

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Milena Pendeza de Avila

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS
FIXOS E VOLÁTEIS EM MATRIZES ASFÁLTICAS EMPREGANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Santa Maria, RS
2021

Milena Pendeza de Avila

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS FIXOS E
VOLÁTEIS EM MATRIZES ASFÁLTICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS
2021

Avila, Milena
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS
FIXOS E VOLÁTEIS EM MATRIZES ASFÁLTICAS EMPREGANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) / Milena
Avila.- 2021.
86 p.; 30 cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho
Coorientador: Paulo Cícero do Nascimento
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2021

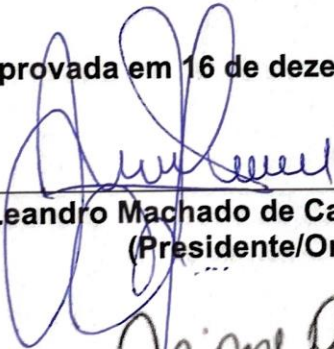
1. Asfalto 2. Material Particulado 3. Cromatografia
Líquida de Alta Eficiência 4. NHPAs I. Machado de
Carvalho, Leandro II. Cícero do Nascimento, Paulo III.
Título.

Milena Pendeza de Avila

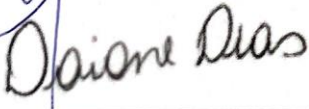
**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS
FIXOS E VOLÁTEIS EM MATRIZES ASFÁLTICAS EMPREGANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovada em 16 de dezembro de 2021:



Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Daiane Dias, Dr. (FURG)



Simone NoreMBERG Kunz, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2021

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Marta e Roger
E meus avós, Anna, Jorge e Lorena*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar em todos os passos e tornar mais leve a caminhada;

Também aos meus pais Marta e Roger, meus avós Anna, Jorge e Lorena e meu namorado Cristian, que acreditaram e ainda acreditam incondicionalmente nos meus sonhos e não medem esforços para torná-los reais;

Ao meu orientador, professor Leandro Carvalho por me ensinar pacientemente o que é a pesquisa e guiar meu desenvolvimento como cientista, me permitindo buscar, experimentar e argumentar;

Ao professor Paulo Nascimento pelas aulas inspiradoras, que me fizeram querer aprofundar o conhecimento na área da Química Analítica;

A todos os colegas do LACHEM, em especial aos meus amigos Cristina Trindade, Gabriel Reis e Maiara Maziero por me acolherem e impulsionarem nessa jornada profissional e ao Luís Ferraz, pela disposição e prontidão em compartilhar conhecimento e facilitar o meu desenvolvimento científico;

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Química pela possibilidade do curso de mestrado;

Também a Petrobrás, pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES pela bolsa concedida;

Agradeço ainda a Universidade Federal do Ceará, em especial ao Departamento de Engenharia de Transportes e a professora Verônica Castello-Branco pelas amostras concedidas e;

Por fim, agradeço a banca avaliadora composta pelas professoras Daiane Dias e Simone Noremberg Kunz por terem aceitado o convite e por contribuir no meu processo de aprendizagem.

“A principal meta da educação é criar homens que sejam capazes de fazer coisas novas, não simplesmente repetir o que outras gerações já fizeram. Homens que sejam criadores, inventores, descobridores. A segunda meta da educação é formar mentes que estejam em condições de criticar, verificar e não aceitar tudo que a eles se propõe.”

Jean Piaget

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS FIXOS E VOLÁTEIS EM MATRIZES ASFÁLTICAS EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

AUTORA: Milena Pendeza de Avila
ORIENTADOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

O cimento asfáltico de petróleo é a principal fonte de cimento asfáltico da atualidade. O manuseio e aplicação do ligante no pavimento só é possível com o uso de altas temperaturas, o que faz com que a matriz sofra um processo de envelhecimento através da volatilização de compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados, à exemplo dos compostos nitrogenados (NHPAs). Esse processo resulta, ainda, em emissões danosas à saúde humana e ao meio ambiente. Pelo exposto, o presente trabalho investigou a presença de 16 NHPAs (1) na forma volátil da matriz através da análise de 21 amostras de material particulado (MP) emitido pelo processo de usinagem de misturas asfálticas de uma refinaria do Ceará; e (2) na forma fixa da matriz através da análise de 3 ligantes oriundos de refinarias distintas. Utilizou-se para isso a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD). Foram desenvolvidos e validados dois métodos cromatográficos a fim de possibilitar a separação e identificação dos compostos de interesse, um deles baseado no mecanismo de fase reversa e o outro de par iônico. Ambos os métodos apresentaram boa linearidade com faixa linear ampla para os compostos estudados (variando entre 0,1 a 400 mg. L⁻¹ para a acridina e 12 a 600 mg. L⁻¹ para o 9-fenilcarbazol, por exemplo) e bons limites de detecção e quantificação, demonstrando a elevada sensibilidade dos métodos propostos. Ainda, a precisão e exatidão obtidas foram consideradas aceitáveis para a análise de matrizes dessa natureza. A fim de possibilitar a análise cromatográfica, o MP coletado por meio de amostragem ativa foi extraído em diclorometano, concentrado e ressuspensionado em acetonitrila. Já no caso das amostras do ligante, obteve-se a fração asfáltica por meio da precipitação em solvente apolar, conforme o método SARA, que foi ainda separada em frações ácidas, básicas e neutras. Essas frações passaram por um processo de limpeza que utilizou extração em fase sólida em cartuchos de aminopropil como ferramenta analítica. A análise de todas as amostras por HPLC-DAD foi realizada utilizando o método de fase reversa. Os resultados obtidos constataram a presença de N,N-dimetilanilina (ANL), 1-nitronaftaleno (1NN) e 1-nitropireno (1NP) nas amostras de MP, que foram posteriormente confirmados por APPI-MS/MS. A ANL não pode ser quantificada, no entanto 1NN foi encontrado na matriz em concentrações que variaram de 0,08 a 28,83 µg e o 1NP em concentrações que variaram entre 0,83 e 14,41 µg. Já nas amostras do ligante, o composto 1NN foi encontrado na fração ácida de uma das amostras investigadas em uma concentração de 350 mg. kg⁻¹. Os resultados obtidos exibem a dinâmica dos compostos entre as frações fixas e voláteis, a exemplo do 1NN, que foi encontrado na forma fixa do ligante e nas emissões provenientes do mesmo, demonstrando efetividade do presente trabalho para aquilo que se propõe, ou seja, identificar e quantificar os compostos nitrogenados nas diversas formas da matriz.

Palavras-chave: Asfalto, Material Particulado, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, NHPAs.

ABSTRACT

DETERMINATION OF FIXED AND VOLATILE NITROGEN AROMATIC COMPOUNDS IN ASPHALT MATRIX USING HIGH EFFICIENCY LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

AUTHOR: Milena Pendeza de Avila
ADVISOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Petroleum asphalt cement is the main source of asphalt cement today. The handling and application of the binder on the pavement is only possible with the use of high temperatures, which causes the matrix to undergo an aging process through the volatilization of compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives, such as nitrogen compounds (NHPAs). This process also results in harmful emissions to human health and the environment. Therefore, the present work investigated the presence of 16 NHPAs (1) in the volatile form of the matrix through the analysis of 21 samples of particulate matter (PM) emitted by the machining process of asphalt mixtures from a refinery in Ceará; and (2) in the fixed form of the matrix through the analysis of 3 binders from different refineries. For this purpose, high performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection (HPLC-DAD) was used. Two chromatographic methods were developed and validated in order to enable the separation and identification of the compounds of interest, one based on the reversed-phase mechanism and the other based on the ion-pair mechanism. Both methods showed good linearity with a wide linear range for the compounds studied (ranging from 0.1 to 400 mg. L⁻¹ for acridine and 12 to 600 mg. L⁻¹ for 9-phenylcarbazole, for example) and good limits of detection and quantification, demonstrating the high sensitivity of the proposed methods. Furthermore, the precision and accuracy obtained were considered acceptable for the analysis of matrices of this nature. In order to allow the chromatographic analysis, the PM collected by means of active sampling was extracted in dichloromethane, concentrated and resuspended in acetonitrile. In the case of the binder samples, the asphaltenic fraction was obtained through precipitation in apolar solvent, according to the SARA method, which was further separated into acidic, basic and neutral fractions. These fractions underwent a cleaning process that used solid phase extraction in aminopropyl cartridges as an analytical tool. Analysis of all samples by HPLC-DAD was performed using the reversed-phase method. The results obtained confirmed the presence of N,N-dimethylaniline (ANL), 1-nitronaphthalene (1NN) and 1-nitropyrene (1NP) in the PM samples, which were later confirmed by APPI-MS/MS. ANL cannot be quantified, however 1NN was found in the matrix in concentrations ranging from 0.08 to 28.83 µg and 1NP in concentrations ranging from 0.83 to 14.41 µg. In the ligand samples, the 1NN compound was found in the acid fraction of one of the investigated samples at a concentration of 350 mg. kg⁻¹. The results obtained show the dynamics of the compounds between the fixed and volatile fractions, such as 1NN, which was found in the fixed form of the ligand and in the emissions from it, demonstrating the effectiveness of the present work for what is proposed, that is, identify and quantify the nitrogen compounds in the different forms of the matrix.

Key words: Asphalt, Particulate Matter, High Performance Liquid Chromatography, NHPAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura hipotética de uma molécula de asfalto baseada na análise de uma amostra certificada oriunda da California Coastal (AAD-1) pelo Strategic Highway Research Program (SHRP).....	21
Figura 2 – Esquema de CAP apresentando comportamento de (a) ligante Sol e (b) ligante Gel.....	23
Figura 3 – Modelo de estrutura do CAP proposto pelo SHRP.....	24
Figura 4 – Fluxograma do fracionamento químico do CAP pelo de método SARA.....	25
Figura 5 – Processo de separação pelo método proposto por Green e colaboradores (1984)	26
Figura 6 – Esquema de diferenciação entre emissões, fumos e fração aerossolizada do CAP.....	29
Figura 7 – Esquema de exposição por inalação e distribuição do MP nas vias aéreas.....	32
Figura 8 – Diferença na interação do par de elétrons livres do nitrogênio com o sistema π aromático do núcleo pirrólico e do núcleo piridínico.....	35
Figura 9 – Proposta de mecanismo de formação do composto 2-nitropireno a partir de seu precursor pireno.....	36
Figura 10 – Esquema de separação pelo mecanismo de par iônico.....	42
Figura 11 – Preparo das amostras de MP para determinação de compostos nitrogenados.....	46
Figura 12 – Preparo das amostras de CAP para determinação de compostos nitrogenados.....	48
Figura 13 – Comparativo da interação soluto-fase estacionária entre uma coluna polimérica e uma coluna monomérica.....	51
Figura 14 – Melhor separação obtida para os NHPAs na concentração de 2 mg.L ⁻¹ em experimento preliminar. Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 40% B, fluxo 1mL/min., temperatura 25 °C.....	52
Figura 15 – Melhor separação obtida para os NHPAs na concentração de 2 mg.L ⁻¹ . Condições: fase reversa, eluição gradiente, fase móvel 0-15 minutos 40% B e 15-45 minutos 70% B, fluxo 1mL/min., temperatura 25 °C.	53
Figura 16 – Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na concentração de 2 mg.L ⁻¹ quando testadas diferentes concentrações de H ₃ PO ₄ (A). Condições: fase reversa, eluição gradiente, fase móvel 0-15 minutos 40% B e 15-45 minutos 70% B, fluxo 1mL/min., temperatura 25 °C, 245 nm.....	54
Figura 17 – Cromatograma de separação dos 16 compostos nitrogenados usando o método em fase reversa otimizado. Compostos: (1) 5-hidroxi-indol-3-ácido acético; (2) quinolina; (3) N,N-dimetilanilina; (4) acridina; (5) 2-metilindol; (6) 3-metilindol; (7) fenazina; (8) fenantridina; (9) 1-nitronaftaleno; (10) carbazol; (11) benzo[h]quinolina; (12) 2-fenilindol; (13) 2-nitrofluoreno; (14) 9-nitroantraceno; (15) 1-nitropireno; (16) 9-fenilcarbazol. Fase móvel: 0,5 mM H ₃ PO ₄ e ANC. Gradiente de eluição e fluxo: descritos na tabela 2. Detecção UV: 245 nm. Temperatura da coluna: 30 °C.....	55
Figura 18 – Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na	

concentração de 2 mg.L ⁻¹ quando testadas diferentes concentrações de SOS como aditivo de B. Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 50% B, 50% A (0,5 mM H ₃ PO ₄), fluxo 0,5mL/min., temperatura 25 °C, 245 nm.....	57
Figura 19 – Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na concentração de 2 mg.L ⁻¹ quando testadas diferentes concentrações de H ₃ PO ₄ (A). Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 50% B (2 mM SOS em ACN), fluxo 0,5mL/min., temperatura 25 °C, 245 nm.....	57
Figura 20 - Cromatograma de separação dos 16 compostos nitrogenados usando o método de pareamento iônico otimizado. Compostos: (1) 5-hidroxi-indol-3-ácido acético; (2) quinolina; (3) N,N-dimetilanilina; (4) acridina; (5) 2-metilindol; (6) 3-metilindol; (7) fenazina; (8) fenantridina; (9) 1-nitronaftaleno; (10) carbazol; (11) benzo[h]quinolina; (12) 2-fenilindol; (13) 2-nitrofluoreno; (14) 9-nitroantraceno; (15) 1-nitropireno; (16) 9-fenilcarbazol. Fase móvel: 1 mM H ₃ PO ₄ e 2mM SOS + ACN. Gradiente de eluição e fluxo: descritos na tabela 3. Detecção UV: 245 nm. Temperatura da coluna: 30 °C.....	58
Figura 21 – Cromatograma da amostra 15 com crescentes adições de (a) 1-nitronaftaleno e (b) 1-nitropireno.....	63
Figura 22 – Espectro de massas da amostra 15 contendo fragmentos característicos dos compostos (A) 1-nitropireno, (B) 1-nitronaftaleno e (C) N,N-dimetilanilina.....	65
Figura 23 – Comparativo visual das amostras de CAP (A) antes e (B) depois do método de extração em fase sólida (SPE) aplicado Figura 18 – Cromatograma da amostra CAP-2 com crescentes adições de 1-nitronaftaleno.....	66
Figura 24 – Cromatograma da amostra de CAP-2 com crescentes adições de 1-nitronaftaleno.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nome, fórmula molecular, fórmula estrutural e características físico-químicas dos NHPAs estudados.....	38
Tabela 2 – Gradiente de eluição e fluxo para a separação dos compostos nitrogenados pelo mecanismo de fase reversa.....	49
Tabela 3 – Gradiente de eluição para a separação dos compostos nitrogenados pelo mecanismo de par iônico.....	50
Tabela 4 – Parâmetros de validação do método em fase reversa proposto para determinação de compostos nitrogenados.....	60
Tabela 5 – Recuperações dos 16 compostos nitrogenados em amostras de CAP e MP pelo método em fase reversa proposto.....	60
Tabela 6 – Resultados das recuperações obtidas na análise do SRM 1975.....	61
Tabela 7 – Parâmetros de validação do método de pareamento iônico proposto para determinação de compostos nitrogenados.....	61
Tabela 8 – Recuperações dos 16 compostos nitrogenados em amostras de CAP e MP pelo método de pareamento iônico proposto.....	62
Tabela 9 – Valores em massa encontrados para os compostos 1-nitropireno e 1-nitronaftaleno nas amostras de material particulado estudadas.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1NN	1-nitronaftaleno
1NP	1-nitropireno
AC	Acetato de Celulose
ANL	N,N-dimetilanilina
APPI	Fotoionização à Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais, do inglês <i>American Society for Testing and Materials</i>
CAP	Cimento Asfáltico de Petróleo
CENPES	Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DME	Microemulsão livre de Detergente, do inglês <i>Detergentless Microemulsion</i>
ESI	Ionização por Eletrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
EUA	Estados Unidos da América
FD	Detector de Fluorescência, do inglês <i>Fluorescence Detector</i>
FID	Detector por Ionização em Chama, do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
GC	Cromatografia Gasosa, do inglês <i>Gas Chromatography</i>
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	Agência Internacional de estudos sobre o Câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPC	Cromatografia de Par Iônico, do inglês <i>Ion-Pair Chromatography</i>
LC	Cromatografia Líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MM	Massa Molar
MP	Material Particulado
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i> sequencial (em tandem)
NHPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Nitrogenados
NIELC	Cromatografia Líquida de Troca Iônica em meio Não-aquoso, do inglês <i>Nonaqueous Ion Exchange Liquid Chromatography</i>
NIOSH	Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional, do inglês <i>National Institute for Occupational Safety & Health</i>
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OHPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Oxigenados
PAV	Vaso de Pressão para Envelhecimento, do inglês <i>Pressure Aging Vessel</i>
PE	Ponto de Ebulição
PF	Ponto de Fusão

PTFE	Politetrafluoretileno
RC	Celulose Regenerada, do inglês <i>Regenerated Cellulose</i>
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RPC	Cromatografia em Fase Reversa, do inglês <i>Reverse Phase Chromatography</i>
RTFOT	Teste de Estufa de Filme Fino Rotativo, do inglês <i>Rolling Thin Film Oven Test</i>
SARA	Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SHPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Sulfurados
SHRP	Programa Estratégico de Pesquisa Rodoviária, do inglês <i>Strategic Highway Research Program</i>
SOS	Octil Sulfato de Sódio, do inglês <i>Sodium Octil Sulfate</i>
SPE	Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	Material de Referência Certificado, do inglês <i>Standard Reference Material</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência, do inglês <i>Ultra-high Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultra-Violeta
XAD-2	Resina Polimérica Amberlite XAD-2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 CIMENTO ASFÁLTICO DE PETRÓLEO.....	19
2.1.1 Composição química e estrutura molecular	20
2.1.2 Fracionamento químico	24
2.1.3 Envelhecimento dos CAPs	27
2.2 EMISSÕES ASFÁLTICAS.....	28
2.2.1 Material Particulado (MP)	31
2.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS.....	32
2.3.1 Presença de compostos aromáticos nitrogenados em frações derivadas do petróleo	32
2.3.2 Classificação química dos compostos nitrogenados oriundos de combustíveis fósseis	34
2.3.3 Uso da cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta para separação de compostos aromáticos nitrogenados em matrizes asfálticas	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	43
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	44
3.3 AMOSTRAS.....	45
3.3.1 Preparo das amostras de material particulado	45
3.3.2 Preparo das amostras de asfalto	46
3.4 CONDIÇÕES E DETERMINAÇÕES POR HPLC-DAD.....	49
3.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE FASE REVERSA E DE PAR IÔNICO.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EM FASE REVERSA.....	51
4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PAR IÔNICO.....	56
4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO EM FASE REVERSA.....	59
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PAR IÔNICO.....	61
4.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DO AR.....	62
4.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ASFALTO.....	66
5 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES	78
APÊNDICE A.....	78
APÊNDICE B.....	86

1 INTRODUÇÃO

O cimento asfáltico de petróleo (CAP) é o nome dado ao resíduo do refino do petróleo, que é um produto largamente utilizado na pavimentação (BERNUCCI, 2010; SPEIGHT, 2001). Durante a manipulação e aplicação no pavimento, esse material é aquecido a altas temperaturas, produzindo vapores de significativa toxicidade (SCHREINER, 2011). Ao mesmo tempo que emite, também envelhece, modificando sua estrutura química a curto prazo. Com o tempo, outras modificações a longo prazo também podem ocorrer, afetando agora a vida útil do pavimento (LESEUER, 2009). Por esse motivo, a elucidação da constituição química do asfalto permite compreender tanto seu comportamento reológico (LI; GREENFIELD, 2014; MICHALICA, 2008) quanto aspectos relacionados as emissões do ligante asfáltico e os possíveis danos que os compostos químicos voláteis causam nos seres humanos e no meio ambiente ao seu redor (KITTO et al., 1997).

O fracionamento em classes majoritárias de compostos é a forma mais difundida para permitir a análise da mistura complexa de cimento asfáltico de petróleo. O método proposto por Corbett (1969), normalizado pela ASTM D4124, conhecido na Europa como SARA, separa as frações em Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos, como a sigla sugere (WANG et al.; 2019). Os asfaltenos, insolúveis em n-heptano, são separados da fração maltênica por precipitação e posteriormente a fração maltênica é fracionada em seus respectivos produtos (resinas, aromáticos e saturados). Os asfaltenos são quimicamente constituídos de compostos polares ou polarizáveis unidos por associações intermoleculares – dentre eles compostos aromáticos nitrogenados (PORTO et al., 2019). Neste trabalho, é feita a separação de três amostras de cimento asfáltico de petróleo virgens em maltenos e asfaltenos de acordo com a ASTM D4124. Posteriormente os asfaltenos são separados novamente em frações ácidas, básicas e neutras de acordo com o método proposto por Green e colaboradores (1984) e adaptado por Carvalho e colaboradores (2015) para este tipo de matriz. Esse estudo busca elucidar a estrutura química do ligante através da análise dessas subfrações por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*).

No que diz respeito as emissões do ligante, o termo geral “emissão asfáltica” é atribuído a misturas complexas de aerossóis, vapores e gases formados nos

processos de aquecimento do CAP superior à 150 °C. Essas emissões são compostas, dentre outras coisas, de material particulado (MP) (IARC, 2013). Por MP, entende-se uma mistura de partículas sólidas e líquidas em suspensão no ar, classificadas de acordo com seu tamanho. As partículas menores podem atingir os alvéolos pulmonares, se inaladas (FONTENELE et al., 2018). Os materiais particulados são constituídos de substâncias orgânicas como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados, como por exemplo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados (NHPAs), oxigenados (OHPAs) e sulfurados (SHPAs). No presente estudo, 23 amostras de material particulado coletadas durante a usinagem de misturas asfálticas em duas usinas localizadas no Ceará são analisadas por HPLC-DAD na busca de NHPAs.

A grande problemática em torno da possível exposição aos compostos policíclicos aromáticos nitrogenados, que podem estar presentes no cimento asfáltico de petróleo e por consequência, no material particulado do ar, consiste no seu elevado poder mutagênico e carcinogênico, sendo potencialmente mais agressivos que os seus precursores HPAs (DELHOME, 2007; NASCIMENTO et al., 2015). Assim, é necessário o entendimento da composição química dessas matrizes a fim de mensurar o risco ao qual estão expostos os trabalhadores das usinas de CAP (WALGRAEVE et al., 2010). Dessa forma, surge a ideia principal deste trabalho, que propõe o desenvolvimento e utilização de metodologias analíticas a fim de identificar e quantificar compostos aromáticos nitrogenados em frações fixas e voláteis de cimento asfáltico de petróleo. Após investigação de compostos nitrogenados relatados em trabalhos anteriores para matrizes semelhantes, são estudados para este fim os compostos: acridina, N,N-dimetil-anilina, 9-nitroantraceno, carbazol, 9-fenilcarbazol, fenantridina, fenazina, 2-nitrofluoreno, 2-fenilindol, 2-metilindol, 3-metilindol, 5-hidroxi-indol-3-ácido acético, 1-nitronaftaleno, 1-nitropireno, quinolina e benzo[h]quinolina.

Estudos realizados recentemente vêm tentando mapear HPAs e seus derivados tanto em matrizes fixas como voláteis do ligante, como os trabalhos desenvolvidos por Brudi e colaboradores (2020) e Cargnin e colaboradores (2021) que investigaram a presença de SHPAs em emissões asfálticas por HPLC-DAD. Também Nascimento e colaboradores (2015) e Claussen (2017) investigaram a presença de HPAs, NHPAs e OHPAs em matrizes asfálticas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas em tandem (HPLC-

MS/MS, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*). No entanto nenhum destes trabalhos o fez de forma a avaliar um número expressivo de NHPAs concomitantemente nas duas matrizes, como proposto no presente trabalho.

Separações cromatográficas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detecção ultravioleta (UV) ou por fluorescência (FD) são geralmente empregadas para a identificação e quantificação de HPAs e seus derivados no CAP (IARC, 2013). Para este trabalho, usa-se um detector ultravioleta de arranjo de fotodiodos (DAD) para identificação e quantificação de compostos aromáticos nitrogenados em matrizes fixas e voláteis do ligante asfáltico. A cromatografia de partição em fase reversa e a cromatografia de pareamento iônico foram exploradas como mecanismos de separação cromatográfica, uma vez que esses compostos orgânicos são facilmente ionizáveis. Para a matriz volátil, ainda, foi utilizada a análise de massas em tandem com fonte de fotoionização à pressão atmosférica (APPI-MS/MS, do inglês, *Tandem Mass Spectrometry with Atmospheric Pressure Photoionization*) para confirmação dos compostos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar compostos aromáticos nitrogenados na forma fixa (CAP) e volátil (MP) da matriz asfáltica, utilizando para isso a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector ultravioleta de arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) e empregando os mecanismos de separação de fase reversa e pareamento iônico.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral deste trabalho, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Desenvolver e validar um método cromatográfico em fase reversa usando HPLC-DAD para a determinação de 16 compostos nitrogenados, sendo eles: acridina, N,N-dimetil-anilina, 9-nitroantraceno, carbazol, 9-fenilcarbazol, fenantridina, fenazina, 2-nitrofluoreno, 2-fenilindol, 2-metilindol, 3-metilindol, 5-

- hidroxi-indol-3-ácido acético, 1-nitronaftaleno, 1-nitropireno, quinolina e benzo[h]quinolina;
- b) Desenvolver e validar concomitantemente um segundo método cromatográfico de par iônico usando HPLC-DAD para a determinação dos mesmos compostos nitrogenados, objetivando assim uma segunda ferramenta analítica;
 - c) Aplicar um método de preparo das amostras de material particulado do ar empregando extração em solvente a fim de possibilitar a análise cromatográfica;
 - d) Aplicar métodos de preparo das amostras de cimento asfáltico de petróleo empregando ensaios de precipitação, cromatografia líquida de troca iônica em meio não aquoso e extração em fase sólida a fim de possibilitar a análise cromatográfica;
 - e) Determinar os compostos nitrogenados eventualmente presentes na matriz fixa e entender a sua relação com as frações volatilizadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIMENTO ASFÁLTICO DE PETRÓLEO

Cimento asfáltico é o nome designado ao asfalto apropriado para a construção de pavimentos, podendo ser de origem natural ou oriundo da destilação do petróleo bruto (BERNUCCI et al., 2010). Obtém-se o cimento asfáltico de origem natural quando o petróleo, que migra para a superfície da terra, acaba sofrendo um processo de “destilação natural” com o passar do tempo, onde frações mais leves como os gases evaporam com as ações da natureza, restando um resíduo, que é o asfalto natural. Esse tipo de ocorrência pode ser encontrado na Ilha de Trindade e na Venezuela, por exemplo (PINTO; PINTO, 2019). Já o asfalto originário do petróleo, também chamado de cimento asfáltico de petróleo (CAP) ou betume, terminologia difundida pelos europeus, é obtido como um resíduo da destilação do petróleo bruto em torres de fracionamento com arraste a vapor. Graças ao domínio das técnicas de exploração em profundidade, a principal forma de obtenção do cimento asfáltico hoje é originária do petróleo (HUNTER et al., 2015).

De acordo com Bernucci e colaboradores (2010), cerca de 95% das estradas brasileiras são revestidas com cimento asfáltico de petróleo. Esse uso predominante do asfalto na pavimentação deve-se a características como elasticidade, conferindo resistência a aplicação de cargas rápidas, viscosidade, conferindo resistência a aplicação de cargas por longos períodos, impermeabilização a água e baixa reatividade, podendo ser usado ainda em combinações com ou sem aditivos (FARAH, 2015). No entanto, essa baixa reatividade química não impede que o CAP sofra a ação de agentes externos durante a sua aplicação e vida útil, levando-o a sofrer um processo de envelhecimento a curto e a longo prazo (FERNÁNDEZ-GÓMEZ, 2014).

Na grande maioria dos países a produção do asfalto se dá pela mistura de diversos petróleos. Sendo assim, a composição química do CAP vai depender tanto da origem do(s) petróleo(s) utilizado(s), bem como do processo de refino (WANG et al., 2019). Isso faz com que a complexidade da matriz, que já é alta, torne-se ainda mais complexa do ponto de vista químico. Uma vez que a composição química do CAP tem influência direta no seu desempenho físico e mecânico é relevante o entendimento dessa mistura complexa (BERNUCCI et al., 2010).

