

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

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SEUS DERIVADOS
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciana Assis Gobo

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS E SEUS DERIVADOS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Luciana Assis Gobo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós -
graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica,
da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Assis Gobo, Luciana
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS E SEUS DERIVADOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS / Luciana
Assis Gobo.-2013.
98 p. ; 30cm

Orientadora: Denise Bohrer do Nascimento
Coorientadora: Paulo Cícero Nascimento
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2013

1. LC-MS 2. HPAs 3. NHPAs 4. OHPAs 5. Ligante
asfáltico I. Bohrer do Nascimento, Denise II.
Nascimento, Paulo Cícero III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centra de ciências naturais e exatas
Programa de Pós-graduação em Química**

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de
Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS E SEUS DERIVADOS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA
DE MASSAS**

elaborada por
Luciana Assis Gobo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA:



Denise Bohrer do Nascimento, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Carine Viana Silva, Dr^a (UFSM)



Daiane Dias, Dr^a (UFPel)

Santa Maria, 06 de agosto de 2013

Dedico este trabalho aos meus pais Lauri e Maria Angelina, por terem me ensinado desde sempre a importância do conhecimento, a importância de se colocar amor em tudo o que fazemos e por serem meu espelho.

À minha avó Adelaide Andretti Assis exemplo de força e coragem, por me ensinar que com fé e determinação somos capazes de mudar o mundo e nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento, um agradecimento especial por ter me concedido a oportunidade de ingressar na pesquisa, por ser um exemplo de profissional e pesquisadora. Obrigada pela amizade e pela orientação durante os 3 anos de iniciação científica e 2 anos de mestrado.

Ao Professor Dr. Paulo Cicero do Nascimento pela amizade, ensinamentos, co-orientação e ainda pela participação na comissão examinadora do Exame de Qualificação.

Ao Professor Dr. Leandro Machado de Carvalho pelo incentivo, amizade e momentos de descontração vivenciados no laboratório.

À professora Dr^a. Carine Viana pela participação na banca examinadora da Defesa de Dissertação. Obrigada pelo carinho e amizade.

À Professora Dr^a. Daiane Dias, pela participação na comissão examinadora do Exame de qualificação e Defesa de Dissertação. Obrigada pelos ensinamentos, “puxões de orelha” e verdadeira amizade.

Aos meus pais, Lauri e Maria Angelina, por serem meu porto seguro, minha força, por terem enfrentado todas as tempestades ao meu lado. Se cheguei até aqui é graças a vocês, sem seu amor, compreensão e apoio nada disso seria possível. Não há como expressar o quanto eu amo vocês.

Ao meu irmão João Paulo, meu melhor amigo, meu conselheiro, obrigado por tudo que me ensinaste, principalmente por me mostrar que não devemos ter medo da vida, que devemos encará-la de frente para que possamos apreciar o que ela tem de melhor. Amo você.

Agradeço também as minhas avós Adelaide e Hilda e minha tia-avó Ana Maria, que são para mim exemplos de amor, fé e carinho. Obrigada pelas noites de sono perdidas rezando por mim.

À minha querida tia Angela Maria Assis Borges, por ser sinônimo de alegria e coragem. Por me alegrar nos momentos mais difíceis e me mostrar sempre o valor de um sorriso. Aos meus tios Silvio Assis filho, Dalva Assis, Paulo Roberto Silva Borges, e meus primos Mariana Assis Borges, Gabriel Assis Borges e Carolina Assis, obrigada pelo apoio e carinho de sempre.

À irmã que a vida me permitiu escolher Viviana Ferrari, obrigada pelo incentivo, compreensão e verdadeira amizade, por estar presente tanto nos momentos de alegria quanto nos de dificuldades durante estes 18 anos de amizade. Às melhores amigas que alguém poderia encontrar Ana Rosa Cabral, Mayara Bernardinis, Márcia Martins, Fernanda Vargas, Betina Lagomarsino e Daila Tirloni, obrigada pelo apoio, carinho, compreensão e amizade de sempre.

À todos os colegas do Lachem, Alex, Alexandre, Ananda, Bruna, Carla, Carolina, Crhys, Cristian, Diana, Fernanda, Franciele, Fábio, Helena, Henrique, Lisandro, Lucas, Luis Claussen, Luis Ferraz, Marcella, Mariana, Márcia, Patrícia, Rayane, Rejane, Roberta, Sandra, Thais e Valéria muito obrigada pelo coleguismo e amizade.

À Marlei Veiga dos Santos, minha “Mãe cromatográfica” obrigada por todos os ensinamentos, e principalmente pela amizade construída nestes anos de trabalho conjunto.

Às minhas queridas Lulu's, Ana Paula, Géssica, Gabriela, Larissa, Mariele e Monique obrigada pela amizade e companheirismos de sempre. Pelos momentos de descontração e cantorias na cromatografia, por compartilharem comigo as dúvidas e inseguranças da pesquisa. E pela força em todos os momentos.

À CAPES e à Petrobras pelo suporte financeiro.

Por fim gostaria de agradecer acima de tudo a Deus por estar presente em todos os momentos de minha vida e por ter me concedido a graça de conhecer conviver e aprender com pessoas tão queridas e especiais. As quais talvez eu não consiga expressar o quanto sou grata.

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.”

Eduardo Galeano em O Livro dos Abraços

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SEUS DERIVADOS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

AUTORA: Luciana Assis Gobo
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Denise Bohrer do Nascimento
Santa Maria, 06 de agosto de 2013.

Neste trabalho, métodos analíticos utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica (LC-APCI-MS), foram desenvolvidas para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em frações do asfalto. Foram determinados 14 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), 7 derivados nitrogenados (NHPAs) e 5 derivados oxigenados (OHPAs). Estes compostos caracterizam-se por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados, atividade carcinogênica e mutagênica, e por estarem amplamente distribuídos como constituintes de misturas complexas em muitos ambientes. Os parâmetros da interface de ionização química a pressão atmosférica (APCI) foram otimizados com o objetivo de obter a maior sensibilidade possível para todos os compostos. Os limites de detecção dos métodos variaram de 0,5 a 346,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os HPAs, 0,1 a 57,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os NHPAs e 0,1 a 6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os OHPAs. Já os limites de quantificação ficaram na faixa de 1,7 a 1550 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os HPAs, 4,6 a 191 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os NHPAs e por fim 0,3 a 8,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os OHPAs. Os métodos analíticos desenvolvidos foram aplicados em amostras de asfalto brasileiro, após seu fracionamento segundo a ASTM D4124 e o método de Green. As concentrações dos HPAs quantificados na amostra variaram de 0,86 a 647 mg Kg^{-1} , a concentração de NHPAs foi de 9,26 a 2146 mg Kg^{-1} e a presença de OHPAs não foi detectada.

ABSTRACT

Master Dissertation in Chemistry
Postgraduate in Chemistry
Federal University of Santa Maria

DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND ITS DERIVATIVES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED MASS SPECTROMETRY

AUTHOR: Luciana Assis Gobo
ADVISOR: Prof. Dr. Denise Bohrer do Nascimento
Santa Maria, August 6, 2013

In this study analytical methods using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (LC-APCI-MS) were developed for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt fractions. Fourteen polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) 7 nitrogenated derivatives (NHPAs) and 5 oxygenated derivatives (OHPAs) were determined. These compounds are characterized by having two or more condensed aromatic rings, they have mutagenic and carcinogenic activity, and are widely distributed as constituents of complex mixtures in many environments. APCI interface parameters were optimized in order to obtain the highest sensitivity for all compounds. The detection limits of the methods ranged from 0,5 to 346,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ for PAHs, from 0.1 to 57.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NHPAs and 0.1 to 6.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for OHPAs. The limits of quantification were in the range from 1.7 to 1550 $\mu\text{g L}^{-1}$ for PAHs, from 4.6 to 191 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NHPAs and finally 0.3 to 8.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ for OHPAs. The analytical methods developed were applied to brazilian asphalt samples after their fractionation according to ASTM D4124 and Green method. The concentration of PAHs in this sample ranged from 0.86 to 647 mg kg^{-1} , and NHPAs were 9.26 to 2146 mg kg^{-1} , the OPAHs were not detected.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VISÃO GERAL DA FONTE APCI.	28
FIGURA 2. CONFIGURAÇÃO DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSA TRIPLO QUADRUPOLO	29
FIGURA 3. GRADIENTE DE ELUIÇÃO DOS HPAS.	39
FIGURA 4. GRADIENTE DE ELUIÇÃO DOS NHPAS.	40
FIGURA 5. FLUXOGRAMA DO PREPARO DAS AMOSTRAS	44
FIGURA 6. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO VAPORIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 325 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA	47
FIGURA 7. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO GÁS DE SECAGEM. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	47
FIGURA 8. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DA PRESSÃO DO NEBULIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	48
FIGURA 9 VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DO FLUXO DE GÁS. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	48
FIGURA 10. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DA VOLTAGEM DO CAPILAR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 8 L MIN ⁻¹ E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	49
FIGURA 11. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS HPAS EM FUNÇÃO DA DESCARGA DA AGULHA CORONA. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 8 L MIN ⁻¹ E VOLTAGEM DO CAPILAR 3000 V.	49
FIGURA 12. ESPECTRO DE MASSAS DE UMA AMOSTRA SINTÉTICA DE HPAS. FONTE DE ÍONS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 8 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 20 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 3000 V E DESCARGA DA CORONA 10 µA. VOLUME DE INJEÇÃO 20 µL.	51
FIGURA 13. CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DO PADRÃO 3 DOS HPAS. COLUNA PURSUIT 3 PAH 4,6 x 100 MM E 3 µM. FASE MÓVEL 80% METANOL/ÁGUA, EM 9 MINUTOS 90% E 9,5 MINUTOS 100%. FLUXO 0,8 mL MIN ⁻¹ E VOLUME DE INJEÇÃO DE 20 µL.	52
FIGURA 14. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PADRÃO 3 PARA CADA M/Z DOS HPAS MONITORADA.	53
FIGURA 15. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO VAPORIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 325 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4µA.	55
FIGURA 16 VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO GÁS. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	55
FIGURA 17. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DO FLUXO DE GÁS. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	56

FIGURA 18. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DA PRESSÃO DO NEBULIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, FLUXO DE GÁS 5L MIN ⁻¹ , VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	57
FIGURA 19. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DA VOLTAGEM DO CAPILAR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	57
FIGURA 20. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS NHPAS EM FUNÇÃO DA DESCARGA DA AGULHA CORONA. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ E VOLTAGEM DO CAPILAR 3500 V.	58
FIGURA 21. ESPECTRO DE MASSAS DE UMA AMOSTRA SINTÉTICA DE NHPAS FONTE DE ÍONS: TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 20 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 3500 V E DESCARGA DA CORONA 10 µA. VOLUME DE INJEÇÃO 20 µL.	59
FIGURA 22. CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DO PADRÃO 4 DOS NHPAS. COLUNA 120 EC-C18 3,0 x 50 MM E 2,7 µM. FASE MÓVEL 60% METANOL/ÁGUA ATÉ 1 MINUTO, EM 2 MINUTOS 100% METANOL. FLUXO 0,6 ML MIN ⁻¹ E O VOLUME DE INJEÇÃO 10 µL.	59
FIGURA 23. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PADRÃO 4 PARA CADA M/Z DOS NHPAS MONITORADA.	60
FIGURA 24. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO VAPORIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO GÁS 325 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4µA.	62
FIGURA 25. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DO GÁS. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 60 PSI VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	62
FIGURA 26. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DO FLUXO DE GÁS. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	63
FIGURA 27. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DA PRESSÃO DO NEBULIZADOR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, FLUXO DE GÁS 5 L MIN ⁻¹ , VOLTAGEM DO CAPILAR 2500 V E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	64
FIGURA 28. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DA VOLTAGEM DO CAPILAR. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ E DESCARGA DA CORONA 4 µA.	64
FIGURA 29. VARIAÇÃO DA ÁREA DO SINAL DO CONJUNTO DOS OHPAS EM FUNÇÃO DA DESCARGA DA AGULHA CORONA. PARÂMETROS MANTIDOS FIXOS: TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, TEMPERATURA DO GÁS 300 °C, PRESSÃO DO NEBULIZADOR 20 PSI, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ E VOLTAGEM DO CAPILAR 3500 V.	65
FIGURA 30. ESPECTRO DE MASSAS DE UMA AMOSTRA SINTÉTICA DE OHPAS FONTE DE ÍONS: TEMPERATURA DO GÁS 250 °C, TEMPERATURA DO VAPORIZADOR 250 °C, FLUXO DE GÁS 13 L MIN ⁻¹ , NEBULIZADOR 20PSI, VOLTAGEM DO CAPILAR 3000 V E DESCARGA DA CORONA 10 µA. VOLUME DE INJEÇÃO 10µL.	66
FIGURA 31. CROMATOGRAMA DA SEPARAÇÃO DO PADRÃO 5 DOS OHPAS. ZORBAX MODELO SB-C18 2,1 x 50 MM E 1,8 µM. FASE MÓVEL 60% METANOL/ÁGUA. FLUXO 0,5 ML MIN ⁻¹ E O VOLUME DE INJEÇÃO 5 µL.	67
FIGURA 32. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DO PADRÃO 5 PARA CADA M/Z DOS OHPAS MONITORADA.	68

FIGURA 33. CROMATOGRAMA DOS HPAS OBTIDO PARA FRAÇÃO ÁCIDA E FRAÇÃO ÁCIDA + SPIKE.	74
FIGURA 34. CROMATOGRAMA DOS HPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO BASICA E FRAÇÃO BÁSICA + SPIKE	75
FIGURA 35. CROMATOGRAMA DOS HPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO NEUTRA E FRAÇÃO NEUTRA + SPIKE.	75
FIGURA 36. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO ÁCIDA PARA CADA M/Z DOS HPAS MONITORADA.	76
FIGURA 37. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO BÁSICA PARA CADA M/Z DOS HPAS MONITORADA.	77
FIGURA 38. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO NEUTRA PARA CADA M/Z DOS HPAS MONITORADA.	78
FIGURA 39. CROMATOGRAMA DOS NHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO ÁCIDA E FRAÇÃO ÁCIDA + SPIKE.	82
FIGURA 40. CROMATOGRAMA DOS NHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO BASICA E FRAÇÃO BÁSICA + SPIKE.	83
FIGURA 41. CROMATOGRAMA DOS NHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO NEUTRA E FRAÇÃO NEUTRA + SPIKE.	83
FIGURA 42. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO ÁCIDA PARA CADA M/Z DOS NHPAS MONITORADA.	84
FIGURA 43. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO BÁSICA PARA CADA M/Z DOS NHPAS MONITORADA.	85
FIGURA 44. CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA FRAÇÃO NEUTRA PARA CADA M/Z DOS NHPAS MONITORADA.	86
FIGURA 45. CROMATOGRAMA DOS OHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO ÁCIDA E FRAÇÃO ÁCIDA + SPIKE.	88
FIGURA 46. CROMATOGRAMA DOS OHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO BÁSICA E FRAÇÃO BÁSICA + SPIKE.	89
FIGURA 47. CROMATOGRAMA DOS OHPAS OBTIDO PARA A FRAÇÃO NEUTRA E FRAÇÃO NEUTRA + SPIKE.	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPAS. ADAPTADO DE WANG ET AL. 2009.	20
TABELA 2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS NHPAS E OHPAS. ADAPTADO DE WALGRAEVE ET AL.,2010.	21
TABELA 3. TEOR DE HPAS EM BETUME E FUMOS DE BETUME. (ASPHALT INTITUTE, EUROBITUME, 2011).....	24
TABELA 4. CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE CADA UM DOS HPAS.....	35
TABELA 5. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (A) DOS HPAS.	36
TABELA 6. CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE CADA UM DOS NHPAS.	36
TABELA 7. CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DE CADA UM DOS OHPAS.	37
TABELA 8. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (C) OHPAS.	37
TABELA 9. PARÂMETROS TESTADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA FONTE APCI PARA OS HPAS.....	38
TABELA 10. PARÂMETROS TESTADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA FONTE APCI PARA OS NHPAS.	40
TABELA 11. PARÂMETROS TESTADOS PARA OTIMIZAÇÃO DA FONTE APCI PARA OS OHPAS.	41
TABELA 12. NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DOS HPAS, NHPAS E OHPAS NA FAIXA DE TRABALHO (CURVA ANALÍTICA).	43
TABELA 13. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA OS 14 HPAS.....	45
TABELA 14. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A FONTE APCI PARA OS HPAS.	50
TABELA 15. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA OS 7 NHPAS.....	54
TABELA 16. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A FONTE APCI PARA OS NHPAS.....	58
TABELA 17. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA OS 5 OHPAS.....	61
TABELA 18. PARÂMETROS OTIMIZADOS PARA A FONTE APCI PARA OS OHPAS.....	65
TABELA 19. PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A DETERMINAÇÃO DOS HPAS.	70
TABELA 20. PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A DETERMINAÇÃO DOS HPAS.	71
TABELA 21. PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NHPAS.....	72
TABELA 22. PARÂMETROS ANALÍTICOS DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A DETERMINAÇÃO DOS OHPAS.	73
TABELA 24. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO E ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE CADA UM DOS HPAS NA FRAÇÃO MALTÊNICA (N = 3).	80
TABELA 25. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO E ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE CADA UM DOS HPAS NA FRAÇÃO MALTÊNICA (N = 3).	81
TABELA 26. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO E ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE CADA UM DOS NHPAS NA FRAÇÃO MALTÊNICA (N = 3).....	87
TABELA 27. RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO E ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE CADA UM DOS NHPAS NA FRAÇÃO MALTÊNICA (N = 3).....	87
TABELA 28. RESULTADOS DO ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DE CADA UM DOS OHPAS NA FRAÇÃO MALTÊNICA (N = 3).	91
TABELA 29. RESULTADOS DA RECUPERAÇÃO MÉDIA DOS HPAS, NHPAS E OHPAS NA AMOSTRA DE ASFALTO (N = 3).	92
TABELA 30. CONCENTRAÇÃO CALCULADA DE HPAS E NHPAS NA AMOSTRA DE ASFALTO.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI Ionização química a pressão atmosférica, do inglês Atmospheric Pressure Chemical Ionization

APPI Fotoionização a pressão atmosférica, do inglês Atmospheric Pressure Photo Ionization

ASTM, Sociedade americana de testes e materiais, do inglês American Society for Testing and Materials

CAP Cimento Asfáltico de Petróleo

DPR Desvio Padrão Relativo

ESI Eletro nebulização, do inglês Electrospray Ionization

FAB Fonte de bombardeamento com átomos rápidos, do inglês Fast Atom Bombardment

GC Cromatografia gasosa, do inglês Gas Chromatography

GC-MS Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry

HPAs Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LC Cromatografia líquida, do inglês Liquid Chromatography

LC-MS Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry

LD Limite de Detecção

LQ Limite de Quantificação

MALDI Dessorção-ionização a laser assistida por matriz, do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MS Espectrometria de massas, do inglês Mass Spectrometry

MRM Monitoramento seletivo de reações, do inglês Multiple Reaction Monitoring

(m/z) Razão massa/carga

NHPAs Derivados Nitrogenados dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

OHPAs Derivados Oxigenados dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

ROS Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species

SIM Monitoramento seletivo de íons, do inglês Selected Ion Monitoring

UV Ultravioleta

TOF Tempo de vôo, do inglês Time of Flight

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados oxigenados e nitrogenados.	18
3.2	Ligante asfáltico	22
3.3	Métodos para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados oxigenados e nitrogenados	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Instrumentação, Reagentes e Soluções	33
4.2	Desenvolvimento e Otimização dos Métodos	37
4.2.1.	Desenvolvimento da metodologia para determinação de HPAs	37
4.2.2.	Desenvolvimento da metodologia para determinação de NHPAs	39
4.2.3.	Desenvolvimento da metodologia para determinação de OHPAs	41
4.3	Validação das metodologias desenvolvidas	42
4.4	Preparação das amostras	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Métodos desenvolvidos:	45
5.1.1.	Método para determinação de HPAs	45
5.1.2.	Método para determinação de NHPAs	53
5.1.3.	Método para determinação de OHPAs	61
5.2	Validação dos métodos desenvolvidos	68
5.3	Aplicação na amostra de asfalto:	74
6	CONCLUSÃO:	94
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados oxigenados e nitrogenados são formados a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, queima de combustíveis fósseis e através de reações atmosféricas com espécies oxidativas como ozônio, radicais hidroxila e nitratos, assim como fotorreações na presença de radiação ultravioleta. (WALGRAEVE et al.,2010)

Tanto os HPAs quanto seus derivados nitrogenados e oxigenados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem. Os HPAs não são mutagênicos diretos, não reagem diretamente com o DNA, necessitando sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas (NETTO et al., 2000). Entretanto, seus derivados oxigenados e nitrogenados caracterizam-se por possuírem atividade mutagênica direta e por serem bioacumulativos e carcinogênicos, sendo considerados mais tóxicos para os seres humanos que seus compostos de origem, os HPAs. (WALGRAEVE et al.,2010)

Por se tratarem de compostos com alto peso molecular, os HPAs e seus derivados estão presentes geralmente nas frações pesadas dos derivados de petróleo, como o ligante asfáltico. (BRANDIT; DE GROOT, 2001)

O ligante asfáltico é obtido a partir da destilação do petróleo e é geralmente utilizado em serviços de pavimentação, juntamente com outros componentes formando uma mistura adequada para resistir às intempéries.

