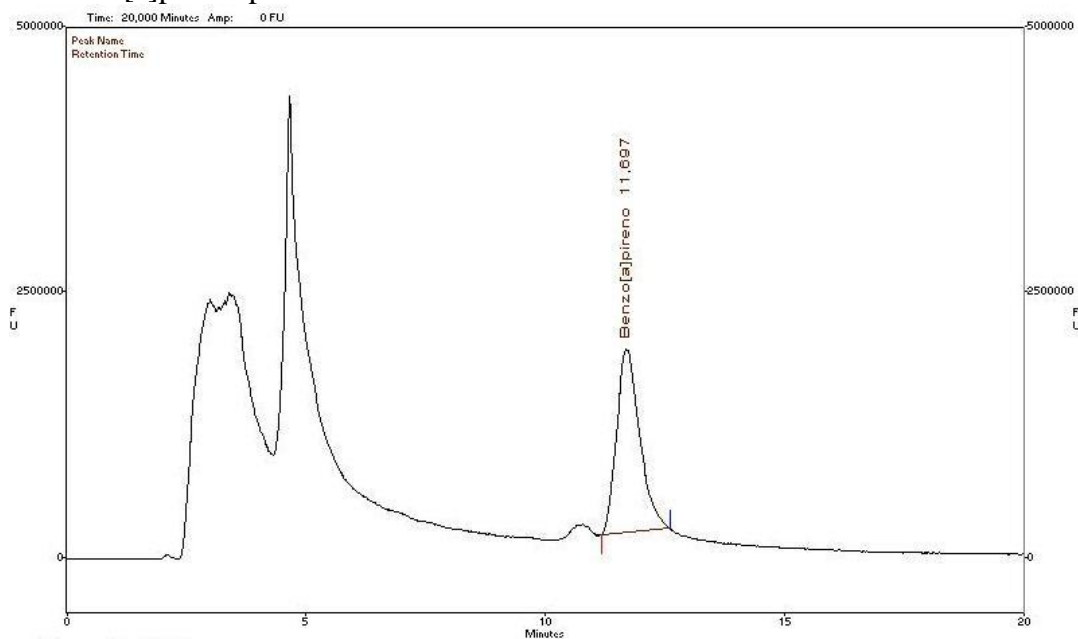
### Seletividade

A Figura 1 mostra o perfil cromatográfico de água subterrânea isenta do benzo[a]pireno, não apresentando nenhum sinal no tempo de retenção do composto. Já na amostra fortificada (Figura 2) observou-se um pico isolado com tempo de retenção de aproximadamente 12 minutos, pertencente ao composto benzo[a]pireno. Sendo assim, foi assegurada a seletividade do método e ausência de interferentes.