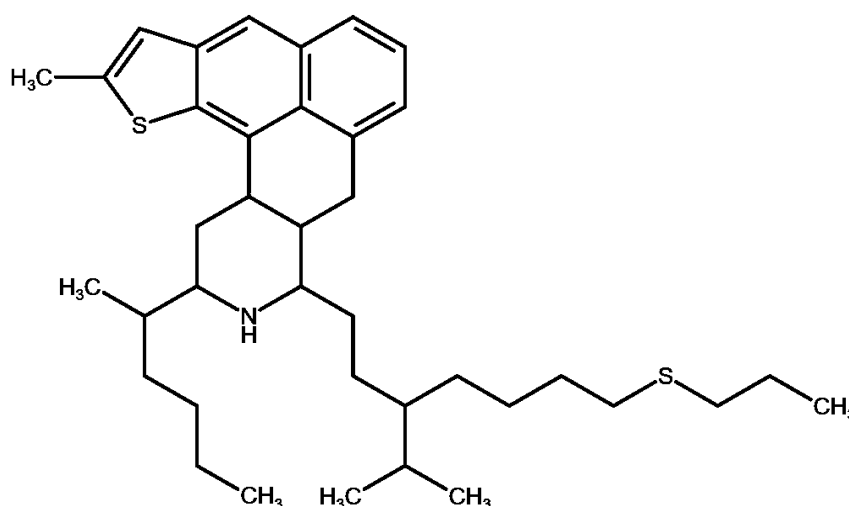
2.1.1 Composição química e estrutura molecular

De maneira geral, o CAP é formado por hidrocarbonetos, que compõe cerca de 95% da matriz. Os outros 5% são compostos por heteroátomos como: enxofre, que se apresenta na forma de sulfetos e tióis; nitrogênio, que se apresenta na forma de pirróis e piridinas; oxigênio, que se apresenta na forma de cetonas, fenóis e ácidos carboxílicos; e alguns metais, como níquel, vanádio, ferro e magnésio, muitas vezes presentes na forma de porfirinas (LESEUER, 2009; PORTO et al., 2019). As propriedades físicas, químicas e mecânicas do ligante são governadas pelo balanço entre esses componentes polares e apolares, de maior e menor tamanho (LI, GREENFIELD, 2014). Esse balanço e, conseqüentemente, as características do ligante podem variar dependendo da origem do petróleo utilizado, do processo de refino, dos processos de modificação ao qual o CAP é submetido, bem como do tempo de serviço (MICHALICA et al., 2008).

Embora modelos hipotéticos de moléculas de asfalto possam ser mensurados, como pode ser visualizado na figura 1, é difícil caracterizá-lo de maneira prática a

nível molecular, dada sua elevada complexidade química (ASPHALT INSTITUTE, 2015). Uma estratégia bastante utilizada é a separação do CAP em frações, o que permite através do estudo dessas frações entender as estruturas que compõe o ligante de uma maneira geral (WANG et al., 2019). Isso possibilita a criação de modelos aceitáveis que conseguem relacionar a composição química com muitas das propriedades físicas do ligante.

Figura 1 - Estrutura hipotética de uma molécula de asfalto baseada na análise de uma amostra certificada oriunda da California Coastal (AAD-1) pelo Strategic Highway Research Program (SHRP)



FONTE: (Adaptado de LESEUER et al., 2009).

A estratégia de separação mais difundida atualmente para o CAP baseia-se no método denominado SARA, que separa o ligante de acordo com a sua solubilidade em duas classes majoritárias de compostos, chamadas asfaltenos e maltenos. Posteriormente é feita a separação dos maltenos em seus respectivos produtos, que são constituídos de compostos saturados, aromáticos e resinas (POSSEBON, 2018). Maiores detalhes a respeito do método de fracionamento serão discutidos posteriormente, no entanto, por fins didáticos, é fundamental entender um pouco sobre cada uma dessas frações, a fim de compreender o que originou um dos modelos mais aceitos para o entendimento do ligante em termos químicos, chamado modelo de micelas.

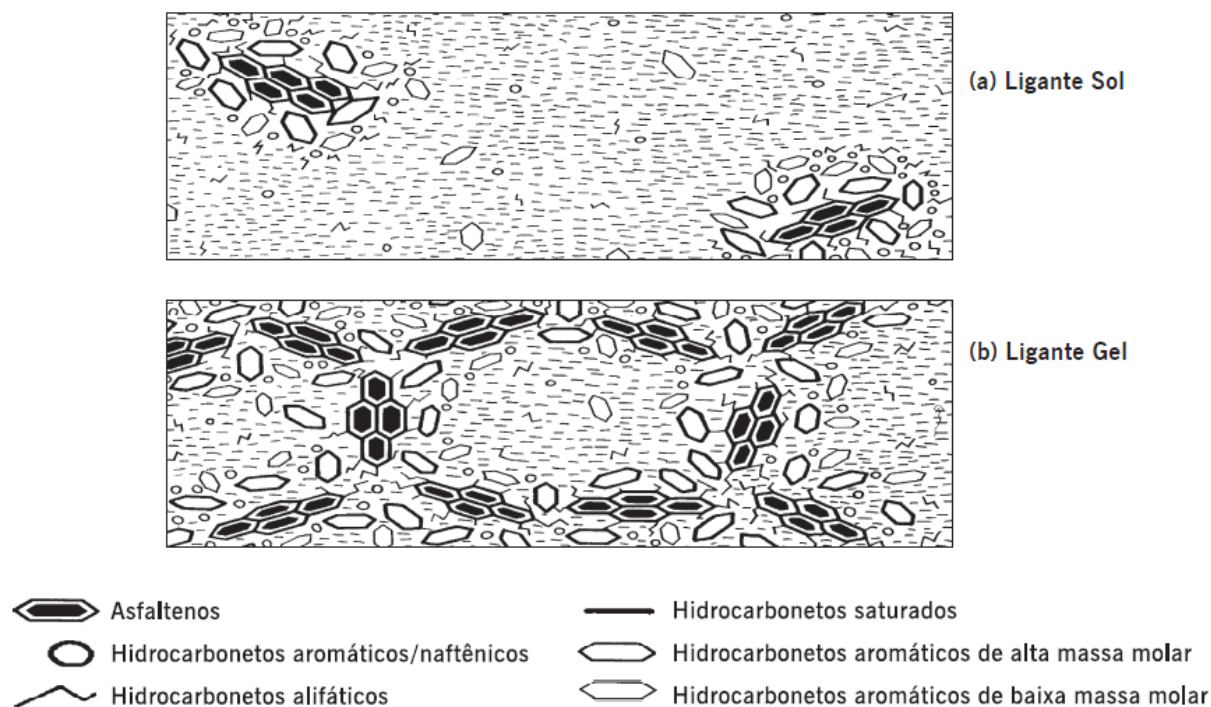
De acordo com Cravo (2016), a fração asfáltica é quimicamente constituída por anéis policíclicos aromáticos substituídos com várias cadeias alquílicas laterais. Possuem o maior percentual de heteroátomos dentre todas as quatro frações, sendo

assim, são compostos polares ou polarizáveis unidos por associações intermoleculares (LUCENA, 2005). Já as frações oriundas dos maltenos têm características mais apolares. Os componentes aromáticos, como o próprio nome já informa, são formados por cadeias carbônicas aromáticas, a fração saturada é formada de compostos não polares, constituídos de cadeias alifáticas retas e ramificadas de hidrocarbonetos. As resinas, no entanto, são bastante semelhantes aos asfaltenos, porém exibem menor peso molecular que esse últimos, sendo constituídas de hidrocarbonetos com pequenas proporções de heteroátomos (BERNUCCI et al., 2010).

Segundo o modelo de micelas proposto por Yen, Ederman e Pollack (1961), o CAP pode ser considerado como uma dispersão coloidal de asfaltenos dispersos em maltenos. São consideradas micelas um aglomerado de asfaltenos circundados por uma camada de resinas aromáticas que funcionam como agentes peptizantes. A proporção de resinas e asfaltenos governa o comportamento do ligante como solução (Sol) ou como gelatina (Gel) (HUNTER et al., 2015), conforme pode ser visualizado na figura 2.

Ligantes do tipo Sol ocorrem quando os asfaltenos formam micelas com boa mobilidade no meio das resinas e aromáticos, sendo totalmente peptizados ou dispersos. Estes CAPs são considerados “moles”, pois apresentam alta susceptibilidade térmica e baixo ponto de amolecimento. Ligantes do tipo Gel ocorrem quando as frações não estão balanceadas, ou seja, quando a razão aromáticos/resinas não é suficiente para peptizar as micelas, resultando em associação dos asfaltenos, o que leva a estruturas irregulares com aberturas entre as micelas (vazios internos). Este tipo de CAP possui menos susceptibilidade térmica e maior ponto de amolecimento, sendo considerado “duro” (LUCENA, 2005).

Figura 2 – Esquema de CAP apresentando comportamento de (a) ligante Sol e (b) ligante Gel



Fonte: (Adaptado de BERNUCCI et al., 2010).

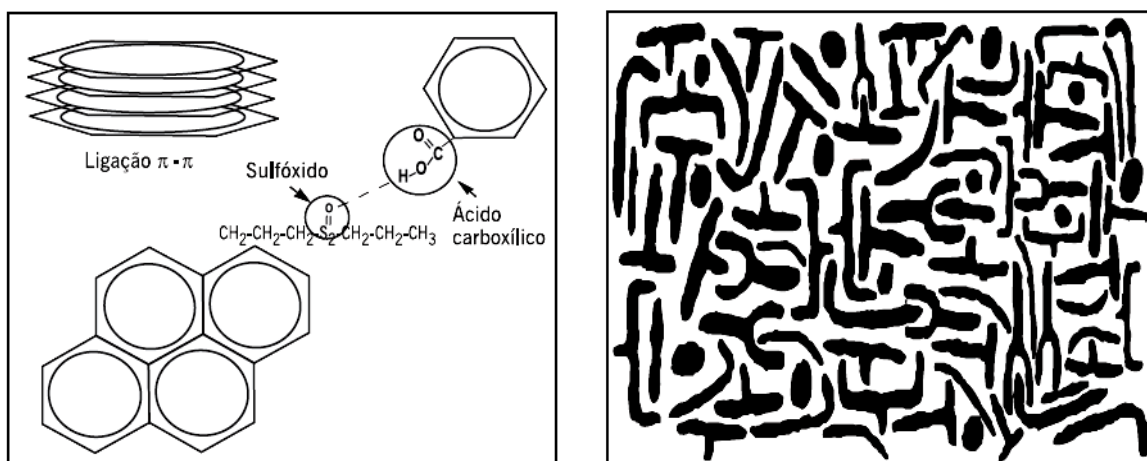
Para compreender esse modelo é necessário ainda expandir o entendimento da estrutura química do CAP para além de micelas unitárias, mas entender que existem associações dessas micelas formando aglomerados. Essas associações são explicadas devido as interações intermoleculares atuantes no meio e as interações do tipo π entre os anéis aromáticos condensados (SILVEIRA, 2018).

Conforme o ligante sofre processos de oxidação (através do envelhecimento, por exemplo) esse equilíbrio entre a dispersão coloidal varia, resultando em um aumento do teor de asfaltenos e diminuição do teor de maltenos, favorecendo assim a estrutura Gel através da associação das micelas para formar aglomerados de asfaltenos (CRAVO, 2016). Pode-se perceber com facilidade agora como esse modelo permite explicar as propriedades físicas, mecânicas e reológicas do ligante.

Mesmo explicando muitos fenômenos físicos, o modelo de micelas não é absoluto na comunidade científica, sendo revisado e até contestado algumas vezes. À exemplo, o modelo proposto pelo SHRP (do inglês, *Strategic Highway Research Program*) visto na figura 3, refuta o conceito de asfaltenos e maltenos e propõe o conceito de polaridade para classificar as frações constituintes do CAP. Para que se possa entender o modelo, a estratégia é pensar no CAP como frações polares e

apolares. Essa diferença de polaridade resulta na presença de interações intermoleculares e intramoleculares, como as do tipo π - π , de hidrogênio e London. Essas interações criam redes tridimensionais de moléculas que podem ser relacionadas às características físicas do CAP como elasticidade e viscosidade (BERNUCCI et al., 2010; LUCENA, 2005; SILVEIRA, 2018).

Figura 3 – Modelo de estrutura do CAP proposto pelo SHRP



Fonte: (Adaptado de BERNUCCI et al., 2010).

Os modelos que buscam explicar a estrutura química do CAP têm por objetivo a elucidação do seu entendimento reológico, ou seja, buscam compreender o comportamento físico do ligante diante de fenômenos como o a temperatura, pressão exercida pelas cargas e radiação solar (situações que diminuem sua vida útil no pavimento). Assim, é possível obter estruturas com comportamento mecânico adequado, evitando defeitos prematuros, como deformação permanente e trincamento por fadiga (BARBOSA, 2019). Outra questão relevante no estudo dos constituintes do ligante estão relacionados aos compostos voláteis que por ele são emitidos e os danos que esses compostos causam nos seres humanos e no meio ambiente ao seu redor (KITTO et al., 1996).

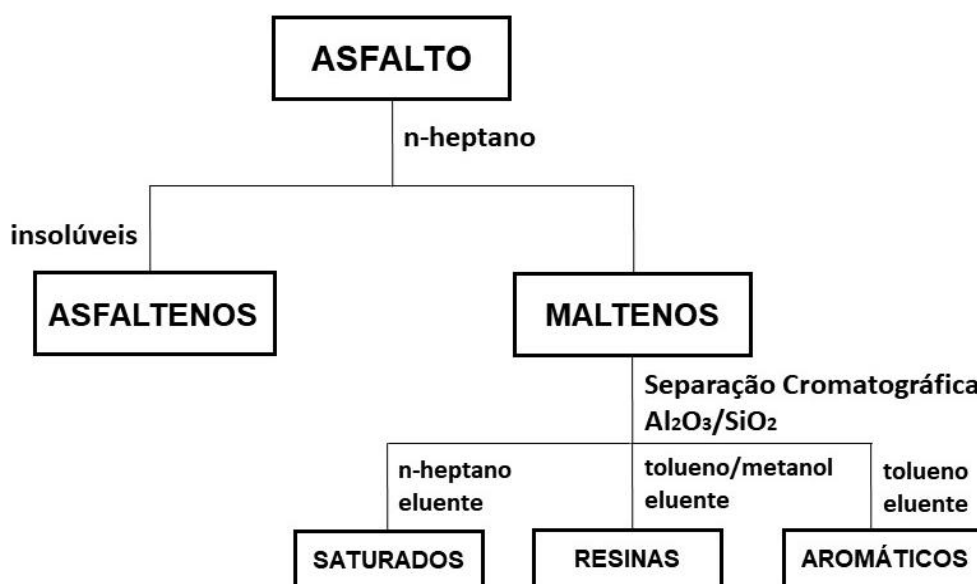
2.1.2 Fracionamento químico

Na literatura é possível encontrar métodos de fracionamento do CAP baseados nos ensaios de precipitação, destilação, técnicas cromatográficas, técnicas espectrométricas, titrimétricas, gravimétricas, de análise elementar, análise de peso molecular por espectrometria de massas, dentre outras (SPEIGHT, 2015).

No entanto, os métodos de fracionamento mais utilizados baseiam-se no princípio de solubilidade, permitindo a separação de grupos de moléculas com características químicas semelhantes. É possível assim a determinação de moléculas que constituem o ligante, e pode-se então mensurar a extensão do efeito dessas estruturas sobre as suas propriedades físicas (SANT'ANNA, 2015).

O método proposto por Corbett (1969), normalizado pela ASTM D 4124, conhecido na Europa como SARA, separa as frações em Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos, conforme a sigla sugere (WANG et al., 2019). Como comentado anteriormente, esse método é um dos mais difundidos para o fracionamento do CAP. Os asfaltenos, insolúveis em solventes apolares como n-heptano, são separados da fração maltênica por precipitação. Posteriormente a fração maltênica é fracionada através da cromatografia em coluna de sílica/alumina em seus respectivos produtos: saturados, eluídos com n-heptano; resinas, eluídas com tolueno/metanol e; aromáticos, eluídos com tolueno, conforme pode ser visualizado na figura 4 (PORTO et al., 2019).

Figura 4 – Fluxograma do fracionamento químico do CAP pelo de método SARA

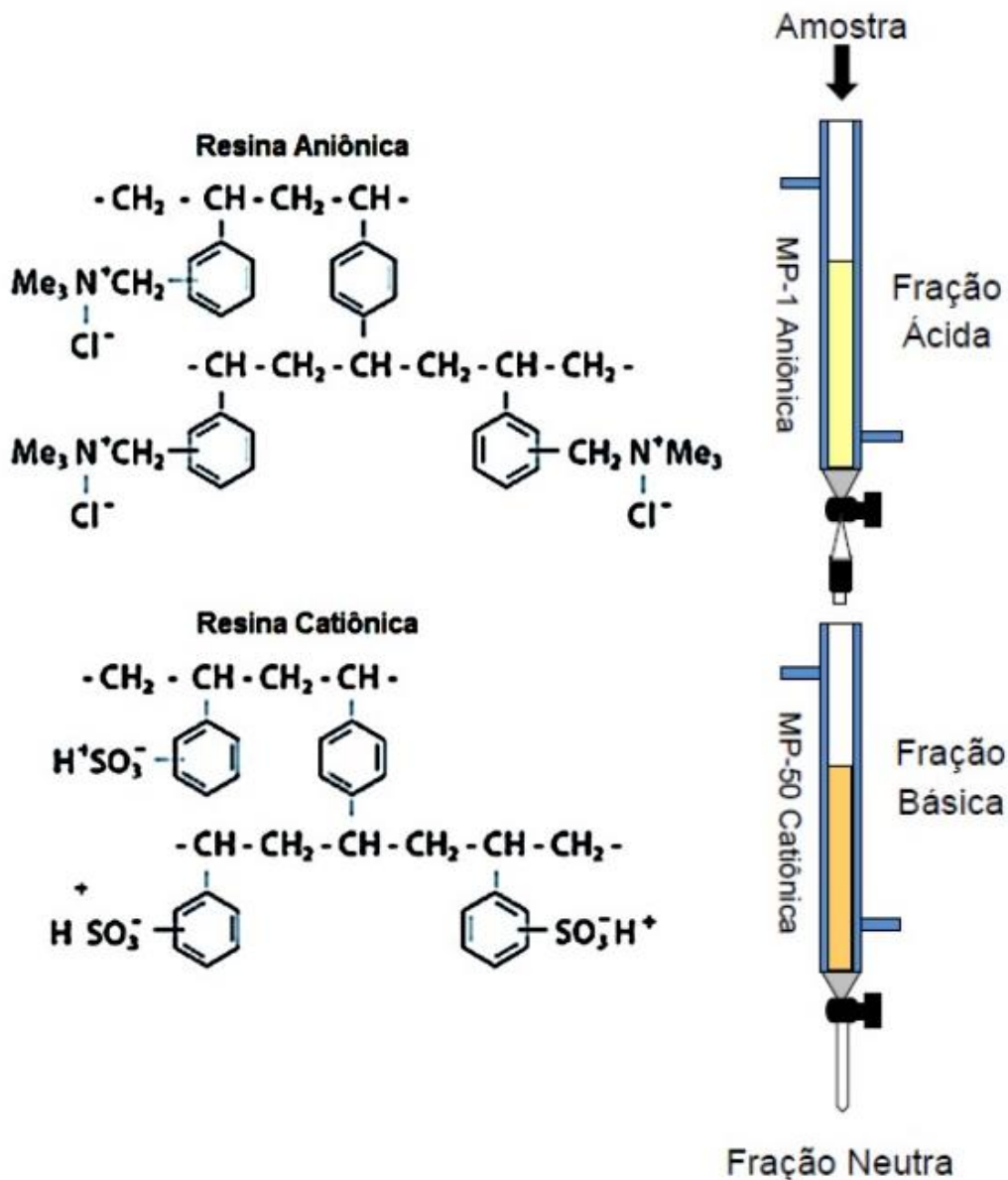


FONTE: (Adaptado de SILVA, 2005).

Já Green e colaboradores (1984) propuseram um método de fracionamento para CAPs venezuelanos baseado na cromatografia de troca iônica em meio não aquoso (NIELC, do inglês *Nonaqueous Ion Exchange Liquid Chromatography*). O método consiste na separação de frações positivas, negativas e neutras de CAP.

Para isso são utilizadas duas colunas, uma recheada com uma resina de troca aniônica e outra com resina catiônica, conectadas em série. A amostra é depositada sobre o topo da primeira coluna, de modo que a fração ácida é obtida na coluna de troca aniônica e a fração básica na coluna de troca catiônica. A fração da amostra que não interage com as resinas é a fração neutra. Após a cromatografia, o conteúdo da resina aniônica é extraído com um ácido em benzeno e o conteúdo da resina catiônica é extraído com uma base em benzeno. Um esquema simplificado do processo de fracionamento pode ser visualizado na figura 5.

Figura 5 – Processo de separação pelo método proposto por Green e colaboradores (1984)



FONTE: (Adaptado de SILVEIRA, 2018).

Carvalho e colaboradores (2015) utilizaram uma adaptação do método SARA aliada ao método proposto por Green e colaboradores (1984) a fim de investigar compostos de enxofre em ligantes asfálticos brasileiros. Já Nascimento e colaboradores (2015a, 2015b) e Claussen (2017) utilizaram a mesma metodologia para a investigação de compostos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrogenados (NHPAs) e oxigenados (OHPAs) em CAPs brasileiros virgens e envelhecidos por HPLC-MS/MS. Ainda, Silveira e colaboradores (2017) utilizaram a primeira etapa do método SARA para permitir a investigação de compostos sulfurados nas frações maltênicas e asfálticas de CAPs brasileiros virgens e envelhecidos por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de fotoionização a pressão atmosférica (UHPLC-APPI-MS/MS, do inglês, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry with Atmospheric Pressure Photoionization*).

2.1.3 Envelhecimento dos CAPs

O processo de envelhecimento do ligante está relacionado as reações químicas que ocorrem desde a fabricação, aplicação no pavimento e tempo de serviço do CAP e que modificam progressivamente sua estrutura, afetando o seu bom desempenho (SANT'ANA, 2015). De acordo com Férnades-Gómes e colaboradores (2014), os principais mecanismos associados ao envelhecimento do ligante são: volatilização de componentes mais leves, oxidação durante o tempo de serviço e endurecimento físico. A seguir serão detalhados cada tipo de envelhecimento:

- a) A volatilização ocorre nos processos de usinagem, transporte e pavimentação, onde são usadas altas temperaturas a fim de permitir a manipulação do ligante. Esse tipo de envelhecimento tem efeito menos pronunciado, mas afeta o peso molecular do ligante devido á evaporação das frações mais leves – saturados e aromáticos (FÉRNANDES-GÓMES et al., 2014).
- b) A oxidação consiste em um processo de reestruturação do CAP. Observa-se assim alteração entre as frações de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos favorecendo a estrutura Gel do ligante (CLAUSSEN, 2017). O envelhecimento oxidativo é um fenômeno irreversível desencadeado

principalmente por reações térmicas entre o oxigênio presente na atmosfera e os componentes do CAP (TAUSTE et al. 2018).

- c) Por último, o endurecimento físico ocorre conforme o tempo de serviço do asfalto no pavimento, e se deve a reorganização interna das moléculas do ligante e a cristalização de parafinas da fração saturada do CAP. Seus efeitos são moderados e causam endurecimento reversível do ligante (SANT'ANA, 2015; TAUSTE et al., 2018).

A fim de investigar os efeitos que o envelhecimento causa na estrutura química do asfalto, existem métodos laboratoriais que simulam esses processos. De acordo com Silveira (2018), podem ser citados o teste de estufa de filme fino rotativo para envelhecimento a curto prazo (RTFOT, do inglês, *Rolling Thin Film Oven Test*), que simula as condições do ligante durante a aplicação no pavimento. Também o vaso de pressão para envelhecimento a longo prazo (PAV, do inglês, *Pressure Aging Vessel*), que simula o envelhecimento do ligante durante 5 – 7 anos de serviço, e por fim, o teste denominado SUNTEST, que simula o envelhecimento por incidência de radiação UV do sol.

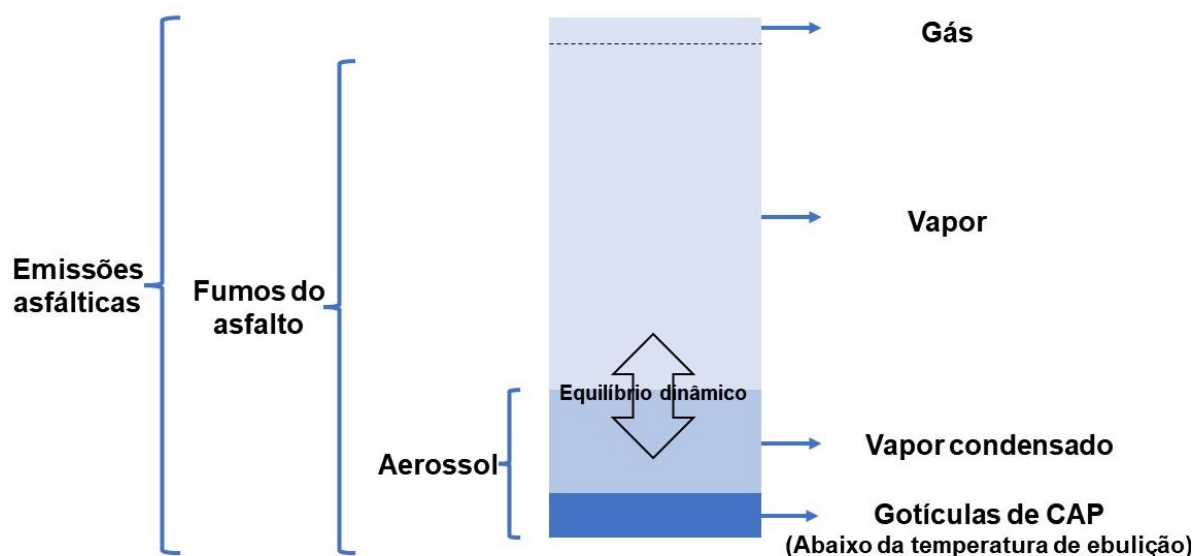
Neste trabalho, foram utilizados asfalto virgens, ou seja, sem nenhum tipo de envelhecimento forçado, a fim de investigar a composição da matriz na sua forma fixa. No entanto, é fundamental entender os processos de envelhecimento a fim de compreender a dinâmica do ligante. Além disso, o envelhecimento por volatilização resulta em emissões asfálticas, dentre elas, materiais particulados, que são outra matriz de interesse no presente trabalho. Esses materiais particulados são investigados a fim de determinar as estruturas químicas danosas presentes na matriz passível de volatilização.

2.2 EMISSÕES ASFÁLTICAS

Por definição, emissões asfálticas são misturas complexas de aerossóis, vapores e gases provenientes do aquecimento das misturas asfálticas (ASPHALT INSTITUTE, 2015). É importante atentar que o termo “emissão asfáltica” é bastante abrangente, e faz referência ao conteúdo total do asfalto que porventura venha a ser encontrado no ar. Já o termo “fumos de asfalto”, frequentemente encontrado na literatura, faz referência a fração aerossolizada do asfalto total, como por exemplo o

material particulado sólido, conforme pode ser visualizado no esquema da figura 6 (IARC, 2013).

Figura 6 – Esquema de diferenciação entre emissões, fumos e fração aerossolizada do CAP



FONTE: (Adaptado de ASPHALT INSTITUTE, 2015).

Quando o asfalto é aquecido a temperaturas superiores a 150 °C, começam a se formar emissões visíveis (HUNTER et al., 2015). Por isso, as emissões asfálticas ocorrem nas proximidades das usinas produtoras do ligante e durante o processo de aplicação, onde altas temperaturas são usadas (SCHREINER, 2011). Como comentado anteriormente, a composição química do CAP depende de uma série de fatores, mas de forma geral hidrocarbonetos são predominantes, contendo ainda pequenas proporções de heteroátomos. Sendo assim, a grande problemática acerca da exposição a essas emissões consiste no fato de que, assim como o ligante, elas podem conter hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados oxigenados e nitrogenados (IARC, 2015; FONTENELE, 2018). De acordo com Delhomme e colaboradores (2007), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados (NHPAs) tem poder carcinogênico dez vezes maior que seus precursores HPAs e estima-se que seu poder mutagênico é cerca de 2×10^5 vezes maior.