Por ser uma mistura complexa com uma grande variedade de compostos orgânicos, o ligante asfáltico pode ser oxidado quando entra em contato com o ar e quando aquecido, gerando uma série de gases voláteis no meio ambiente. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são podem ser encontrados em resíduos e voláteis emitidos durante o processo de aquecimento do ligante asfáltico. (FERNANDES et al., 2007)

Alguns estudos revelaram que, embora os níveis de exposição dos profissionais no setor de pavimentação a estes compostos sejam geralmente baixos, longos períodos de tempo de exposição por inalação ou mesmo riscos por contaminação da pele, pode causar danos à saúde do trabalhador. (FERNANDES et al., 2007)

Neste cenário, a determinação da presença dos HPAs e seus derivados na matriz asfáltica torna-se um parâmetro importante tanto para a indústria petroquímica quanto para a saúde populacional, tendo em vista o potencial carcinogênico destes compostos.

Muitos métodos são descritos na literatura para a determinação desta classe de compostos e seus derivados utilizando técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida com detecção por fluorescência. No entanto, as técnicas utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas ainda estão em pleno desenvolvimento. (WALGRAEVE et al.,2010). Outras amostras ambientais já foram estudadas a fim de determinar e quantificar a presença de HPAs e seus derivados, tais como: material particulado atmosférico, água, óleo diesel, óleo de cozinha, alimentos, etc. Entretanto, a matriz asfáltica ainda é pouco estudada devido a sua complexidade.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias analíticas, utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas, para a determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados nitrogenados e oxigenados em asfalto brasileiro.

2.1 Objetivos específicos:

- Desenvolver um método para a determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
- Desenvolver um método para a determinação dos derivados nitrogenados dos HPAs.
- Desenvolver um método para a determinação dos derivados oxigenados dos HPAs.
- Aplicar os métodos desenvolvidos em amostras da fração maltênica do asfalto.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados oxigenados e nitrogenados.

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em pessoas que trabalhavam limpando chaminés. (HAWES; CLARCK; COLLINS, 1775, apud, NETTO et al., 2000, p.767) Muitos anos depois desta publicação, a carcinogenicidade foi atribuída à presença de benzo(a)pireno nos resíduos das chaminés. Posteriormente, foi comprovado experimentalmente que somente a presença do benzo(a)pireno não justificava o dano observado, sendo o alto potencial carcinogênico atribuído também à presença de outros membros da família dos HPAs e de alguns de seus derivados. (NETTO et al., 2000)

A continuidade dos estudos conduziu à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico atribuído à presença dos HPAs, tais como: produção de alumínio, gaseificação de carvão, produção de coque, produção de eletrodos de carbono, betumes (extratos), negro de carvão, exaustão de motores a diesel exaustão de motores a gasolina, óleo de xisto, entre outras. (NETTO et al., 2000)

A presença de benzo(a)pireno é considerada por entidades regulamentadoras, como a Organização Mundial da Saúde, um marcador do potencial carcinogênico dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. (DELGADO-SABORIT et al., 2011) Estudos toxicológicos mostraram a associação entre a exposição de animais aos HPAs e a toxicidade cardiovascular, toxicidade óssea, toxicidade reprodutiva, supressão do sistema imunológico e câncer. (COLLINS et al., 1998) Estudos epidemiológicos também ressaltam que a evidência de câncer, problemas genéticos, má formação fetal, desordens respiratória e do sistema nervoso podem estar ligadas a exposição ocupacional a níveis de HPAs. No entanto, a exposição humana a estes compostos é muito variável pois ocorre sempre frente a complexas misturas dos mesmos que não mantém uma composição constante. Além disso, os únicos dados toxicológicos disponíveis para avaliar o potencial carcinogênico individual dos HPAs são aplicados a animais e os resultados são

extrapolados para as doses baixas as quais os seres humanos são expostos. Desta forma, torna-se difícil avaliar as consequências e atribuições de cada HPA para a saúde humana. (DELGADO-SABORIT et al., 2011)

Os HPAs são introduzidos no ambiente por fontes naturais e antrópicas. As principais fontes naturais incluem a queima natural de florestas, as emissões vulcânicas e os afloramentos naturais de petróleo (processos petrogênicos). Alguns organismos tais como bactérias, algas e fungos, também podem produzir naturalmente HPAs (processos biogênicos). Todavia as fontes naturais são insignificantes frente às fontes antrópicas. As fontes antropogênicas de HPAs geralmente estão ligadas ao manuseio ou a combustão incompleta da matéria orgânica, especialmente combustíveis fósseis e seus derivados (processos pirogênicos). Desta forma a exposição humana aos HPAs se dá principalmente através da contaminação ambiental. (CAVALCANTE et al., 2007)

Algumas propriedades físico-químicas dos HPAs descritas no trabalho de Wang e colaboradores (2009) estão reproduzidas na tabela 1. Neste estudo os autores ressaltam através das propriedades físico-químicas, a capacidade destes compostos de permanecerem no ambiente devido a sua estabilidade química, e serem transportados para outras localidades através do transporte de partículas atmosféricas.

Os HPAs apresentam pouca solubilidade em água, e em geral sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis aromáticos presentes na molécula. Demonstram também através de seus coeficientes de partição octanol/água, uma grande afinidade lipofílica que também tende a aumentar de acordo com o número de anéis. No entanto, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular, conseqüentemente, HPAs de peso molecular mais baixo apresentam maior pressão de vapor que os mais pesados. Assim os HPAs podem ser encontrados na atmosfera tanto na fase gasosa quanto adsorvidos no material particulado. (NETTO et al., 2000)

A formação dos derivados oxigenados e nitrogenados dos HPAs ocorre a partir da combustão incompleta da matéria orgânica, queima de combustíveis fósseis e reações atmosféricas com espécies oxidativas como ozônio, radicais hidroxila e nitratos, assim como fotorreações na presença de radiação ultravioleta (UV). (WALGRAEVE et al., 2010; ZHANG et al., 2011)

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos HPAs. Adaptado de WANG et al. 2009.

Compostos	Peso Molecular (g mol⁻¹)	Número de anéis	Pressão de vapor (Pa), 5°C	Log K_{O/A} (Coeficiente octanol/água)
Naftaleno	128	2	1,66	3,30
Acenaftileno	152	3	0,50	3,60
Acenafteno	154	3	0,60	3,60
Fluoreno	166	3	0,42	4,20
Fenantreno	178	3	0,20	4,50
Antraceno	178	3	0,17	4,50
Fluoranteno	202	4	0,06	5,00
Pireno	202	4	0,05	5,00
Benzo(b)fluorenteno	252	5	5,74x10 ⁻³	6,10
Benzo(k)fluorenteno	252	5	4,47x10 ⁻³	5,30
Benzo(a)pireno	252	5	3,85x10 ⁻³	6,10
Benzo(ghi)pireno	276	6	1,31x10 ⁻³	6,60
Dibenzo(a,h)antraceno	276	6	7,69x10 ⁻⁴	6,80
Indeno(1,2,3-cd)pireno	278	6	1,46x10 ⁻³	6,60

Estudos mostram que os HPAs reagem com radicais O₃, NO_x e OH formando seus respectivos derivados tanto em ambiente laboratorial quanto em ambiente natural. (RINGET et al., 2012)

Zhang e colaboradores (2011) sugerem que os derivados oxigenados dos HPAs são mais reativos e oxidantes que os respectivos derivados nitrogenados, indicando que a nitração de oxi-e hidroxi-HPA pode ser a fonte de potencial de NHPAs (derivados nitrogenados dos HPAs). No entanto, são poucos os dados sobre a nitração de oxi-e hidroxi-HPAs, embora estes sejam muito mais mutagênicos e tóxicos do que os HPAs.

Os NHPAs, semelhante aos HPAs, mostram uma série de efeitos toxicológicos sobre o crescimento e reprodução dos seres humanos. (KOBETICOVÁ et al., 2008) Vários estudos sobre essa classe de compostos foram efetuados, a fim de determinar a sua capacidade mutagênica e cancerígena. Entre estes estudos, o teste de Ames Salmonella evidenciou que os NHPAs são geralmente mutagênicos

diretos e possuem maior potencial mutagênico que seus correspondentes HPAs. (TOLEDO et al., 2007)

A presença de 1-nitropireno é um importante índice de agentes cancerígenos relacionados ao meio ambiente, devido à sua alta concentração no meio ambiente e de sua capacidade mutagênica. (KUO et al., 2003)

Os OHPAs (derivados oxigenados dos HPAs) têm sido correlacionados com a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species), sugerindo que um dos danos causados por estes compostos a saúde seja o estresse oxidativo. (KNECHT et al., 2013) O estresse oxidativo provavelmente desempenha um papel importante no processo inflamatório nas células respiratórias. Além disso, ROS podem ativar um número de vias de sinalização e eventos celulares. Estes efeitos podem provocar ou agravar, problemas de saúde, como envelhecimento, carcinogênese e processos inflamatórios crônicos. (LINTELMANN et al., 2006)

Na ausência de dados, muitas propriedades físico-químicas dos derivados de HPAs (tabela 2) são estimadas com base em cálculos. Quando comparados com os HPAs, os derivados oxigenados possuem maior peso molecular e pressão de vapor mais baixa. Já a presença de um átomo de nitrogênio no anel torna os derivados nitrogenados mais reativos, solúveis, e conseqüentemente mais “móveis” que os HPAs. (WALGRAEVE et al., 2010; ZHANG et al., 2011)

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos NHPAs e OHPAs. Adaptado de WALGRAEVE et al., 2010.

Compostos	Peso Molecular (g mol⁻¹)	Pressão de vapor (Pa, 25°C)	Log K_{O/A} (Coeficiente octanol/água)	Solubilidade em água (mgL⁻¹)
1-Nitronaftaleno	173	6,38x10 ⁻⁶	3,32	18
1-Nitropireno	247	---	4,69	---
2-Hidroxifluoreno	182	6,15x10 ⁻⁴	3,43	71
9-10-Fenantrenocarboxialdeído	206	1,14x10 ⁻⁴	4,10	2,70
1-Hidroxipireno	218	3,89x10 ⁻⁶	4,39	3,50

3.2 Ligante asfáltico

O ligante asfáltico ou o cimento asfáltico de petróleo (CAP) é produzido a partir do resíduo de destilação atmosférica e destilação o vácuo do óleo cru de petróleo. Sendo geralmente utilizado na pavimentação. O ligante asfáltico oxidado é produzido da mesma maneira, porém sofre a passagem de ar na mistura ainda quente (220 – 300 °C), sendo geralmente utilizado em aplicações de cobertura. (SCHREINER, 2011)

Muitas vezes outros produtos do processo de refino podem ser adicionados ao asfalto para que se possam atingir as características de desempenho desejadas tais como: índice de penetração, ponto de amolecimento e índice de susceptibilidade térmica, viscosidade, entre outros. Portanto a exata composição química da matriz asfáltica depende da complexidade química do óleo cru utilizado e dos produtos adicionados no processo de fabricação do asfalto. (NIOSH, 2000)

O ligante asfáltico é uma complexa mistura de hidrocarbonetos de peso molecular variando de 500 a 2000, com alto ponto de ebulição de aproximadamente 500 °C e com número de carbonos maior que 25. (SCHREINER, 2011) Os componentes majoritários do asfalto podem ser separados em asfaltenos e maltenos. Os asfaltenos são definidos como uma fração insolúvel no n-heptano. Já os maltenos são constituídos de compostos saturados, compostos aromáticos e resinas, que são solúveis no n-heptano. (BOTARO et al., 2006)

Para facilitar o manuseio para pavimentação ou cobertura (impermeabilização de telhados, por exemplo) o ligante asfáltico é aquecido podendo produzir fumos compostos por substâncias de baixo peso molecular, entre as quais podem estar os HPAs, e ainda compostos heterocíclicos contendo oxigênio, enxofre ou nitrogênio. Estes fumos podem ser inalados ou se depositar na pele e roupas dos trabalhadores. (SCHREINER, 2011) Como normalmente a mistura asfáltica é produzida e compactada a temperaturas altas, maiores que 150 °C, a presença destes gases poluentes irá afetar a qualidade do ar. (RUBIO et al., 2013)

Os trabalhadores envolvidos na preparação e aplicação do asfalto estão vulneráveis à exposição direta as emissões asfálticas que contêm HPAs. Por mais que não se tenha evidências consistentes de tais efeitos nocivos dos HPAs neste ambiente, não se pode excluir o risco carcinogênico destes elementos nestes locais (NIOSH, 2000).

Organizações reguladoras têm alertado para os possíveis efeitos carcinogênicos dos fumos de asfalto para os seres humanos, porém os dados ainda são insuficientes. Embora existam dados substanciais mostrando o potencial mutagenico e os danos ao DNA causados pela exposição aos fumos de asfalto, as pesquisas nessa área ainda são limitadas. (SCHREINER, 2011)

Segundo o Asphalt Institute e a Eurobitume, o principal processo utilizado para a produção de betumes (principal componente do asfalto, definido como uma mistura de hidrocarbonetos solúvel no bissulfeto de carbono) é a destilação a vácuo. Este processo é capaz de remover HPAs, uma vez que a formação destes compostos requer um processo de pirólise ou combustão a temperatura superior a 500 °C. No entanto, uma pequena quantidade de HPAs ainda permanece no resíduo e em fumos provenientes do asfalto. A tabela 3 apresenta níveis de HPAs analisados em diversos tipos de betumes e suas respectivas frações gasosas (fumos). A exposição ocupacional aos fumos do asfalto é frequentemente caracterizada por uma fração gasosa contendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com 3-6 anéis. (ASPHALT INTITUTE, EUROBITUME, 2011)

Desta forma, este trabalho visa contribuir na avaliação da presença dos HPAs e seus derivados nas frações do ligante asfáltico brasileiro. Para isso três métodos utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foram desenvolvidos.

Tabela 3. Teor de HPAs em betume e fumos de betume. (ASPHALT INTITUTE, EUROBITUME, 2011)

HPAs	HPAs em fumos de Betume		
	HPAs em betume (mgKg ⁻¹)	(µgm ⁻³) desvio padrão	
Naftaleno	2,5 - 3,0	5,5 (8/9)**	2,9
Acnafteno	ALD - 0,7	3,3 (1/9)	7,8
Acenaftileno	NR	3,3 (2/9)	8,5
Fluoreno	0,3 - 0,5	0,47 (1/9)	0,84
Fenantreno	0,3 - 7,3	0,82 (2/9)	2,2
Antraceno	ALD - 2,0	0,063 (1/9)	0,074
Fluoranteno	ALD - 2,0	0,98 (1/9)	2,6
Pireno	0,2 - 8,3	NA	
Criseno	<0,1 - 11	NA	
Benzo(a)antraceno	ALD - 3.3	NR	
Perileno	ALD - 39	NR	
Benzofluorantenos	ALD - 1,2	0,65 (1/9)	1,7
Benzo(e)pireno	<0,1 - 13	0,78 91/9)	1,7
Benzo(a)pireno	ALD - 4,6	0,16 (1/44)	0,072
Dibenzoantracenos	ALD - 3.3	NR	
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ALD - 2,4	NR	
Benzo(ghi)pireno	<0,1 - 4,6	NR	
Antantreno	ALD - 0,1	NR	
Dibenzo(al)pireno	ALD <0,6	NR	
Dibenzo(ai)pireno	ALD <0,6	NR	
Coroneno	ALD - 1,9	NR	

ALD = abaixo do limite de detecção

NR = não reportado

NA = não aplicável

*Monitoramento da exposição pessoal em terminais e refinarias.

**Resultado da média aritmética das amostras (o numero de amostras acima do limite de detecção/numero de amostras)

3.3 Métodos para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados oxigenados e nitrogenados

Para a determinação destes compostos, geralmente são empregadas técnicas de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas, do inglês Gas Chromatography Coupled Mass Spectrometry (GC-MS), ou cromatografia líquida, do inglês Liquid Chromatography (LC) com detecção por fluorescência. Recentemente algumas metodologias utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry (LC-MS) vêm sendo empregadas para determinação destes compostos. (HUTZLER et al.,2011)

Métodos de rotina para a de determinação dos HPAs empregam cromatografia líquida com detecção por UV (ultravioleta). No entanto, a detecção UV apresenta uma série de desvantagens, tais como problemas de seletividade, limitações de sensibilidade, não elimina interferências da matriz, especialmente em matrizes complexas. A detecção por fluorescência é mais seletiva e sensível do que a detecção por UV, e é atualmente o sistema de detecção de escolha na LC, normalmente com variável de comprimentos de onda de excitação e de emissão. Entretanto esta técnica apresenta uma desvantagem, pois nem todos os HPAs são fluorescentes. (PLAZA-BOLAÑOS et al., 2010)

Atualmente existem métodos oficiais para a análise de HPAs por GC-MS, como o EPA 8100. A utilização de GC-MS apresenta várias vantagens em comparação à cromatografia líquida com detecção por fluorescência, principalmente na sua capacidade de resolução. A GC oferece alto poder de resolução cromatográfica e MS fornece alta seletividade e informações estruturais, permitindo a determinação de HPAs e derivados que apresentam pouca ou nenhuma fluorescência. (PLAZA-BOLAÑOS et al., 2010)

Por outro lado para substâncias termo sensíveis ou compostos que apresentam baixa pressão de vapor e alta polaridade, a cromatografia gasosa só pode ser aplicada após derivatização. Neste cenário, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas vem sendo aplicada para a determinação de HPAs e seus derivados OHPAs e NHPAs. Esta técnica não necessita de derivatização e não apresenta limitações para utilização de solventes como a

cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida com detecção por fluorescência. (DELHOMME et al., 2008)

Barreto e colaboradores (2007) que desenvolveram uma metodologia para a determinação de NHPAs em fuligem de diesel utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização química a pressão atmosférica, do inglês Liquid Chromatography at Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC-APCI-MS). Os NHPAs também foram determinados utilizando cromatografia líquida capilar com detecção por UV, em amostras de água. (TOLEDO et al., 2007) Wang e colaboradores (2003) caracterizaram adutos de DNA-HPAs em tecido pulmonar de camundongos que foram expostos a fumos de asfalto utilizando cromatografia líquida de nanofluxo acoplada a espectrometria de massas por tempo de voo. Os OHPAs foram determinados em material particulado por Lintelmann e colaboradores (2006) através de um método desenvolvido e validado de LC-MS/MS.