**Figura 1:** Cromatograma da amostra de água subterrânea isenta de benzo[a]pireno CLAE/FLU.



**Figura 2:** Cromatograma da amostra de água subterrânea fortificada com a solução mãe de benzo[a]pireno por CLAE/FLU.



### Exatidão e precisão dos métodos de extração

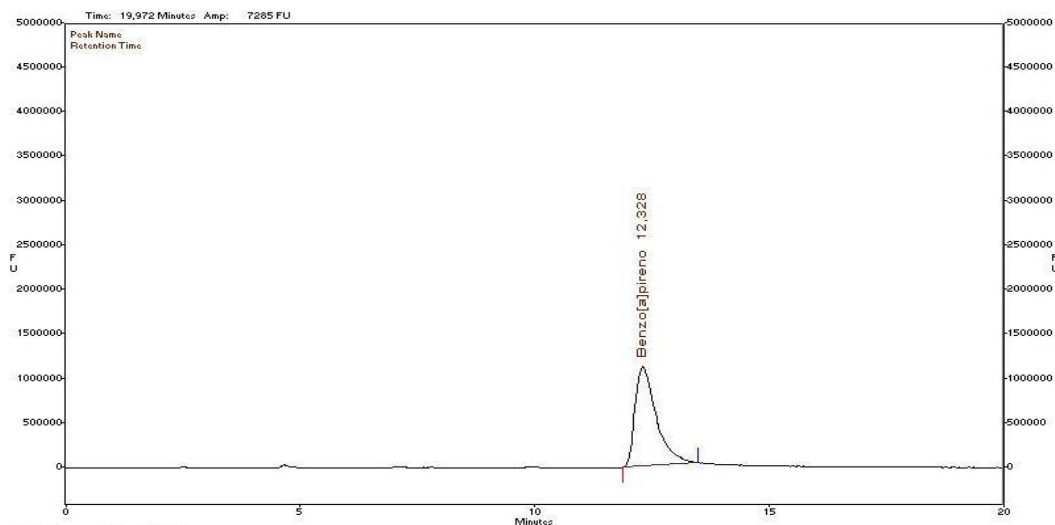
Na Tabela 1, pode-se observar que as técnicas de extração tiveram uma boa exatidão e precisão, apresentando uma recuperação entre 70 – 120% e coeficiente de variação (CV%) menor que 20%, estando assim de acordo com o que é exigido para esses parâmetros (MARTINEZ et al., 2004).

**Tabela 1:** Concentração média, recuperação percentual e coeficiente de variação dos diferentes métodos de extração.

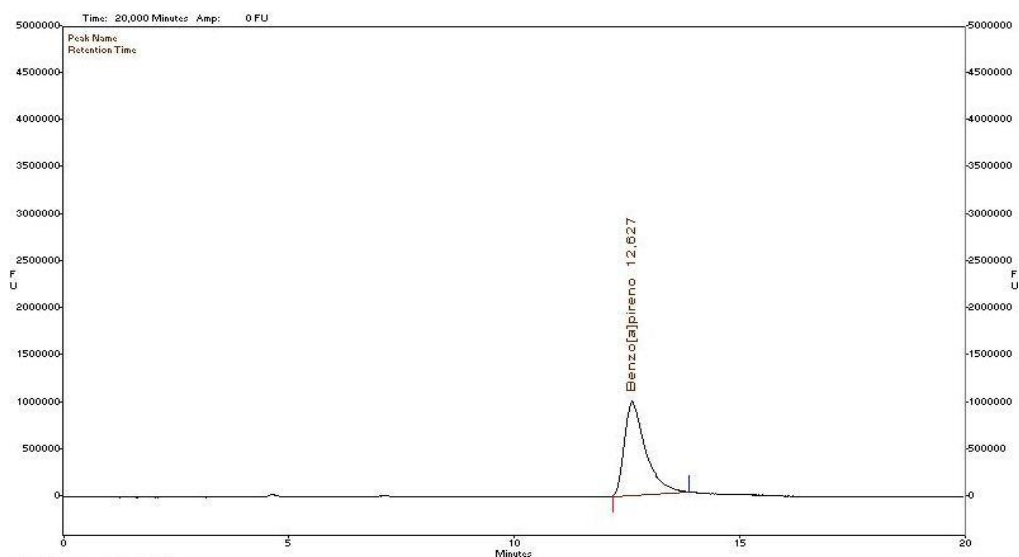
Método de Extração	Concentração Média (µg/L)	Recuperação média (%)	CV (%)
ELL 60 mL DCM	9,20	95,1	0,76
ELL 30 mL DCM	9,26	95,6	1,15
EFS Strata C18-E	9,69	99,6	0,72

A Figura 3 apresenta um cromatograma de uma solução padrão fortificada, portanto com concentração conhecida. Já na Figura 4, pode-se observar que após extração realizada por fase sólida, não há perda do analito após o processo, confirmando a eficiência do método de extração.