Bernucci e colaboradores (2010) explicam que uma exposição a curto prazo às emissões asfálticas pode resultar em irritação nos olhos e vias respiratórias, dores e cabeça e náuseas. Estes sintomas são geralmente leves e temporários, desaparecendo assim que a exposição é cessada. Porém, estudos apontam que a

exposição ocupacional – como no caso de pessoas que trabalham em alguma parte do processamento do CAP – pode ser mutagênica e causar câncer. Dentre os HPAs mais comuns incluídos nesta categoria pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (2008), vale citar: benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, dibenz[a,j]acridina, 7H-dibenzo[c,g]carbazol e 1-nitropireno.

Os HPAs e seus derivados, presentes no óleo cru de petróleo, geralmente são encontrados em baixas concentrações nos CAPs. Isso acontece porque o processo de refino do petróleo, a destilação, remove a maior parte dos compostos de baixa massa molecular com baixo ponto de ebulição, incluindo os HPAs contendo de três a sete anéis fundidos. Apesar da maioria dos HPAs serem removidos durante o processo de produção, resíduos de dois a sete anéis ainda assim são encontrados no CAP sólido e conseqüentemente, nas suas emissões. As emissões do CAP tendem a conter proporcionalmente mais HPAs de dois anéis, como o naftaleno e menos HPAs de cinco anéis, como o benzo[a]pireno quando comparadas ao CAP sólido (IARC, 2013; LUCENA, 2005).

De acordo com Schreiner (2011), a quantidade de hidrocarbonetos emitida depende da temperatura empregada no manuseio do ligante. Conforme a temperatura aumenta, a quantidade de compostos emitidos também aumenta. Essa relação é prevista pela equação de Clausius-Clapeyron, que descreve o aumento da pressão de vapor com a temperatura (ASPHALT INSTITUTE, 2015). Isso significa que, aumentando a temperatura, aumenta-se a quantidade de energia para romper as forças que mantêm as moléculas unidas no estado líquido. Conseqüentemente, haverá maior quantidade de vapor, podendo ser traduzida em um aumento da pressão de vapor em um sistema fechado, por exemplo.

Por causa dessa dependência da temperatura de emissão com a fração de compostos emitidos, que afeta diretamente a saúde dos trabalhadores, o ambiente de trabalho passou a ser uma preocupação relevante. Além de extensas pesquisas na área a fim de investigar esses compostos e os danos causados pela exposição, diferentes estratégias vêm sendo propostas a fim de driblar esse problema. Um exemplo é a estratégia de produzir misturas asfálticas com temperaturas mais baixas que as usuais, dando origem as misturas asfálticas mornas, que são uma alternativa extensivamente estudada na atualidade (CARGNIN, 2017).

Há uma variedade de métodos para coleta e análise de amostras de emissões oriundas do ligante. Originalmente, estes métodos focam em frações de partículas

inaláveis (aerossóis), que podem ser extraídas com determinado solvente para posterior determinação da sua composição química. A maioria desses métodos usa a técnica de amostragem ativa com bombas de ar que “sugam” o ar do meio amostrado (IARC, 2013). De acordo com Barbosa (2019), existe ainda a amostragem passiva, mas essa é menos usada.

O método padronizado NIOSH 5042 foi desenvolvido para a determinação de material particulado total. A fração de interesse, solúvel em benzeno ou ciclohexano, é coletada em filtros. Cada fração é analisada separadamente por análise gravimétrica. Nos EUA, o método NIOSH 5506 usa um filtro seguido de um tubo de XAD-2 para coletar as frações de vapor. A análise é feita por meio de HPLC com detecção por fluorescência (FD) para a análise dos HPAs. Os HPAs podem ainda, ser analisados individualmente usando um intensivo processo de limpeza da amostra seguido por uma análise de cromatografia gasosa (GC) acoplada a detecção por ionização em chama (FID) ou massas (MS), por exemplo (IARC, 2013).

2.2.1 Material Particulado (MP)

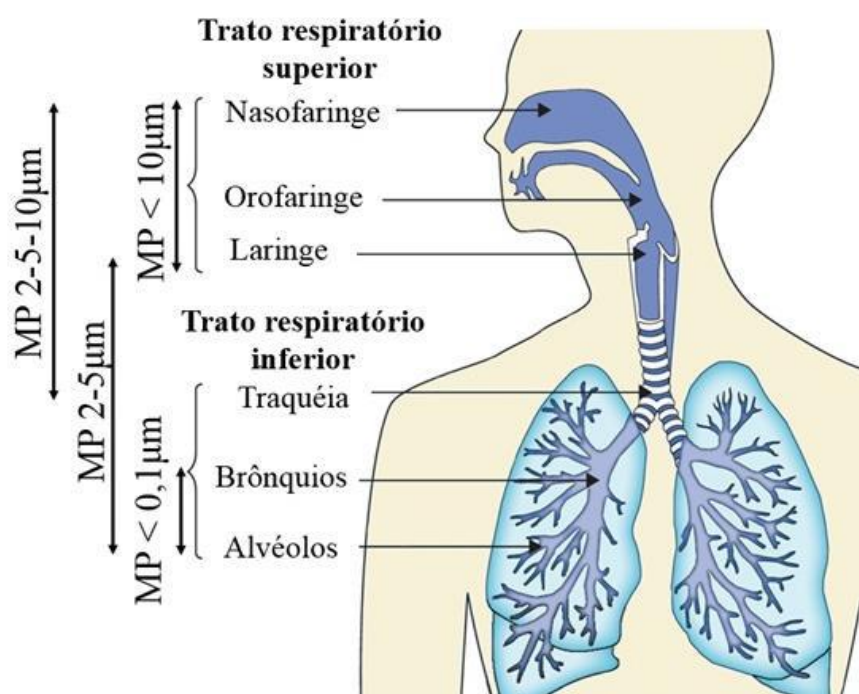
Material particulado (MP) é o termo abrangente usado para descrever uma mistura complexa de partículas sólidas e líquidas em suspensão no ar, que pode ser de origem natural ou antrópica. Os materiais particulados são constituídos geralmente de íons inorgânicos, bem como substâncias orgânicas e metais (BARBOSA, 2019). Segundo explica Braga (2001), essa constituição química vai variar dependendo da fonte da emissão. O MP primário é formado de materiais emitidos diretamente na atmosfera (ex: partículas geradas por combustão). O MP pode ainda ser chamado de secundário, quando formado por vapores condensados pela reação química envolvendo precursores de fase gasosa ou de outros processos (FONTENELE et al., 2018).

O tamanho das partículas do MP é expresso em função do seu tamanho aerodinâmico, ou seja, o diâmetro de uma esfera densa que tem a mesma velocidade de sedimentação que a partícula em questão. Sendo assim, existem partículas grossas, finas e ultrafinas. As partículas grossas têm tamanho médio que varia entre 2,5-10 μm , e são representadas como MP_{10} . As partículas finas, por sua vez, variam entre 0,1-2,5 μm , e são representadas como $\text{MP}_{2,5}$. Por fim, as

partículas ultrafinas possuem tamanho menor que $0,1 \mu\text{m}$ e a sua representação é $\text{MP}_{0,1}$ (BRAGA, 2001; YAGANI, 2012).

Conforme observado no esquema da figura 7, quando inspiradas as partículas de MP_{10} são retidas nas partes superiores das vias aéreas, no entanto, as partículas de $\text{MP}_{2,5}$ e $\text{MP}_{0,1}$ podem atingir os alvéolos pulmonares (YANAGI, 2012). Ainda, os constituintes do MP de menor diâmetro podem alcançar a corrente sanguínea, se espalhando pelo corpo e chegando até as células dos organismos vivos, causando efeitos nocivos diversos (FONTENELE, 2018). Essa alta toxicidade do MP está diretamente relacionada com a presença de HPAs e derivados em sua composição. Esses HPAs, conforme discorrido ao longo desta revisão, possuem alto potencial carcinogênico e mutagênico (WALGRAEVE et al., 2010).

Figura 7 - Esquema da exposição por inalação e distribuição do MP nas vias aéreas



Fonte: (Adaptado de FONTENELE et al., 2019).

2.3 COMPOSTOS AROMÁTICOS NITROGENADOS

2.3.1 Presença de compostos aromáticos nitrogenados em frações derivadas do petróleo

Em frações derivadas do petróleo, a presença de compostos aromáticos nitrogenados é indesejável porque esses compostos são envenenadores catalíticos automotivos e promovem assim o aumento da emissão de NO_x por combustão. Isso

acontece porque a presença de compostos nitrogenados nestes combustíveis reduz a sua estabilidade uma vez que induz a formação de gomas através de reações de polimerização (CUNHA, 2016).

Além disso, esses compostos aromáticos nitrogenados, principalmente os NHPAs, assim como seus precursores HPAs apresentam toxicidade e são prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Conforme comentado anteriormente, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (2008), listou alguns derivados de acridina, bem como o composto 1-nitronaftaleno como potenciais mutagênicos e carcinogênicos. Além disso, a Agência Internacional de Estudos sobre o Câncer - IARC, cita em sua monografia publicada em 2013 o potencial carcinogênico do carbazol e derivados, bem como algumas acridinas. Na literatura podem ser encontrados muitos estudos cujo foco principal é identificar e quantificar esses compostos nas mais diversas frações do destilado.

Como exemplo, Oliveira e colaboradores (2004) usaram cromatografia líquida preparativa para a separação de compostos nitrogenados em uma amostra de gásóleo pesado de petróleo brasileiro. Inicialmente ocorreu um pré-fracionamento empregando óxido de alumínio como fase estacionária e os compostos foram separados em hidrocarbonetos, resinas e asfaltenos. A fração de resinas foi novamente fracionada em sílica modificada e resinas de troca iônica, sendo isolados os compostos básicos e neutros, que foram então analisados por cromatografia gasosa acoplada a detecção por massas (GC-MS). Quinolinas, benzoquinolinas, tetra-hidroquinolinas foram encontradas na fração básica e derivados de carbazóis na fração neutra.

Já Luz; Gonsalvez; Aucélio (2009) investigaram a presença dos compostos 7,8-benzoquinolina, 7,9-dimetilbenzo[c]acridina, 9-amino-1,2,3,4-tetrahidroacridina, 9-metilacridina, acridina, e dibenz[a,j]acridina em querosene de aviação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (HPLC-FD). O preparo da amostra foi realizado em uma única etapa, utilizando uma resina de troca catiônica. Os autores confirmaram a presença dos compostos 7,8-benzoquinolina e 7,9-dimetilbenzo[c]acridina.

No trabalho desenvolvido por Cunha e colaboradores (2016), os autores separaram e quantificaram NHPAs como carbazóis, quinolinas, indóis, anilinas e acridinas em frações de diesel e gásóleo. Para isso usaram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência (FD) e ultravioleta (UV)

usando como preparo das amostras de combustível a microemulsão livre de detergente (DME, do inglês, *detergentless microemulsion*). Os autores encontraram limites de quantificação na ordem de $\mu\text{g. L}^{-1}$ e as recuperações foram de 89,5% e 108,7%.

Nascimento e colaboradores (2015a) investigaram a presença de sete NHPAs e cinco OHPAs em frações de asfalto brasileiro utilizando HPLC-MS/MS. Foi feito um fracionamento do ligante em maltenos e asfaltenos e posteriormente a fração maltênica foi novamente dividida em frações ácidas, básicas e neutras, conforme o método de Green. Os autores encontraram os compostos quinolina e 2-nitrofluoreno na matriz estudada.

Claussen, (2017) avaliou o comportamento de cimento asfáltico de petróleo frente a modificações sofridas durante o envelhecimento para HPAs e seus derivados oxigenados e nitrogenados, bem como para alguns metais. Para isso, o autor separou as amostras (virgens e envelhecidas) em frações ácidas, básicas e neutras de maltenos e asfaltenos. Em seguida, foi desenvolvido um método de limpeza da amostra para análise de HPAs e derivados por HPLC-MS/MS. Os resultados mostraram que os HPAs estão mais concentrados na fração maltênica neutra e NHPAs e OHPAs nas frações asfaltênicas ácida e básica das amostras (virgens e envelhecidas). Com o processo de envelhecimento, os NHPAs e os OHPAs são os que mais se alteram, principalmente na fração ácida, sendo considerados pelo autor marcadores nesse processo.

2.3.2 Classificação química dos compostos nitrogenados oriundos de combustíveis fósseis

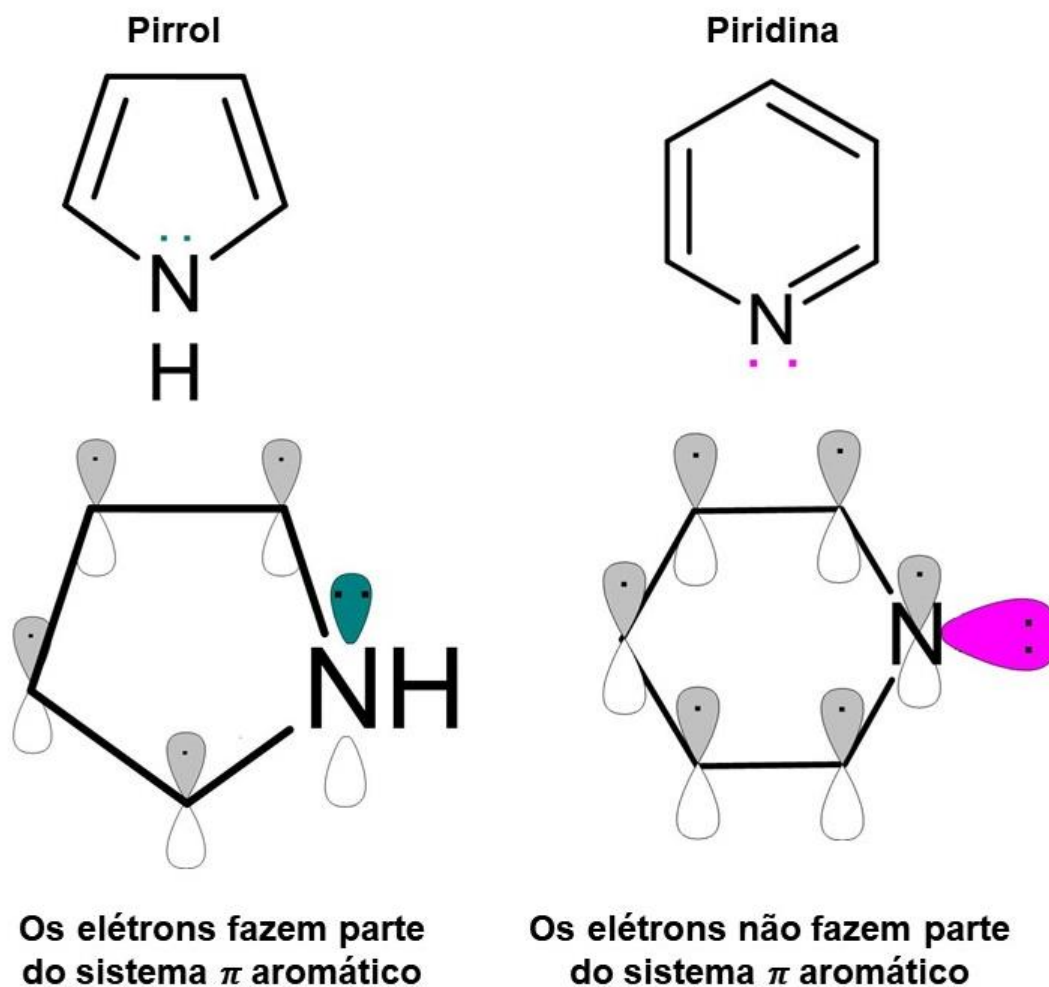
Os compostos nitrogenados oriundos dos combustíveis fósseis apresentam-se majoritariamente como uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contendo pelo menos um átomo de nitrogênio. Conforme explica Maciel (2016), eles podem ser classificados de acordo com suas características químicas em compostos pirrólicos (de caráter neutro/fracamente básico) ou piridínicos (de caráter básico).

Os compostos pirrólicos ou de caráter neutro/fracamente básico são assim classificados pois o par de elétrons livres no átomo de nitrogênio faz parte do sistema π aromático, estando menos apto a doação eletrônica. Dentre os compostos dessa classe vale citar os derivados de indol, que são formados por um anel pirrólico

acoplado a um anel benzênico. Outro exemplo são os derivados de carbazol, que possuem uma estrutura tricíclica, contendo um anel pirrólico fundido entre anéis benzênicos (SILVA, 2014).

Já os compostos piridínicos de caráter básico são assim classificados porque o par de elétrons do nitrogênio não faz parte do sistema π aromático. Nessa classificação, vale citar os derivados de quinolina e isoquinolina, também conhecidos como benzopiridinas. Esses compostos possuem um anel benzênico e outro piridínico em sua estrutura (SILVA, 2014). A figura 8 apresenta um esquema onde é possível observar a diferença da interação do par de elétrons livres do nitrogênio em relação ao sistema π aromático para os casos de compostos com núcleos pirrólicos e piridínicos, sintetizando o que foi acima comentado.

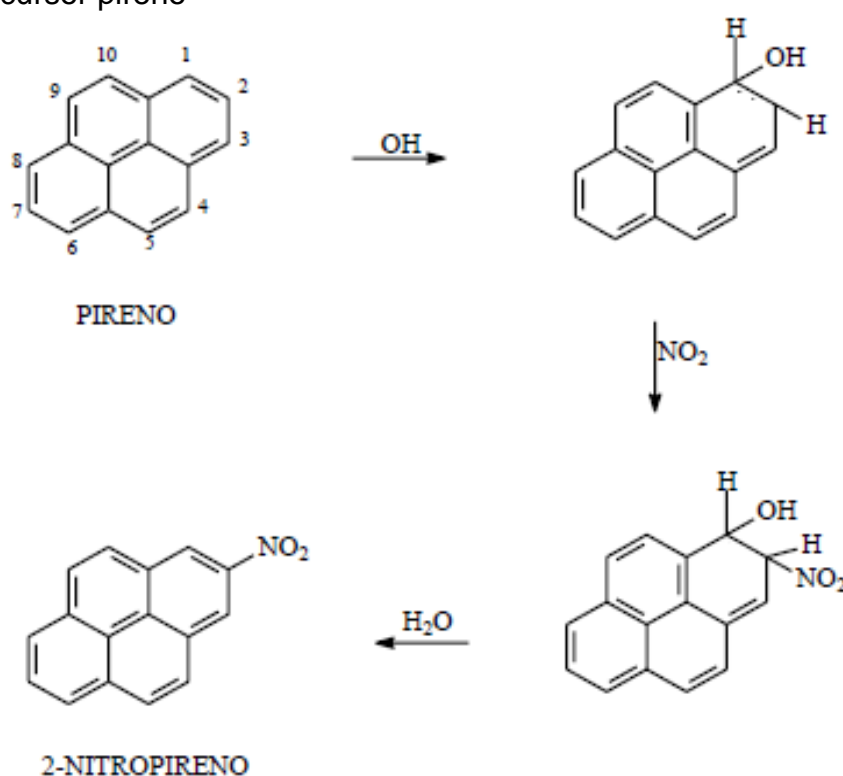
Figura 8 – Diferença na interação do par de elétrons livres do nitrogênio com o sistema π aromático do núcleo pirrólico e do núcleo piridínico



Fonte: (AUTOR).

Nitrocompostos também podem ser encontrados em derivados de combustíveis fósseis. De acordo com Zhang e colaboradores (2011), isso ocorre principalmente por causa combustão incompleta de matéria orgânica e ainda através de reações atmosféricas entre HPAs e espécies oxidativas como O_3 , OH e NO_x . Pitts e colaboradores (1985) propuseram o mecanismo de formação de alguns nitro HPAs a partir de seus precursores HPAs, conforme pode ser observado na figura 9 para o 2-nitropireno.

Figura 9 – Proposta de mecanismo de formação do composto 2-nitropireno a partir de seu precursor pireno



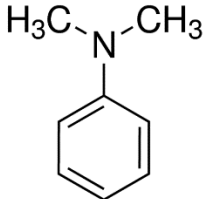
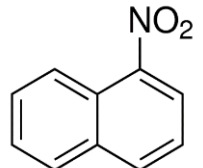
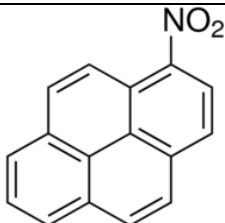
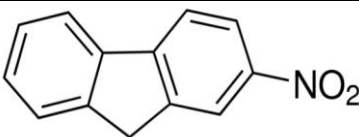
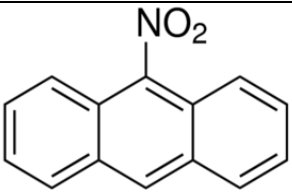
Fonte: (Adaptado de Claussen, 2017).

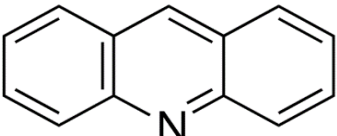
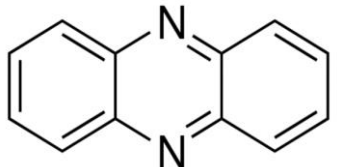
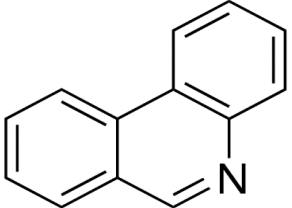
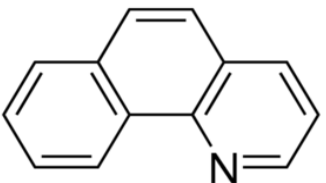
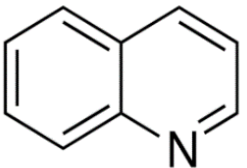
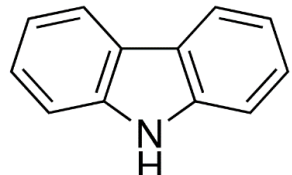
Conforme detalhado anteriormente, os trabalhos desenvolvidos por Nascimento e colaboradores (2015) e Claussen (2017) iniciaram a busca pelos NHPAs em matrizes asfálticas. No entanto, levando em consideração que a presença dos compostos aromáticos contendo nitrogênio em matrizes asfálticas revela informações a respeito da estrutura do ligante e ainda, quando emitidos esses compostos causam danos para os seres humanos e meio ambiente, é eminente a necessidade de um constante desenvolvimento de estratégias capazes de identificar essas estruturas nas frações do CAP, quer na sua forma fixa, quer na sua forma

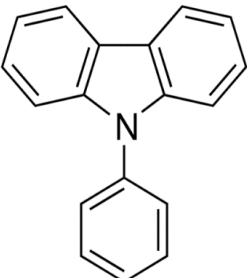
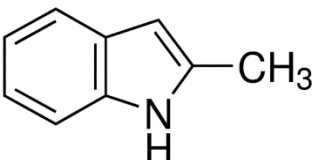
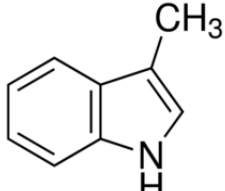
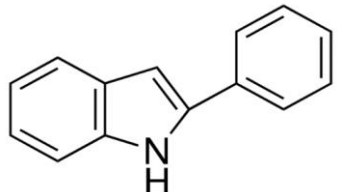
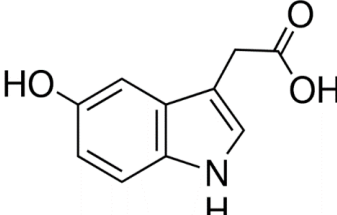
volátil. Sendo assim, o presente trabalho buscou a ampliação dos compostos até aqui relatados a fim de continuar essa investigação.

Em adição, os estudos previamente citados que buscaram mapear a presença de compostos aromáticos nitrogenados nas mais diversas frações do destilado de petróleo (CUNHA et al., 2016; LUZ; GONSALVEZ; AUCÉLIO, 2009; OLIVEIRA et al., 2004) possibilitaram a realização de um levantamento dos compostos frequentemente encontrados nessas frações e, uma vez agrupados, foram investigados pelo presente trabalho em matrizes asfálticas. Os compostos agrupados, sendo eles representantes das classes de núcleo pirrólico, piridínico e nitrocompostos podem ser visualizados na tabela 1, juntamente com a fórmula molecular, fórmula estrutural e características físico-químicas:

Tabela 1 – Nome, fórmula molecular, fórmula estrutural e características físico-químicas dos NHPAs estudados

Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	MM g.mol ⁻¹	PE (°C)	PF (°C)	pKa
N,N-dimetilanilina	C ₈ H ₁₁ N		121,18	192-195	2,5	7,1
1-nitronaftaleno	C ₁₀ H ₇ NO ₂		173,17	304	59-61	
1-nitropireno	C ₁₆ H ₉ NO ₂		247,25		153-155	
2-nitrofluoreno	C ₁₃ H ₉ NO ₂		211,22		158,0	
9-nitroantraceno	C ₁₄ H ₉ NO ₂		223,23		137-139	

Acridina	$C_{13}H_9N$		179,22	346	107	5,6
Fenazina	$C_{12}H_8N_2$		180,21	357,2	172-176	
Fenantridina	$C_{13}H_9N$		179,21	348,9	107,4	
Benzo[h]quinolina	$C_{13}H_9N$		179,22	339,0	52,0	4,7
Quinolina	C_9H_7N		129,16	238	238	4,9
Carbazol	$C_{12}H_9N$		167,20	354,69	246,3	12,1

9-fenilcarbazol	$C_{18}H_{13}N$		243.30		95-97	
2-metilindol	C_9H_9N		131,17	272,0	61,0	17
3-metilindol	C_9H_9N		131,17	265,00	93-95	17
2-fenilindol	$C_{14}H_{11}N$		193.25	250	190,5	
5-hidroxi-indol-3-ácido acético	$C_{10}H_9NO_3$		191,18		161-163	

Fonte: (AUTOR).

2.3.3 Uso da cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta para separação de compostos aromáticos nitrogenados em matrizes asfálticas

De acordo com a Internacional Agency for Research on Cancer (2013), cromatografia líquida e gasosa são as ferramentas mais comuns empregadas para a identificação e quantificação de HPAs e seus derivados no CAP, como por exemplo cromatografia líquida acoplada a detecção ultravioleta (UV) ou por fluorescência (FD) e cromatografia gasosa acoplada a detecção por massas (MS) ou ionização em chama (FID). Diferentes métodos oficiais para a análise de HPAs vêm sendo propostos, tais como: NIOSH 5506, que propõe a separação de HPAs por HPLC-FD; NIOSH 5515, que propõe a separação por GC-FID; NIOSH 5500, que propõe o uso de HPLC-FD. Ainda, de acordo com a agência, a HPLC é uma técnica de separação eficiente para a determinação de HPAs em matrizes complexas e permite quantificação quando acoplada a detectores seletivos.

Vale ressaltar que a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. O princípio é o mesmo de uma extração, por exemplo, no entanto, uma das fases é mantida fixa (a fase estacionária), enquanto a outra se desloca (a fase móvel). A cromatografia pode ser dividida com base no mecanismo de separação em: a) adsorção ou líquido-sólido; b) partição ou líquido-líquido; c) troca iônica; d) exclusão molecular e e) afinidade (HARRIS, 2012).