A cromatografia caracteriza-se por ser um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases que estão em contato direto. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes, sendo possível sua identificação e quantificação. (COLLINS et al., 2006)

Já a espectrometria de massas consiste na geração de íons orgânicos ou inorgânicos para que estes possam ser separados segundo sua razão massa/carga. É uma técnica largamente utilizada para identificação, caracterização elementar e quantificação de moléculas orgânicas, inorgânicas e biomoléculas. A grande sensibilidade da técnica faz com que ela seja rotineiramente usada na análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do doping, controle de qualidade de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre muitas outras aplicações. (GROSS, 2011)

No uso do espectrômetro de massas quatro etapas são necessárias: introdução da amostra, produção de íons (fonte), separação dos íons (analisador de massas) e detecção dos íons. (SKOOG et al., 2009)

A combinação de cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massa (LC-MS) é interessante para a análise de não-voláteis, polares e / ou compostos termicamente instáveis. No entanto, em contraste com o acoplamento do GC-MS, o acoplamento do LC-MS não foi alcançado com facilidade devido às dificuldades de combinar o alto fluxo de líquido usado para a separação cromatográfica, com a exigência de alto vácuo necessário para o espectrômetro de massa. (ZIELINSKA, SAMY, 2006)

Desde a década de 70, quando as práticas de espectrometria de massas começaram a ser acopladas à cromatografia líquida, as técnicas de introdução e ionização da amostra vêm sendo desenvolvidas a fim de vencer os limites entre a fase gasosa de alto vácuo e a fase líquida. Assim ao longo das décadas seguintes, uma série de fontes de ionização foram desenvolvidas, tais como: Eletro nebulização do inglês Electrospray Ionization (ESI), ionização química a pressão atmosférica, do inglês Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), fotoionização a pressão atmosférica, do inglês Atmospheric Pressure Photo Ionization (APPI), fonte de bombardeamento com átomos rápidos, do inglês Fast Atom Bombardment (FAB), dessorção - ionização a laser assistida por matriz, do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI), entre outras. (BOSCO, 2010)

Como a ionização dos compostos a serem analisados é o principal requisito para análise por espectrometria de massas, a escolha da fonte mais adequada é de suma importância para o sucesso do método a ser desenvolvido. Neste caso devem ser avaliadas as propriedades químicas e físico-químicas dos compostos, como: polaridade, pressão de vapor, e potencial de ionização, para que se possa escolher a fonte de íons mais adequada. Somente a partir da formação de íons gasosos do analito será possível a análise por espectrometria de massas. O espectro de massas obtido para esta espécie molecular dependerá fortemente do método utilizado para a formação dos íons. (SKOOG et al., 2009)

Métodos utilizando LC-MS também têm sido aplicados em matrizes ambientais ou biológicas para determinação de HPAs e derivados. Devido ao caráter não-polar destes compostos, a fonte APCI e APPI são as técnicas de ionização mais aplicadas. (PLAZA-BOLAÑOS et al., 2010) A APCI apresenta boas condições para detecção de compostos apolares e boa tolerância a mudanças experimentais como variação da fase móvel e gradiente, suportando fluxos altos de até 2 mL/min. (ARDREY, 2003) APCI consiste na ionização da amostra usando uma descarga

corona (descarga elétrica em um gás, o qual circunda um condutor com um potencial elétrico suficientemente elevado para que o campo elétrico ao seu redor seja capaz de ionizar o gás.) a pressão atmosférica. APPI é a ionização química a pressão atmosférica na qual os íons reagentes são gerados por fotoionização, ionização de um átomo ou molécula por um fóton. (VESSECCHI et al., 2011)

A figura 1 mostra a representação esquemática da fonte de ionização APCI. O efluente da cromatografia passa através de um nebulizador pneumático, gerando pequenas gotículas. O spray assim formado passa então através de uma região aquecida onde é seco. As espécies neutras, agora em fase gasosa, passam por uma agulha corona e recebem uma descarga elétrica, que promove a ionização do analito. O mecanismo de ionização dos compostos de interesse baseia-se em um processo onde o solvente atua como um gás reagente ionizado que ioniza o analito através de colisões, transferência de carga ou transferência de um próton. (GROSS, 2011)

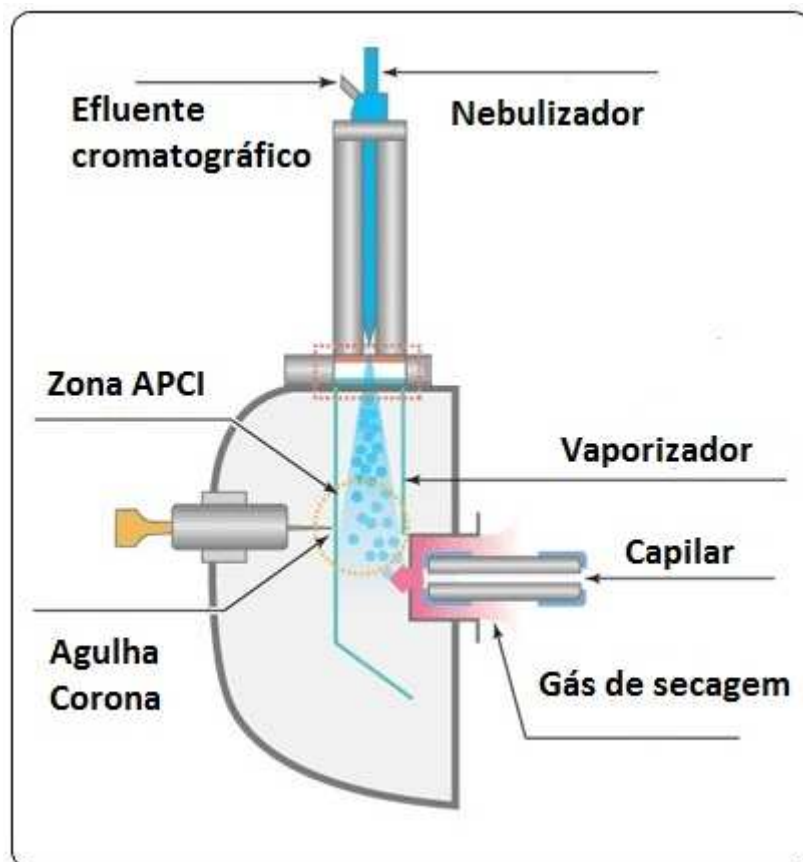


Figura 1. Visão geral da fonte APCI.

A APCI é classificada como uma fonte mole que permite a preservação do íon molecular do analito. Além disso, se aplica a compostos de baixa a moderada polaridade como os HPAs e seus derivados. (ARDREY, 2003)

Após a formação dos íons estes devem ser dispersos segundo sua razão massa carga pelo analisador de massas. Existem atualmente muitos modelos de analisadores de massa tais como: analisador por tempo de vôo do inglês time of flight (TOF), quadrupolo, setor magnético, armadilha de íons (Ion trap), e transformada de Fourier. O quadrupolo é o analisador de massa mais comum. Ele é composto de quatro hastes metálicas paralelas sobre as quais se aplica um potencial elétrico oscilante de radiofrequência. O campo elétrico estabelece trajetórias complexas para os íons quando eles migram através do quadrupolo em direção ao detector, permitindo apenas que íons de determinada massa/carga (m/z) alcancem o transdutor. (GROSS, 2011)

Em um instrumento triplo quadrupolo (figura 2) para obter-se maior seletividade, deve-se fazer uso do monitoramento seletivo de íons, do inglês Selected Ion Monitoring (SIM). Neste modo de operação os analisadores de massas estão ajustados para monitorar apenas alguns poucos valores de m/z . (HARRIS, 2005)



Figura 2. Configuração de um espectrômetro de massa triplo quadrupolo

A seletividade e a razão sinal/ruído podem ser expressivamente melhoradas pelo monitoramento seletivo de reações, do inglês Multiple Reaction Monitoring (MRM), neste modo de operação o quadrupolo Q1 permite a passagem de apenas

um íon precursor para o quadrupolo Q2 também chamado de célula de colisão. Nesta célula de colisão, o íon precursor colide com moléculas de N₂ e se fragmenta formando íons produto. O quadrupolo Q3 permite que apenas determinados íons produto atinjam o detector. (HARRIS, 2005)

O modo MRM é extremamente seletivo para o analito de interesse e permite o monitoramento de mais de um íon precursor e mais de um íon produto. (HARRIS, 2005)

Assim, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas apresenta como principal vantagem a identificação confiável de compostos. Como a cromatografia utiliza apenas o tempo de retenção para a identificação e quantificação de compostos, em misturas complexas podemos observar interferências da matriz no tempo de retenção do analito bem como compostos interferentes que apresentem o mesmo tempo de retenção do componente de interesse. Com a combinação da espectrometria de massas a esta técnica é possível realizar uma identificação definitiva do composto uma vez que a determinação deste baseia-se não apenas em suas características de retenção, mas também em seu espectro de massas. (ARDREY, 2003) Tendo em vista tais vantagens, esta técnica foi escolhida para quantificar os HPAs e seus derivados em amostras de asfalto.

3.4 Processo de validação metodológica

Segundo o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), a validação tem como objetivo confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido. (INMETRO, 2010) Para a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, e exatidão, adequados à análise. (ANVISA, 2003) Assim sendo, a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. (RIBANI et al., 2004)

Os parâmetros que normalmente são avaliados consistem em:

Linearidade: A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. (RIBANI et al., 2004, p.773)

A linearidade pode ser observada pelos coeficientes de correlação linear (r) e coeficiente de determinação (r^2). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90. (RIBANI et al., 2004)

Faixa de trabalho: Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores no qual o método pode ser aplicado. Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. (INMETRO, 2010)

Limite de determinação (LD): Representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado a partir do método sinal ruído da seguinte maneira (equação 1):

$$LD = 3 \times S / b \quad (1)$$

Onde S é a estimativa do desvio padrão do branco e b é o coeficiente angular (inclinação) da curva analítica. (RIBANI et al., 2004)

Limite de quantificação (LQ): Representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

Da mesma forma que o LD, o LQ pode ser calculado a partir do método sinal ruído (equação 2): (RIBANI et al., 2004)

$$LQ = 10 \times S / b \quad (2)$$

Precisão: A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Este parâmetro pode ser expresso pela estimativa

do desvio padrão relativo (DPR) também conhecido como coeficiente de variação (CV)

O desvio padrão relativo (DPR), pode ser calculado da seguinte forma (equação 3):

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100 \quad (3)$$

Sendo: DP o desvio-padrão; CMD a concentração média determinada de uma amostra sintética. (INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004)

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. (ANVISA, 2003)

Exatidão: A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. (INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004)

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (equação 4): (ANVISA, 2003)

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{Concentração da medida experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

Tais parâmetros foram avaliados neste trabalho para garantir que as metodologias propostas atendam os requisitos necessários para sua aplicação em amostras de asfalto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação, Reagentes e Soluções

Para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, utilizou-se o cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity com injeção automática e o detector de massas Agilent Technologies 6430 Triplo quadrupolo.

A coluna cromatográfica utilizada para determinação de HPAs foi uma coluna Varian modelo Pursuit 3 PAH 4,6 x 100 mm e 3 μm de tamanho de partícula. Para a determinação dos derivados nitrogenados utilizou-se uma coluna marca Poroshell modelo 120 EC-C18 3.0 x 50 mm e 2,7 μm , e para determinação dos derivados oxigenados fez-se uso de uma coluna Zorbax modelo SB-C18 2,1 x 50 mm e 1,8 μm .

Os solventes utilizados foram acetonitrila grau LC-MS e metanol grau LC-MS Chromasolv. Os padrões dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados foram adquiridos das marcas Fluka e Sigma-Aldrich.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e derivados nitrogenados e oxigenados determinados através das metodologias desenvolvidas foram:

HPAs:

- ✓ Naftaleno
- ✓ Acenaftileno
- ✓ Acenafteno
- ✓ Antraceno
- ✓ Fenantreno
- ✓ Benzo(b)fluoranteno
- ✓ Benzo(k)fluoranteno
- ✓ Indeno(1,2,3-cd)pireno
- ✓ Dibenzo(a,h)antraceno

- ✓ Fluoreno
- ✓ Fluoranteno
- ✓ Benzo(a)pireno
- ✓ Pireno
- ✓ Benzo(ghi)pireno

NHPAs:

- ✓ 1-Nitronaftaleno
- ✓ 1-Nitropireno
- ✓ Phenazina
- ✓ 9-Nitroantraceno
- ✓ 2-Nitrofluoreno
- ✓ Acridina
- ✓ Quinolina

OHPAs:

- ✓ 2-Naftol
- ✓ 2-Hidroxifluoreno
- ✓ 1-Hidroxipireno
- ✓ 9-Fenantreno carboxialdeído
- ✓ 9-10-Antraquinona

Primeiramente preparou-se uma solução concentrada de cada um dos HPAs a partir da dissolução ou diluição do padrão de cada um dos compostos em metanol, obtendo-se as seguintes concentrações descritas na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações das soluções de cada um dos HPAs

HPAs	Concentração da Solução (mg L⁻¹)
Pireno	200
Benzo(a)pireno	150
Benzo(ghi)pireno	20
Dibenzo(a,h)antraceno	2720
Antraceno	1100
Benzo(b)fluoranteno	5680
Benzo(k)fluoranteno	2470
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	1200
Fenantreno	2060
Fluoreno	1760
Acenaftileno	1510
Acenafteno	1530
Naftaleno	200
Fluoranteno	2452

A partir da diluição das soluções presentes na tabela 4 obteve-se uma mistura denominada solução estoque A dos HPAs, com as seguintes concentrações (tabela 5)

Tabela 5. Concentração da solução estoque (A) dos HPAs.

HPAs	Concentração da Solução estoque (mg L⁻¹)
Pireno	2
Benzo(a)pireno	2
Benzo(ghi)pireno	2
Dibenzo(a,h)antraceno	5
Antraceno	5
Benzo(b)fluoranteno	100
Benzo(k)fluoranteno	100
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	20
Fenantreno	20
Fluoreno	50
Acenaftileno	100
Acenafteno	100
Naftaleno	50
Fluoranteno	500

Da mesma forma procedeu-se o preparo de soluções concentradas de cada um do NHPAs (tabela 6):

Tabela 6. Concentrações das soluções de cada um dos NHPAs.

NHPAs	Concentração da solução (mg L⁻¹)
1-Nitronaftaleno	2900
1-Nitropireno	1800
2-Nitrofluoreno	1610
9-Nitroantraceno	1600
Phenazina	2000
Acridina	1700
Quinolina	2450

Diluindo-se essa solução concentrada, preparou-se uma mistura denominada solução estoque B com as seguintes concentrações: acridina, quinolina e phenazina

na concentração de 50 mg L⁻¹; 1-nitronaftaleno, 1-nitropireno, 2-nitrofluoreno, 9-nitroantraceno na concentração de 100 mg L⁻¹.

Novamente preparou-se padrões individuais de cada um dos OHPAs, como o que já havia sido feito para os HPAs e NHPAs. Assim obtiveram-se as seguintes concentrações para os OHPAs. (tabela 7)

Tabela 7. Concentrações das soluções de cada um dos OHPAs.

OHPAs	Concentração da solução (mg L ⁻¹)
2-Naftol	2110
2-Hidroxifluoreno	1670
9-10-Antraquinona	950
1-Hidroxipireno	1630
9-Fenantrenocarboxialdeído	2090

A partir da diluição destas soluções apresentadas na tabela 7, preparou-se uma mistura denominada solução estoque C, com as concentrações apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Concentração da solução estoque (C) OHPAs.

OHPAs	Concentração da solução (mg L ⁻¹)
2-Naftol	50
2-Hidroxifluoreno	50
9-10-Antraquinona	25
1-Hidroxipireno	10
9-Fenantrenocarboxialdeído	10

4.2 Desenvolvimento e Otimização dos Métodos

4.2.1. Desenvolvimento da metodologia para determinação de HPAs

Após a preparação das soluções padrão descritas no item 4.1 iniciou-se o desenvolvimento da metodologia, através da injeção individual de cada um dos compostos diretamente no espectrômetro de massas. Assim, foi possível obter o

espectro de cada padrão e também otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas, a energia do fragmentor e a energia da célula de colisão. Em seguida injetou-se a mistura dos 14 HPAs (solução estoque A) a fim de obter-se o perfil de massas de uma amostra sintética, contendo o conjunto dos HPAs estudados.

Como HPAs são compostos que possuem baixa polaridade, precisam ser convertidos em íons para que possam ser detectados no espectrômetro de massas. Para isso utilizou-se a fonte de íons APCI. As condições da fonte foram otimizadas testando-se os seguintes parâmetros apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Parâmetros testados para otimização da fonte APCI para os HPAs.

Parâmetros testados	Faixa de variação testada
Temperatura de vaporização (°C)	150, 200 e 250
Temperatura do gás de secagem (°C)	300, 325 e 350
Pressão do nebulizador (psi)	20, 30 e 60
Fluxo de gás (L min ⁻¹)	5, 8, 10, 12
Voltagem do capilar (V)	2500, 3000, 3500 e 4000
Descarga da agulha corona (µA)	4, 8, 10

Tais parâmetros foram testados para a mistura dos 14 HPAs, pois a fonte de íons deve ionizar todos os compostos simultaneamente, uma vez que seus parâmetros não podem ser alterados durante a corrida. Assim, injetou-se 20 µL da solução estoque A diretamente no espectrômetro de massas. Os valores de temperaturas, fluxos, pressão, voltagem e descarga da agulha corona foram limitados pelo equipamento (valor máximo suportado pelo equipamento). Foram realizadas injeções variando um dos parâmetros e mantendo os demais fixos, assim pode-se observar uma melhora no sinal.

Após a otimização dos parâmetros da fonte, injetou-se na coluna cada padrão dos HPAs na concentração de 10 mg L⁻¹, a fim de verificar o tempo de retenção de cada um dos compostos. Desta forma optou-se por uma eluição por gradiente. Este consistia inicialmente em 80% metanol/água, atingindo em 9 minutos 90% e 9,5 minutos 100% metanol que permaneceu nesta concentração até o final da corrida em 23 minutos, sob fluxo 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Para

reequilibrar o sistema ao final da análise utilizou-se um tempo de 7 minutos. O perfil do gradiente de eluição esta apresentado na figura 3.

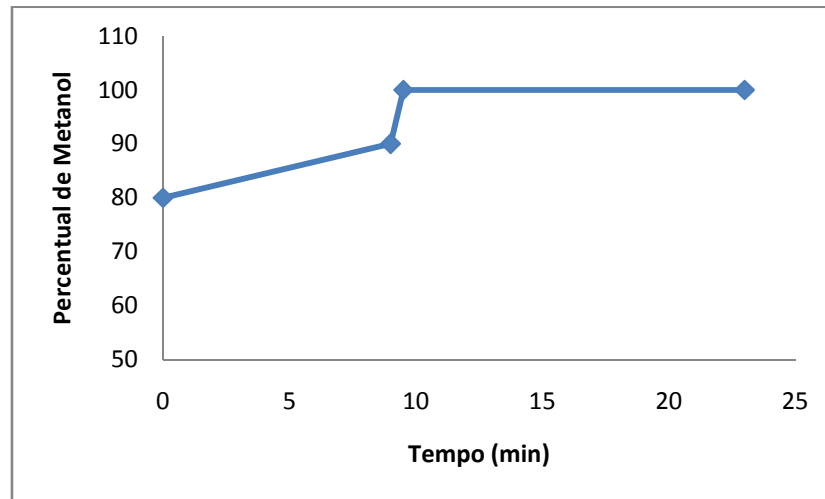


Figura 3. Gradiente de eluição dos HPAs.

4.2.2. Desenvolvimento da metodologia para determinação de NHPAs

Assim como no desenvolvimento da metodologia do item 4.2.1, para a otimização da metodologia para a determinação dos NHPAs, inicialmente injetou-se individualmente cada uma das soluções dos NHPAs diretamente no espectrômetro de massa, obtendo-se assim o espectro de cada padrão e também as melhores condições para os parâmetros do espectrômetro de massas, como: a energia do fragmentor e a energia da célula de colisão. Em seguida injetou-se uma mistura dos sete NHPAs (solução estoque B) para obter o perfil de massas de uma amostra sintética.

Como se tratam de compostos derivados dos HPAs, estes possuem baixa polaridade, e também precisam ser convertidos em íons para que possam ser detectados. Assim utilizou-se novamente a fonte de íons APCI. As condições da fonte foram otimizadas para os 7 NHPAs através da injeção de 20 μ L da solução estoque B diretamente no espectrômetro de massas, avaliando-se os seguintes parâmetros descritos na tabela 10.

Tabela 10. Parâmetros testados para otimização da fonte APCI para os NHPAs.

Parâmetros testados	Faixa de variação testada
Temperatura de vaporização (°C)	150, 200 e 250
Temperatura do gás de secagem (°C)	200, 250, 300 e 350
Pressão do nebulizador (psi)	20, 30 e 40
Fluxo de gás (L min ⁻¹)	5, 8, 10, 13
Voltagem do capilar (V)	2000, 2500, 3000 e 3500
Descarga da agulha corona (µA)	4, 8, 10

Assim como para os HPAs, os valores de cada parâmetro testado foram limitados pelo equipamento. As condições da fonte foram otimizadas para que se obtivesse a melhor resposta possível para todos os compostos, pois os parâmetros não podem ser alterados durante a corrida. As injeções foram realizadas variando um dos parâmetros e mantendo os demais fixos.

Com os parâmetros da fonte já otimizados, injetou-se na coluna cada um dos NHPAs na concentração de 10 mg L⁻¹, verificando o tempo de retenção dos compostos. Com o intuito de reduzir o tempo de análise optou-se por uma eluição por gradiente (figura 4). A condição inicial estabelecida foi de 60% metanol/água durante 1 minuto, e em 2 minutos 100% metanol até o final da corrida em 4.5 minutos. O fluxo de análise foi 0,6 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi 10 µL. O tempo de reequilíbrio do sistema foi de 4 minutos.