**Figura 3:** Cromatograma do padrão de benzo[a]pireno 10µg/L por CLAE/FLU.



**Figura 4:** Cromatograma da amostra de água deionizada fortificada, utilizando a técnica de extração em fase sólida (EFS), por CLAE/FLU.



A análise da precisão instrumental foi realizada injetando três vezes consecutivamente cada amostra, sendo que cada método de extração foi feito em triplicata, como se observa na tabela 2. Obteve-se assim uma pequena variação entre cada injeção, estando portando dentro dos padrões estabelecidos por Bottoli et al (2004) que devem apresentar um coeficiente de variação (CV%) de no máximo 20%.



**Tabela 2:** Precisão instrumental para o benzo[a]pireno pelos métodos de extração.

Método de extração	Tempo de retenção (min)		Área	
	Média	CV (%)	Média	CV(%)
ELL 60 mL DCM	12,494	0,06	6190269	0,09
ELL 30 mL DCM	12,421	0,16	6199048	0,27
EFS Strata C18-E	12,406	0,75	6497919	0,06

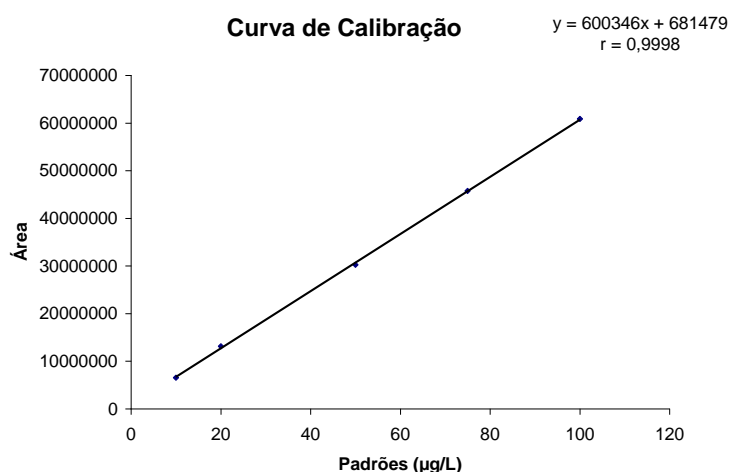
### Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LOQ) e o Limite de detecção (LOD) foram determinados a partir dos dados da curva analítica, onde os valores encontrados foram de 4,9 µg/L e 1,6 µg/L, respectivamente.

### Linearidade

A linearidade do método (Figura 5) foi determinada por regressão de área *versus* concentração do composto por injeção direta dos padrões. O coeficiente de correlação (r) indicou uma relação linear entre a concentração e o sinal obtido. Dessa forma, observou-se que este está dentro dos padrões recomendados pela ANVISA (2003) que deve ser  $r > 0,99$ .

**Figura 5:** Curva de calibração de benzo[a]pireno em CLAE/FLU.



Foi possível observar que todas as técnicas tiveram boa recuperação média, apresentando um alto desempenho para a extração do benzo[a]pireno. Visto isso, vale

ressaltar que cada técnica pode ser aplicada em momentos diferentes, como é o caso da ELL, que é a melhor opção para uma amostra que possua grande quantidade de material em suspensão. Isso se justifica por não precisar fazer o processo de filtração da amostra, o poderia ocasionar perda de HPA's que estiverem adsorvidos no material particulado.

Entre as duas técnicas de extração líquido-líquido (ELL) empregadas no trabalho, ambas apresentaram desempenhos semelhantes, não tendo, assim, diferença significativa entre os resultados encontrados na recuperação média. Frente a isso, fica evidente que mesmo reduzindo pela metade a quantidade empregada do solvente, o método continuou sendo eficiente para a extração do benzo[a]pireno. Além da vantagem na redução dos resíduos gerados pelo processo de extração, houve diminuição da quantidade de solvente empregado e principalmente dos custos envolvidos para a aquisição e descarte apropriado do solvente.