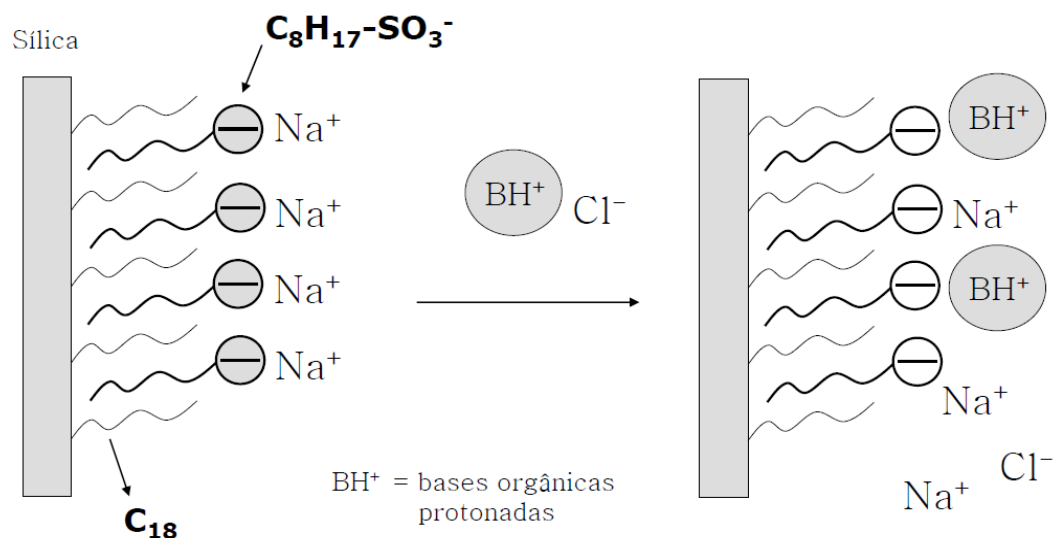
De acordo com Skoog (2007), a cromatografia de partição em fase reversa (RPC, do inglês, *reverse phase chromatography*) é uma das mais usadas em separações por HPLC. Esse mecanismo de separação é geralmente a primeira escolha quando a separação de amostras neutras e iônicas é necessária. Para isso, usa-se uma coluna cromatográfica recheada com uma fase estacionária menos polar, como C₈ e C₁₈ em comparação a fase móvel, que geralmente é uma mistura de água com um solvente orgânico como acetonitrila (SNYDER, 2010).

Quando a cromatografia em fase reversa não é suficiente para a separação porque os analitos são fracamente retidos na fase estacionária, por exemplo, mudanças no pH e o uso da cromatografia de par iônico (IPC, do inglês, *ion pair chromatography*) são ferramentas alternativas muito úteis (SNYDER, 2010). A essência da separação por IPC consiste em uma modificação da superfície de uma

coluna de fase reversa através da inserção de um sal chamado reagente de par iônico (CECCHI, 2008).

O mecanismo de separação por pareamento iônico pode ser entendido da seguinte maneira: primeiramente, pode-se pensar que o contra-íon (porção orgânica do sal) é retido fortemente pela fase estacionária, atribuindo carga a mesma. A separação dos íons do soluto de carga oposta ocorre por formação de complexos de pares iônicos. Os solutos mais retidos formam os complexos mais fortes com a fase estacionária. Vale pensar também que o contra-íon forma um par iônico não carregado com o soluto de carga oposta na fase móvel. Esse par iônico particiona-se na fase estacionária (que nesse caso é apolar), e isso gera uma retenção diferencial dos solutos com base na afinidade do par iônico pelas duas fases (SKOOG, 2007). Um exemplo hipotético de separação por IPC pode ser visto no esquema da figura 10.

Figura 10 – Esquema de separação pelo mecanismo de par iônico



Fonte: (Adaptado de HARRIS, 2012).

Por fim, outro ponto chave na análise cromatográfica, além da seleção adequada do método de separação, consiste também na escolha da detecção (KROMIDAS, 2017). Dentre as características desejáveis para um detector em HPLC podem ser mencionadas a resposta sensível aos solutos investigados, não ser afetado por mudanças na temperatura ou fluxo, ter resposta independente da fase móvel, não contribuir para o alargamento de pico extra-coluna, etc. (SNYDER, 2010). Um dos detectores mais comuns em HPLC baseia-se no princípio da

absorção de luz na região do ultravioleta pelos solutos. Uma vez que muitos compostos orgânicos com grupos cromóforos absorvem luz nessa região de acordo com a Lei de Beer, onde a concentração da amostra em estudo está relacionada linearmente com a luz absorvida, o uso desse tipo de detector é uma estratégia interessante na análise de compostos aromáticos nitrogenados (CORRADINI, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

As análises cromatográficas foram conduzidas em um sistema de HPLC-DAD da Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, EUA), modelo 1260 Infinity, capaz de operar em pressões de até 600 bar. O cromatógrafo, permite separação por gradiente e é equipado com bomba quaternária e injeção automática. O compartimento da coluna possui um forno termostático de temperatura controlável. O software Agilent® OpenLab CDS EZChrom foi utilizado para controle instrumental e análise de dados. Para desenvolvimento do método e análise das amostras foi utilizada uma coluna cromatográfica em fase reversa do tipo Pursuit PAH da Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, EUA) com dimensões de 100 x 4,6 mm e tamanho de partícula 3 µm. Uma pré-coluna Eclipse Plus C₁₈ Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, EUA), com dimensões de 4,6 x 5 mm e tamanho de partícula 1,8 µm também foi usada.

Durante a rotina laboratorial, foi utilizado um sistema de filtração a vácuo de vidro e membranas de celulose Unifil AC 0,47mm, 0,22 µ (para filtração da fase móvel aquosa) e Unifil RC 0,47mm, 0,45 µ (para filtração da fase móvel orgânica); o pHmetro digital Metrohm® (Herisau, Suíça) foi utilizado para as medidas de pH da fase móvel; uma cuba ultrassônica foi utilizada para degaseificação da fase móvel; uma balança analítica Shimadzu® (Quioto, Japão), com quatro casas de precisão foi utilizada para pesagem de padrões analíticos e reagentes; os micropipetadores automáticos (10-100 µL e 100-1000 µL) Brand foram utilizados para o preparo de soluções padrão e amostras. Por fim, os procedimentos analíticos como limpeza dos materiais e preparação da fase móvel foram realizados com água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q, modelo Synergy UV 18,2 MΩ cm⁻¹, Millipore (Bedford, EUA).

As análises de massas de caráter confirmatório foram realizadas no laboratório do Instituto SENAI de Tecnologia Ambiental, localizado em Blumenau – SC, usando um cromatógrafo da Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, EUA), modelo 1260 Infinity, controlado pelo software Agilent® MassHunter Workstation Data Acquisition. Os compostos foram ionizados por uma lâmpada de criptônio em uma fonte de fotoionização à pressão atmosférica (APPI) da Agilent Technologies®, (Santa Clara, CA, EUA) modelo PhotoMate e analisados em sequência por um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, USA) modelo 6420 TripleQuadrupole, operando no modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), no modo positivo/ negativo. Vale comentar que as análises foram realizadas sem o uso de coluna cromatográfica, sendo injetadas as amostras diretamente na fonte APPI em um volume de 5 µL.

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões analíticos aromáticos nitrogenados usados neste estudo foram escolhidos com base em trabalhos anteriores envolvendo matrizes semelhantes – como outros derivados pesados do petróleo. São eles: acridina, N,N-dimetil-anilina, 9-nitroantraceno, carbazol, 9-fenilcarbazol, fenantridina, fenazina, 2-nitrofluoreno, 2-fenilindol, 2-metilindol, 3-metilindol, 5-hidroxi-indol-3-ácido acético, 1-nitronaftaleno, 1-nitropireno, quinolina e benzo[h]quinolina. Todos eles, com alto grau de pureza (pelo menos 95%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Soluções estoque em concentração de 2000 mg. L⁻¹ de cada um dos compostos foram preparadas de forma individual em metanol e armazenadas sob refrigeração em uma temperatura de -30 C°. As soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque de acordo com a necessidade.

Os solventes acetonitrila e metanol grau HPLC, utilizados para preparo de fase móvel e dos padrões analíticos foram adquiridos da J.T.Baker® (EUA) e Panreac (Castellar del Vallès, Espanha). O ácido ortofosfórico (H₃PO₄) (85% w/v) utilizado para ajuste de pH da fase móvel foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). O reagente de par iônico octil sulfato de sódio (SOS) P.A. utilizado como aditivo de fase móvel foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA).

O material de referência certificado, SRM 1975, foi adquirido do National Institute of Standards and Technology – NIST (Gaithersburg, MD, EUA). O SRM consiste em

um extrato particulado de diesel e apresenta valores certificados para 8 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e valores não certificados (recomendados) para 23 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e 19 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados adicionais.

3.3 AMOSTRAS

As amostras de material particulado utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Essas amostras são emissões que foram coletadas durante o processo de usinagem de misturas asfálticas, provenientes de duas usinas pertencentes a uma mesma indústria, localizadas na Região Metropolitana de Fortaleza, no Ceará. Durante a amostragem, diferentes misturas asfálticas foram usinadas, mas todas elas fizeram uso do mesmo ligante asfáltico (CAP 50/70), produzido na refinaria local.

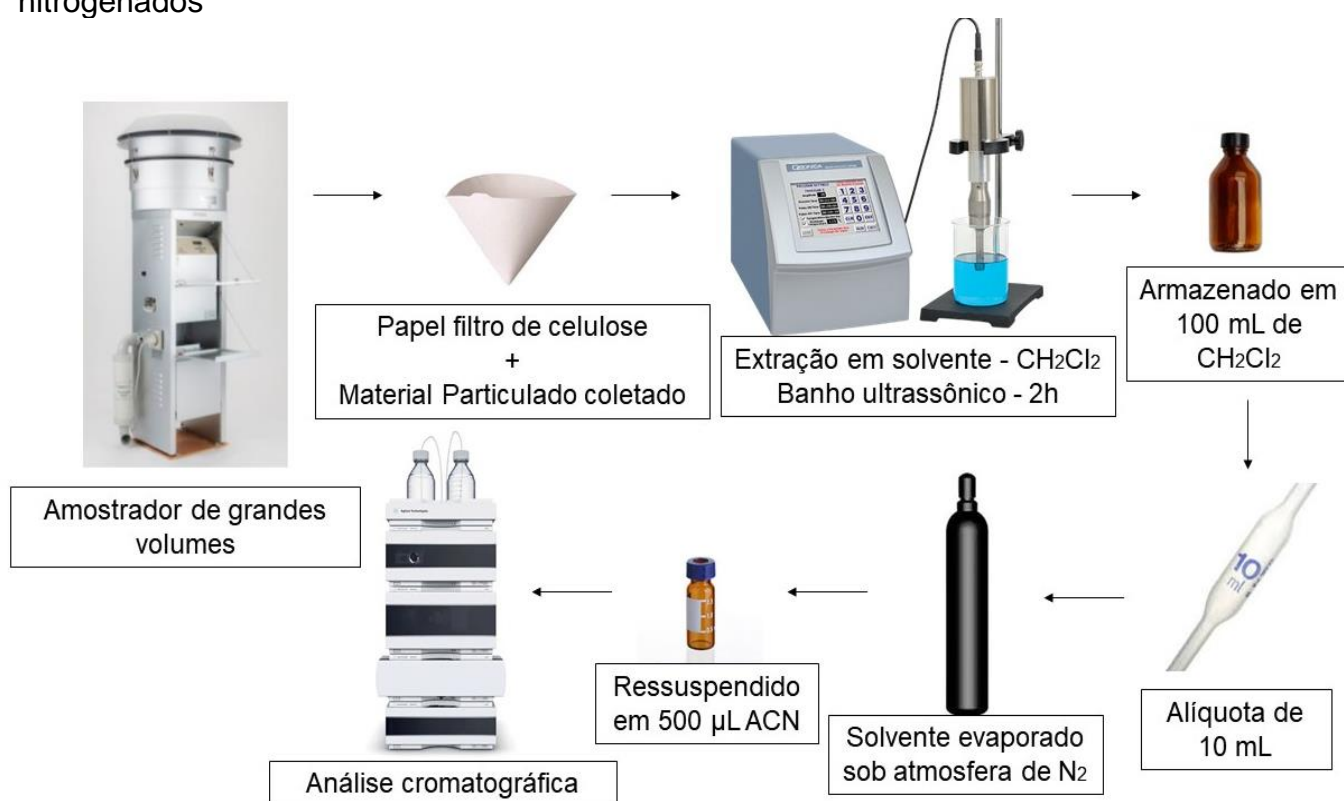
Já as amostras de asfalto utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) – Petrobrás, e advêm de diferentes refinarias brasileiras e americanas. Das amostras de asfalto disponíveis, foram escolhidas três delas de acordo com os critérios: (a) a amostra aqui denominada CAP-1 foi escolhida por ser uma amostra brasileira com alto teor de nitrogênio total; (b) a amostra CAP-2 foi escolhida por ser uma amostra brasileira proveniente da mesma refinaria que produziu o ligante usinado na coleta do material particulado e (c) a amostra Ca Coast (MRL Code AAD-1) foi escolhida por ser uma amostra americana certificada também com alto teor de nitrogênio total.

3.3.1 Preparo das amostras de material particulado

Durante a coleta, as amostras foram obtidas por meio de amostragem ativa, que é quando o material particulado do ar é sugado por uma bomba para o interior de um equipamento chamado amostrador de grandes volumes (Sistema HiVol). O amostrador foi distribuído em pontos estratégicos da usina durante um tempo de amostragem de 3 horas, conforme detalha Barbosa (2018), gerando 23 coletas analisadas pelo presente trabalho. Esse equipamento é munido de um separador inercial que faz a seleção das partículas de interesse (nesse caso MP₁₀), que são então coletadas em um papel filtro. Para este trabalho um papel filtro de celulose foi

pesado antes e depois de cada coleta para estimar a quantidade de MP obtida. O conteúdo do filtro foi extraído com diclorometano em banho ultrassônico por duas horas, conforme adaptação da ideia proposta por Heikilla e colaboradores (2002), e concentrado em 100 mL do solvente. Para análise cromatográfica, uma alíquota de 10 mL dessa solução foi evaporada sob atmosfera de N_2 e o conteúdo restante foi ressuspenso em 500 μ L de acetonitrila, para ser então analisado pelo método em fase reversa. O esquema da figura 11 resume de forma visual o processo aqui detalhado para o preparo das amostras de MP.

Figura 11 – Preparo das amostras de MP para determinação de compostos nitrogenados



Fonte: (AUTOR)

3.3.2 Preparo das amostras de asfalto

O preparo das amostras de asfalto foi conduzido de acordo com Carvalho e colaboradores (2015), que adaptaram para a análise de amostras de asfalto brasileiras o método ASTM D4124 aliado ao método proposto por Green e colaboradores (1984). Sendo assim, as amostras de asfalto foram primeiramente fracionadas em maltenos e asfaltenos, com base no método ASTM D4124. Para este ensaio, aproximadamente 2 g de cada amostra foram mantidos sob agitação e

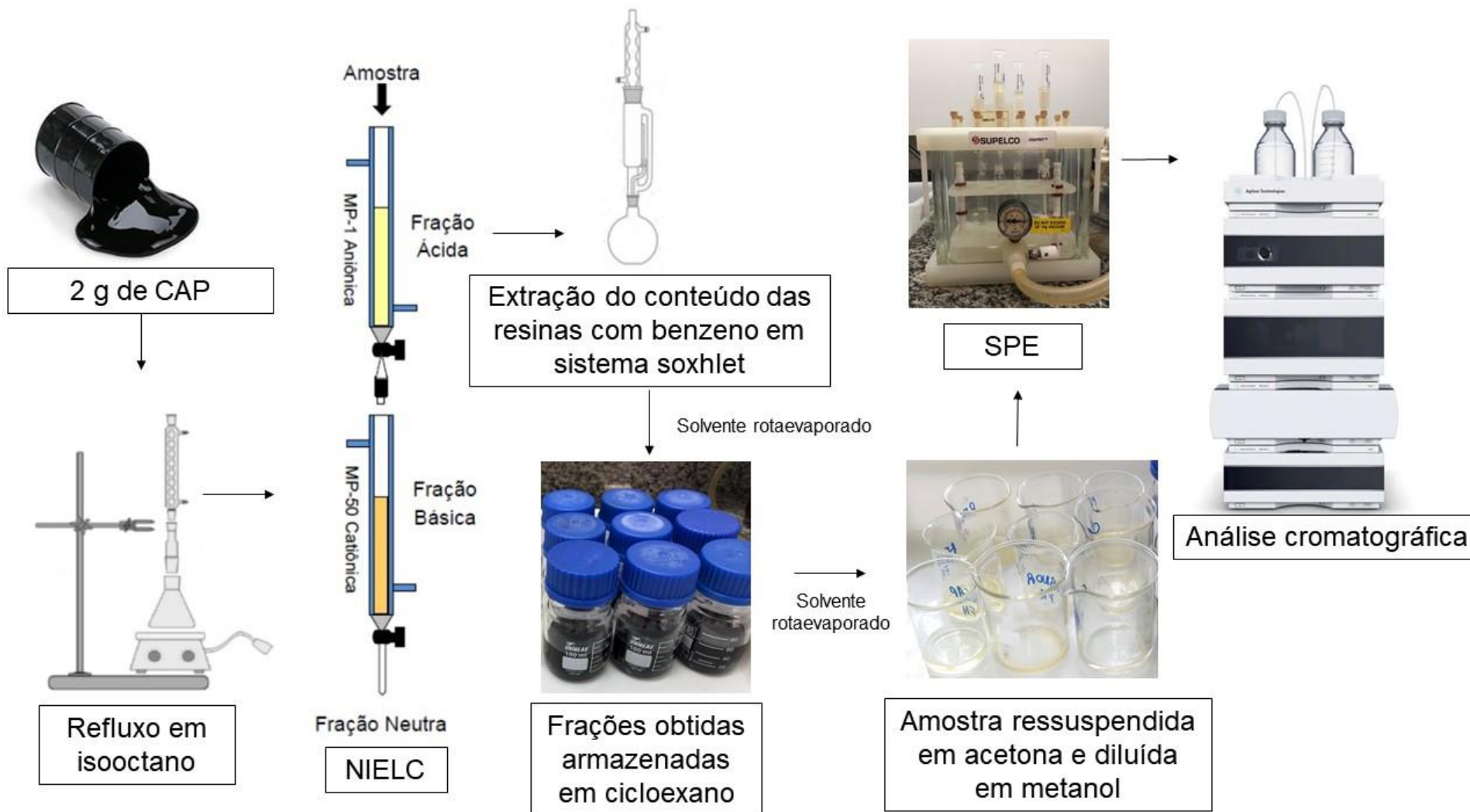
refluxo com isooctano por duas horas e posterior agitação à frio por mais duas horas. Após filtração, foram obtidos os asfaltenos, insolúveis em isooctano e fração de interesse para este estudo. O sólido resultante foi pesado e armazenado em cicloexano. A fração maltênica não foi usada neste trabalho.

Após esta etapa, a fração asfaltênica foi novamente dividida em frações ácidas, básicas e neutras, de acordo com o método de cromatografia líquida de troca iônica em meio não aquoso (NIELC), desenvolvido por Green e colaboradores (1984). Para este ensaio, duas colunas, uma recheada com uma resina de troca aniônica e outra com resina catiônica (previamente ativadas) foram conectadas em série e condicionadas com cicloexano. Sobre o topo da primeira coluna, foi vertida a fração asfaltênica resultante da etapa anterior, sendo eluída com cicloexano. Desse modo, obtiveram-se as frações ácida na coluna de troca aniônica e básica na coluna de troca catiônica. A fração da amostra que não interagiu com as resinas foi a fração neutra, recolhida no final do processo. As frações ácida e básica ligadas às resinas foram extraídas em um sistema de soxhlet com um ácido e base em benzeno, respectivamente. Após obtenção, as três frações foram rotaevaporadas, pesadas e armazenadas em 60 mL de tolueno.

Uma vez obtidas as frações ácidas, básicas e neutras de asfaltenos das amostras 1, 2 e 3, resultando em 9 subfrações, procedeu-se a limpeza de cada uma delas usando um método de extração em fase sólida (SPE, do inglês, *solid phase extraction*) previamente descrito por Silveira e colaboradores (2017). De acordo com o método, 5 mL de cada amostra foram coletados e rotaevaporados até a eliminação do solvente. O material resultante foi então redissolvido em acetona e diluído 1:1 (v/v) em metanol. Foram transferidos 5 mL desta solução para um cartucho de amonipropil de extração em fase sólida, previamente condicionado com 5 mL de metanol e 3 mL de acetona. A extração foi feita em um Manifold Visiprep™ da Supelco Sigma Aldrich Co., sob fluxo de 1.5 mL.min⁻¹ e vácuo de -5 kPa. Após essa etapa, as amostras foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 µm, armazenadas em frasco âmbar e mantidas sob refrigeração de -30°C até análise cromatográfica pelo método em fase reversa.

Na figura 12 encontra-se um esquema que resume de forma visual o processo aqui detalhado para as amostras de CAP de forma a facilitar o entendimento acerca das etapas necessárias.

Figura 12 - Preparo das amostras de CAP para determinação de compostos nitrogenados



Fonte: (AUTOR).

3.4 CONDIÇÕES E DETERMINAÇÕES POR HPLC-DAD

Os compostos aromáticos nitrogenados foram separados por HPLC-DAD usando dois mecanismos de separação diferentes, um deles baseado em fase reversa e o outro em pareamento iônico – o que originou dois métodos analíticos complementares. Os parâmetros experimentais avaliados para o método em fase reversa foram: proporção de modificador orgânico da fase móvel, gradiente de eluição da fase móvel, pH e concentração de ácido fosfórico da fase móvel, fluxo de fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda. De forma semelhante ocorreu a avaliação para o método baseado no mecanismo de par iônico. Nesse último, ainda, foi avaliada a concentração do aditivo de par iônico.

O método baseado no mecanismo de separação por fase reversa consiste em um gradiente de eluição e fluxo, onde a proporção de modificador orgânico e o volume de eluente são variados linearmente com o tempo de análise decorrido. Para o método em questão, uma mistura binária de solventes é utilizada, sendo eles: ácido fosfórico em concentração de 0,5 mM e acetonitrila. O gradiente utilizado pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2 – Gradiente de eluição e fluxo para a separação dos compostos nitrogenados pelo mecanismo de fase reversa

Tempo (min)	H ₃ PO ₄ 0,5 mM (%)	ACN (%)	Fluxo (mL.min ⁻¹)
0	60	40	1,2
10	60	40	1,2
15	60	40	1
45	30	70	2

Fonte: (AUTOR).

O método baseado no mecanismo de par iônico consiste também em um gradiente de eluição, onde há variação da proporção de uma mistura binária de solventes. No entanto, agora a mistura binária consiste em ácido fosfórico em concentração de 1 mM e acetonitrila aditivada com 2 mM de octil sulfato de sódio – o reagente de par iônico. A tabela 3 descreve o gradiente utilizado para análise dos compostos aromáticos nitrogenados por HPLC-DAD neste método.

Tabela 3 – Gradiente de eluição para a separação dos compostos nitrogenados pelo mecanismo de par iônico

Tempo (min)	H ₃ PO ₄ 1 mM (%)	ACN + SOS 2 mM (%)	Fluxo (mL.min ⁻¹)
0	50	50	0,5
15	50	50	0,5
50	30	70	0,5

Fonte: (AUTOR).

Durante o desenvolvimento do trabalho, diariamente, a coluna era submetida a condição inicial do método em questão durante 30 minutos para estabilização e então, após esse tempo, 5 µL das soluções de trabalho eram injetadas de forma automática. Durante as corridas cromatográficas, o compartimento da coluna era mantido em uma temperatura de 30°C. Entre uma análise e outra, foi utilizado um tempo de 5 minutos para reequilíbrio do sistema. A detecção foi conduzida em um comprimento de onda de 245 nm. Uma solução contendo uma mistura de todos os 16 compostos aromáticos nitrogenados em uma concentração de 2 mg. L⁻¹ cada foi utilizada para os ensaios de otimização.

3.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE FASE REVERSA E DE PAR IÔNICO

Os métodos desenvolvidos foram validados através da determinação dos seguintes parâmetros de mérito: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão. Esses parâmetros foram avaliados de acordo com as instruções do INMETRO (2020). A linearidade foi obtida pela confecção de uma curva analítica, feita através da medida de nove níveis de concentração de cada um dos compostos. A linearidade da curva analítica foi então considerada utilizando valores de coeficientes de correlação linear maiores que 0,99, determinados pelo método dos mínimos quadrados. Para o cálculo do LD e LQ, foi construída uma curva analítica contendo os compostos em uma faixa próxima ao limite de detecção. O LD e LQ foram então calculados a partir dessa curva analítica, usando os valores de $3,3\sigma$ e 10σ , respectivamente. O valor de σ foi obtido pela divisão do desvio padrão de sete replicatas da medida da linha base pela inclinação da curva analítica (coeficiente angular) de cada composto nitrogenado. A precisão foi avaliada através do desvio padrão relativo (RSD) da medida de cinco níveis de concentração de cada um dos compostos, feita em triplicata. A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação (expressos em %), onde os padrões dos

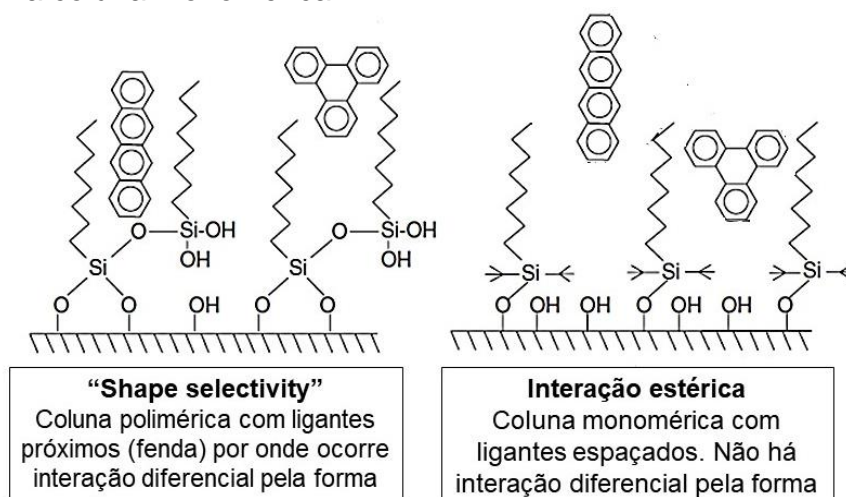
compostos foram adicionados à uma amostra de asfalto e uma amostra de material particulado isentas dos mesmos em três diferentes níveis de concentração (baixo, médio e alto) da faixa de uso do método, em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO EM FASE REVERSA

Sabe-se que a maneira mais efetiva de melhorar a resolução de uma separação por cromatografia é por meio da otimização da seletividade (SNYDER, 2010). Sendo assim, o primeiro parâmetro considerado foi a escolha da coluna cromatográfica. Colunas poliméricas de alquilsílica são conhecidas na literatura por propiciarem retenção diferenciada de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) planares através de uma “shape selectivity”, ou seja, interação preferencial desses HPAs por meio de ranhuras presentes na fase estacionária (SANDER; WISE, 1993). Levando em consideração que os compostos alvo deste trabalho são em sua maioria HPAs planares, conforme pode ser observado na tabela 1, escolheu-se a fase estacionária polimérica para desenvolvimento do método. Um comparativo hipotético dessa interação soluto-fase estacionária para dois HPAs em uma coluna monomérica *versus* coluna polimérica pode ser observado na figura 13. Ainda, vale comentar que colunas com diâmetro de 100 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 3 μm fornecem número de pratos (N) adequado para os interesses dessa separação (N~11000).

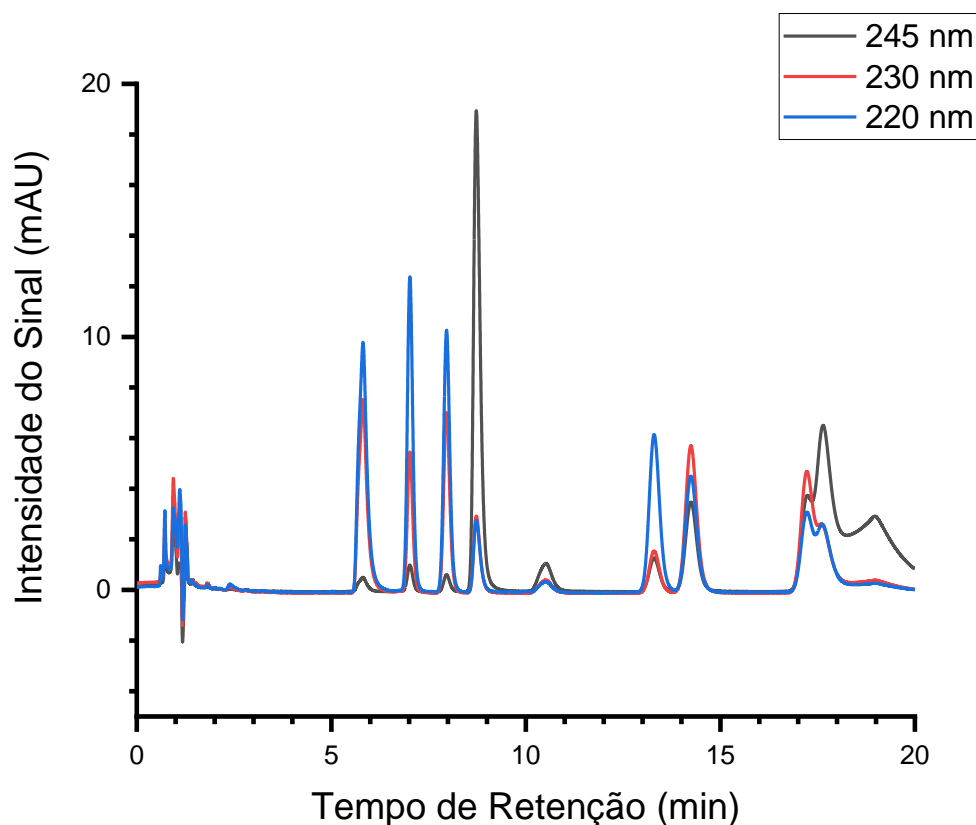
Figura 13 – Comparativo da interação soluto-fase estacionária entre uma coluna polimérica e uma coluna monomérica



Fonte: (Adaptado de SNYDER, 2010).