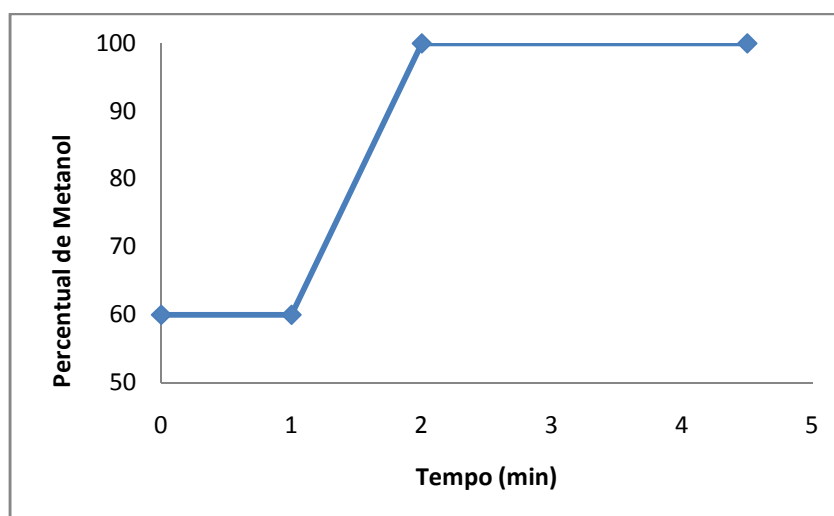


Figura 4. Gradiente de eluição dos NHPAs.

4.2.3. Desenvolvimento da metodologia para determinação de OHPAs

Para o desenvolvimento da metodologia para determinação dos OHPAs, injetou-se individualmente cada uma das soluções dos OHPAs diretamente no espectrômetro de massa, e em seguida injetou-se a mistura contendo os 5 compostos (solução estoque C). Desta forma obteve-se o perfil de massa de cada composto e de uma amostra sintética, como o que foi obtido anteriormente para os HPAs e NHPAs. A partir destas injeções foi possível determinar também as melhores condições para os parâmetros do espectrômetro de massas, como: a energia do fragmentor e a energia da célula de colisão.

Os OHPAs são compostos que também possuem baixa polaridade, e precisam ser convertidos em íons para que possam ser detectados, assim mais uma vez utilizou-se a fonte de íons APCI. As condições da fonte foram otimizadas para os 5 OHPAs através da injeção de 20 μL da solução estoque C diretamente no espectrômetro de massas, avaliando-se os parâmetros descritos na tabela 11.

Tabela 11. Parâmetros testados para otimização da fonte APCI para os OHPAs.

Parâmetros testados	Faixa de variação testada
Temperatura de vaporização ($^{\circ}\text{C}$)	175, 200, 225 e 250
Temperatura do gás de secagem ($^{\circ}\text{C}$)	200, 250, 300, 325 e 350
Pressão do nebulizador (psi)	20, 30 e 60
Fluxo de gás (L min^{-1})	5, 8, 10, e 13
Voltagem do capilar (V)	2000, 2500, 3000 e 3500
Descarga da agulha corona (μA)	4, 6, 8, e 10

Como já citado nos itens 4.2.1 e 4.2.2 os valores de cada parâmetro testado foram limitados pelo equipamento. As injeções foram realizadas variando um dos parâmetros e mantendo os demais fixos

De posse destes resultados, iniciou-se o desenvolvimento do método cromatográfico para os OHPAs. Através da injeção individual de 5 mg L^{-1} de cada um dos compostos, avaliou-se seus respectivos tempos de retenção e optou-se por uma eluição isocrática. A metodologia proposta consistiu na eluição com 60% de metanol/água sob um fluxo de 0,5 ml min^{-1} , e um volume de injeção de 5 μL .

4.3 Validação das metodologias desenvolvidas

Para verificar a linearidade do método fez-se uso da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados, com base em um ensaio da resposta do equipamento em função da concentração. Preparou-se a partir das soluções estoque A, B e C soluções de diferentes concentrações para cada classe de compostos estudada e obteve-se a relação entre o sinal medido e a concentração de cada composto. Em seguida preparou-se uma curva analítica a partir da diluição das soluções estoque, e determinou-se a faixa de trabalho (tabela 12).

O LD e LQ foram calculados a partir do método sinal ruído.

Para realizar o ensaio de precisão foram preparadas amostras sintéticas a partir da diluição das soluções estoque A, B e C em metanol, com concentrações conhecidas que estavam situadas no limite inferior, meio e limite superior da curva analítica. Foi avaliada a precisão intra-dia (3 medidas realizadas no mesmo dia) e inter-dia (3 medidas realizadas em um intervalo de 3 dias).

A exatidão foi avaliada a partir da adição de padrão ao metanol, em concentrações que estavam situadas no limite inferior, meio e limite superior da curva analítica, como já citado para o ensaio de precisão.

Tabela 12. Níveis de concentração dos HPAs, NHPAs e OHPAs na faixa de trabalho (curva analítica).

HPAs, NHPAs e OHPAs	Níveis de concentração da faixa de trabalho (mg L ⁻¹)					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Naftaleno	0,25	0,5	1	2,5	5	10
Acenaftileno	0,5	1	2	5	10	20
Acenafteno	0,5	1	2	5	10	20
Antraceno	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Fluoranteno	2,5	5	10	25	50	100
Pireno	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4
Fluoreno	0,25	0,5	1	2,5	5	10
Benzo(b)fluoranteno	0,5	1	2	5	10	20
Benzo(k)fluoranteno	0,5	1	2	5	10	20
Benzo(a)pireno	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4
Benzo(ghi)pireno	0,01	0,02	0,04	0,1	0,2	0,4
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,1	0,2	0,4	1	2	4
Dibenzo(ah)antraceno	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Fenantreno	0,1	0,2	0,4	1	2	4
Fenazina	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Acridina	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1
Quinolina	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1
1-Nitronaftaleno	0,5	1	5	10	20	30
2-Nitrofluoreno	0,3	0,6	3	6	12	18
9-Nitroantraceno	0,5	1	5	10	20	30
1-Nitropireno	0,05	0,1	0,5	1,0	2	3
2-Naftol	0,1	0,25	0,5	1,0	2,5	5
2-Hidroxifluoreno	0,1	0,25	0,5	1,0	2,5	5
9-10-Antraquinona	0,05	0,125	0,25	0,5	1,25	2,5
1-Hidroxipireno	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1
9-Fenantreno- carboxialdeido	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1

4.4 Preparação das amostras

Para determinação dos HPAs e seus derivados, a amostra de asfalto fornecida pela Petrobras foi fracionada, a partir da ASTM D4124, em maltenos e asfaltenos seguida pela separação das frações ácida, básica, e neutra a partir do método de Green (GREEN et al, 1993). A uma alíquota destas frações foram adicionadas quantidades conhecidas das soluções estoque A B e C dos HPAs, NHPAs e OHPAs com o intuito de avaliar a exatidão do método através de ensaios de recuperação.

As frações ácida e básica foram diluídas 50 vezes em metanol, filtradas em filtros de PTFE 0,22 μm e em seguida injetadas.

A fração neutra foi preparada a partir da secagem de 2 mL da fração em rotaevaporador, e em seguida redissolvida em 1 mL de diclorometano. Essa nova solução da fração neutra foi diluída 10 vezes em metanol, duplamente filtrada em filtros de PTFE 0,22 μm e injetada.

O fluxograma da figura 5 mostra resumidamente o preparo das amostras.

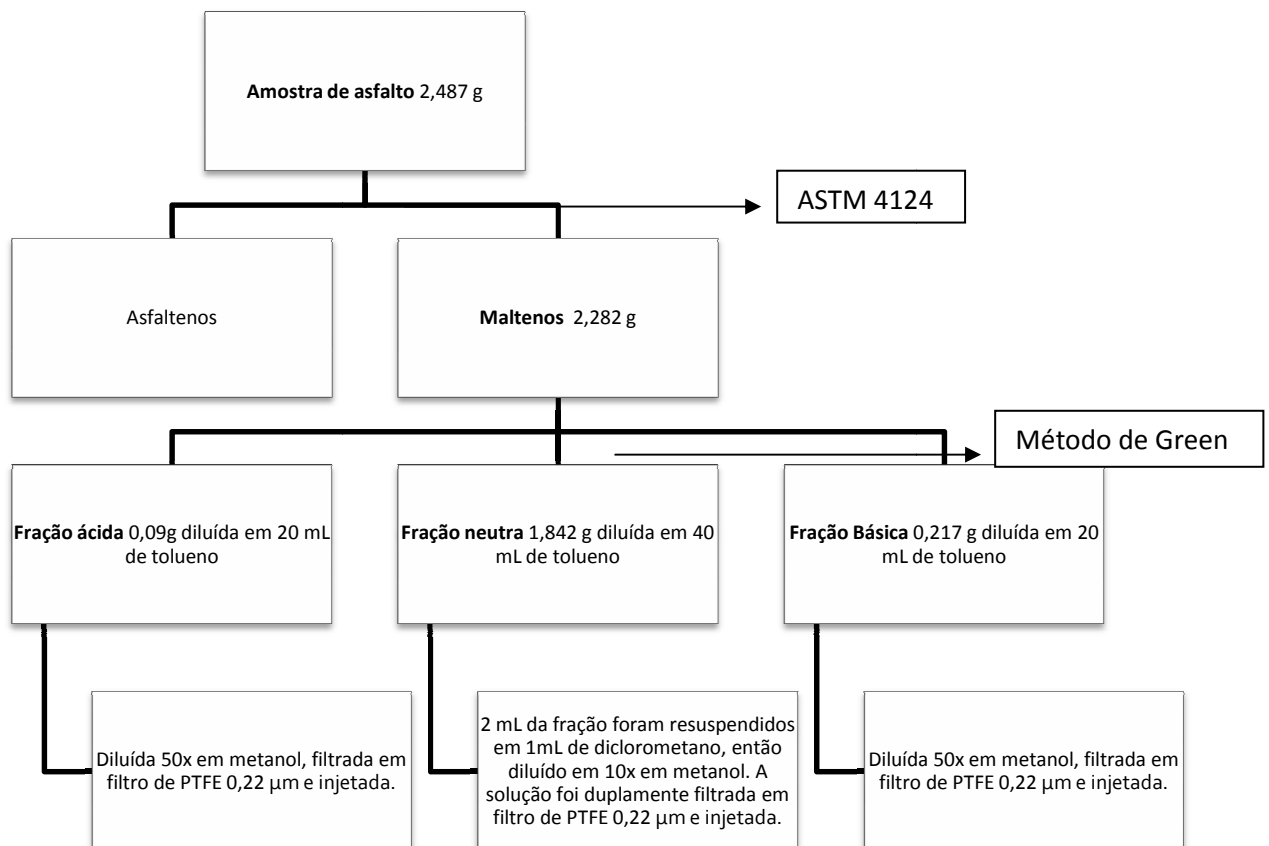


Figura 5. Fluxograma do preparo das amostras

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

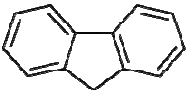
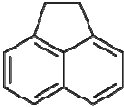
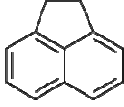
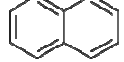
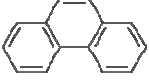

5.1 Métodos desenvolvidos:

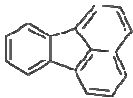
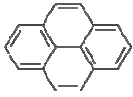
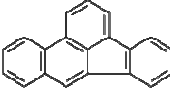
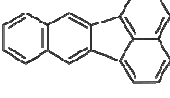
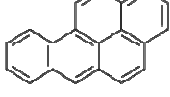
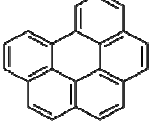
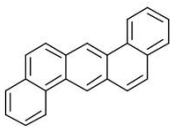
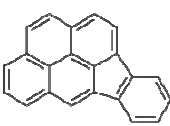
5.1.1. Método para determinação de HPAs

Avaliou-se primeiramente a possibilidade do monitoramento seletivo de reações (MRM) para cada composto através da espectrometria de massas seqüencial. Contudo, como a estrutura química de cada um destes compostos é muito estável, composta por cadeias aromáticas condensadas, estes apresentam ligações C-C muito fortes que dificilmente sofrem quebras. (COULING et al, 2010) Desta forma optou-se por monitorar a massa do íon molecular de cada composto através do monitoramento seletivo de íons (SIM).

Assim determinou-se a melhor condição dos parâmetros do espectrômetro de massas, que operou no modo positivo com os seguintes valores de $[M+H]^+$ e de energia do fragmentor para cada um dos 14 HPAs (tabela 13).

Tabela 13. Parâmetros do espectrômetro de massas para os 14 HPAs.

Composto	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	$[M+H]^+$	Energia do Fragmentor (V)
Fluoreno		$C_{13}H_{10}$	167.1	210
Acenaftileno		$C_{12}H_8$	153.1	200
Acenafteno		$C_{12}H_{10}$	155.1	111
Naftaleno		$C_{10}H_8$	129.1	190
Fenantreno		$C_{14}H_{12}$	181.1	142
Antraceno		$C_{14}H_{10}$	179.1	132

Fluoranteno		$C_{16}H_{10}$	203.1	132
Pireno		$C_{16}H_{10}$	203.1	128
Benzo(b)fluoranteno		$C_{20}H_{12}$	253.1	143
Benzo(k)fluoranteno		$C_{20}H_{12}$	253.1	128
Benzo(a)pireno		$C_{20}H_{12}$	253.1	143
Benzo(ghi)pireno		$C_{22}H_{12}$	277.1	148
Dibenzo(a,h)antraceno		$C_{22}H_{14}$	279.1	153
Indeno(1,2,3-cd)pireno		$C_{22}H_{12}$	277.1	168

A melhor condição de operação da fonte foi verificada através da otimização dos parâmetros já citados no item 4.2. Os resultados estão apresentados nas figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, e na tabela 14.

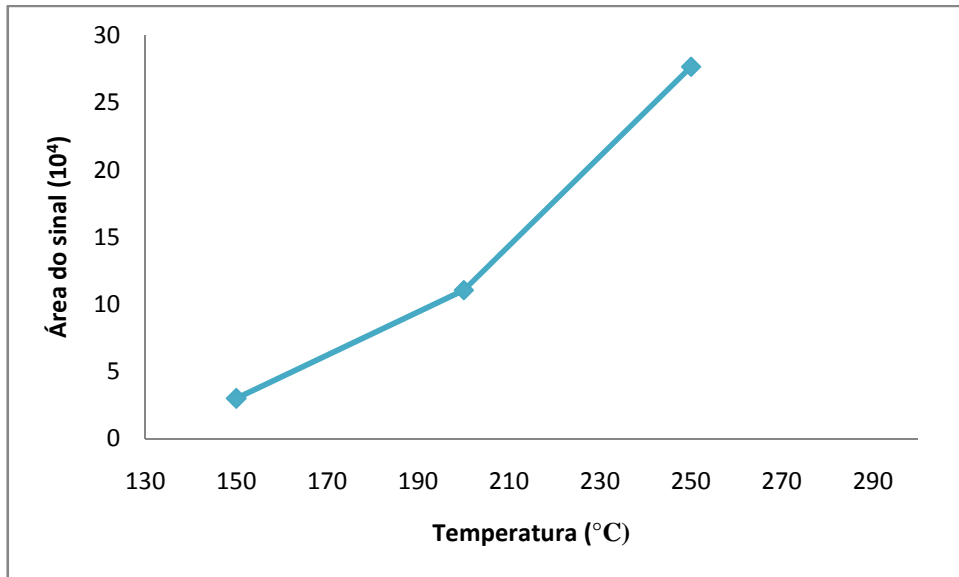


Figura 6. Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função da temperatura do vaporizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás 325 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 µA.

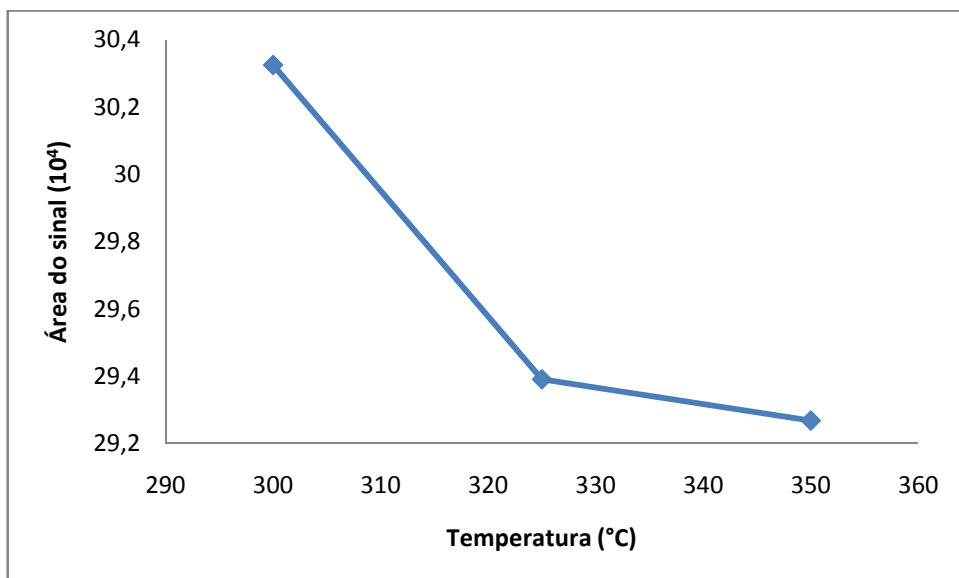


Figura 7. Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função da temperatura do gás de secagem. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 µA.

Uma vez que a ionização do analito na fonte APCI ocorre em fase gasosa é importante garantir a secagem e vaporização do solvente para que se consiga uma melhor resposta no equipamento. (GROSS, 2011)

Observou-se uma significativa dependência entre o fluxo proveniente da coluna cromatográfica com a temperatura do gás de secagem e temperatura de vaporização. Tais parâmetros ficaram estabelecidos em 300 e 250 °C

respectivamente (figuras 6 e 7) para que o fluxo de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ pudesse ser seco e vaporizado.

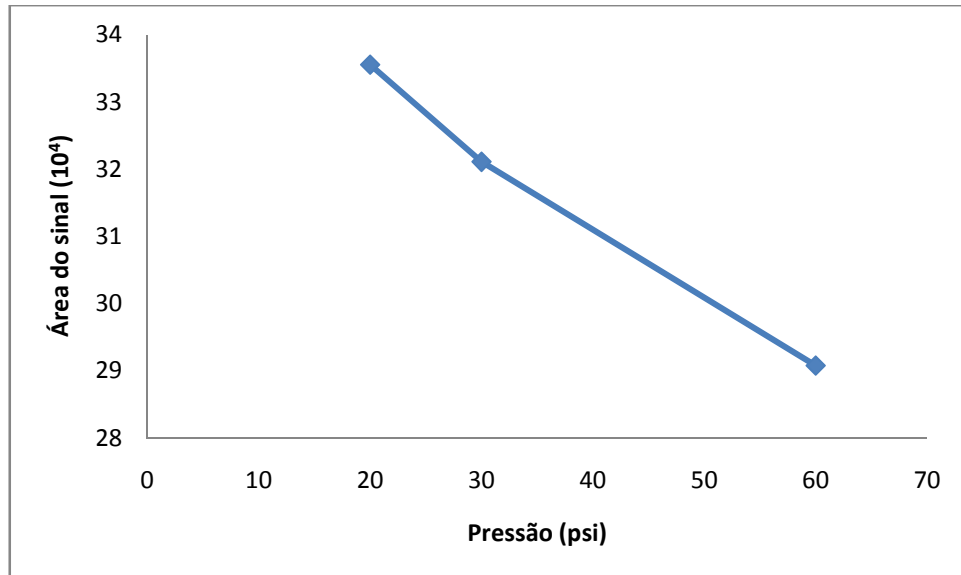


Figura 8. Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função da pressão do nebulizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás $300 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do vaporizador $250 \text{ }^\circ\text{C}$, fluxo de gás 5 L min^{-1} , voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona $4 \text{ } \mu\text{A}$.