## **CONCLUSÃO**

Foi possível concluir que as técnicas de extração (líquido-líquido e sólido-líquido) tiveram boa recuperação em relação ao benzo[a]pireno. Assim observou-se que a extração líquido-líquido mesmo reduzindo pela metade a quantidade de solvente empregado na técnica não alterou significativamente seu resultado. Porém como se trata da análise de um composto de grande potencial mutagênico e carcinogênico, e que as legislações empregam valores muito pequenos para sua quantificação, é de extrema importância a escolha do melhor método de extração para que não ocorra perda do analito e um resultado falso para o mesmo. Assim tanto a ELL quanto a EFS são técnicas excelentes para a extração do benzo[a]pireno e a escolha desses métodos depende da forma como se encontrar a amostra de interesse.

## **REFERÊNCIAS**

ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: 05 setembro 2012.

BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Quim. Nova, 2004. p. 27, 771.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Disponível: < [http://www.agrolab.com.br/portaria%20518\\_04.pdf](http://www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf)>. Acesso em: 05 setembro 2012.

CETESB, 2009. O gerenciamento de áreas contaminadas no estado de São Paulo: cadastro de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo. Disponível: [http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas\\_contaminadas/texto\\_areas\\_cont\\_nov\\_09\\_.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_09_.pdf). Acesso em: 05 setembro 2012.

CONAMA. Resolução CONAMA nº 396, de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Disponível: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>. Acesso em: 05 setembro 2012.

EPA. Method 3510C: thod3 510C:funnel liquid-liquid extraction, 1996. Disponível: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3510c.pdf>. Acesso em: 05 setembro 2012.

EPA. Method 8310: polynuclear aromatic hydrocarbons, 1986. Disponível: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8310.pdf>. Acesso em: 05 setembro 2012.

IARC, 2012. Agents Classified the IARC Monographs, Volumes 1-105. Disponível: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>. Acesso em: 05 setembro 2012.

LATTUADA, R. M.; MENEZES, C. T. B.; PAVEI, P. T. Estudos de Sedimentos Aquáticos Contaminados por Metais Pesados e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oriundos da Mineração de Carvão. MILIOLI, G; SANTOS, R.; CITADINI-ZANETTE, V., EDS (ORG.). Mineração de carvão, meio ambiente e desenvolvimento sustentável no sul de Santa Catarina. Curitiba, 2009.

MARTINEZ, E.; GROS, M.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. J. Chromatogr., A., 2004. p. 1047, 181.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

NETTO, A. D.; DIAS, A. E. X. O.; MOREIRA, J. C.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Quim. Nova, 2000. p. 23, 773.

PERERA, F. P.; TANG, D.; RAUH, V.; LESTER, K.; TSAI, W. Y.; TU, Y. H.; WEISS, L.; HOEPER, L.; KING, J.; PRIORE, G.; LEDERMAN, S. A. Environ. Health Perspectives, 2005. p. 113, 1062.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 24, p. 68-76, 2001.

READMAN, J. W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J. P.; CATINNI, C.; MEE, L.D. *Mar. Pollut. Bull*, 2002. p. 44, 62. SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. *Trends Biotechnol*, 2002. p. 20, 248. PHILLIPS, D.H. *Mutat. Res*, 1999. p. 443, 147.

YILMAZER, M.; ADA, A. O.; SUZEN, S.; DEMIROGLU, C.; DEMIRBAG, A. E.; EFE, S.; ALEMDAR, Y.; ISCAN, M.; BURGAZ, S. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 2006. p.76, 559. KATO, M.; LOOMIS, D., BROOKS, L. M.; GATTAS, G. F. J.; GOMES, L.; CARVALHO, A. B.; REGO, M. A. V.; DE MARINI, D. M. *Cancer Epidemiological Biomarkers Prevention*, 2004. p. 13, 1005. REYNAUD, S.; DESCHAUX, P. *Aquat. Toxicol*, 2006. p. 77, 229.