O segundo passo foi a escolha dos solventes, sendo definidos água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) como a mistura binária inicial. A acetonitrila foi escolhida como modificador orgânico por seu caráter dipolar, promovendo interações interessantes com alguns grupos funcionais dos compostos em estudo (SNYDER, 2010). Inicialmente, foram feitos testes no modo isocrático, onde diferentes proporções de B foram experimentadas a fim de explorar o fator de retenção dos solutos, variando de fases móveis com 30% B à 90% B. Mesmo na melhor das condições, ou seja, 40% B, a separação dos 16 compostos foi insuficiente, apresentando resolução inadequada, como pode ser observado na figura 14.

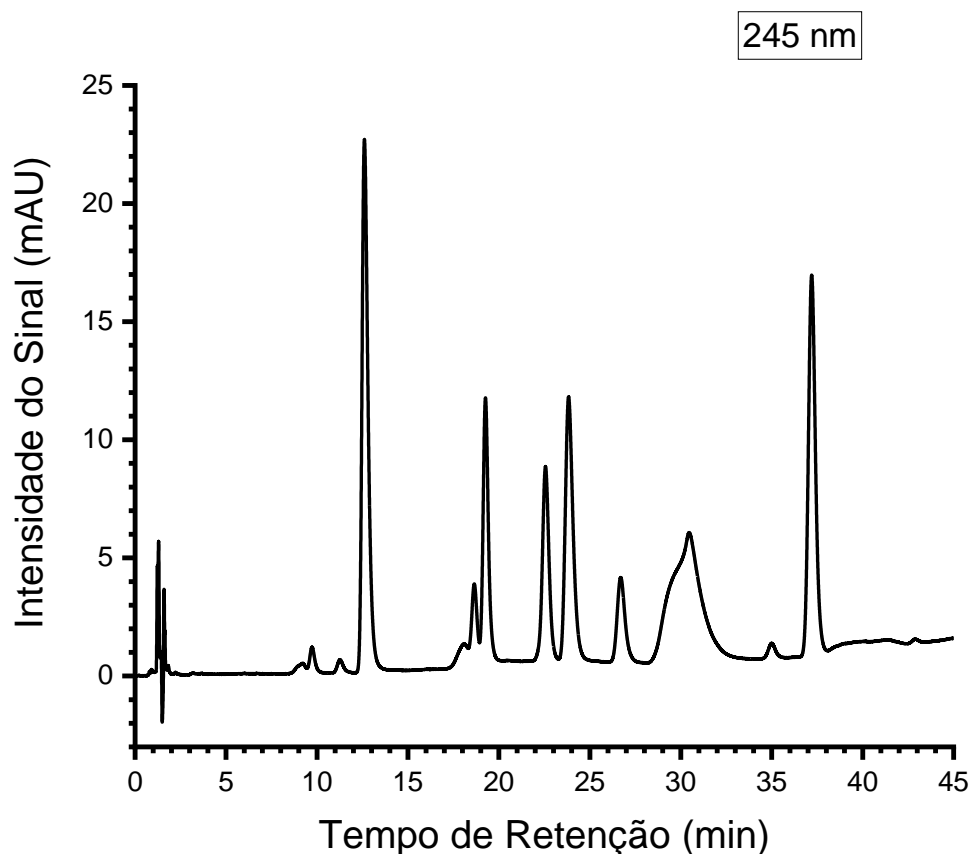
Figura 14 – Melhor separação obtida para os NHPAs na concentração de 2 mg.L^{-1} em experimento preliminar. Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 40% B, fluxo 1 mL/min. , temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: (AUTOR).

Partiu-se então para o modo gradiente de eluição, onde a melhor condição encontrada, sendo 0-15 minutos 40% B e 15-45 minutos 70% B continuava insuficiente, conforme pode ser visualizado na figura 15.

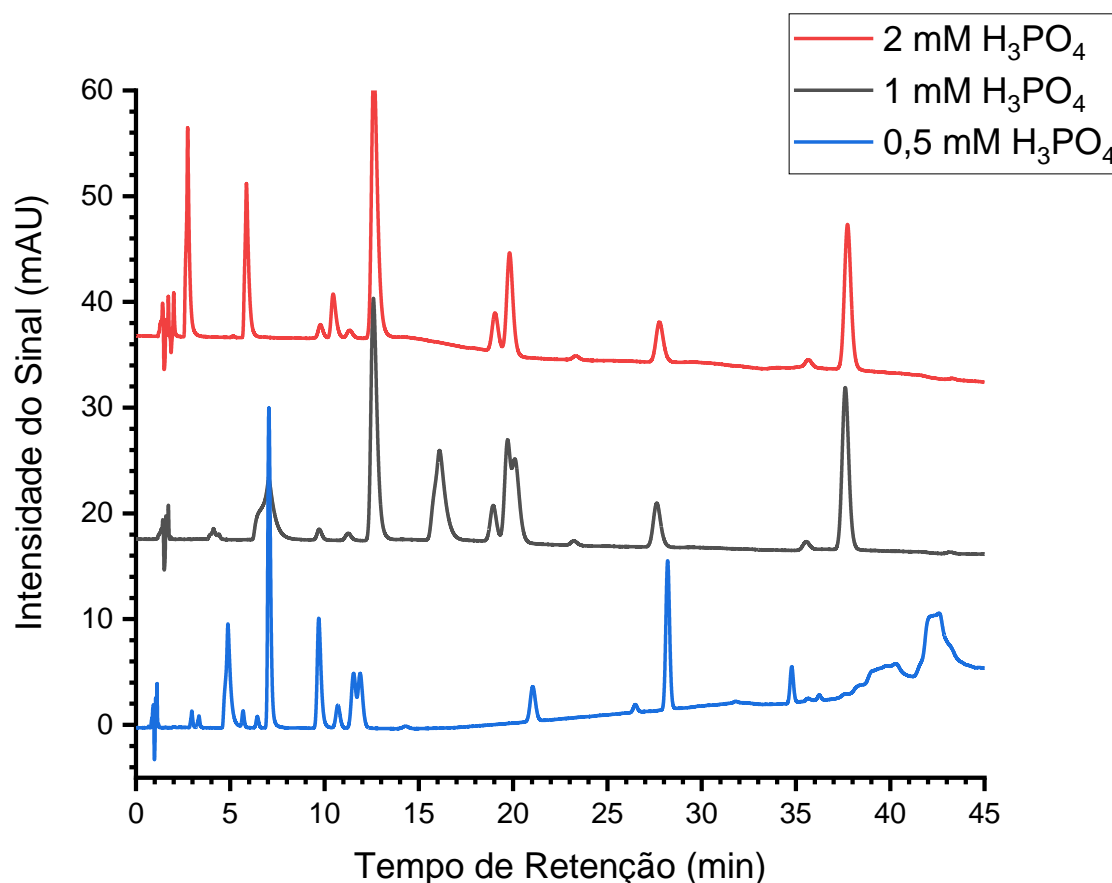
Figura 15 - Melhor separação obtida para os NHPAs na concentração de 2 mg.L⁻¹. Condições: fase reversa, eluição gradiente, fase móvel 0-15 minutos 40% B e 15-45 minutos 70% B, fluxo 1mL/min., temperatura 25 °C.



Fonte: (AUTOR).

O passo seguinte foi a modificação do pH da fase móvel. A estratégia foi o uso de um pH de fase móvel baixo, a fim de manter os compostos (básicos – valor de $pK_a \geq 5$) na sua forma protonada, diminuindo assim sua interação com a fase estacionária hidrofóbica (SNYDER, 2010; AGRAFIOTOU et al., 2011). O ácido fosfórico foi testado em diferentes concentrações, sendo elas: 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, conforme pode ser observado na figura 16. A concentração de 0,5 mM resolveu o problema, permitindo uma separação satisfatória para quatorze compostos. Dois deles não puderam ser separados, mesmo fazendo tentativas de otimização subsequentes, mas isso não chega a ser um problema, como será detalhado posteriormente.

Figura 16 – Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na concentração de 2 mg.L^{-1} quando testadas diferentes concentrações de H_3PO_4 (A). Condições: fase reversa, eluição gradiente, fase móvel 0-15 minutos 40% B e 15-45 minutos 70% B, fluxo 1 mL/min. , temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 245 nm



Fonte: (AUTOR).

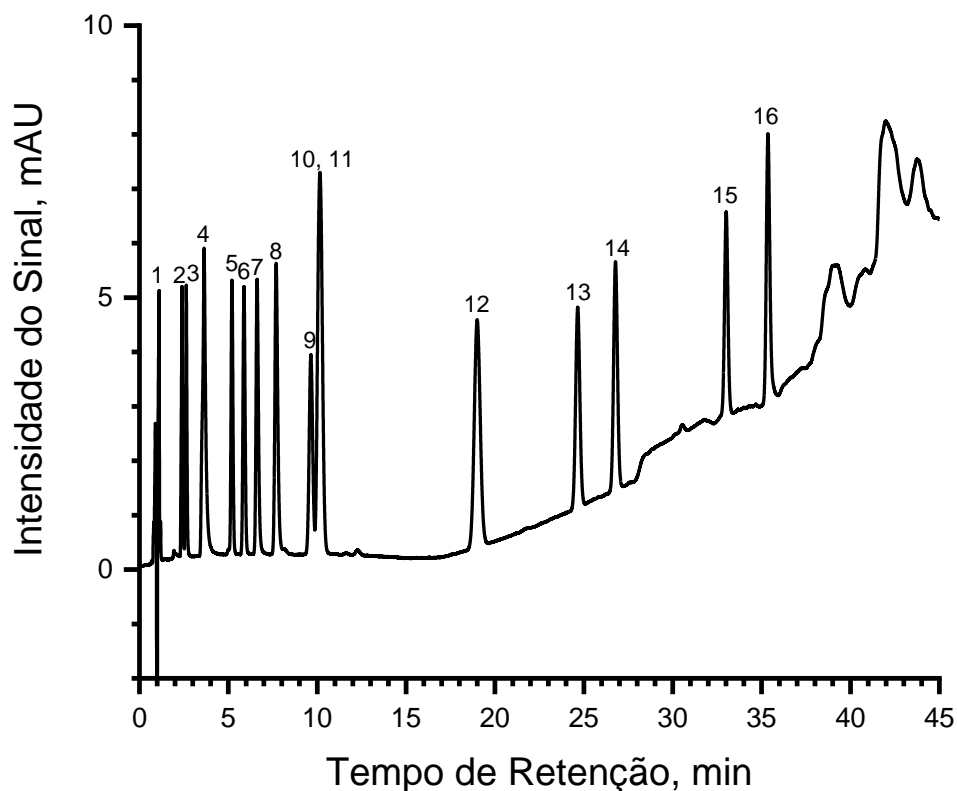
Durante o desenvolvimento do método, o fluxo foi fixado em 1 mL.min^{-1} ao longo de toda a corrida cromatográfica. Após otimização dos parâmetros comentados anteriormente, foi então feito um ajuste no fluxo da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica a fim de permitir uma resolução melhorada. A temperatura do forno do compartimento da coluna foi também avaliada, e as temperaturas de 25 , 30 , 35 , 40 e $45 \text{ }^\circ\text{C}$ foram testadas a fim de fazer um ajuste no método, por meio da mudança na viscosidade da fase móvel (HEINISCH; ROCCA, 2004). A temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ foi então escolhida por propiciar melhor resolução entre os compostos.

Uma vez que os compostos avaliados neste trabalho apresentam grupos cromóforos, podem ser avaliados por detecção ultravioleta. Além da facilidade de uso e baixo custo, uma das vantagens da detecção ultravioleta por arranjo de fotodiodos, ainda, baseia-se na possibilidade do monitoramento simultâneo

comprimentos de onda (SWARTZ, 2010). Durante o desenvolvimento deste método foram monitorados os comprimentos de onda de 230 nm, 245 nm e 260 nm, sendo posteriormente definido o comprimento de onda de 245 nm como o melhor de acordo com a resolução demonstrada para os compostos sob condições ótimas.

O espectro UV de cada um dos compostos individuais pode ser acessado por meio da consulta ao apêndice A. Já o espectro 3D gerado da análise cromatográfica, que exibe a intensidade do sinal de cada analito no tempo estipulado para análise em todos os comprimentos de onda que compreendem a região UV se encontra no apêndice B. A figura 17 mostra o cromatograma obtido para a separação dos compostos nitrogenados usando o método otimizado.

Figura 17 – Cromatograma de separação dos 16 compostos nitrogenados usando o método em fase reversa otimizado. Compostos: (1) 5-hidroxi-indol-3-ácido acético; (2) quinolina; (3) N,N-dimetilanilina; (4) acridina; (5) 2-metilindol; (6) 3-metilindol; (7) fenazina; (8) fenantridina; (9) 1-nitronaftaleno; (10) carbazol; (11) benzo[h]quinolina; (12) 2-fenilindol; (13) 2-nitrofluoreno; (14) 9-nitroantraceno; (15) 1-nitropireno; (16) 9-fenilcarbazol. Fase móvel: 0,5 mM H₃PO₄ e ANC. Gradiente de eluição e fluxo: descritos na tabela 2. Detecção UV: 245 nm. Temperatura da coluna: 30 °C



Fonte: (AUTOR).

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE PAR IÔNICO

Durante o desenvolvimento do primeiro método, outras estratégias foram pensadas a fim de melhorar a separação. Uma delas foi a inserção de um reagente de par iônico de cadeia curta, como o octil sulfato de sódio (SOS), a fim explorar a cromatografia de par iônico – uma ferramenta eficiente na separação de compostos iônicos por fase reversa. A inserção do modificador tem como consequência um aumento da retenção dos solutos, carregados positivamente (KNOX, 1981).

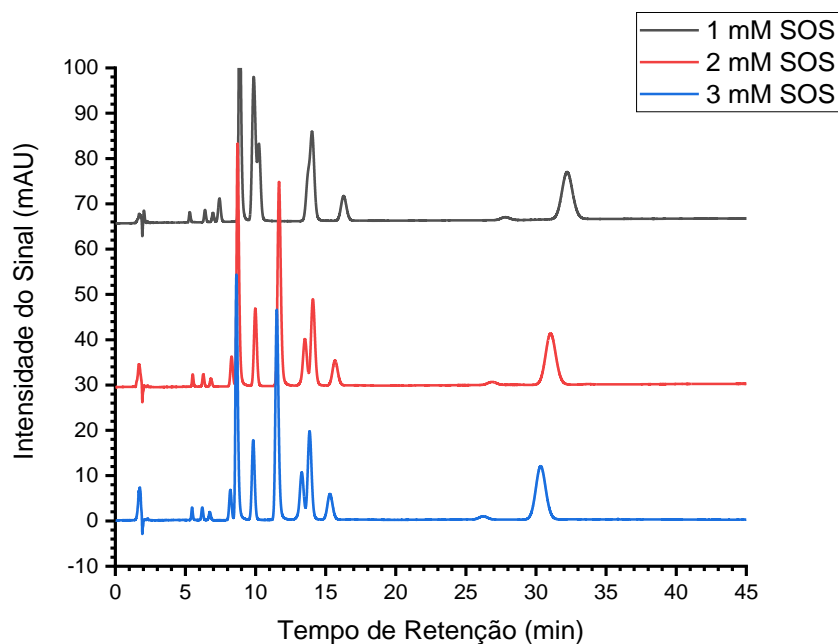
Assim, usando a mesma fase estacionária e móvel do método anterior, aditivou-se o modificador orgânico com SOS. O teste foi conduzido sob modo isocrático, com 50% A (H_3PO_4 0,5 mM), 50 % B (ACN+SOS), fluxo de 0,5 mL. min^{-1} e temperatura de 25 °C. O resultado foi muito promissor, no entanto alguns ajustes foram avaliados:

(a) foi otimizada a concentração do reagente de par iônico. Concentrações de 1 mM, 2 mM e 3 mM de SOS foram testadas, pode ser observado no cromatograma da figura 19. Através da análise do cromatograma, pode-se perceber que embora houvesse coeluição de alguns compostos, os analitos apresentaram a melhor resolução quando utilizado o octil sulfato de sódio em concentração de 2 mM;

(b) também foram testadas as concentrações 0,5 mM e 1 mM de H_3PO_4 , sendo a concentração de 1 mM escolhida por propiciar melhor resolução para os compostos em estudo, conforme demonstrado pelo cromatograma da figura 20. Também foi testada a concentração de 2 mM, no entanto, essa última não apresentou diferença significativa na resolução dos compostos quando comparada a concentração de 1 mM..

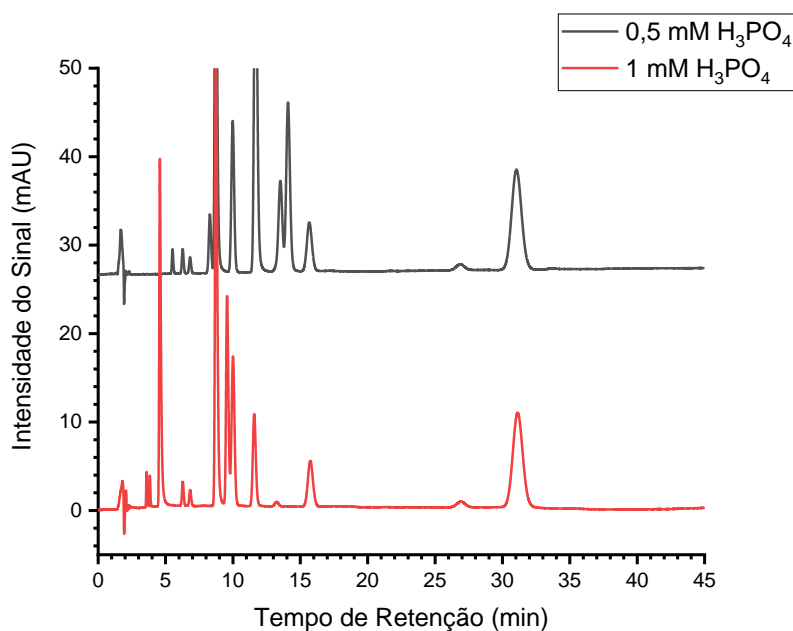
Embora o entendimento exato dos equilíbrios presentes nesses ensaios pode ser uma tarefa desafiadora, pode-se atribuir a necessidade de modificação de concentração do ácido à força iônica do meio, que muda com a inserção de SOS ao sistema (CECCHI, 2008).

Figura 18 - Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na concentração de 2 mg.L^{-1} quando testadas diferentes concentrações de SOS como aditivo de B. Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 50% B, 50% A ($0,5 \text{ mM H}_3\text{PO}_4$), fluxo $0,5 \text{ mL/min.}$, temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 245 nm



Fonte: (AUTOR).

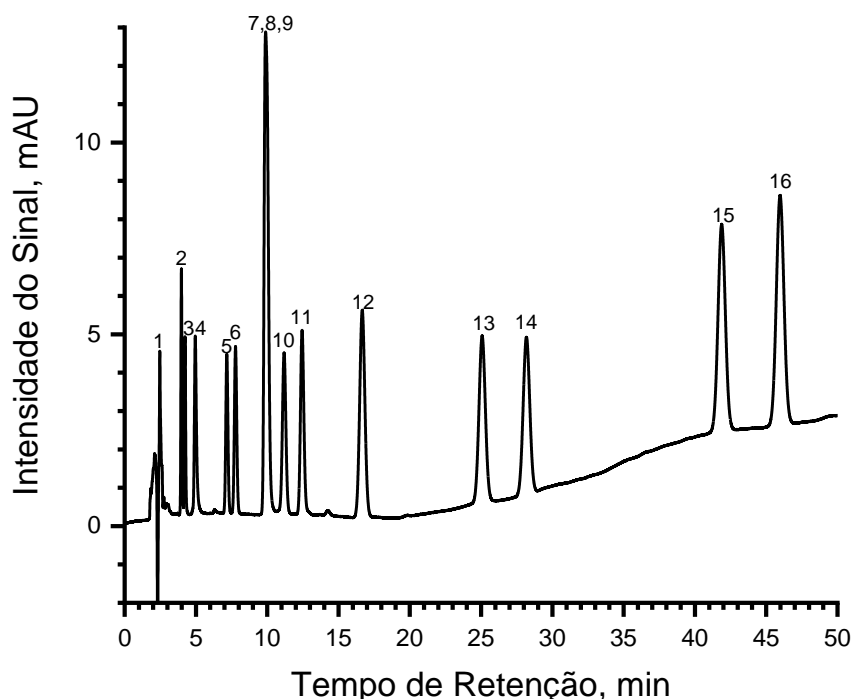
Figura 19 - Comparação da resolução obtida para os 16 NHPAs em estudo na concentração de 2 mg.L^{-1} quando testadas diferentes concentrações de H_3PO_4 (A). Condições: fase reversa, eluição isocrática, fase móvel 50% B (2 mM SOS em ACN), fluxo $0,5 \text{ mL/min.}$, temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 245 nm



Fonte: (AUTOR).

Então, um gradiente de eluição teve de ser inserido após 15 minutos de análise, a fim de aumentar a força de eluição e permitir que os dois últimos compostos pudessem eluir antes do término da análise, já que tiveram sua retenção aumentada. O gradiente solucionou ainda a coeluição que vinha ocorrendo entre os quatro últimos compostos. Por fim, o tempo de análise precisou ser aumentado para permitir a visualização de todos os compostos eluídos. A figura 20 mostra o cromatograma obtido para a separação dos compostos nitrogenados usando o método otimizado.

Figura 20 – Cromatograma de separação dos 16 compostos nitrogenados usando o método de pareamento iônico otimizado. Compostos: (1) 5-hidroxi-indol-3-ácido acético; (2) quinolina; (3) N,N-dimetilanilina; (4) acridina; (5) 2-metilindol; (6) 3-metilindol; (7) fenazina; (8) fenantridina; (9) 1-nitronaftaleno; (10) carbazol; (11) benzo[h]quinolina; (12) 2-fenilindol; (13) 2-nitrofluoreno; (14) 9-nitroantraceno; (15) 1-nitropireno; (16) 9-fenilcarbazol. Fase móvel: 1 mM H₃PO₄ e 2mM SOS + ACN. Gradiente de eluição e fluxo: descritos na tabela 3. Detecção UV: 245 nm. Temperatura da coluna: 30 °C



Fonte: (AUTOR).

Como consequência do uso do SOS, a eluição dos compostos neste método foi levemente “atrasada”, em comparação com o método anteriormente proposto, já que o reagente de par iônico provoca aumento da retenção dos solutos ionizados na

fase estacionária. Assim, o tempo aumentado de análise pode ser considerado desvantajoso, já que faz uma diferença significativa quando levado em consideração múltiplas análises em um mesmo dia. No entanto, essa desvantagem pode ser superada pela pequena melhora no fator de retenção (valor de k) dos compostos.

Vale comentar ainda, que mesmo sob condições otimizadas, um método pode não apresentar resolução de linha base para um par ou grupo crítico de compostos, dependendo da complexidade dos solutos explorados. No caso do método em fase reversa, isso ocorre entre os compostos 10 (carbazol) e 11 (benzo[h]quinolina). Já no caso do método de par iônico, isso ocorre entre os compostos 7 (fenazina), 8 (fenantridina) e 9 (1-nitronaftaleno). Pelo exposto, nota-se que tanto o método em fase reversa como o de par iônico propostos neste trabalho apresentam um grupo crítico de compostos, os quais mesmo sob condições ótimas não pôde ser resolvido. Levando em conta a complexidade da separação e o fato de que o grupo crítico de um método não é o mesmo que o grupo crítico de outro, ambos podem ser usados como métodos complementares em uma análise, permitindo, aliado a informação espectral e de pureza de pico, maior credibilidade na identificação dos compostos da amostra.

4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO EM FASE REVERSA

Como pode ser notado pelos valores de r acima de 0,99 apresentados na tabela 4, o método apresenta linearidade satisfatória dentro da faixa proposta. Pequenas variações na faixa linear para cada composto (ex: fenazina 0,2-300 mg. L⁻¹ e 9-fenilcarbazol 12-600 mg. L⁻¹) pode ser explicada pela Lei de Beer, que mostra que a relação linear entre absorvância e concentração é afetada pela absorvidade molar de cada composto (CORRADINI, 2010). A absorvidade molar nada mais é do que a característica de uma substância que indica qual a quantidade de luz absorvida em determinado comprimento de onda (HARRIS, 2012).

Já os valores de LD e LQ da tabela 4 demonstram que o método é sensível para a análise dos compostos nitrogenados em estudo, característica que é atribuída principalmente a presença de grupos cromóforos na estrutura dos compostos, possuindo absorção máxima próximo ao comprimento de onda selecionado. Ainda, para este trabalho foram encontrados valores satisfatórios de precisão, entre 0,01% a 14,30%.

Tabela 4 – Parâmetros de validação do método em fase reversa proposto para determinação de compostos nitrogenados

Composto	Faixa Linear (mg. L ⁻¹)	r	LD (mg. L ⁻¹)	LQ (mg. L ⁻¹)	Precisão (RSD %)
5-hidroxiindol-3-ácido acético	1,5-600	0,999	0,031	0,094	2,49-7,45
Quinolina	0,5-400	0,998	0,036	0,110	2,98-10,47
N,N-dimetilanilina	1,0-400	0,999	0,012	0,037	0,30-3,86
Acridina	0,4-400	0,998	0,003	0,009	0,11-6,36
2-metilindol	0,8-600	0,998	0,022	0,068	0,48-1,26
3-metilindol	2,0-600	0,999	0,045	0,137	0,10-3,47
Fenazina	0,2-300	0,997	0,001	0,005	0,14-2,48
Fenantridina	0,4-600	0,999	0,003	0,010	0,01-11,04
1-nitronaftaleno	1,5-600	0,999	0,013	0,041	0,22-1,29
Carbazol	0,8-600	0,999	0,012	0,038	0,20-7,37
Benzo[h]quinolina	0,5-400	0,999	0,007	0,021	0,12-0,48
2-fenilindol	1,5-600	0,999	0,012	0,038	1,04-6,32
2-nitrofluoreno	1,0-600	0,999	0,092	0,279	0,31-12,29
9-nitroantraceno	0,3-400	0,998	0,002	0,008	1,76-14,30
1-nitropireno	1,5-600	0,998	0,039	0,120	0,79-2,02
9-fenilcarbazol	12,0-600	0,999	0,209	0,633	0,66-9,44

Fonte: (AUTOR).

A tabela 5 mostra os valores de recuperação obtidos para cada composto em cada matriz estudada, exibindo valores de precisão que variam entre 80%-118%, o que é satisfatório para esse tipo de amostra na faixa de concentração estudada.

Tabela 5 – Recuperações dos 16 compostos nitrogenados em amostras de CAP e MP pelo método em fase reversa proposto

Composto	Recuperação nas amostras de CAP (%)	Recuperação nas amostras de MP (%)
5-hidroxiindol-3-ácido acético	97,36 ± 1,95	107,19 ± 0,37
Quinolina	93,77 ± 14,33	118,81 ± 4,23
N,N-dimetilanilina	94,69 ± 8,18	83,68 ± 2,28
Acridina	89,15 ± 9,66	101,45 ± 12,03
2-metilindol	99,61 ± 5,65	106,50 ± 5,02
3-metilindol	104,42 ± 9,66	110,04 ± 0,60
Fenazina	89,64 ± 4,79	101,04 ± 5,58
Fenantridina	81,96 ± 10,72	96,68 ± 7,79
1-nitronaftaleno	103,56 ± 6,62	112,95 ± 5,64
Carbazol	80,13 ± 12,44	90,91 ± 6,31
Benzo[h]quinolina	98,65 ± 9,48	106,68 ± 1,55
2-fenilindol	95,89 ± 9,47	107,89 ± 13,48
2-nitrofluoreno	98,64 ± 7,04	115,99 ± 5,51
9-nitroantraceno	85,21 ± 7,96	112,70 ± 13,07
1-nitropireno	103,21 ± 7,07	107,08 ± 7,58
9-fenilcarbazol	86,06 ± 4,73	89,15 ± 3,27

Fonte: (AUTOR).