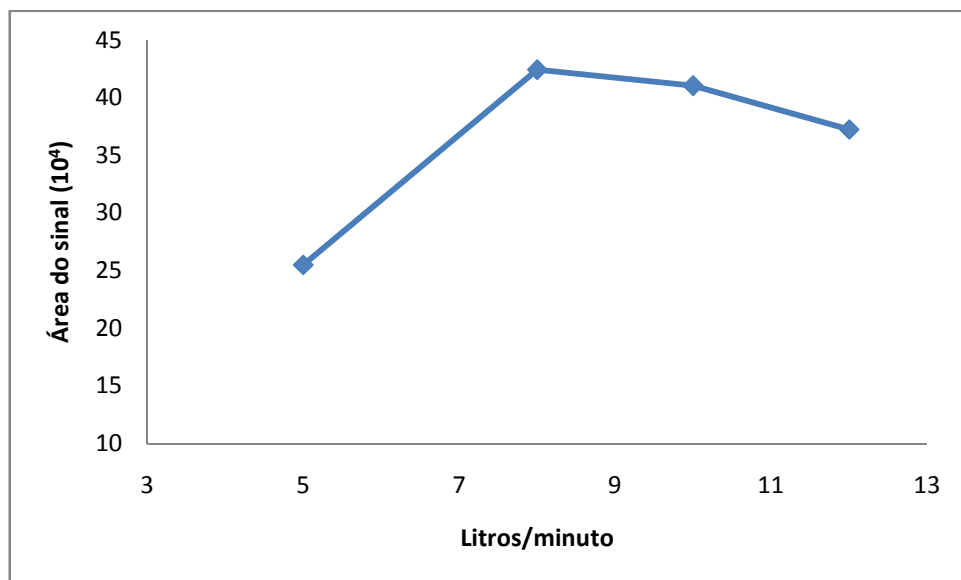


Figura 9 Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função do fluxo de gás. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás $300 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura do vaporizador $250 \text{ }^\circ\text{C}$, pressão do nebulizador 20 psi , voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona $4 \text{ } \mu\text{A}$.

A pressão do nebulizador esta diretamente ligada à formação de um spray passível de ser seco e ionizado através da descarga da agulha corona. O fluxo de gás também irá ajudar a secagem deste spray. Foi verificado um decréscimo do

sinal com o aumento dos valores evidenciando a condição ideal de 8 L min⁻¹ e 20 psi. (figuras 8 e 9)

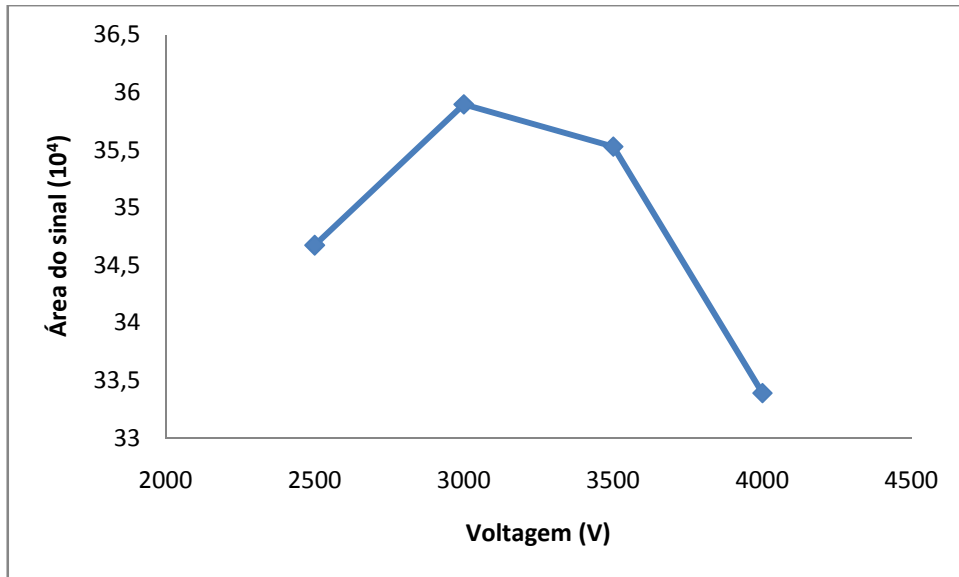


Figura 10. Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função da voltagem do capilar. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás 300 °C, temperatura do vaporizador 250 °C, pressão do nebulizador 20 psi, fluxo de gás 8 L min⁻¹ e descarga da corona 4 μA.

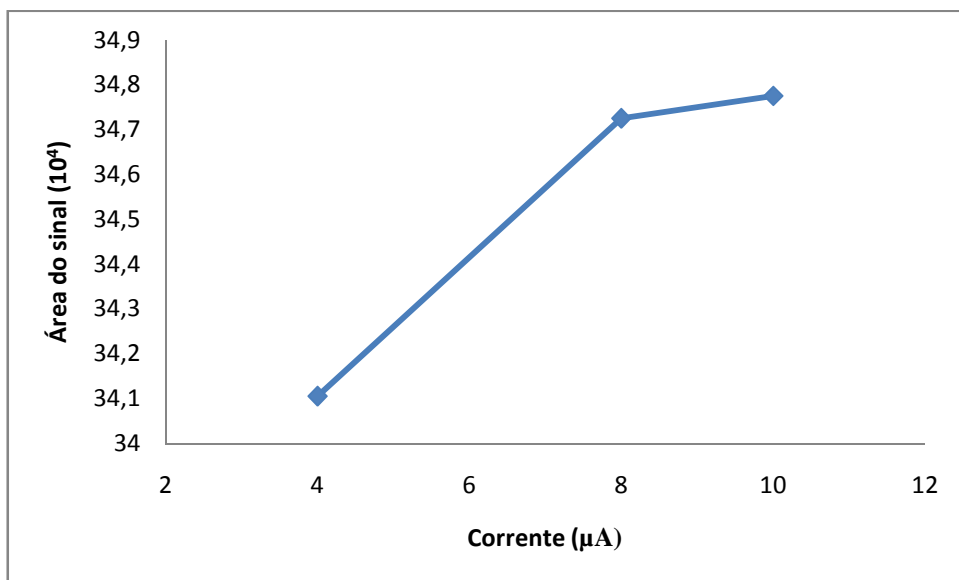


Figura 11. Variação da área do sinal do conjunto dos HPAs em função da descarga da agulha corona. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás 300 °C, temperatura do vaporizador 250 °C, pressão do nebulizador 20 psi, fluxo de gás 8 L min⁻¹ e voltagem do capilar 3000 V.

A descarga da agulha corona por sua vez esta relacionada diretamente com a formação de íons do analito, quanto maior a descarga maior o grau de ionização observado através do aumento do sinal. Smith e colaboradores (2009) mostram que

os HPAs possuem uma alta energia de ionização, sendo necessário o uso de dopantes para a determinação dos mesmos utilizando a fonte APPI. O fato de os HPAs apresentarem tais potenciais de ionização justificaria a necessidade da aplicação de uma significativa descarga da corona de 10 μA (figura 11). A voltagem do capilar determina a entrada dos íons no espectrômetro de massa, sendo a voltagem ideal para os HPAs de 3000 V (figura 12). Assim os íons formados descreverão uma trajetória estável direto para o espectrômetro.

A condição final de operação da fonte esta demonstrada na tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros otimizados para a fonte APCI para os HPAs.

Parâmetros da fonte	Condição otimizada
Temperatura de vaporização ($^{\circ}\text{C}$)	250
Temperatura do Gás ($^{\circ}\text{C}$)	300
Pressão do nebulizador (psi)	20
Fluxo de gás (L min^{-1})	8
Voltagem do capilar (V)	3000
Descarga da Corona (μA)	10

Após a otimização da fonte obteve-se o perfil de massas de uma amostra sintética (Figura 12) a partir da injeção da mistura dos padrões dos 14 HPAs. Este perfil tem por finalidade indicar qualitativamente a possível presença de HPAs, através da comparação dos espectros de massa do padrão e da amostra.

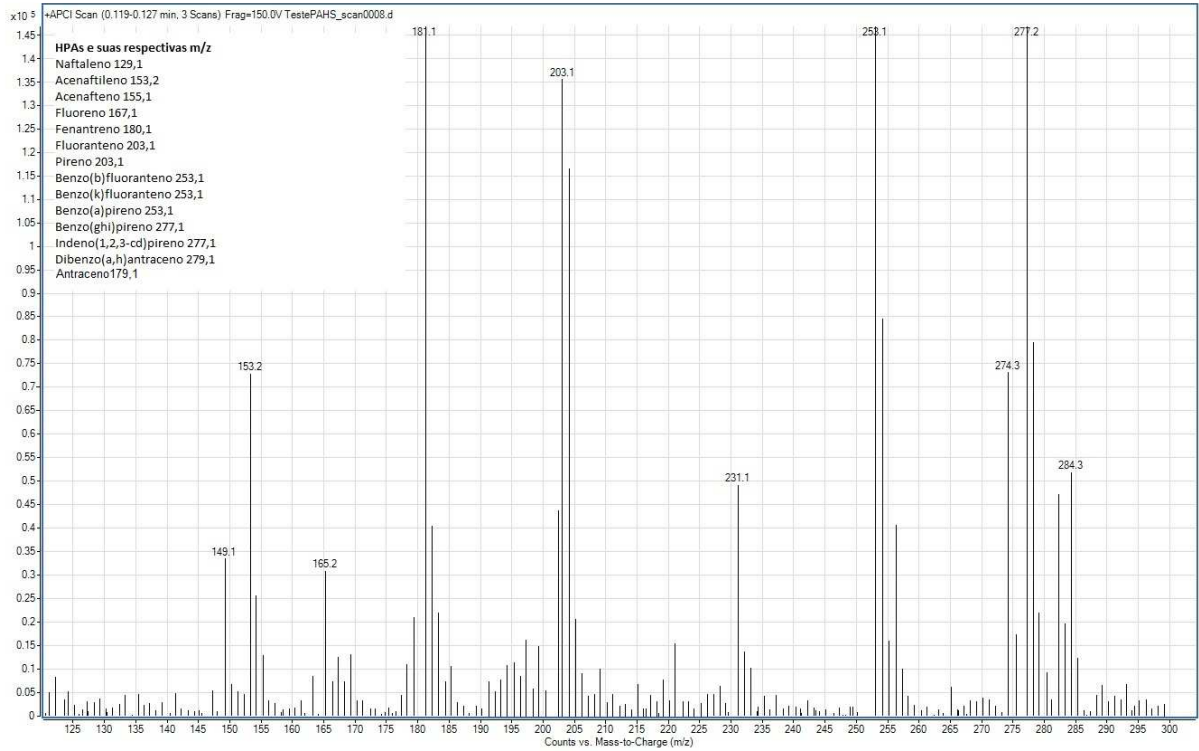


Figura 12. Espectro de massas de uma amostra sintética de HPAs. Fonte de íons: temperatura do gás 300 °C, temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 8 L min⁻¹, nebulizador 20 psi, voltagem do capilar 3000 V e descarga da corona 10 µA. Volume de injeção 20 µL.

O resultado da aplicação do gradiente desenvolvido e otimização da fonte está demonstrado no cromatograma indicado na figura 13.

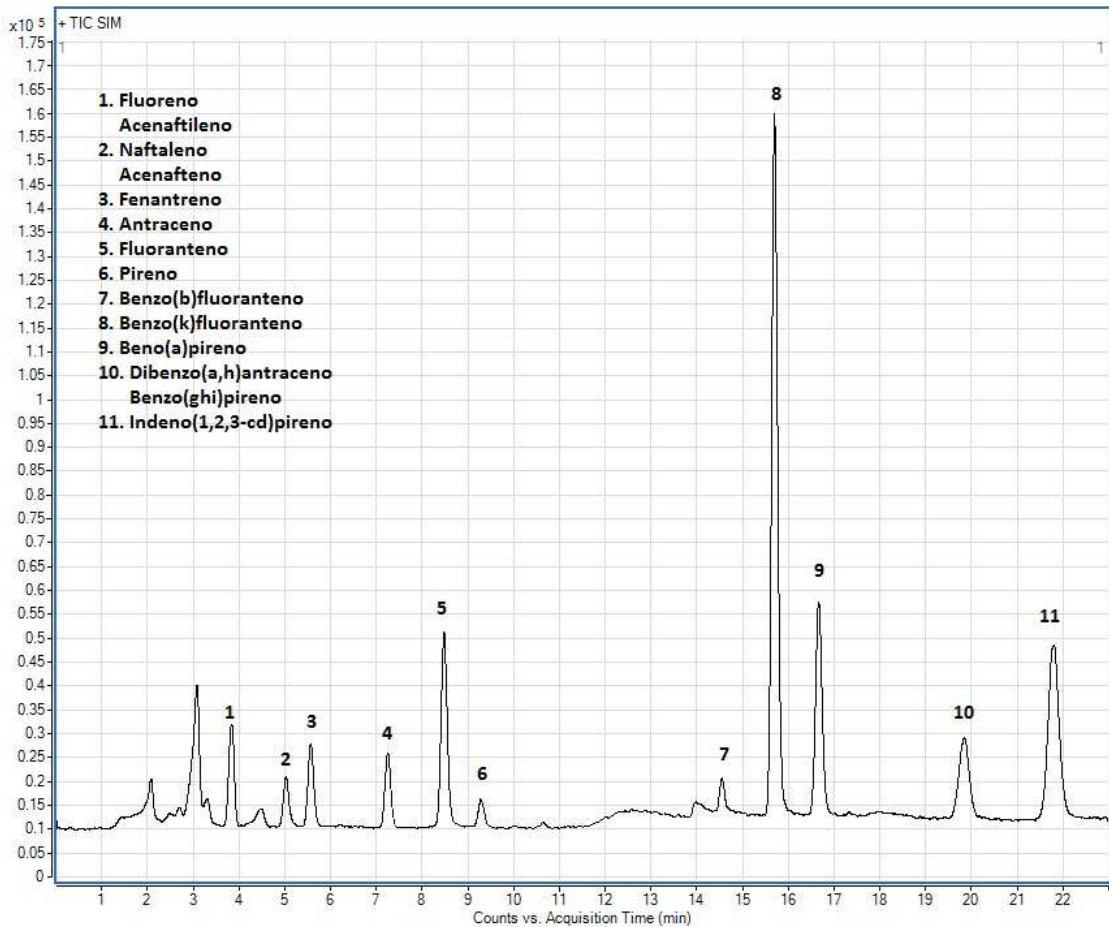


Figura 13. Cromatograma da separação do padrão 3 dos HPAs. Coluna Pursuit 3 PAH 4,6 x 100 mm e 3 μm . Fase móvel 80% Metanol/água, em 9 minutos 90% e 9,5 minutos 100%. Fluxo 0,8 mL min^{-1} e volume de injeção de 20 μL .

Analisando o cromatograma obtido é possível verificar 3 co-eluições, uma entre o fluoreno e o acenaftileno, outra entre o naftaleno e o acenafteno e por fim uma terceira co-eluição entre o dibenzo(a,h)antraceno e o benzo(ghi)pireno. Os picos que co-eluem possuem o mesmo tempo de retenção, porém razão massa carga (m/z) diferente. Como o analisador está operando no modo SIM, este consegue eliminar a interferência de um composto na detecção do outro, pois os valores de m/z monitorados são selecionados para representar o composto alvo. Assim o espectrômetro de massas detecta uma m/z por vez. (GROSS, 2011) Isto pode ser verificado na figura 14, onde se encontram os cromatogramas extraídos para cada m/z . Quanto aos isóbaros como, por exemplo, o fluoranteno e o pireno, estes foram separados pela cromatografia, para que não interferissem um na detecção do outro.

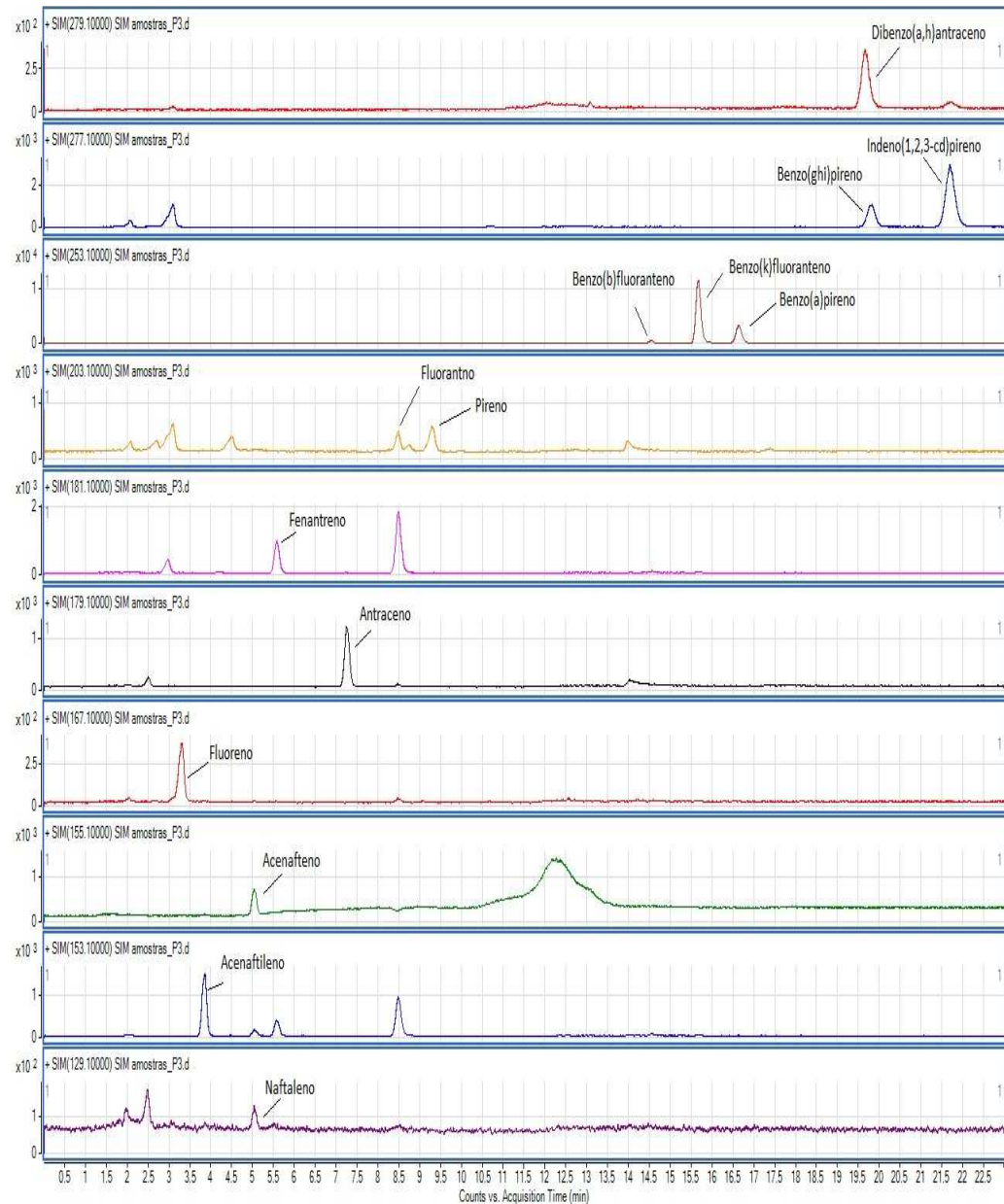


Figura 14. Cromatograma extraído do padrão 3 para cada m/z dos HPAs monitorada.

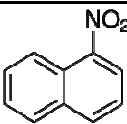
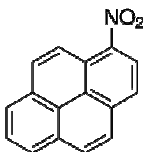
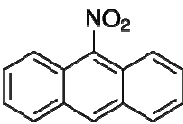
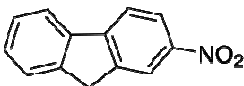
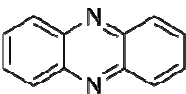
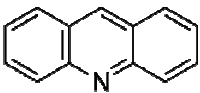
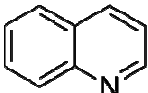
5.1.2. Método para determinação de NHPAs

Como foi descrito no item 5.1.1, avaliou-se a possibilidade do monitoramento seletivo de reações (MRM) para os NHPAs. Os compostos que possuem um grupamento NO₃ ligado as suas estruturas aromáticas (1-nitronaftaleno, 1-nitropireno, 9-nitroantraceno e 2-nitrofluoreno) apresentaram quebras significativas, perdendo de mais de uma unidade de massa, com boa intensidade de sinal para o íon precursor e para o íon produto. Contudo os compostos que possuem um heteroátomo de N em sua estrutura aromática (quinolina, acridina e fenazina) não

apresentaram quebras significativas, com pouca intensidade de sinal para os íons produto. Como o analisador não pode operar no modo MRM e modo SIM ao mesmo tempo, optou-se pelo monitoramento no modo SIM, pois este consegue detectar todos os compostos com boa sensibilidade.

Assim a melhor condição dos parâmetros do espectrômetro de massas foi a detecção no modo positivo com os seguintes valores de $[M+H]^+$ e de energia do fragmentor para os 7 NHPAs (tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros do espectrômetro de massas para os 7 NHPAs.

Composto	Fórmula Estrutural	Fórmula molecular	$[M+H]^+$	Energia do Fragmentor (V)
1-Nitronaftaleno		$C_{10}H_7NO_2$	174.1	88
1-Nitropireno		$C_{16}H_9NO_2$	248.1	93
9-Nitroantraceno		$C_{14}H_9NO_2$	224.1	75
2-Nitrofluoreno		$C_{13}H_9NO_2$	212.1	98
Phenazina		$C_{12}H_8N_2$	181.1	161
Acridina		$C_{13}H_9N$	180.1	176
Quinolina		C_9H_7N	130.1	176

O mesmo estudo realizado para os HPAs foi repetido para seus derivados nitrogenados. Assim foi possível otimizar os parâmetros da fonte para os NHPAs, que estão apresentados nas figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e tabela 16.

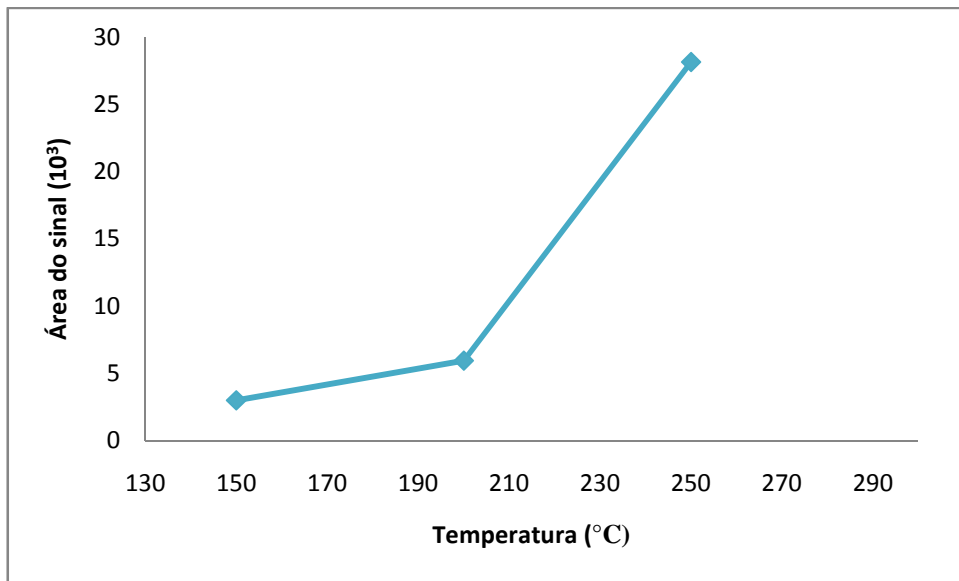


Figura 15. Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função da temperatura do vaporizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás 325 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μA.

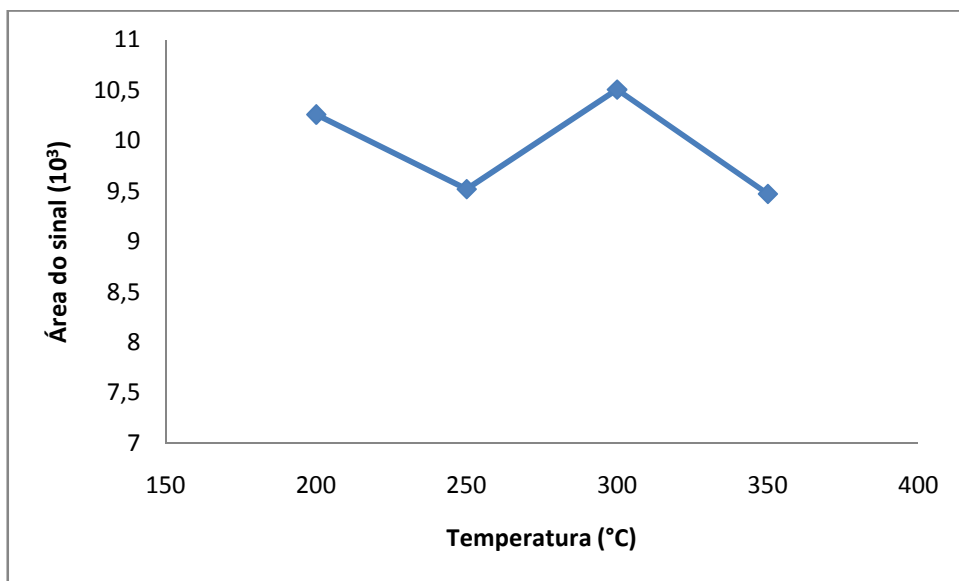


Figura 16 Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função da temperatura do gás. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μA.

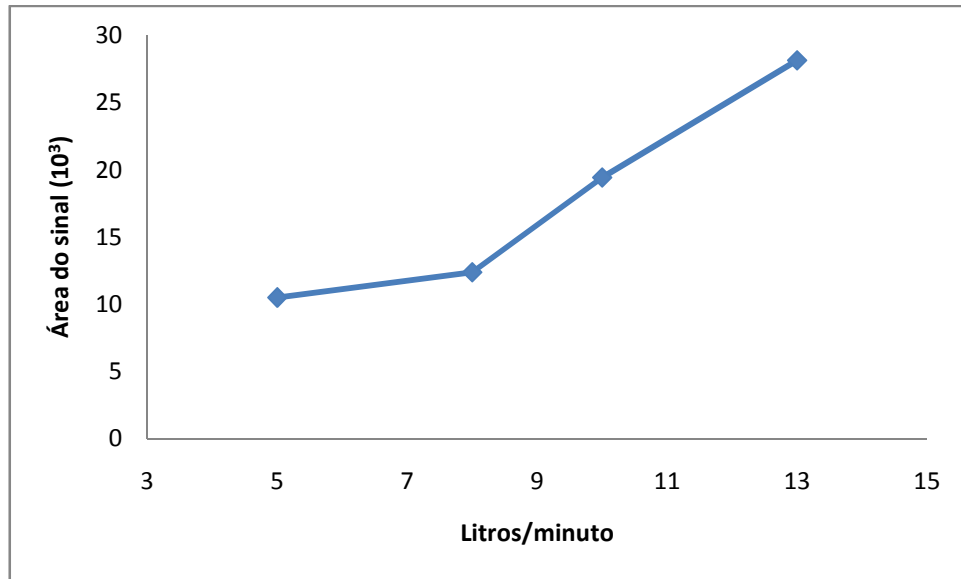


Figura 177. Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função do fluxo de gás. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, pressão do nebulizador 20 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μ A.

Os resultados agora obtidos para esta classe de compostos revelam a necessidade de utilizar além de temperaturas altas para o gás de secagem e vaporizador (300 e 250 °C respectivamente) um fluxo alto do gás de secagem de 13 $L\ min^{-1}$, como podemos observar nas figuras 15, 16 e 17. Isso ocorre em virtude do maior teor de água (40%) proveniente do sistema cromatográfico, o qual dificulta a secagem do aerossol formado, sendo necessário um maior volume de gás de aquecido.

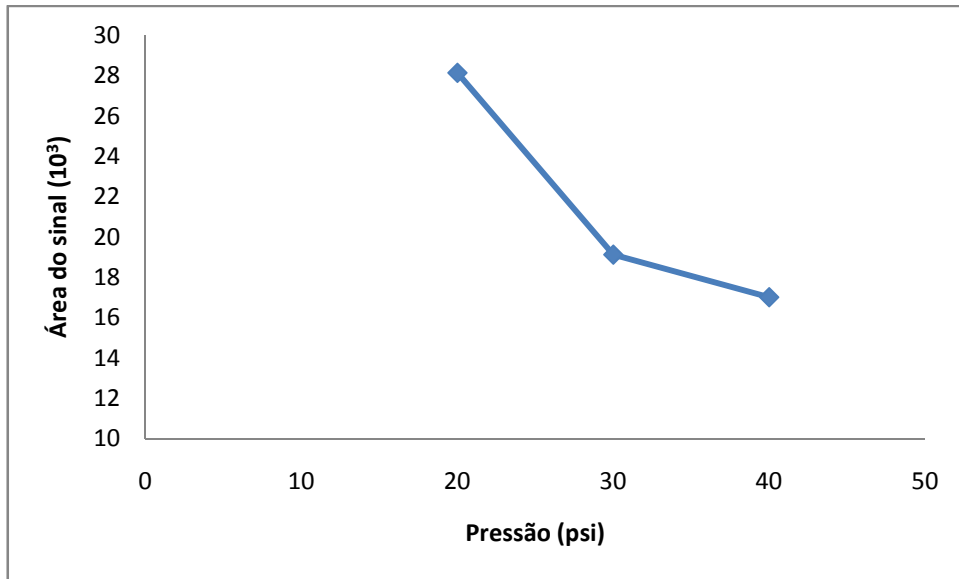


Figura 188. Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função da pressão do nebulizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do gás $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, fluxo de gás 5 L min^{-1} , voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona $4\text{ }\mu\text{A}$.

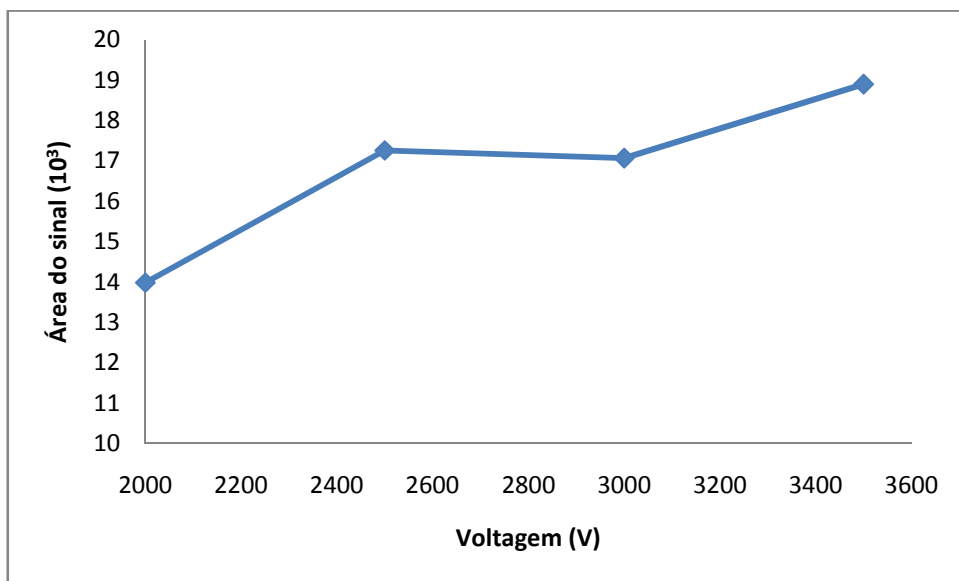


Figura 19. Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função da voltagem do capilar. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do gás $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressão do nebulizador 20 psi , fluxo de gás 13 L min^{-1} e descarga da corona $4\text{ }\mu\text{A}$.

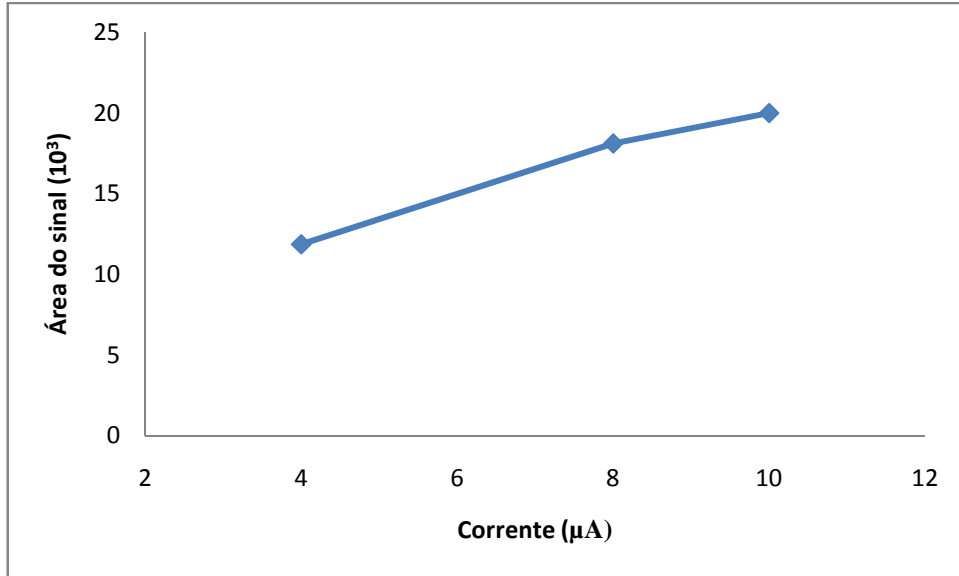


Figura 20. Variação da área do sinal do conjunto dos NHPAs em função da descarga da agulha corona. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, pressão do nebulizador 20 psi, fluxo de gás 13 L min⁻¹ e voltagem do capilar 3500 V.

A pressão ideal do nebulizador foi de 20 psi (figura 18). Novamente foi necessária uma significativa descarga da corona de 10 µA, pois quanto maior a energia aplicada ao sistema maior o número de íons formados, maior o sinal observado (figura 20). A voltagem do capilar ficou estabelecida em 3500 V (figura 19).

A tabela 16 apresenta os parâmetros otimizados para a operação da fonte.

Tabela 16. Parâmetros otimizados para a fonte APCI para os NHPAs.

Parâmetros da fonte	Condição otimizada
Temperatura de vaporização (°C)	250
Temperatura do Gás (°C)	300
Pressão do nebulizador (psi)	20
Fluxo de gás (L min ⁻¹)	13
Voltagem do capilar (V)	3500
Descarga da Corona (µA)	10

Análogo ao item 5.1.1, obteve-se o espectro de massas da mistura dos padrões dos 7 NHPAs, gerando o perfil de massas de uma amostra sintética. (Figura 21.)

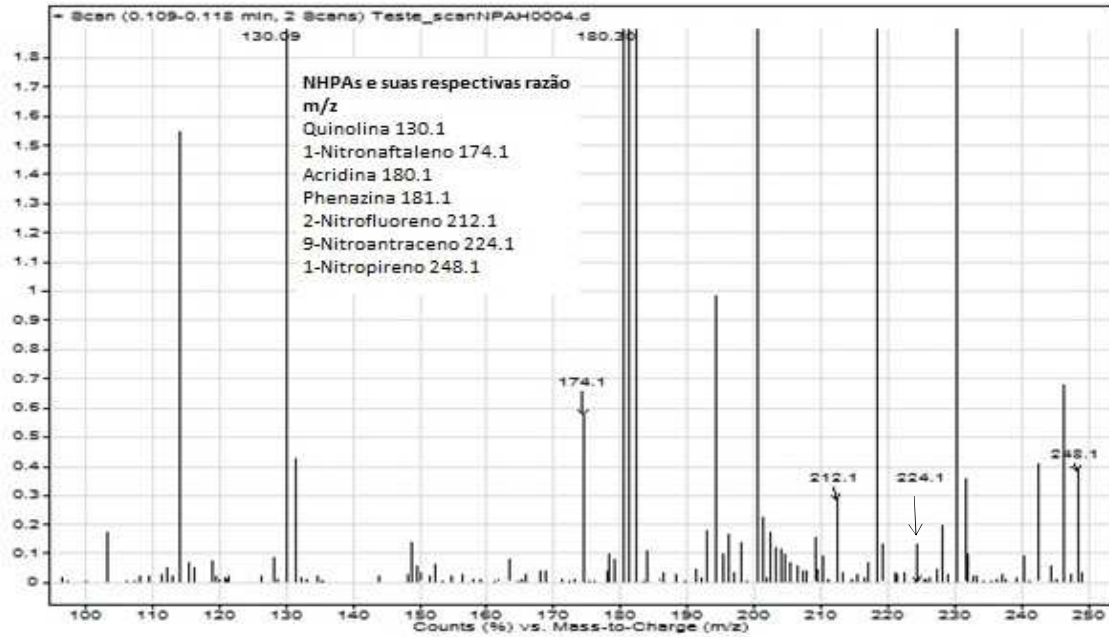


Figura 21. Espectro de massas de uma amostra sintética de NHPAs. Fonte de íons: temperatura do gás 300 °C, temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 13 L min⁻¹, nebulizador 20 psi, voltagem do capilar 3500 V e descarga da corona 10 µA. Volume de injeção 20 µL.

Aplicando a metodologia desenvolvida obteve-se o cromatograma indicado na figura 22.

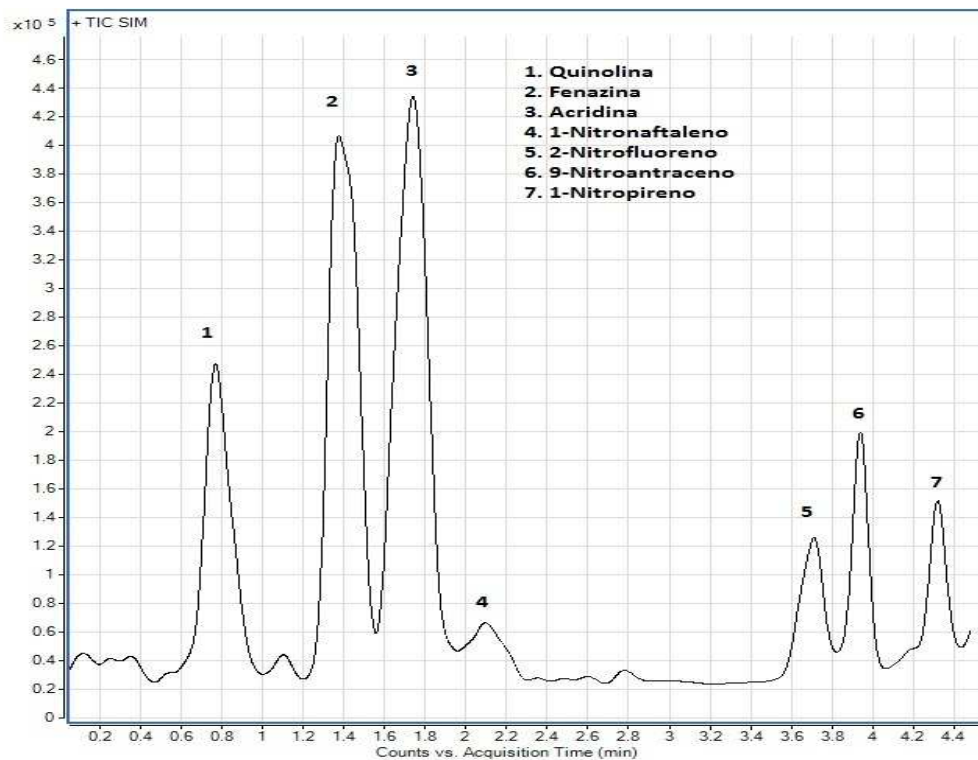


Figura 22. Cromatograma da separação do padrão 4 dos NHPAs. Coluna 120 EC-C18 3,0 x 50 mm e 2,7 µm. Fase móvel 60% Metanol/água até 1 minuto, em 2 minutos 100% Metanol. Fluxo 0,6 mL min⁻¹ e o volume de injeção 10 µL.

Observando o cromatograma de separação dos NHPAs é possível identificar uma baixa resolução entre os picos 2 (fenazina) e 3 (acridina), e os picos 5 (2-nitrofluoreno) e 6 (9-nitroantraceno). Esta baixa resolução é contornada pelo espectrômetro de massas da mesma forma com que as co-eluições dos HPAs no item 5.1.1, pois a fenazina possui m/z diferente da acridina, assim como o 2-nitrofluoreno possui m/z diferente do 9-nitroantraceno. Com o analisador operando no modo SIM, este consegue eliminar a interferência de um composto na detecção do outro (figura 23).