Para este método, ainda, foi avaliada a exatidão por meio da análise do SRM 1975, um extrato particulado de diesel, para os compostos 1-nitropireno e 9-nitroantraceno. A análise foi feita através de ensaios de adição do padrão ao SRM, realizada em duplicata para cada composto. A tabela 6 mostra os valores encontrados para os compostos 1-nitropireno e 9-nitroantraceno no SRM em estudo. Esses resultados são considerados satisfatórios, uma vez que os compostos nitrogenados presentes no SRM não são certificados, mas dizem respeito a valores recomendados na matriz. Sendo assim, encontrar valores de recuperação próximos ao relatado pelo instituto permite inferir que o método proposto tem boa exatidão.

Tabela 6 – Resultados das recuperações obtidas na análise do SRM 1975

Composto	Valor certificado (mg. kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg. kg ⁻¹)
1-Nitropireno	16,59 ± 0,44	19,41 ± 1,06
9-Nitroantraceno	1,244 ± 0,088	1,750 ± 0,117

Fonte: (AUTOR).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE PAR IÔNICO

A tabela 7 resume os parâmetros de validação do método de par iônico.

Tabela 7 – Parâmetros de validação do método de pareamento iônico proposto para determinação de compostos nitrogenados

Composto	Faixa Linear (mg. L ⁻¹)	r	LD (mg. L ⁻¹)	LQ (mg. L ⁻¹)	Precisão (RSD %)
5-hidroxiindol-3-ácido acético	0,3-400	0,997	0,013	0,039	0,28-3,51
Quinolina	0,3-400	0,999	0,025	0,078	0,13-1,34
N,N-dimetilanilina	0,3-90	0,999	0,021	0,064	1,25-4,50
Acridina	0,1-400	0,998	0,002	0,007	0,33-1,70
2-metilindol	0,3-400	0,999	0,071	0,217	0,34-1,15
3-metilindol	0,5-400	0,997	0,094	0,287	0,28-0,98
Fenazina	0,1-300	0,994	0,001	0,002	0,35-1,02
Fenantridina	0,4-400	0,999	0,003	0,011	0,18-0,57
1-nitronaftaleno	0,3-400	0,999	0,015	0,045	0,20-2,88
Carbazol	0,2-400	0,997	0,011	0,034	0,08-0,93
Benzo[h]quinolina	0,5-400	0,999	0,005	0,017	0,25-2,80
2-fenilindol	1,0-400	0,999	0,007	0,021	0,24-1,27
2-nitrofluoreno	5,0-250	0,999	0,168	0,510	0,20-1,75
9-nitroantraceno	0,3-270	0,992	0,006	0,019	0,16-3,47
1-nitropireno	0,3-400	0,999	0,035	0,107	0,43-4,35
9-fenilcarbazol	12-400	0,999	0,247	0,750	0,25-5,29

Fonte: (AUTOR).

Como pode ser observado, os valores de *r* demonstram linearidade satisfatória dentro da faixa proposta. Ainda, os valores de LD e LQ exibem boa sensibilidade para o estudo de compostos nitrogenados neste método, assim como para o anterior. A precisão, avaliada pelo valor de RSD, variou de 0,13% para a quinolina a 5,29% para o 9-fenilcarbazol, por exemplo, exibindo valores satisfatórios para o ensaio. Por fim, recuperações nas matrizes fixas (asfalto) e voláteis (material particulado) podem ser visualizadas na tabela 8, os valores obtidos estão dentro do esperado para a análise de amostras complexas, variando entre 83% para fenazina à 118% para o 3-metilindol, por exemplo.

Tabela 8 - Recuperações dos 16 compostos nitrogenados em amostras de CAP e MP pelo método de pareamento iônico proposto

Composto	Recuperação nas amostras de CAP (%)	Recuperação nas amostras de MP (%)
5-hidroxiindol-3-ácido acético	92,66 ± 12,36	94,51 ± 13,70
Quinolina	102,09 ± 6,78	110,31 ± 8,94
N,N-dimetilanilina	103,05 ± 11,57	118,90 ± 1,31
Acridina	90,76 ± 6,33	95,13 ± 4,51
2-metilindol	95,36 ± 15,88	99,66 ± 14,69
3-metilindol	93,68 ± 4,27	118,01 ± 1,01
Fenazina	83,21 ± 7,47	84,10 ± 4,50
Fenantridina	92,67 ± 16,37	102,34 ± 17,18
1-nitronaftaleno	94,06 ± 12,59	94,05 ± 6,48
Carbazol	87,72 ± 12,32	99,20 ± 13,76
Benzo[h]quinolina	112,73 ± 10,20	110,67 ± 9,56
2-fenilindol	99,81 ± 16,89	109,12 ± 12,80
2-nitrofluoreno	95,87 ± 31,63	106,54 ± 17,12
9-nitroantraceno	101,99 ± 19,07	114,30 ± 7,44
1-nitropireno	89,45 ± 12,68	97,18 ± 12,91
9-fenilcarbazol	98,87 ± 12,76	95,82 ± 2,13

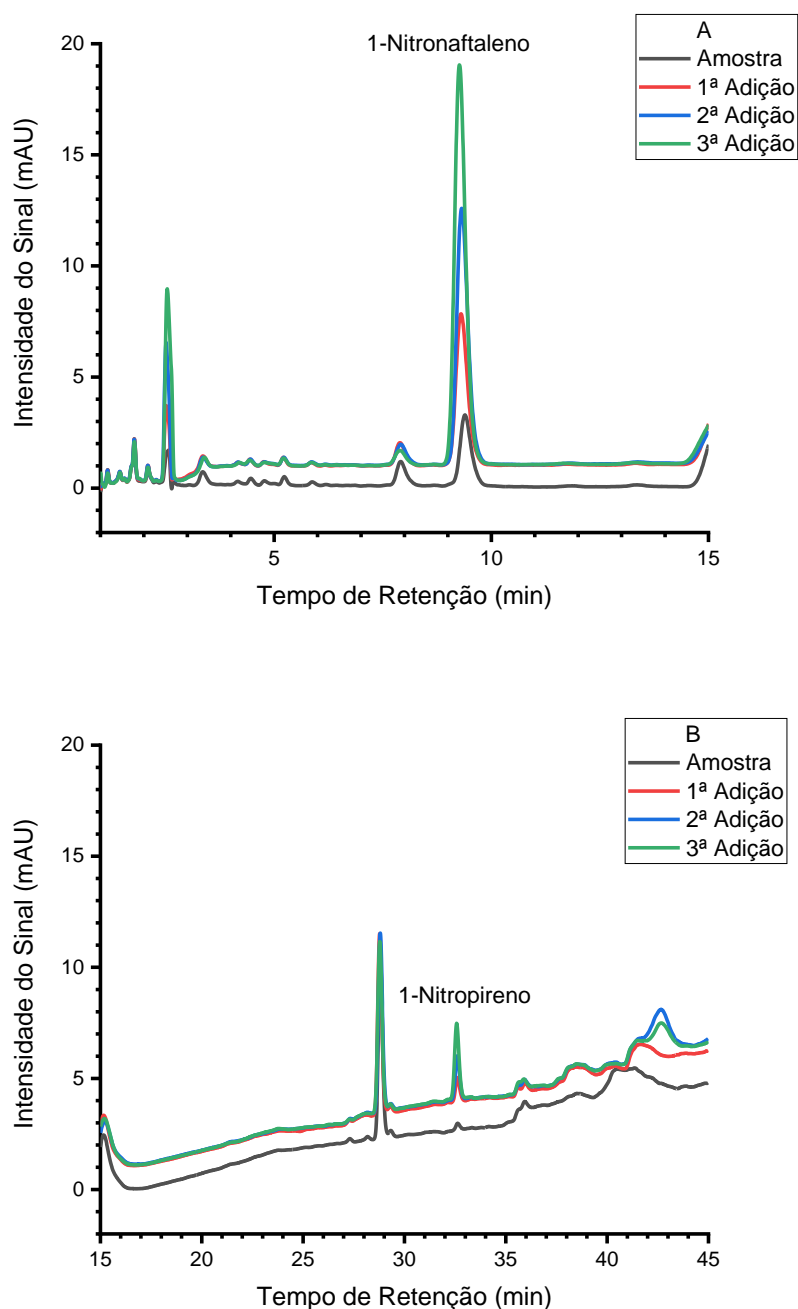
Fonte: (AUTOR).

4.5 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DO AR

Uma vez preparadas, as amostras de material particulado do ar foram analisadas pelo método baseado no mecanismo de fase reversa. Foi feito primeiramente um *screening* das 23 amostras em estudo, o que sinalizou através da comparação com o tempo de retenção e espectro de absorção no UV a presença dos compostos N,N-dimetilanilina (ANL), 1-nitronaftaleno (1NN) e 1-nitropireno (1NP) na maioria delas. Posteriormente esses compostos foram confirmados através de ensaios de fortificação. Foi feita então a quantificação dos compostos

encontrados por meio da adição do padrão, conforme pode ser visualizado para amostra 15 na figura 21. O composto N,N-dimetilanilina, no entanto, não pode ser quantificado pelo método, uma vez que seu pico coeluiu com algum outro interferente da amostra. A tabela 9 apresenta os valores em μg encontrados dos compostos 1-nitronaftaleno e 1-nitropireno nas amostras.

Figura 21 – Cromatograma da amostra 15 com crescentes adições de (a) 1-nitronaftaleno e (b) 1-nitropireno



Fonte: (AUTOR).

Tabela 9 – Valores em massa encontrados para os compostos 1-nitropireno e 1-nitronaftaleno nas amostras de material particulado estudadas

Amostra	Concentração encontrada (μg)	
	1NN	1NP
1	nd	nd
2	11,84	nd
3	8,60	1,53
4	12,69	nd
5	26,85	14,00
6	10,32	4,39
7	0,08	nd
8	9,70	nd
9	17,36	4,71
10	13,26	1,34
11	11,27	0,84
12	8,66	3,80
13	9,62	2,34
14	6,17	3,08
15	28,83	14,41
16	9,59	5,10
17	11,80	1,32
18	10,56	2,24
19	11,51	2,49
20	6,74	0,83
21	13,35	0,86
22	9,04	1,71
23	10,13	1,64

Fonte: (AUTOR).

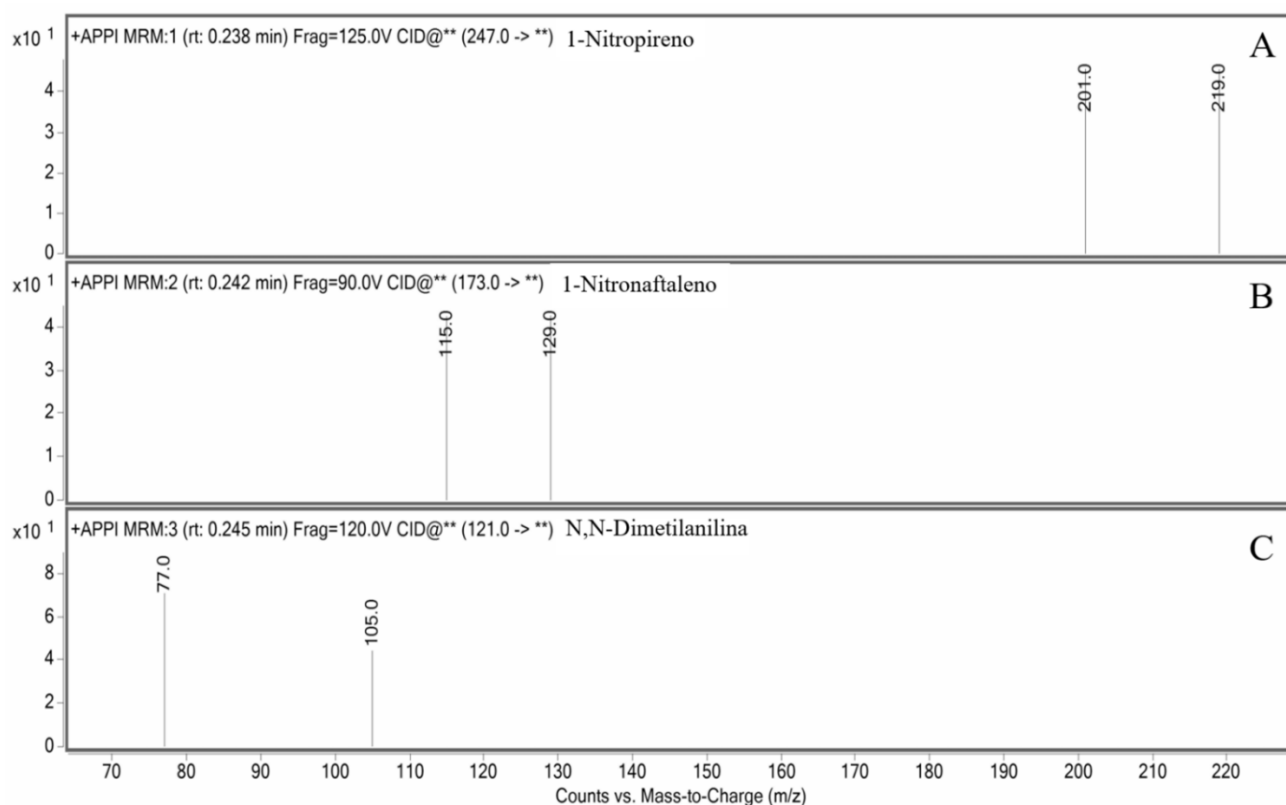
Diversas agências regulatórias ao redor do mundo vêm estabelecendo limites de exposição ocupacional que variam entre 0,5 e 10 mg. m^{-3} para emissões de fumos de asfalto durante períodos que variam de alguns minutos até 8 horas (ASPHALT INSTITUTE, 2015). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), vinculado ao Ministério da Saúde, é o órgão responsável pela regulamentação dos Padrões Nacionais de Qualidade do Ar, e estabelece na Resolução 491 de novembro de 2018 o nível de atenção para concentrações de 250 mg. m^{-3} de MP_{10} para um período de 24h (CONAMA, 2018).

Embora não existam na literatura valores que indiquem a quantidade máxima de exposição permitida para esses compostos nitrogenados em específico pelos seres humanos, a grande preocupação com a presença de compostos aromáticos

nitrogenados nesse tipo de matriz relaciona-se com o fato de que muitos compostos dessa classe são suspeitos de serem mutagênicos e carcinogênicos em caso de exposição à longo prazo, sendo cumulativos e potencialmente mais agressivos que seus precursores HPAs. Pelo exposto, de acordo com os resultados encontrados neste trabalho, percebe-se uma quantidade significativa principalmente do composto 1-nitronaftaleno na matriz em estudo, o que é indesejável levando em consideração ao risco de exposição constante que os trabalhadores das usinas são submetidos diariamente durante o trabalho.

Posteriormente, a presença dos compostos nitrogenados nas amostras foi ainda confirmada através da análise por APPI-MS/MS, onde o perfil dos fragmentos das amostras de material particulado foi comparado com os padrões. Os fragmentos característicos do 1-nitropireno (m/z) 247 > 201 e 247 > 219, 1-nitronaftaleno (m/z) 173 > 115 e 173 > 129 e da N,N-dimetilanilina (m/z) 121 > 77 e 121 > 105 confirmaram em todas as amostras suspeitas a sua presença, conforme pode ser observado na figura 22 para a amostra 15.

Figura 22 – Espectro de massas da amostra 15 contendo fragmentos característicos dos compostos (A) 1-nitropireno, (B) 1-nitronaftaleno e (C) N,N-dimetilanilina



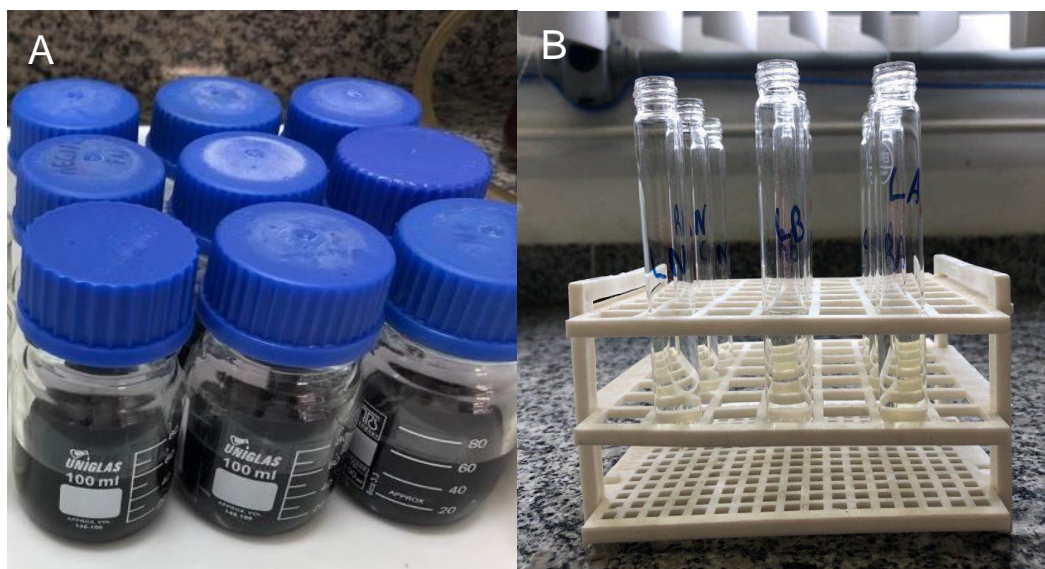
Fonte: (AUTOR).

4.6 APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ASFALTO

As amostras de asfalto analisadas neste trabalho foram separadas primeiramente em duas frações majoritárias, os maltenos e os asfaltenos. Os maltenos constituem a fração apolar do asfalto, enquanto os asfaltenos são formados por compostos de maior polaridade. Por essa razão, os asfaltenos foram escolhidos como fração de interesse neste trabalho. Ainda, estudos anteriores demonstraram uma concentração maior de compostos aromáticos nitrogenados nessas frações (CLAUSSEN, 2017), o que corrobora com a justificativa da investigação de compostos nitrogenados nessa fração da matriz.

O passo seguinte foi o fracionamento de cada uma das amostras de CAP-1, CAP-2 e AAD-1 em porções ácidas, básicas e neutras, gerando assim 9 subfrações de estudo. Essas 9 subfrações foram então preparadas através do método SPE previamente relatado. É possível encontrar na figura 23 um registro das 9 subfrações (A) antes e (B) depois da aplicação do método de limpeza. Uma vez procedida a limpeza das amostras, elas foram injetadas no cromatógrafo.

Figura 23 – Comparativo visual das amostras de CAP (A) antes e (B) depois do método de extração em fase sólida (SPE) aplicado

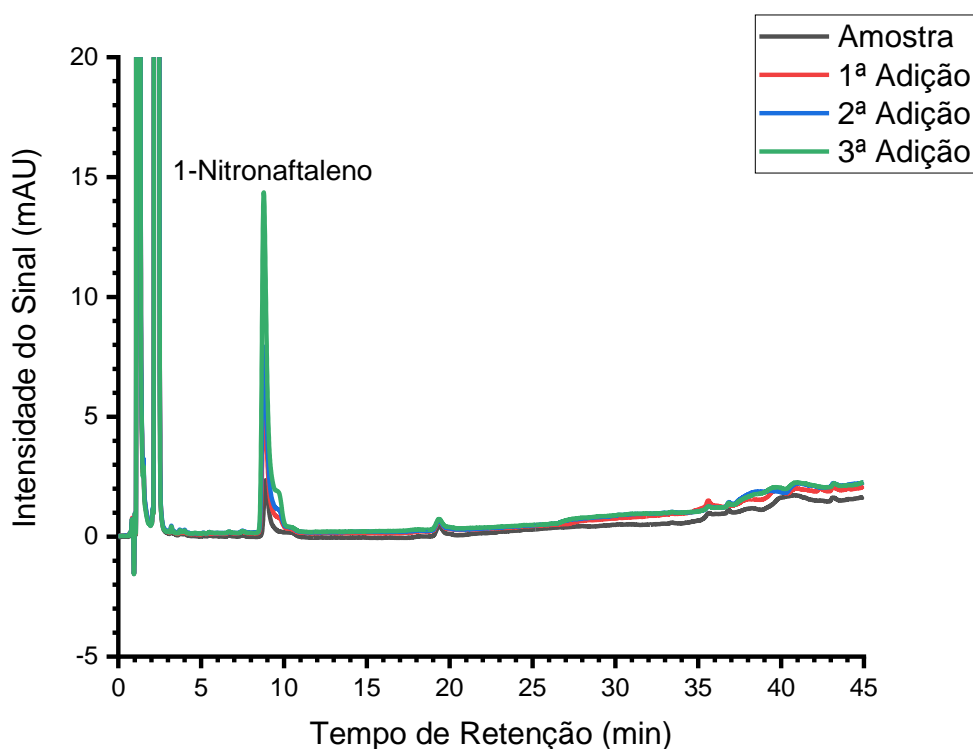


Fonte: (AUTOR).

O método em fase reversa também foi utilizado aqui para as análises de amostras de asfalto. Foi feito primeiramente um *screening* das subfrações das amostras investigadas. As frações ácidas, básicas e neutras das amostras de CAP-1

e AAD-1 não apresentaram sinal analítico, assim como as frações básicas e neutras da amostra de CAP-2 também não. Apenas a subfração ácida da amostra de CAP-2 apresentou sinal analítico durante a corrida cromatográfica. Esse sinal correspondia a um composto com tempo de retenção muito parecido com o 1-nitronaftaleno. Após comparação com o tempo de retenção e com o espectro de absorção no UV, a presença do composto 1-nitronaftaleno foi confirmada pela fortificação do mesmo. O cromatograma obtido para a amostra bem como as crescentes concentrações do padrão adicionado para a quantificação pode ser visualizado na figura 24.

Figura 24 – Cromatograma da amostra de CAP-2 com crescentes adições de 1-nitronaftaleno



Fonte: (AUTOR).

O resultado encontrado foi de 8852 mg.kg^{-1} de 1-nitronaftaleno somente na fração ácida da amostra de CAP-2. Convertendo agora esse valor levando em consideração a massa total da amostra de CAP-2 que foi inicialmente pesada, o valor de concentração do composto presente foi de 350 mg.kg^{-1} . Essa amostra em especial é proveniente da mesma refinaria que produziu o ligante usinado na coleta do material particulado. Sendo assim, encontrar o composto 1-nitronaftaleno nessa

matriz é bastante interessante, e demonstra que o composto está presente tanto na porção fixa quanto volátil das matrizes asfálticas.

Em suma, o método em fase reversa desenvolvido neste estudo foi efetivo para a análise das amostras investigadas. Ainda, embora não tenha sido utilizado neste trabalho, já que não houve problemas de coeluição dos compostos de interesse, por exemplo, o desenvolvimento de um segundo método (par iônico) como ferramenta complementar, caso fosse necessário, bem como a exploração de um segundo mecanismo de separação para as moléculas aromáticas nitrogenadas mostra-se bastante interessante do ponto de vista químico.

De acordo com a International Agency for Research on Cancer (IARC, 2013), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados nitrogenados são potenciais mutagênicos e carcinogênicos e estão presentes em matrizes asfálticas, quer na forma fixa ou volátil, o que foi evidenciado pelos resultados demonstrados neste trabalho. Por esse motivo, faz-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de métodos capazes de identificar e quantificar compostos dessa classe a fim de entender a composição do ligante, bem como prever a magnitude da exposição a qual trabalhadores dessas usinas e à comunidade em geral está inserida.

5 CONCLUSÕES

Matrizes asfálticas são bastante complexas do ponto de vista químico. A fim de permitir sua investigação, um método de preparo das amostras de material particulado baseado na extração com solvente e um método de preparo das amostras de cimento asfáltico de petróleo baseado na precipitação e cromatografia líquida de troca iônica em meio não aquoso foram aplicados, demonstrando-se adequados para os devidos fins, permitindo a separação dos analitos de interesse da matriz, além de assegurar o bem-estar do instrumento de trabalho.

Os compostos aromáticos nitrogenados investigados neste estudo constituem uma mistura complexa, sendo composta de isômeros e outros compostos nitrogenados cuja separação por cromatografia líquida é desafiadora. Apesar disso, neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos, considerados complementares, que usam diferentes mecanismos de separação muitas vezes poucos explorados em trabalhos desse tipo, agregando ao presente estudo uma interessante discussão. Os métodos desenvolvidos exibiram sensibilidade adequada, boa precisão e exatidão,

bem como uma faixa linear relativamente extensa para a determinação dos 16 compostos nitrogenados investigados.

O método em fase reversa aplicado permitiu ainda a identificação de três dos compostos investigados – confirmada pela análise de massas – e quantificação de dois deles em todas as amostras de material particulado e em uma das frações de uma amostra de asfalto, provando sua efetividade para os fins de interesse. Dessa forma, é possível perceber a dinâmica dos compostos aromáticos nitrogenados e sua distribuição entre as parcelas fixas (CAP) e volatilizadas (MP) do ligante asfáltico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRAFIOTOU, P.; RÀFOLS, C.; CASTELLS, C.; BOSCH, E. ROSÉS, M. Simultaneous effect of pH, temperature and mobile phase composition in the chromatographic retention of ionizable compounds. **Journal of Chromatography A**. v.1218, n.30, p.4995-5009, 2011.
2. ASPHALT INSTITUTE. The bitumen industry – A Global Perspective – Production, chemistry, use, specification and occupational exposure. 3^a ed. USA. 2015.
3. ASTM D 4124-01. **Standard Test Method for separation of asphalt into four fractions**, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2001.
4. BARBOSA, L. M. **Avaliação das concentrações de material particulado, NO₂ E SO₂ resultantes dos serviços de pavimentação asfáltica em um ambiente urbano**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
5. BERNUCCI, L. B., MOTTA, L. D., CERATTI, J. A. P. **Pavimentação asfáltica: formação básica para engenheiros**. 3^a Reimpressão. Rio de Janeiro: PETROBRAS: ADEBA, 2010.
6. BRAGA, A.; BÖHM, G. M.; PEREIRA, L. A. A.; SALDIVA, P. Poluição atmosférica e saúde humana. **Revista USP**. n.51, p.58-71, 2001.
7. BRUDI, L. C.; ADOLFO, F. R.; NASCIMENTO, P. C.; CARGNIN, R. S.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M.; BURGO, T. A. L.; CRAVO, M. C.; NASCIMENTO, L. A. H. Emission and Collection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Raw Asphalt Samples Heated at 130° C. **Energy & Fuels**. v. 34, n.9, p.11248-11257, 2020.
8. CARGNIN, R. S. **Extração e adsorção de HPAs através de transferência gás-sólido (XAD-2 e EPU) utilizando dispositivo de extração e coleta**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

9. CARGNIN, R. S.; ADOLFO, F. R.; NASCIMENTO, P. C.; SCHMIDT, P.; BRUDI, L. C.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, D. B.; CRAVO, M. C. C.; NASCIMENTO, L. A. H. Collection of polycyclic aromatic sulfur heterocycles from asphalt fumes and quantification by an HPLC-DAD method. **Analytical Methods**. v.13, n.29, p.3307-3315, 2021.
10. CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; CLAUSSEN, L. E.; FERRAZ, L.; GRASSMAN, C.; BRAIBANTE, H. T. S.; DIAS, D.; CRAVO, M.; LEITE, L. F. M. Distribution of total sulfur in acidic, basic, and neutral fractions on Brazilian asphalt cements and its relationship to the aging process. **Energy & Fuels**, v.29, n.3, p.1431-1437, 2015.
11. CECCHI, T. Ion pairing chromatography. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.38, n.3, p.161-213, 2008.
12. CLAUSSEN, L. E. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, níquel e vanádio em frações ácidas, básicas e neutras de asfalto virgens e envelhecidas**. Tese de doutorado em Química Analítica – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.
13. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA n° 491 de 19.11.2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 20 de novembro de 2021.
14. CORBETT, L. W. Composition of asphalt based on generic fractionation, using solvent deasphalting, elution-adsorption chromatography, and densimetric characterization. **Analytical Chemistry**, v.41, n.4, p.576-579, 1969.
15. CORRADINI, D. **Handbook of HPLC**. 2^a ed. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, 2010.
16. DELHOMME, O.; HERCKES, P.; MILLET, M. Determination of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols using HPLC fluorescence with a post-column derivatisation technique. **Analytical and bioanalytical chemistry**. v.389, n.6, p.1953-1959, 2007.