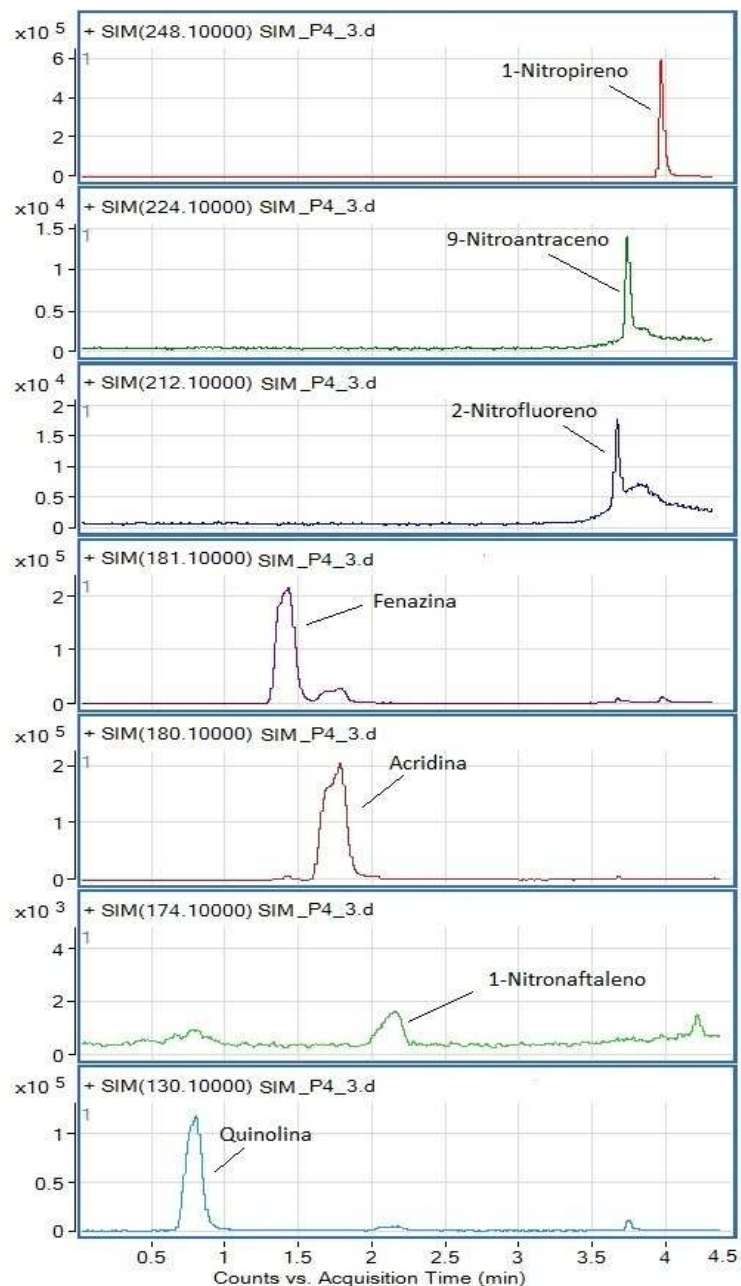


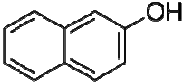
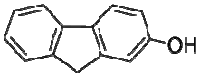
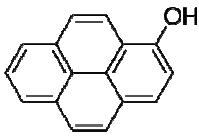
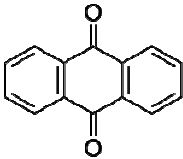
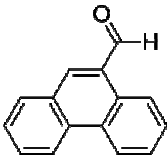
Figura 23. Cromatograma extraído do padrão 4 para cada m/z dos NHPAs monitorada.

5.1.3. Método para determinação de OHPAs

Para a determinação dos OHPAs foi realizado o monitoramento seletivo de reações (MRM), uma vez que todos os compostos apresentaram quebras significativas, com uma boa intensidade para os íons precursores e íons produtos.

Neste caso foi preciso otimizar além da energia do fragmentor a energia da célula de colisão para cada um dos compostos. Também foi preciso determinar a massa do íon produto a ser monitorado para cada OHPA. Os dados obtidos para estes parâmetros estão relatados na tabela 17.

Tabela 17. Parâmetros do espectrômetro de massas para os 5 OHPAs.

Composto (fórmula molecular)	Fórmula Estrutural	Energia da célula de colisão CE (eV)	Energia do Fragmentor (V)	Íon Precursor [M+H] ⁺	Íon produto
2-Naftol (C ₁₀ H ₇ OH)		18	91	145.1	127.1
2- Hidroxi fluoreno (C ₁₃ H ₁₀ O)		18	91	183.1	165.1
1-Hidroxi pireno (C ₁₆ H ₁₀ O)		20	132	219.1	201.1
9-10-Antraquinona (C ₁₄ H ₈ O ₂)		20	107	209.1	153.1
9-Fenantrenocar- boxialdeído (C ₁₅ H ₁₀ O)		10	96	207.1	179.1

O mesmo estudo realizado nos itens 5.1.1 e 5.1.2 foi repetido para os OHPAs. Os parâmetros otimizados da fonte APCI para os OHPAs estão apresentados nas figuras 24, 25, 26, 27, 28, 29 e tabela 18.

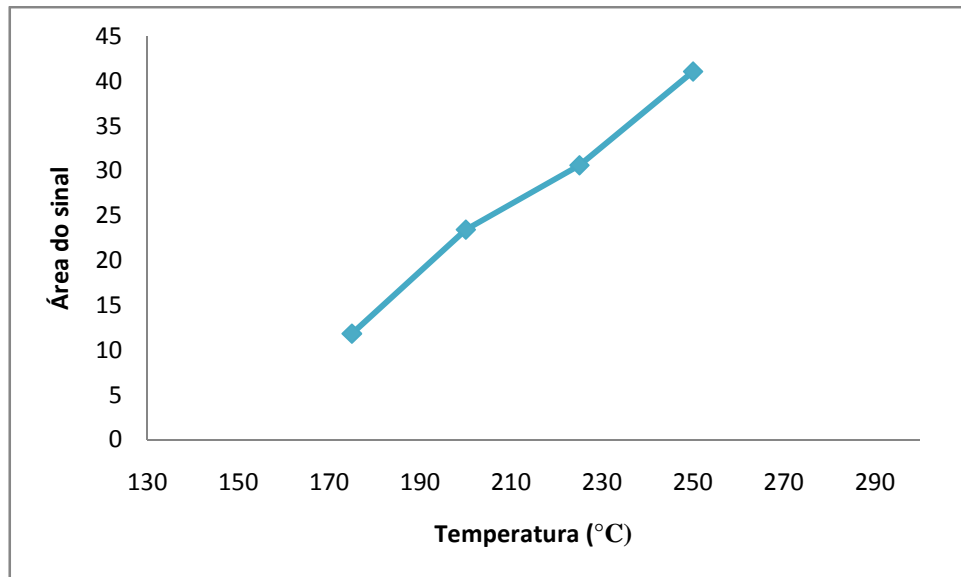


Figura 24. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função da temperatura do vaporizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do gás 325 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μA.

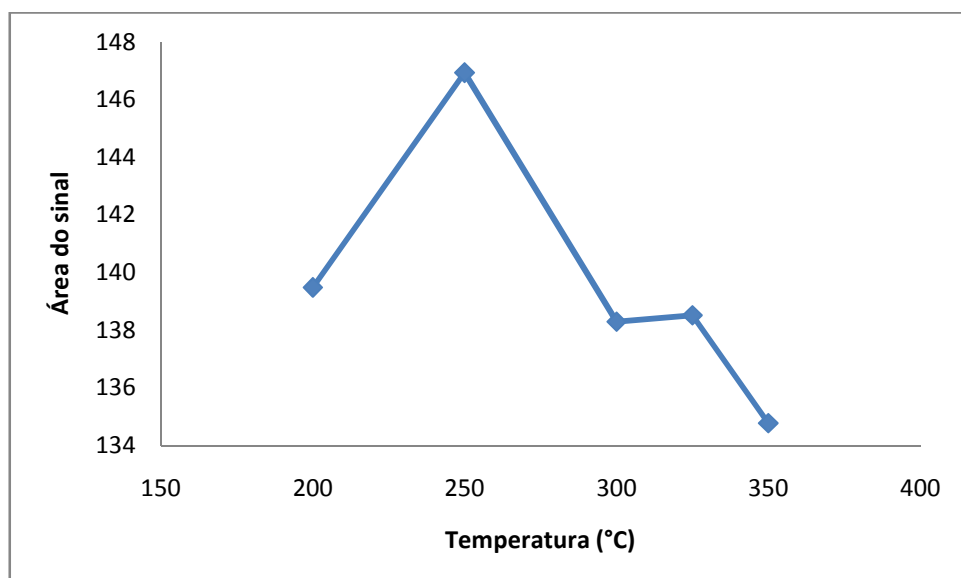


Figura 25. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função da temperatura do gás. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, nebulizador 60 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μA.

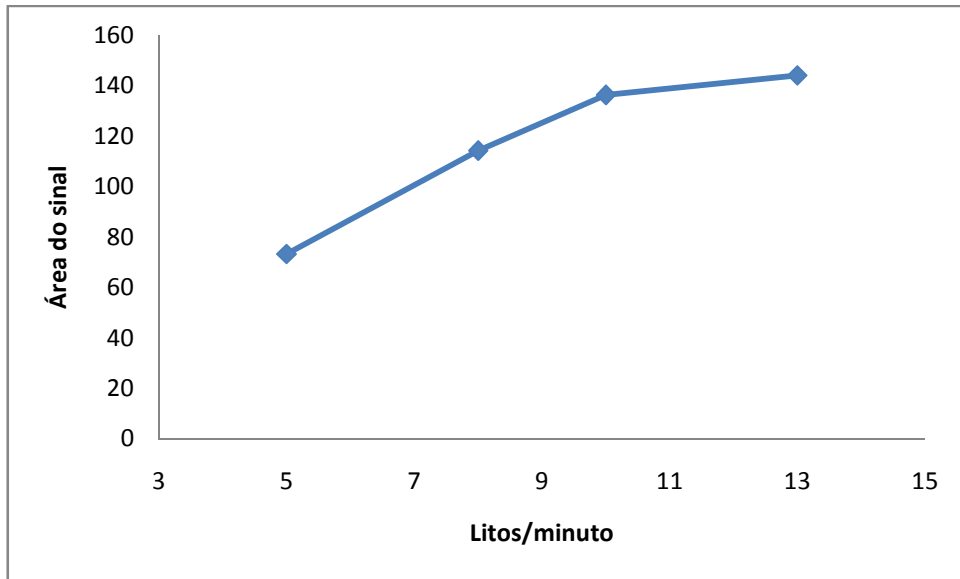


Figura 266. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função do fluxo de gás. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, pressão do nebulizador 20 psi, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μ A.

Observando os dados otimizados da fonte para a determinação dos OHPAs, percebemos novamente a necessidade de secar o eluato composto por 40% de água. Os valores da temperatura do vaporizador, gás de secagem e fluxo de gás em 250, 250 °C e 13 L min⁻¹ respectivamente (figuras 24, 25, e 26) demonstram isso. Contudo, observamos um decaimento do sinal quando é aumentada a temperatura do gás de secagem (figura 25), o que nos leva a inferir que estes compostos podem sofrer alguma degradação térmica.

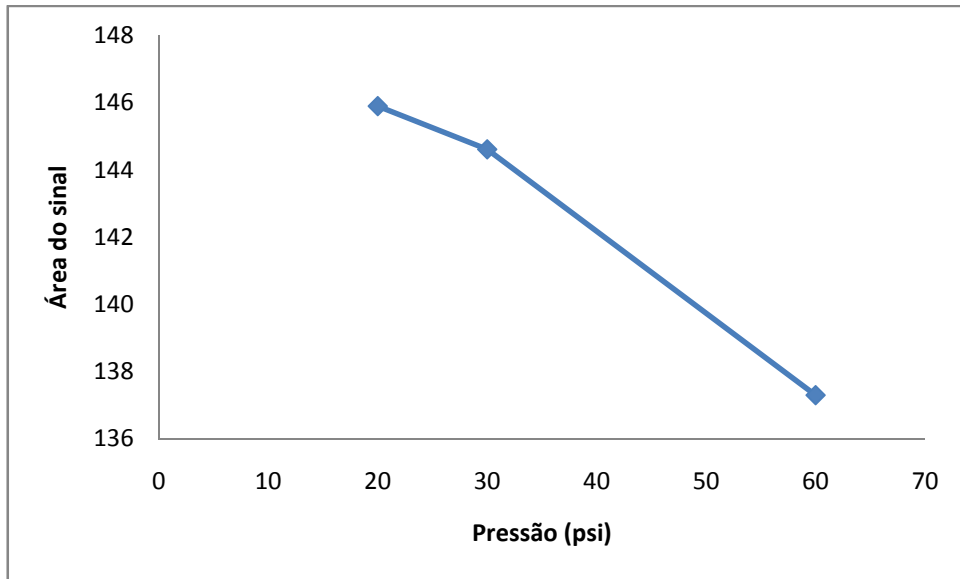


Figura 277. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função da pressão do nebulizador. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, fluxo de gás 5 L min⁻¹, voltagem do capilar 2500 V e descarga da corona 4 μA.

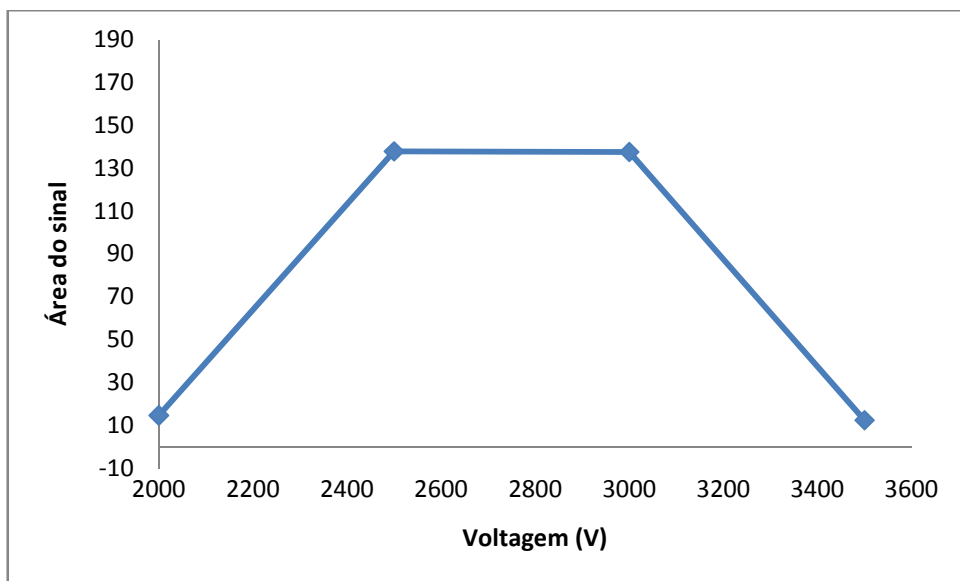


Figura 28. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função da voltagem do capilar. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, pressão do nebulizador 20 psi, fluxo de gás 13 L min⁻¹ e descarga da corona 4 μA.

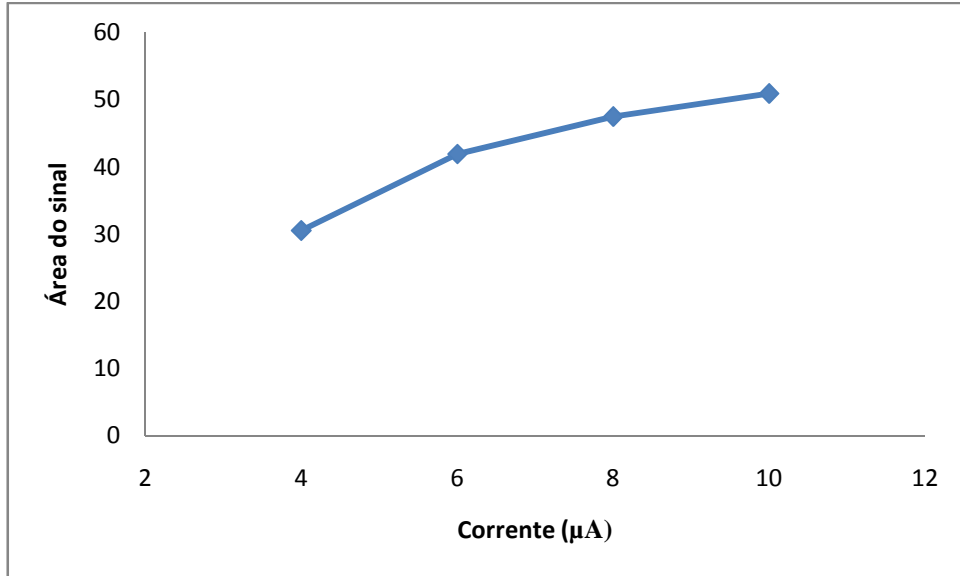


Figura 29. Variação da área do sinal do conjunto dos OHPAs em função da descarga da agulha corona. Parâmetros mantidos fixos: temperatura do vaporizador 250 °C, temperatura do gás 300 °C, pressão do nebulizador 20 psi, fluxo de gás 13 L min⁻¹ e voltagem do capilar 3500 V.

A pressão do nebulizador novamente foi de 20 psi (figura 27). A descarga da corona de 10 µA (figura 29), e a voltagem do capilar ficou estabelecida em 3000 V (figura 28).

Os parâmetros otimizados para operação da fonte para determinação dos OHPAs podem ser verificados na tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros otimizados para a fonte APCI para os OHPAs.

Parâmetros da fonte	Condição otimizada
Temperatura de vaporização (°C)	250
Temperatura do Gás (°C)	250
Pressão do nebulizador (psi)	20
Fluxo de gás (L min ⁻¹)	13
Voltagem do capilar (V)	3000
Descarga da Corona (µA)	10

Conforme o que já foi descrito no item 5.1.1 e 5.1.2, obteve-se o espectro de massas da mistura dos padrões dos 5 OHPAs, gerando o perfil de massas de uma amostra sintética. (figura 30)

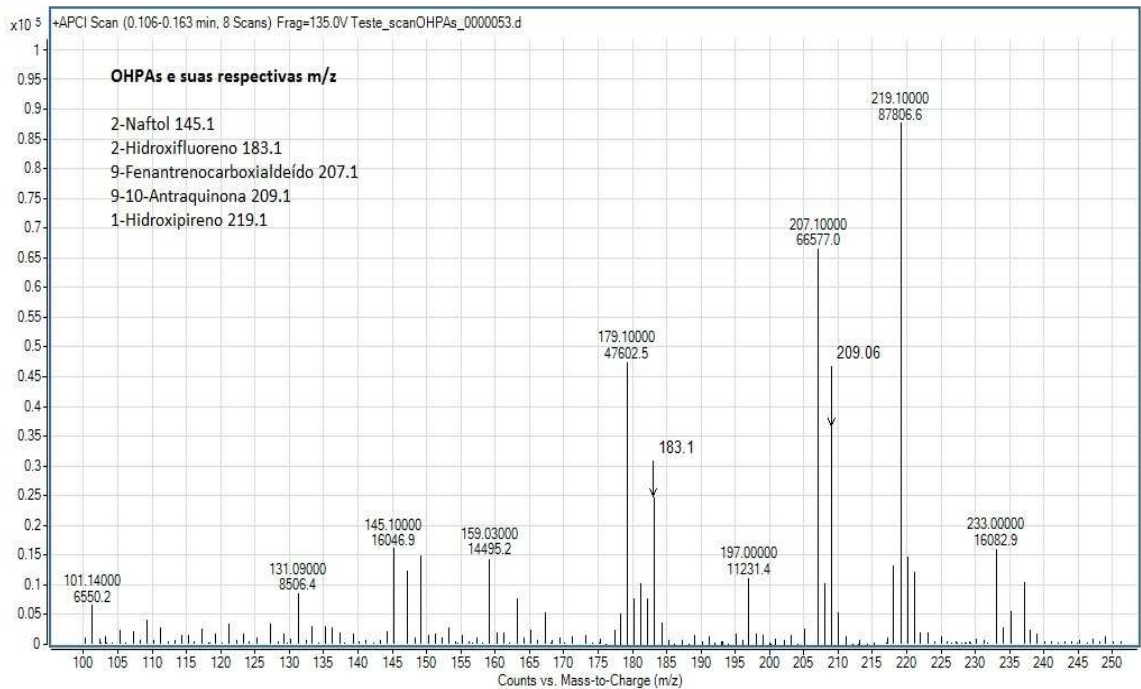


Figura 30. Espectro de massas de uma amostra sintética de OHPAs. Fonte de íons: temperatura do gás 250 °C, temperatura do vaporizador 250 °C, fluxo de gás 13 L min⁻¹, nebulizador 20psi, voltagem do capilar 3000 V e descarga da corona 10 µA. Volume de injeção 10µL

Aplicando-se o método cromatográfico desenvolvido para os OHPAs alcançou-se a separação apresentada na figura 31.