17. CRAVO, M. C. C. **Efeitos do envelhecimento térmico e fotoquímico em ligantes asfálticos, mástique e matriz de agregados finos.** Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
18. CUNHA, A. L. M. C.; SÁ, A.; MELLO, S. C.; VÁSQUEZ-CASTRO, Y. E.; LUNA, A. S.; AUCELIO R. Q. Determination of nitrogen-containing polycyclic aromatic compounds in diesel and gas oil by reverse-phase high performance liquid chromatography using introduction of sample as detergentless microemulsion. **Fuel**, v.176, p.119-129, 2016.
19. DAL MOLIN, T. R. **Suplementos alimentares comercializados no Brasil: uma abordagem rotular, analítico e toxicológica.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.
20. FARAH, M. A. **Petróleo e seus derivados: definição, constituição, aplicação, especificações, características de qualidade.** Rio de Janeiro: LTC, 2015.
21. FÉRNANDES-GÓMEZ, W. D.; QUINTANA, H. A. R.; DAZA, C. E.; LIZCANO, F. A. R. The effects of environmental aging on Colombian asphalts. **Fuel**. v.115, p.321-328, 2014.
22. FONTENELE, P. V. G.; CASTELO BRANCO, V. T. F.; CAVALCANTE, R. C.; FERREIRA, W. L. G.; ROCHA, C. A. Avaliação da exposição e risco de câncer em trabalhadores da pavimentação: um estudo baseado nos níveis de partículas respiráveis presentes nos fumos de asfalto. **Revista Transportes**. v.26, n.2, p.55-69, 2018.
23. GREEN, J. B.; HOFF, J.; WOODWARD, P. W.; STEVENS, L. L. Separation of liquid fossil fuels into acid, base and neutral concentrates: 1. An improved nonaqueous ion exchange method. **Fuel**. v.63, n.9, p.1290-1301, 1984.
24. HEINISCH, S.; ROCCA, J. L. Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reverse-phase liquid chromatography: applications to method development. **Journal of Chromatography A**. v.1048, n.2, p.183-193, 2004.

25. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
26. HEIKKILÄ, P.; RIALA, R.; HÄMEILÄ, M.; NYKYRI, E.; PFÄFFLI, P. Occupational Exposure to Bitumen During Road Paving. **American Industrial Hygiene Association**. v.63, n.2, p.156-165, 2002.
27. HUNTER, R. N., SELF, A., READ, J. **The shell bitumen handbook**. 6ª ed. London: ICE Publishing, 2015.
28. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Orientação sobre validação de métodos analíticos. Revisão 8, 2020. Disponível em: <inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios>. Acesso em: 02/07/2021.
29. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Bitumens and bitumens emissions, and some N- and S-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. v.103, Lyon, 2013.
30. KITTO, A. M.; PIRBAZARI, M.; BADRIYHA, B. N.; RAVINDRAN, V.; TYNER, R.; SYNOLAKIS, C. E. Emissions of volatile and semi-volatile organic compounds and particulate matter from hot asphalts. **Environmental Technology**. v.18, n.2, p.121-138, 1996.
31. KNOX, J. H.; HARTWICK, R. A. Mechanism of ion-pair liquid chromatography of amines, neutrals, zwitterions and acids using anionic heteroions. **Journal of Chromatography A**. v.204, p.3-21, 1981.
32. KROMIDAS, S. **The HPLC expert II: Find and optimize the benefits of your HPLC/UHPLC**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2017.
33. LESUEUR, D. The colloidal structure of bitumen: Consequences on the rheology and on the mechanisms of bitumen modification. **Advances in colloid and interface science**. v.145, n.1-2, p.42-82, 2009.

34. LI, D. D.; GREENFIELD, M. L. Chemical compositions of improved model asphalt systems for molecular simulations. **Fuel**. v.115, p 347-356, 2014.
35. LUCENA, M. C. C. **Caracterização Química e Reológica de Asfaltos Modificados por Polímeros**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
36. LUZ, E. R.; GONSALVES, T. F. M.; AUCÉLIO, R. Q. Determination of basic azaarenes in aviation kerosene by solid-phase extraction and HPLC-fluorescence detection. **Journal of separation Science**. v.32, n.12, p.2058-2065, 2009.
37. MACIEL, G. P. S. **Extração de compostos nitrogenados do diesel e análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GCxGC/qMS)**. Tese de doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.
38. MICHALICA, P.; KAZATCHKOV, I. B.; STASTNA, J.; ZANZOTTO, L. Relationship between chemical and rheological properties of two asphalts of different origins. **Fuel**. v.87, n.15-16, p.3247-3253, 2008.
39. NASCIMENTO, P.C.; GOBO, L. A.; BOHRER, D. CARVALHO, L. M.; CRAVO, M. C.; LEITE, L. F. M. Determination of oxygen and nitrogen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in fractions of asphalt mixtures using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of separation science** v.38, n.23, p.4055-4062, 2015a.
40. NASCIMENTO, P.C.; GOBO, L. A.; BOHRER, D. CARVALHO, L. M.; CRAVO, M. C.; LEITE, L. F. M. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fractions in asphalt mixtures using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **Journal of separation science** v.38, n.23, p.4055-4062, 2015b.
41. NIOSH 5042. Benzene soluble fraction and total particulate (asphalt fume). Atlanta, Estados Unidos, 1998.

42. NIOSH 5506. Polynuclear aromatic hidrocarbons by HPLC. Atlanta, Estados Unidos, 1998.
43. PINTO, S.; PINTO, I. E. **Pavimentação asfáltica: conceitos fundamentais sobre materiais e revestimentos asfálticos**. Rio de Janeiro: Grupo Editora Nacional, 2015.
44. PITTS, J. N.; SWEETMAN, J. A.; ZIELINSKA, B.; WINER, A. M.; ATKINSON, R. Determination of 2-nitrofluoranthene and 2-nitropyrene in ambient particulate organic matter: evidence for atmospheric reactions, **Atmospheric Environment**, v.19, n.10, p.1601 – 1608, 1985.
45. PORTO, M., CAPUTO, P., LOISE, V., ESKANDERSAFAT, S., TELTAYEY, B., ROSSI C. Bitumen and bitumen modification: A review on latest advances. **Applied Sciences**. v.9, n.4, p.742, 2019.
46. POSSEBON, E. P. **Estudo laboratorial das propriedades mecânicas de misturas com diferentes cimentos asfálticos de petróleo produzidos no Brasil**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.
47. OLIVEIRA, E. C.; CAMPOS, M. C. V.; LOPES, A. S.; VALE, M. G. R.; CAMARÃO, E. B. Ion-exchange resins in the isolation of nitrogen compounds from petroleum residues. **Journal of Chromatography A**. v.1027, n.1-2, p.171-177, 2004.
48. SANDER, L. C.; WISE, S. A. Shape selectivity in reversed-phase liquid chromatography for the separation of planar and non-planar solutes. **Journal of Chromatography A**. v.656, n.1-2, p.335-351, 1993.
49. SANT'ANA, C. S. **Especiação de compostos de enxofre, níquel e vanádio em cimento asfáltico de petróleo (CAP) e sua relação com os processos de envelhecimento**. Tese de Doutorado em Química Analítica. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

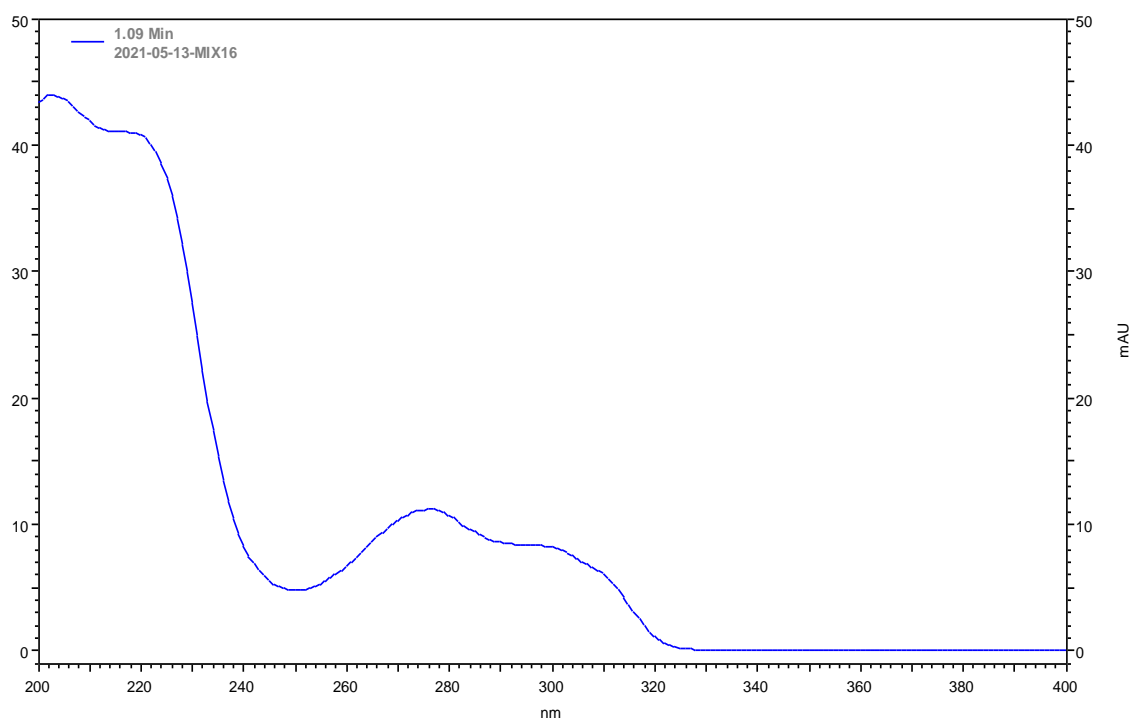
50. SCHREINER, C. A. Review of mechanistic studies relevant to the potential carcinogenicity of asphalts. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.59, n.2, p.270-284, 2011.
51. SILVA, J. M. **Determinação de compostos nitrogenados aromáticos em alcatrão de carvão através da cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas**. Tese de doutorado – Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
52. SILVA, L. S. **Contribuição ao estudo do envelhecimento de ligantes asfálticos. Influência da adição de polímeros e comportamento frente a radiação UV**. Tese de doutorado – Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
53. SILVEIRA, G. D.; HOINACKI, C. K.; GOULARTE, R. B.; NASCIMENTO, P. C.; BOHRER, D.; CRAVO, M.; LEITE, L. F. M.; CARVALHO, L. M. A cleanup method using solid phase extraction for the determination of organosulfur compounds in petroleum asphalt cements. **Fuel**. v.202, p.206-215, 2017.
54. SILVEIRA, G. D. **Determinação de compostos organossulfurados como marcadores dos processos de envelhecimento em matrizes asfálticas**. Tese de doutorado em Química Analítica –Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.
55. SKOOG, D. A., WEST D. M., HOLLER F. J., CROUCH S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.
56. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
57. SPEIGHT, J. G. **Handbook of petroleum analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
58. SPEIGHT, J. G. **Asphalt materials and science technology**, 1ª ed. Waltham: Elsevier, 2015.

59. SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.33, n.9-12, p.1130-1150, 2010.
60. TAUSTE, R.; MORENO-NAVARRO, F.; SÓL-SÁNCHEZ, M.; RÚBIO-GÁMEZ, M. C. Understanding the bitumen ageing phenomenon: A review. **Construction and Building Materials**. v.192, p.593-609, 2018.
61. WALGRAEVE, C.; DEMEESTERE, K.; DEWULF, J.; ZIMMERMANN, R.; LANGENHOVE, H. V. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. **Atmospheric Environment**. v.44, n.15, p.1831-1846, 2010.
62. WANG, J.; WANG, T.; HOU, X.; XIAO, F. Modelling of rheological and chemical properties of asphalt binder considering SARA fraction. **Fuel**. v.238, p.320-330, 2019.
63. YANAGI, Y.; ASSUNÇÃO, V. J.; BARROZO, V. L. Influência do material particulado atmosférico na incidência e mortalidade por câncer no Município de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. v.28, n.9, p.1737-1748, 2012.
64. YEN, T. F.; ERDMAN, J. G.; POLLACK, S. S. Investigation of the structure of petroleum asphaltene by X-ray diffraction. **Analytical chemistry**. v.33, n.11, p.1587-1594, 1961.
65. ZHANG, Y.; YANG, B.; GAN, J.; LIU, C.; SHU, X.; SHU, J. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. **Atmospheric Environment**. v.45, n.15, p.2515-2521, 2011.

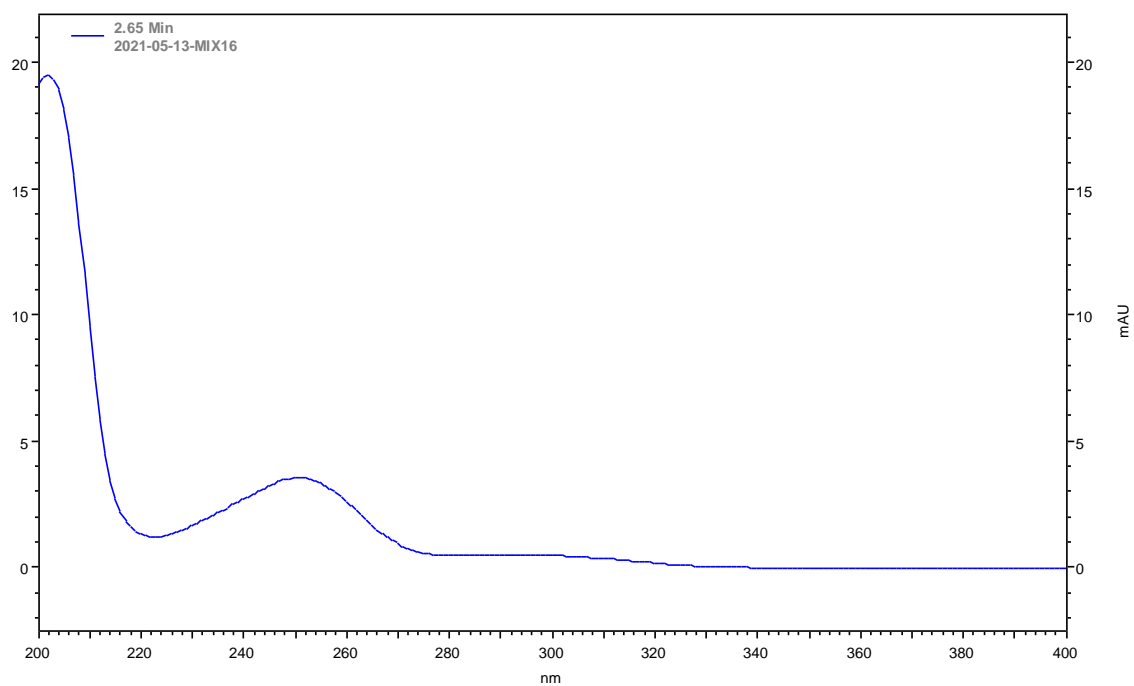
APÊNDICES

APÊNDICE A - Espectros de absorção no UV para os compostos em estudo

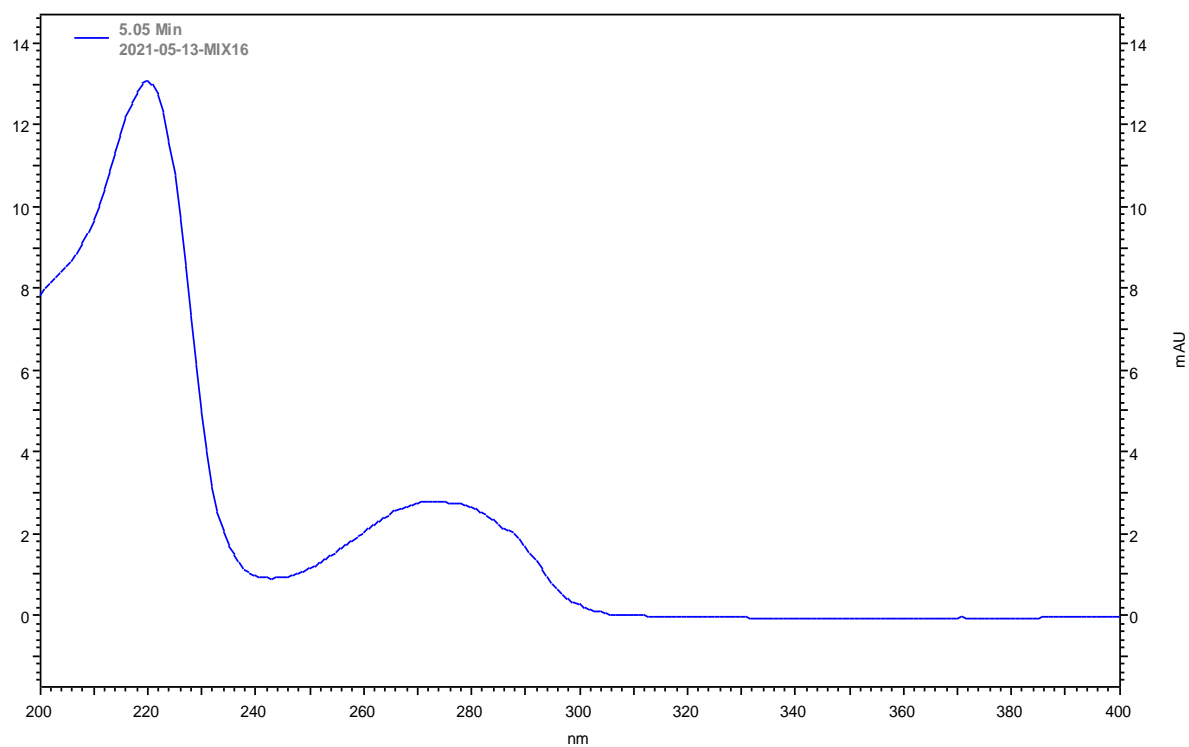
5-hidroxiindol-3-ácido acético



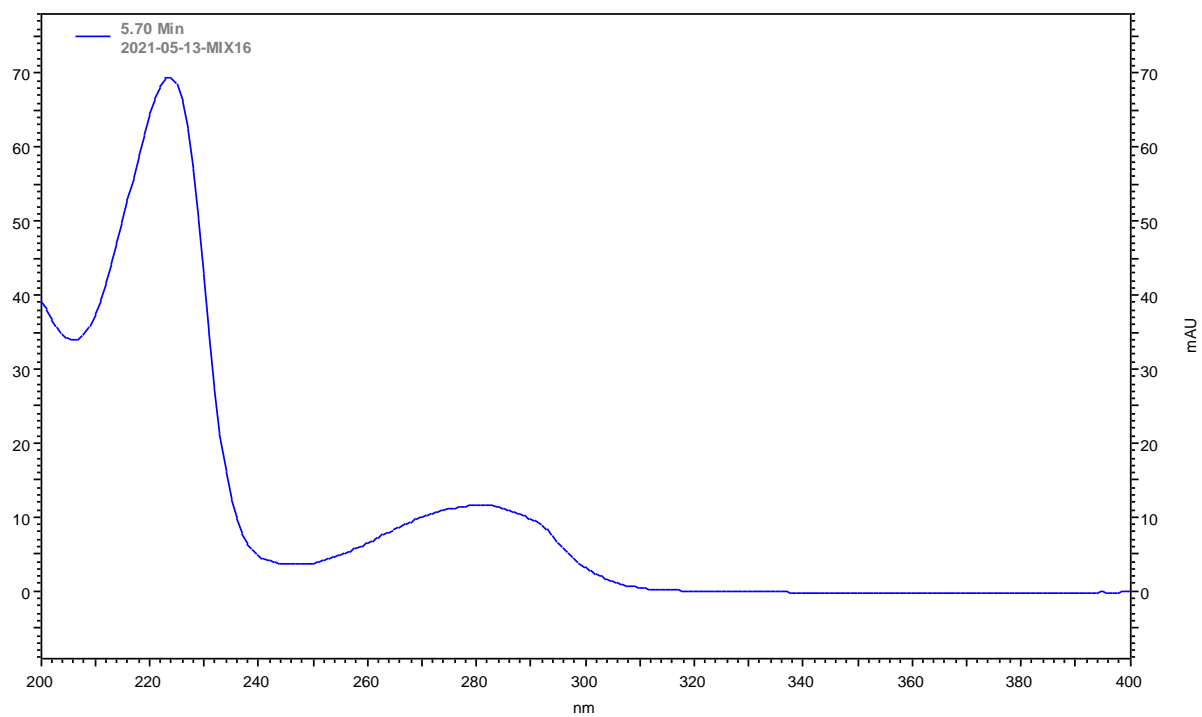
N,N-dimetilanilina



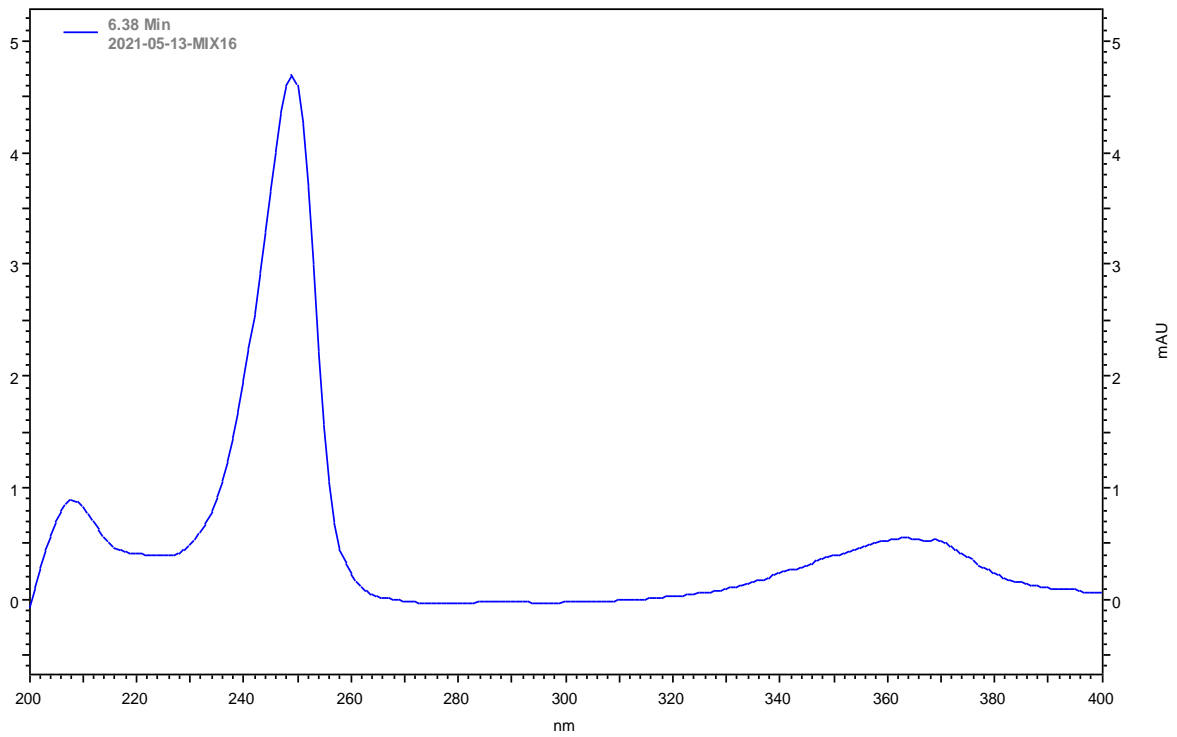
2-metilindol



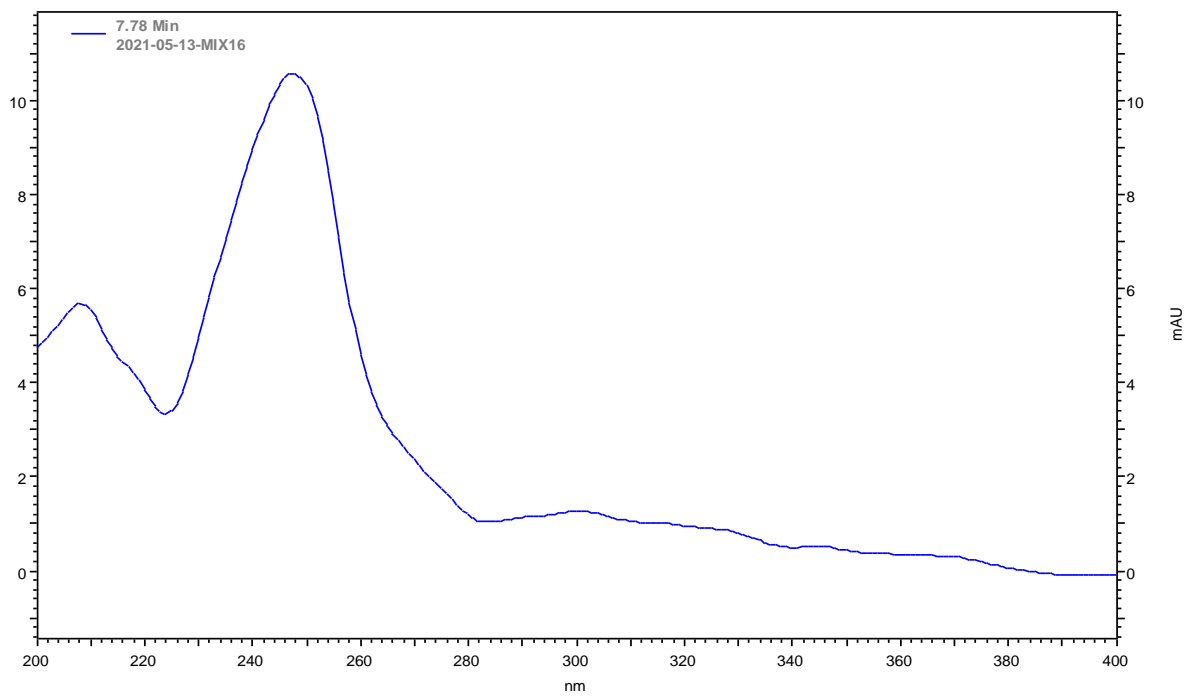
3-metilindol



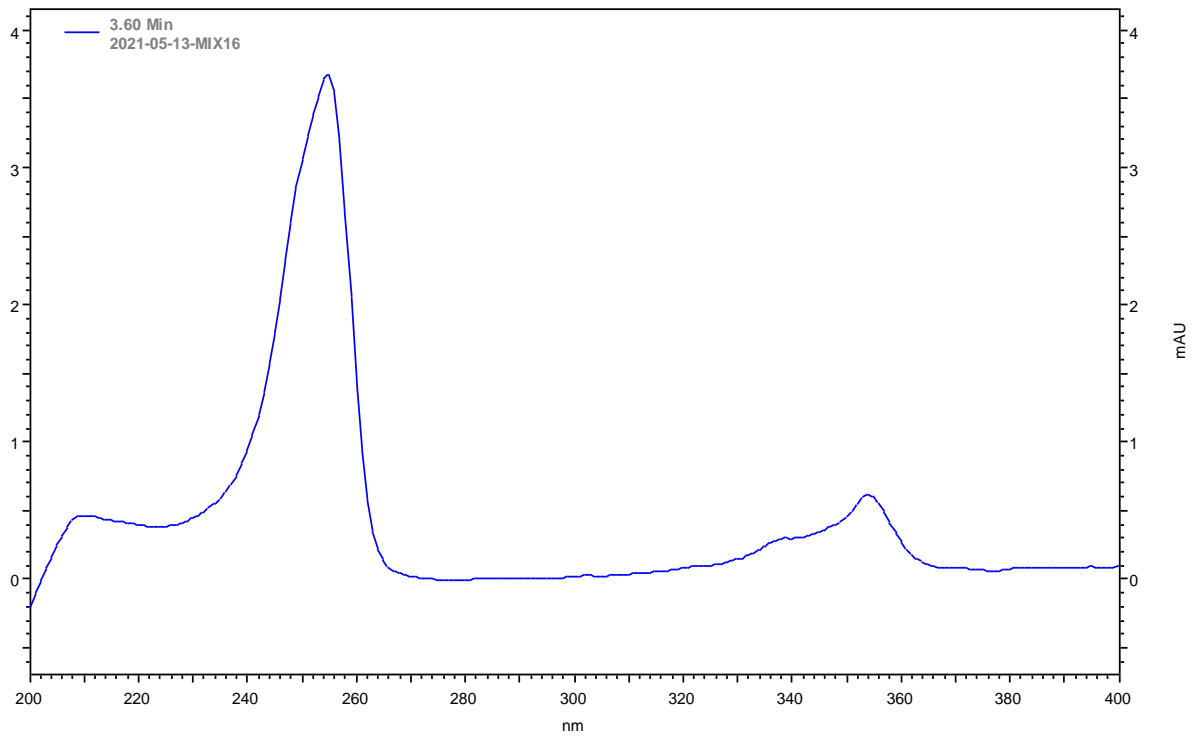
Fenazina



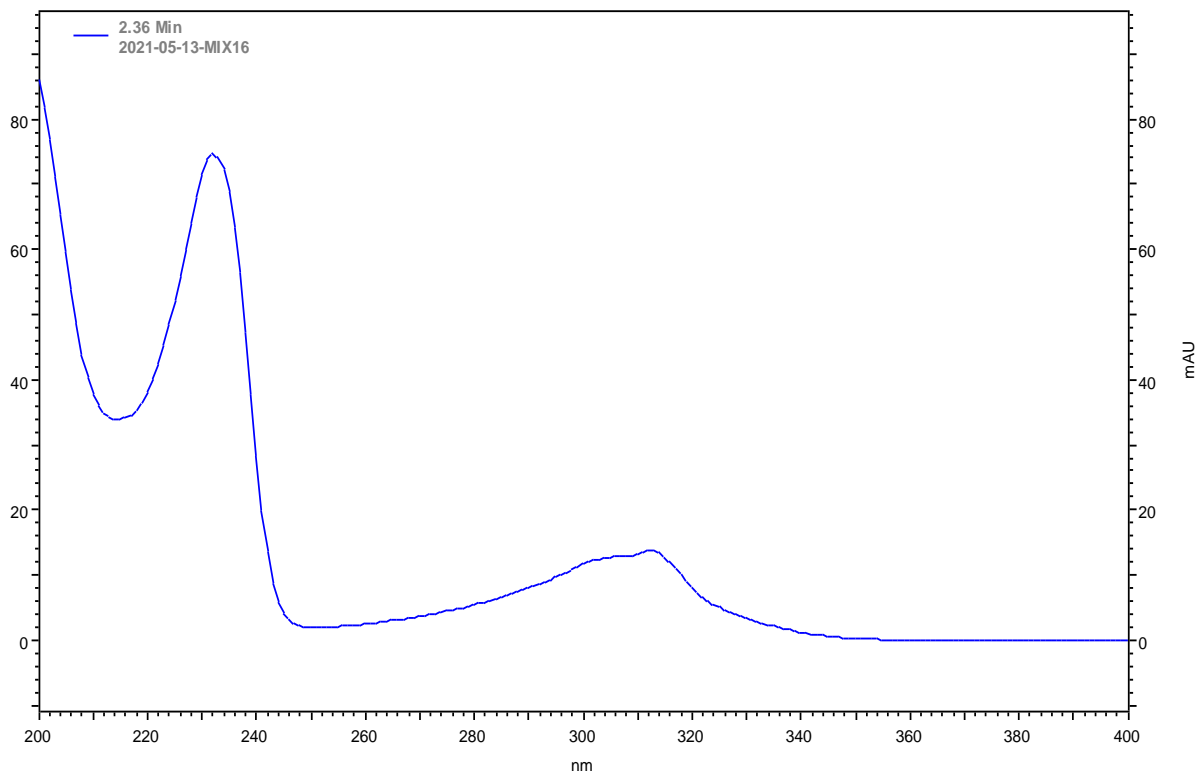
Fenantridina



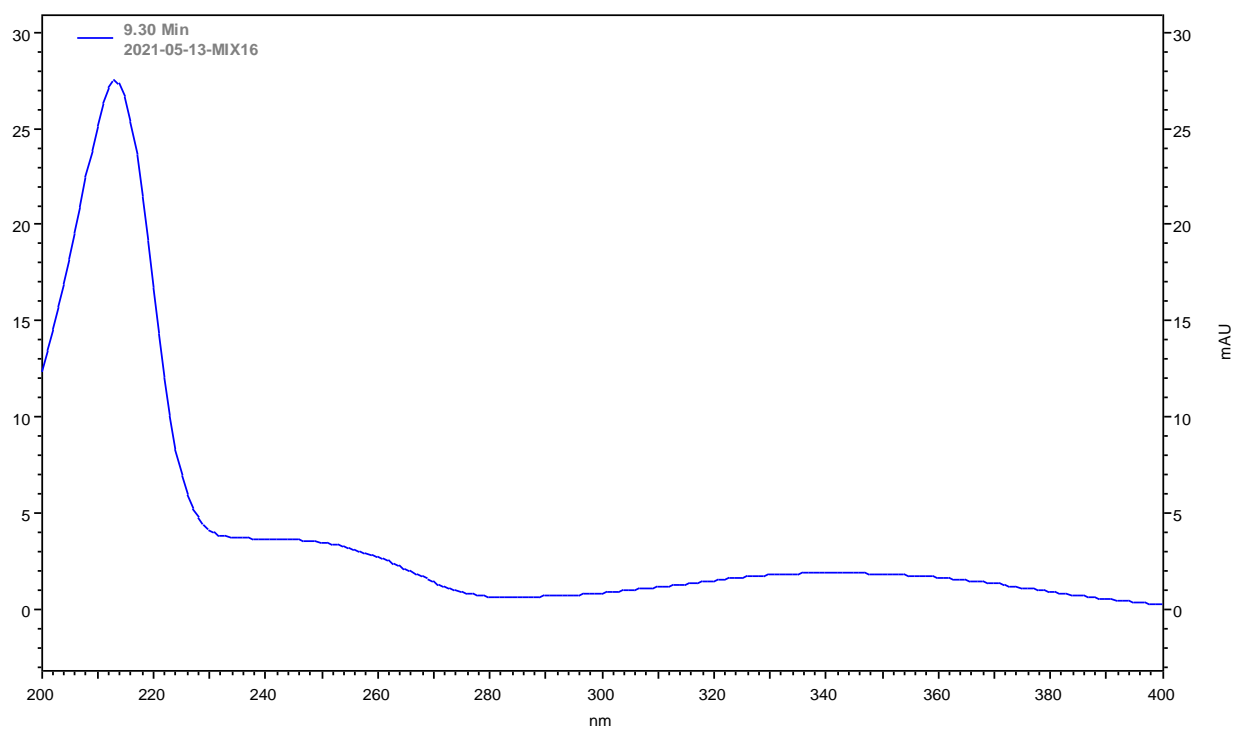
Acridina



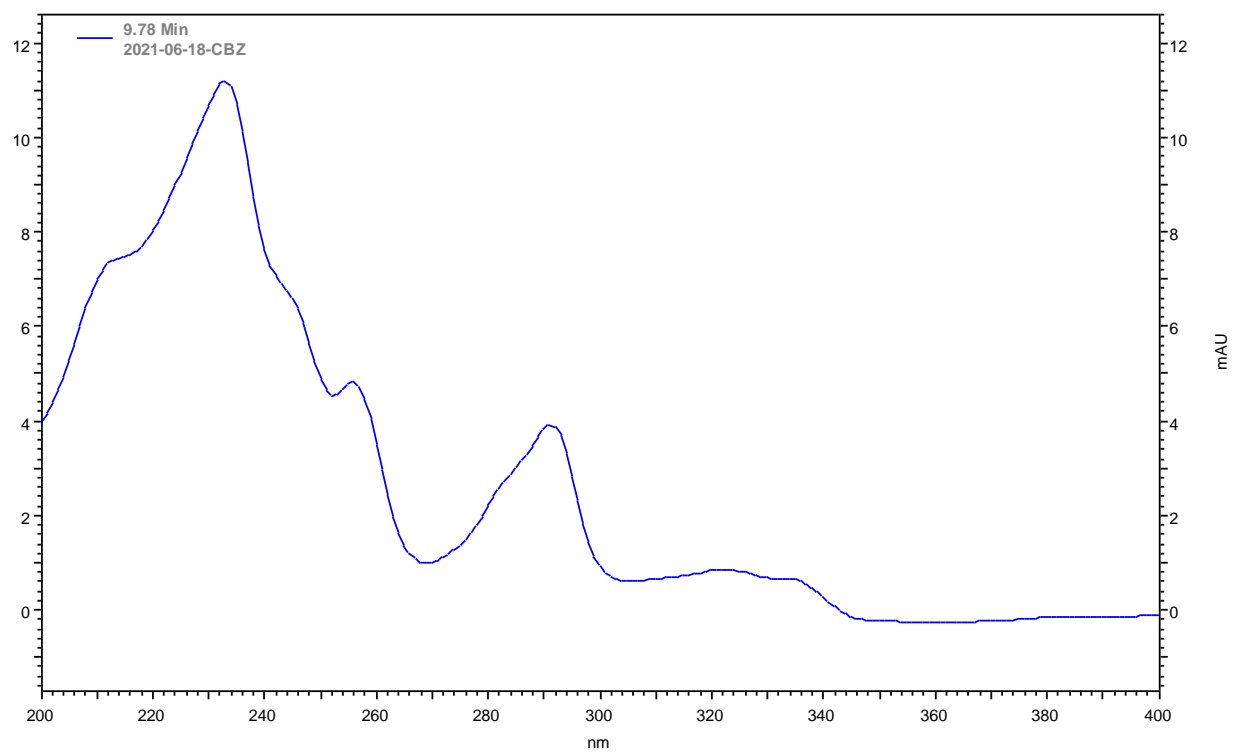
Quinolina



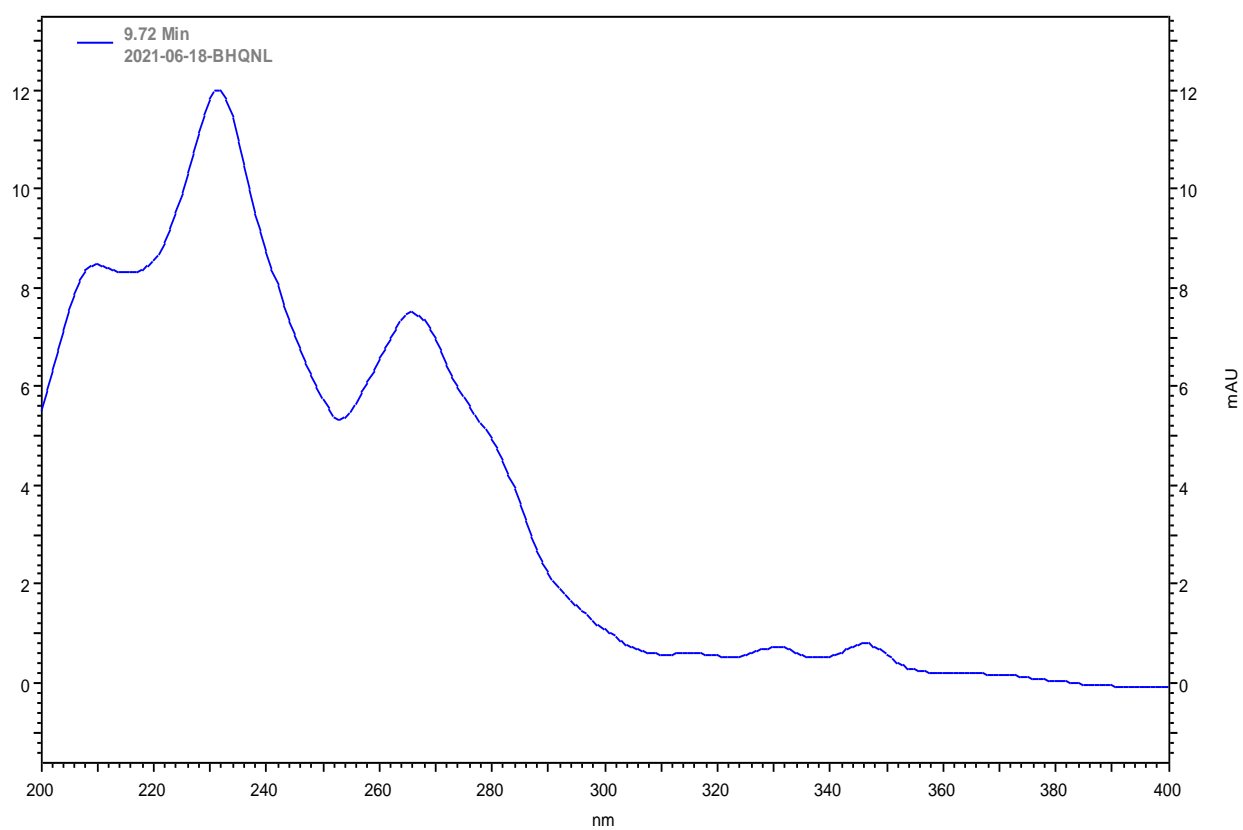
1-nitronaftaleno



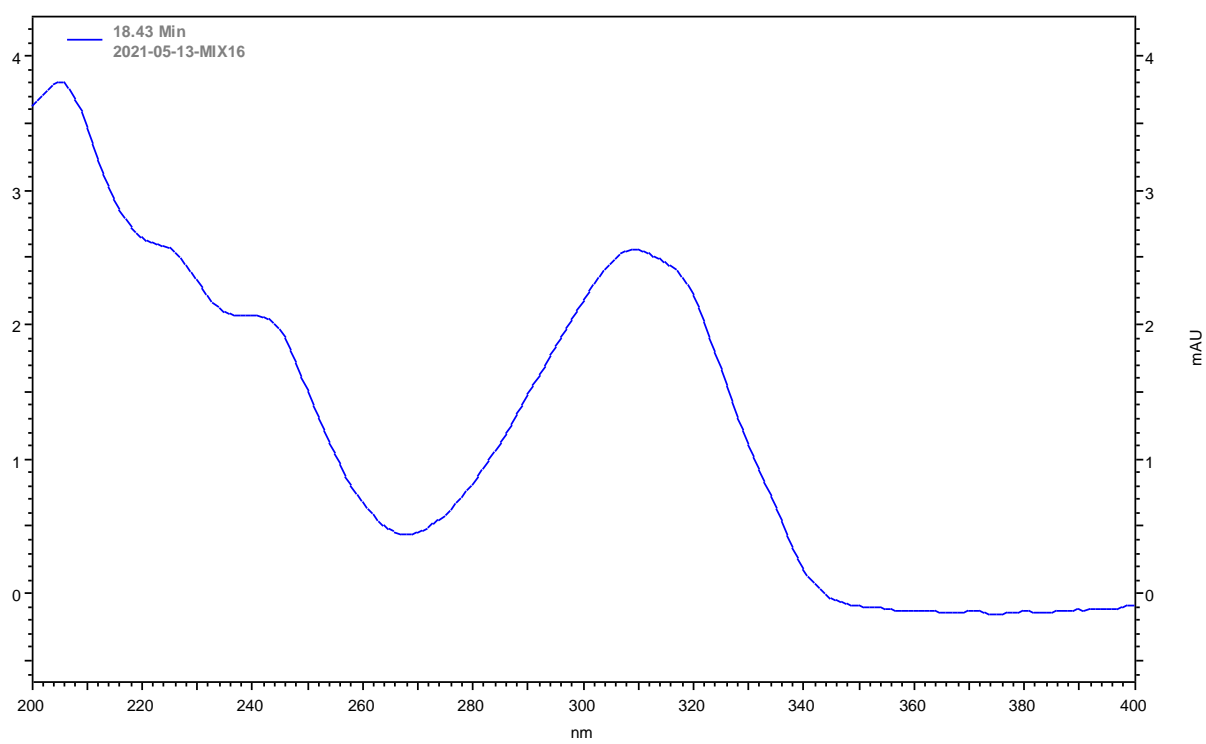
Carbazol



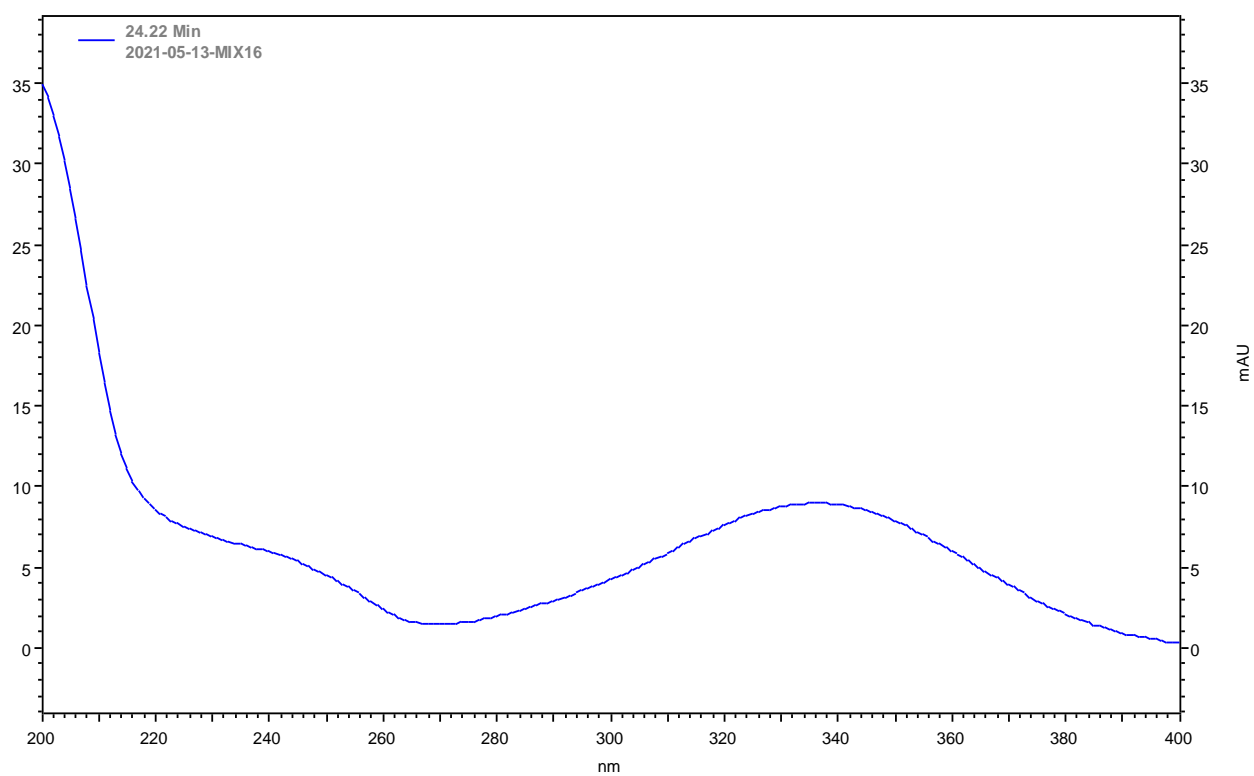
Benzo[h]quinolina



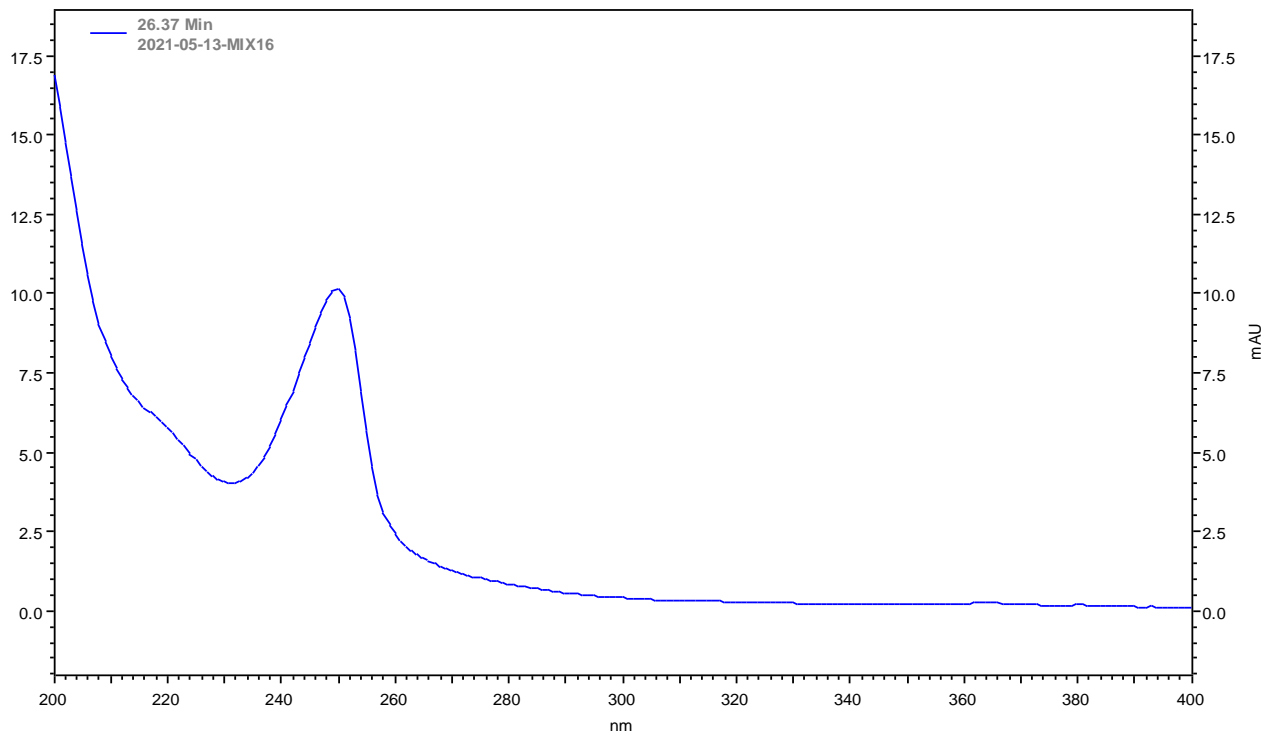
2-fenilindol



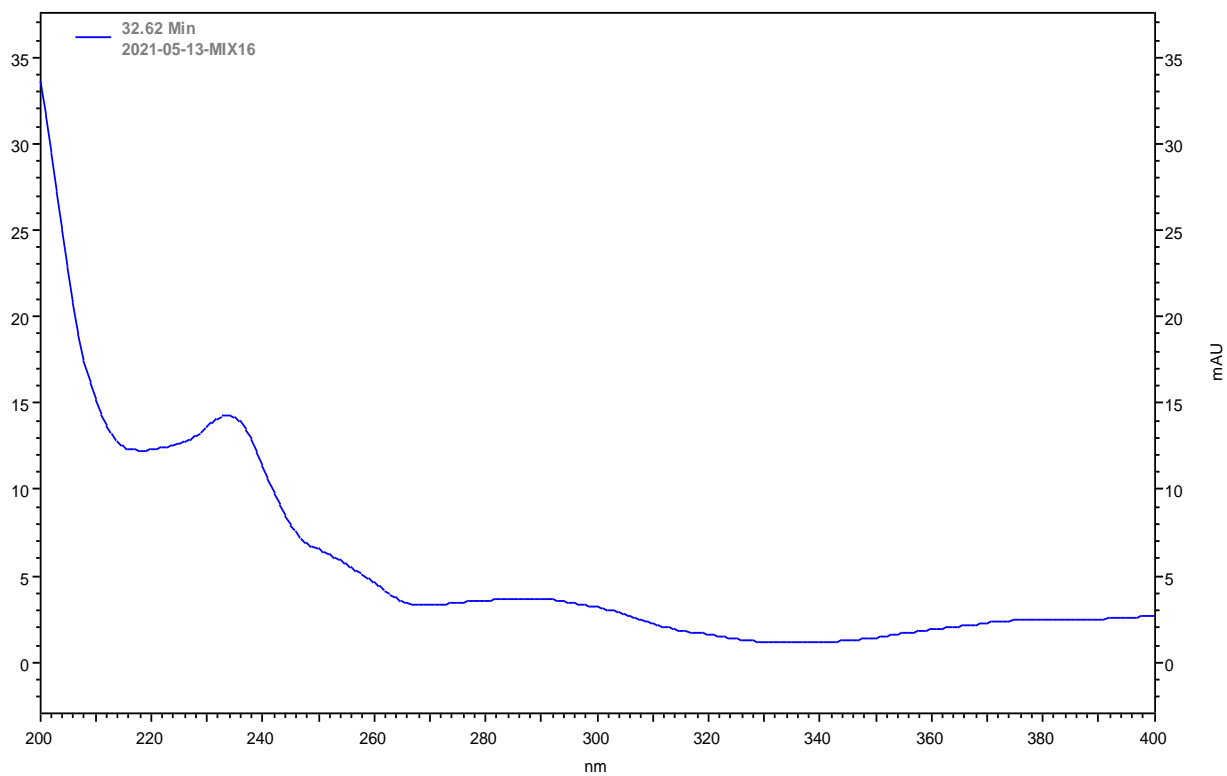
2-nitrofluoreno



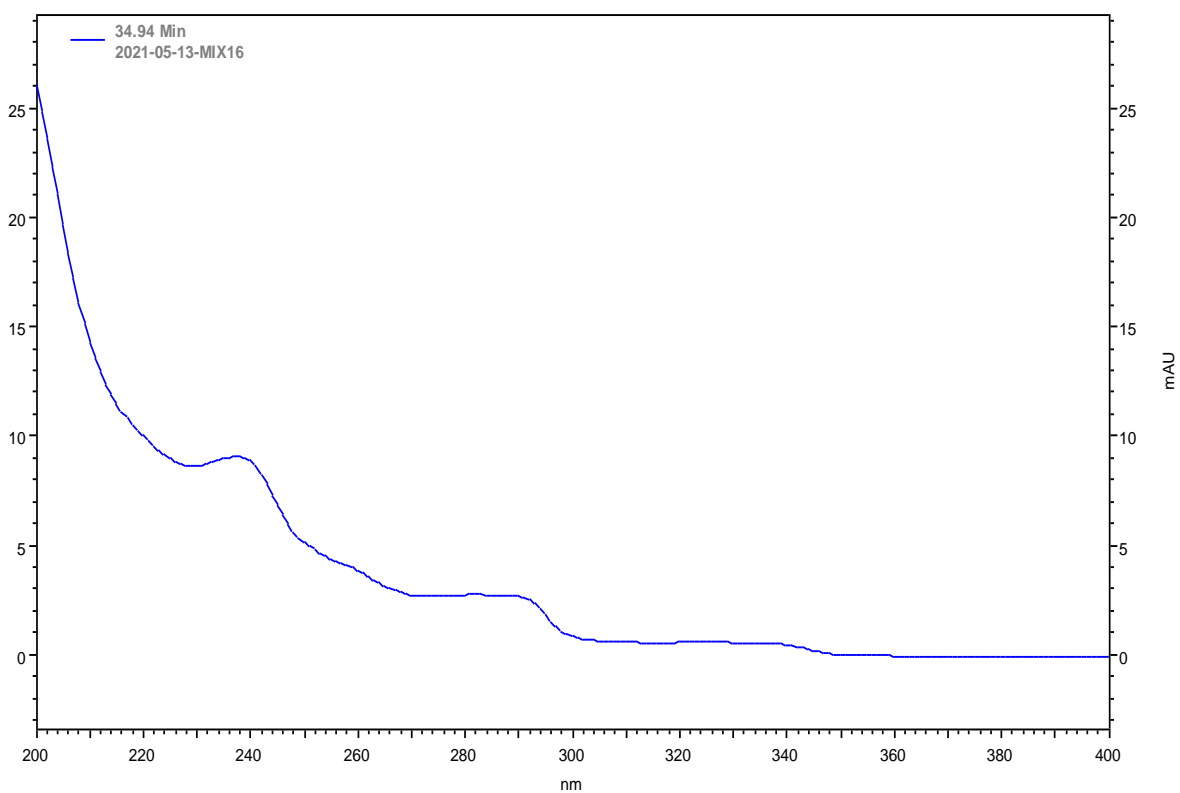
9-nitroantraceno



1-nitropireno



9-fenilcarbazol



APÊNDICE B - Espectro em 3D do método em fase reversa