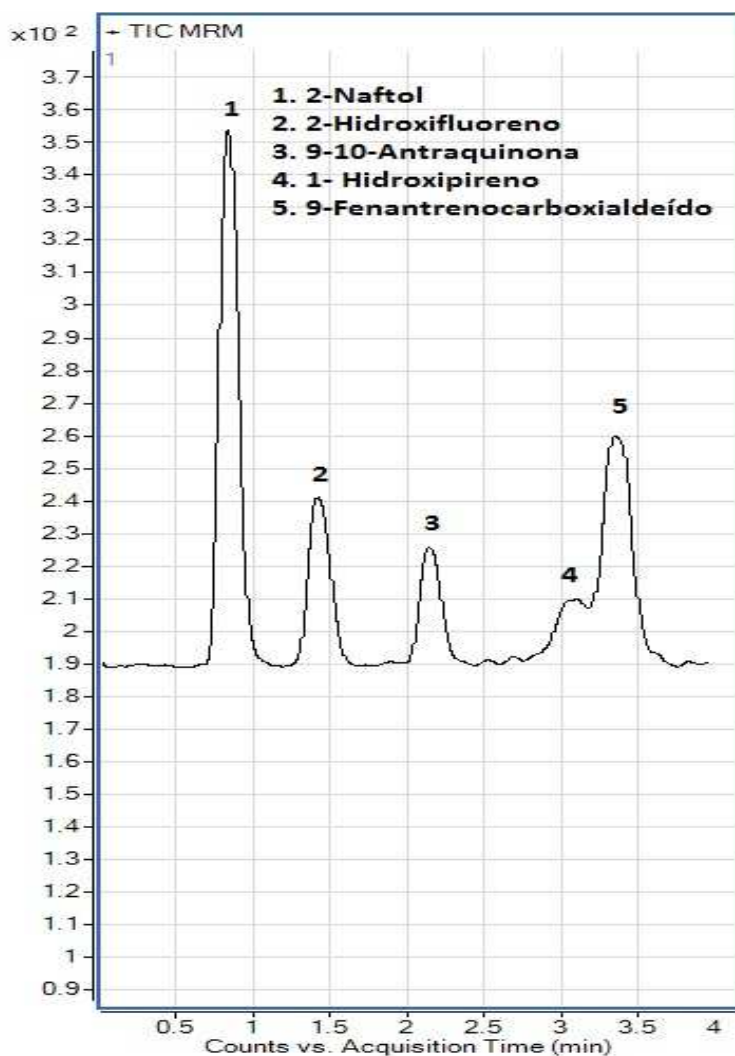


Figura 31. Cromatograma da separação do padrão 5 dos OHPAs. Zorbax modelo SB-C18 2,1 x 50 mm e 1,8 μm . Fase móvel 60% Metanol/água. Fluxo 0,5 mL min^{-1} e o volume de injeção 5 μL .

Examinando o cromatograma obtido, podemos observar uma baixa resolução entre os picos 4 (1-hidroxipireno) e 5 (9-fenantrenocarboxialdeído), no entanto o espectrômetro de massas corrige esta interferência de maneira análoga ao que foi citado nos itens 5.1.1 e 5.1.2. Neste caso o analisador está operando no modo MRM, e está monitorando a massa do íon precursor e íon produto de cada composto, desta forma ele distingue o sinal de cada analito, pois o 1- hidroxipireno possui íon precursor e íon produto diferente do 9-fenantrenocarboxialdeído (figura 32). Neste modo de operação, compostos de mesma massa podem co-eluir no mesmo pico desde que seus íons produto possuam razão massa carga diferentes. (GROSS, 2011)

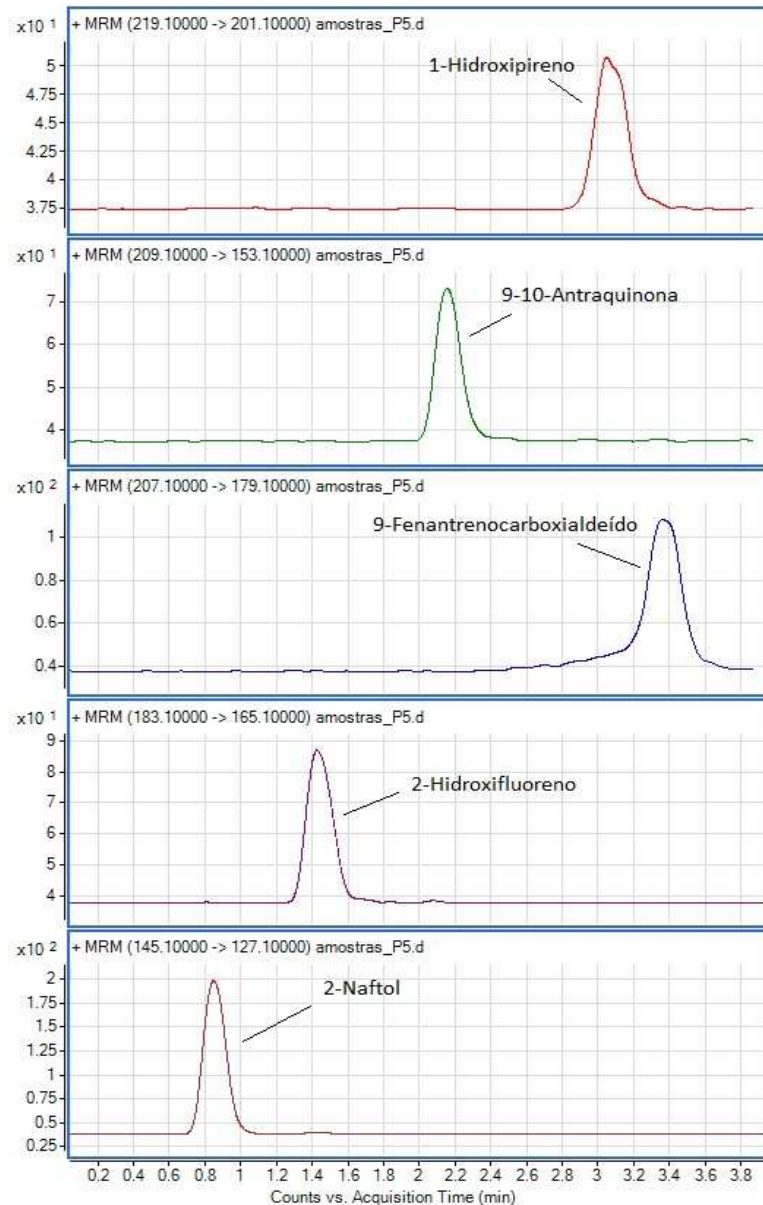


Figura 32. Cromatograma extraído do padrão 5 para cada m/z dos OHPAs monitorada

5.2 Validação dos métodos desenvolvidos

Após o desenvolvimento dos métodos para determinação dos HPAs e seus derivados desenvolvidos, os mesmos foram validados e os resultados estão apresentados nas tabelas 19, 20, 21, e 22.

Analisando os resultados de validação obtidos, é possível verificar através dos coeficientes de correlação linear (r) uma boa linearidade dos métodos uma vez que estes valores estão muito próximos a 1. O INMETRO recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo 0,90 e a ANVISA de no mínimo 0,99, assim os valores

apresentados pelos métodos atendem as exigências dos dois órgãos regulamentadores. Tais valores ainda ressaltam uma correlação linear elevada. (BRITO et al, 2003) Além disso, os métodos apresentam uma ampla faixa linear, de mais de uma ordem de grandeza.

Os métodos obtiveram limites de detecção e quantificação satisfatórios muitos na faixa de partes por bilhão (ppb). Apenas o composto fluoranteno apresentou limites de detecção e quantificação mais altos, devido a sua menor sensibilidade e dificuldade de ionização. Os três métodos apresentaram uma boa precisão intra dia e inter dia, pois os valores de DPR estão dentro de um limite aceitável, pois a concentração analisada estava na faixa de ppb a ppm e os métodos analisam traços ou impurezas. Nessas condições são aceitos DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. (BRITO et al, 2003; RIBANI et al., 2004) Os resultados de recuperação para avaliar a exatidão da medida, também mostraram-se satisfatórios pois os valores obtidos encontram-se dentro de uma faixa aceitável de 80 a 110 % para os níveis de concentração estudados.(BRITO et al, 2003; LISTER, 2005)

Tabela 19. Parâmetros analíticos do método desenvolvido para a determinação dos HPAs.

	Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno	Fluoreno
Precisão intra dia (DPR %)	1,65	0,68	0,47	0,67	2,10	0,84	0,49
Precisão inter dia (DPR %)	3,18	1,32	2,32	1,92	4,59	3,24	1,19
Exatidão (recuperação%)	81,97 a 95,44%	84,75 a 99,47%	85,65 a 99,18%	89,35 a 97,80%	80,55 a 99,58%	85,70 a 96,70%	84,86 a 95,42%
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,05 – 50	0,005 – 50	0,05 – 50	0,002 – 50	0,5 – 100	0,002 – 50	0,05 - 50
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,25 – 10	0,5 - 20	0,5 - 20	0,025 – 1	2,5 – 100	0,01 - 0,4;	0,25 - 10
LD (mg L ⁻¹)	0,0104	0,0035	0,0387	0,0016	0,3465	0,0005	0,0049
LQ (mg L ⁻¹)	0,0347	0,0115	0,1290	0,0053	1,5497	0,0017	0,0162
coeficiente de correlação linear (r)	0,999	0,990	0,999	0,999	0,998	0,999	0,999
Coeficiente de determinação (r ²)	0,998	0,998	0,997	0,997	0,995	0,997	0,998

Tabela 20. Parâmetros analíticos do método desenvolvido para a determinação dos HPAs.

	Benzo(b) fluoranteno	Benzo(k) fluoranteno	Benzo(a) Pireno	Benzo(ghi) Pireno	Indeno(1,2,3-c,d) pireno	Dibenzo(a,h) antraceno	Fenantreno
Precisão intra dia (DPR%)	1,36	0,92	0,60	0,63	0,65	3,14	0,58
Precisão inter dia (DPR%)	10,36	3,78	2,01	2,31	11,22	7,02	3,78
Exatidão (recuperação%)	86,77 a 96,22	84,44 a 98,42%	106,39 a 109,62%	83,33 a 91,54%	80,60 a 93,87%	96,51 a 114,86%	81,28 a 105,06%
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,05 – 50	0,05 – 50	0,002 – 50	0,002 – 50	0,005 - 50	0,05 - 50	0,01 - 50
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,5 – 20	0,5 - 20	0,01 - 0,4;	0,01 - 0,4;	0,1 - 4	0,025 - 1	0,1 - 4
LD (mg L ⁻¹)	0,0371	0,0666	0,0007	0,0050	0,0049	0,0370	0,0013
LQ (mg L ⁻¹)	0,1238	0,2219	0,0023	0,0166	0,0163	0,1234	0,0044
coeficiente de correlação linear (r)	0,999	0,998	0,999	0,999	0,998	0,995	0,999
Coeficiente de determinação (r ²)	0,997	0,996	0,997	0,997	0,995	0,999	0,997

Tabela 21. Parâmetros analíticos do método desenvolvido para a determinação dos NHPAs.

	Fenazina	Acridina	Quinolina	1-Nitronaftaleno	2-Nitrofluoreno	9-Nitroantraceno	1-Nitropireno
Precisão intra dia (DPR%)	0,21	0,46	0,20	2,68	0,94	1,57	0,68
Precisão inter dia (DPR%)	2,81	8,76	11,42	14,89	11,10	5,96	1,60
Exatidão (recuperação %)	86,23 a 108,36	82,90 a 104,24	83,22 a 102,09	96,54 a 98,72	96,24 a 100,93	100,93 a 106,48	100,46 a 113,62
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,005 - 1,00	0,005 - 1,00	0,005 - 1,00	0,5 - 30	0,3 - 25	0,3 - 25	0,02 - 10
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,005 - 1,0	0,005 - 1,0	0,005 - 1,0	0,5 - 30	0,3 - 18	0,3 - 18	0,05 - 3,0
LD (mgL ⁻¹)	0,0001	0,0002	0,0014	0,0333	0,0185	0,0573	0,0027
LQ (mgL ⁻¹)	0,0005	0,0005	0,0046	0,1111	0,0616	0,1911	0,0091
coeficiente de correlação linear (r)	0,999	0,995	0,998	0,999	0,999	0,999	0,998
Coeficiente de determinação (r ²)	0,998	0,990	0,997	0,998	0,999	0,999	0,997

Tabela 22. Parâmetros analíticos do método desenvolvido para a determinação dos OHPAs.

	2-Naftol	2-Hidroxifluoreno	9-10-Antraquinona	1-Hidroxipireno	9-Fenantrenocarboxialdeído
Precisão intra dia (DPR%)	1,44	5,84	0,74	0,95	0,87
Precisão inter dia (DPR%)	13,20	16,12	3,30	3,26	3,11
Exatidão (recuperação %)	90,97 a 99,56	87,29 a 99,64	83,17 a 104,51	98,45 a 101,08	98,06 a 100,50
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,05 - 5,0	0,05 - 5,0	0,025 - 2,5	0,01 - 1,0	0,01 - 1,0
Faixa de trabalho (mg L ⁻¹)	0,1 - 5,0	0,1 - 5,0	0,05 - 2,5	0,02 - 1,0	0,02 - 1,0
LD (mg L ⁻¹)	0,0020	0,0004	0,0027	0,0001	0,0009
LQ (mg L ⁻¹)	0,0066	0,0013	0,0089	0,0003	0,0030
coeficiente de correlação linear (r)	0,996	0,997	0,995	0,996	0,996
Coeficiente de determinação (r ²)	0,993	0,995	0,990	0,992	0,993

5.3 Aplicação na amostra de asfalto:

Após a validação dos métodos desenvolvidos, estes foram utilizados para análise de uma amostra de asfalto fracionada. Esta amostra foi fracionada em maltenos e asfaltenos, e a fração maltênica foi analisada por ser constituída de hidrocarbonetos de menor peso molecular solúveis em n-heptano. Esta fração pode ser separada em resinas, óleo de petróleo saturado e óleos aromáticos. (LINS et al, 2008) Sendo assim, é grande a probabilidade de os HPAs e seus derivados se encontrarem nesta fração.

As frações ácida e básica foram diluídas em metanol, pois este foi o solvente utilizado como fase móvel na cromatografia. Quanto à fração neutra, por possuir uma matriz mais complexa, foi ressuspensa em diclorometano já que os HPAs e derivados são solúveis e tem boa afinidade por este solvente (SILVA et al, 2006). Uma vez que os compostos estão solubilizados em diclorometano, podem ser posteriormente diluídos em metanol, enquanto compostos mais apolares e resinas presentes na matriz não serão solúveis em metanol e irão precipitar. Desta forma através da dupla filtração é possível eliminar tais interferências da matriz.

A concentração de HPAs nas frações variou de 0,053 mg L⁻¹ a 40,24 mg L⁻¹ com o desvio padrão relativo variando de 0,55 a 16,07 %. As figuras 33, 34, e 35 mostram os cromatogramas obtidos para as frações ácida, básica e neutra dos maltenos e as respectivas adições de padrão (Spike).

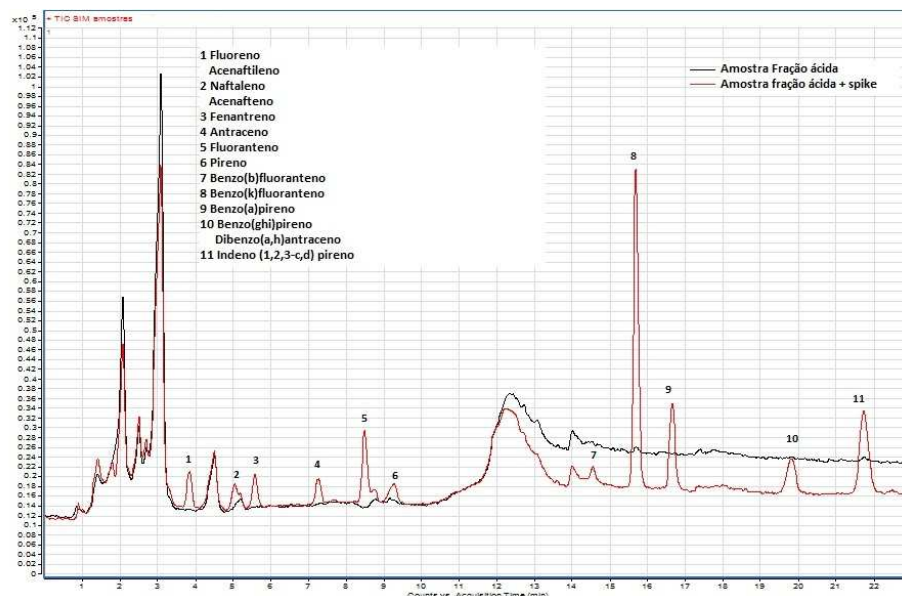


Figura 33. Cromatograma dos HPAs obtido para fração ácida e fração ácida + spike.

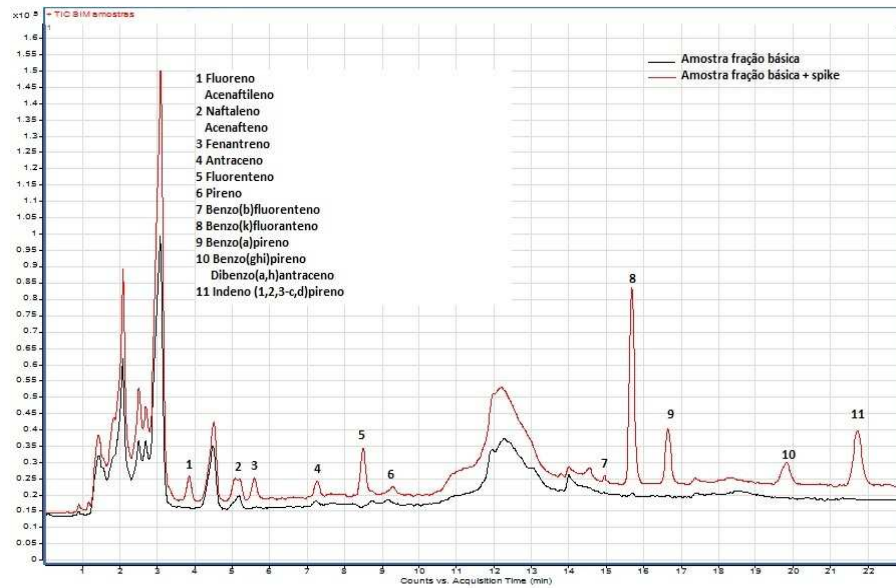


Figura 34. Cromatograma dos HPAs obtido para a fração básica e fração básica + Spike

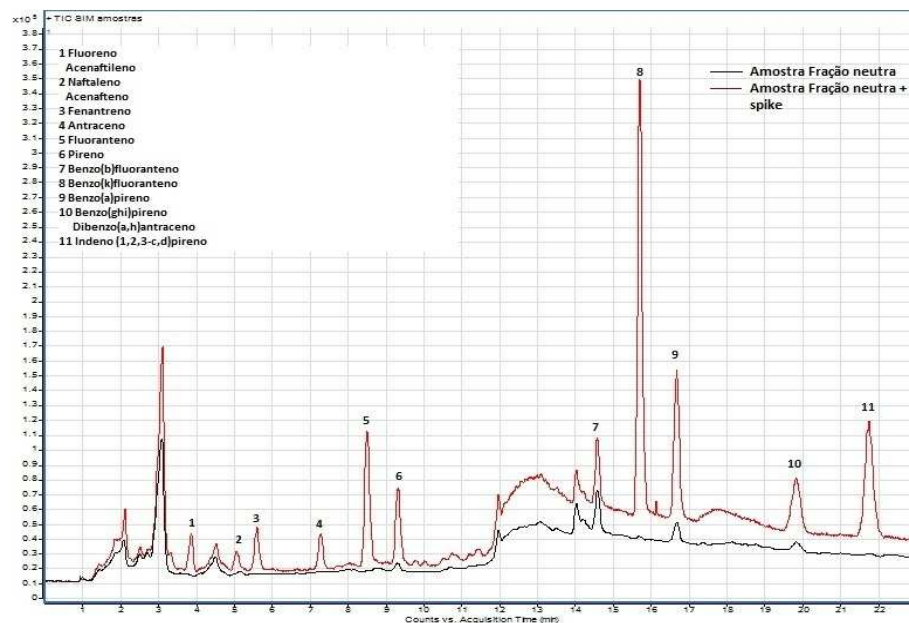


Figura 35. Cromatograma dos HPAs obtido para a fração neutra e fração neutra + Spike.

É possível identificar alguns picos no cromatograma que podem corresponder aos HPAs, desta forma extraindo o cromatograma para cada massa monitorada no modo SIM, podemos confirmar a presença dos HPAs através do tempo de retenção e m/z , identificando qualitativo e quantitativamente os compostos na amostra analisada. (figuras 36, 37, 38)

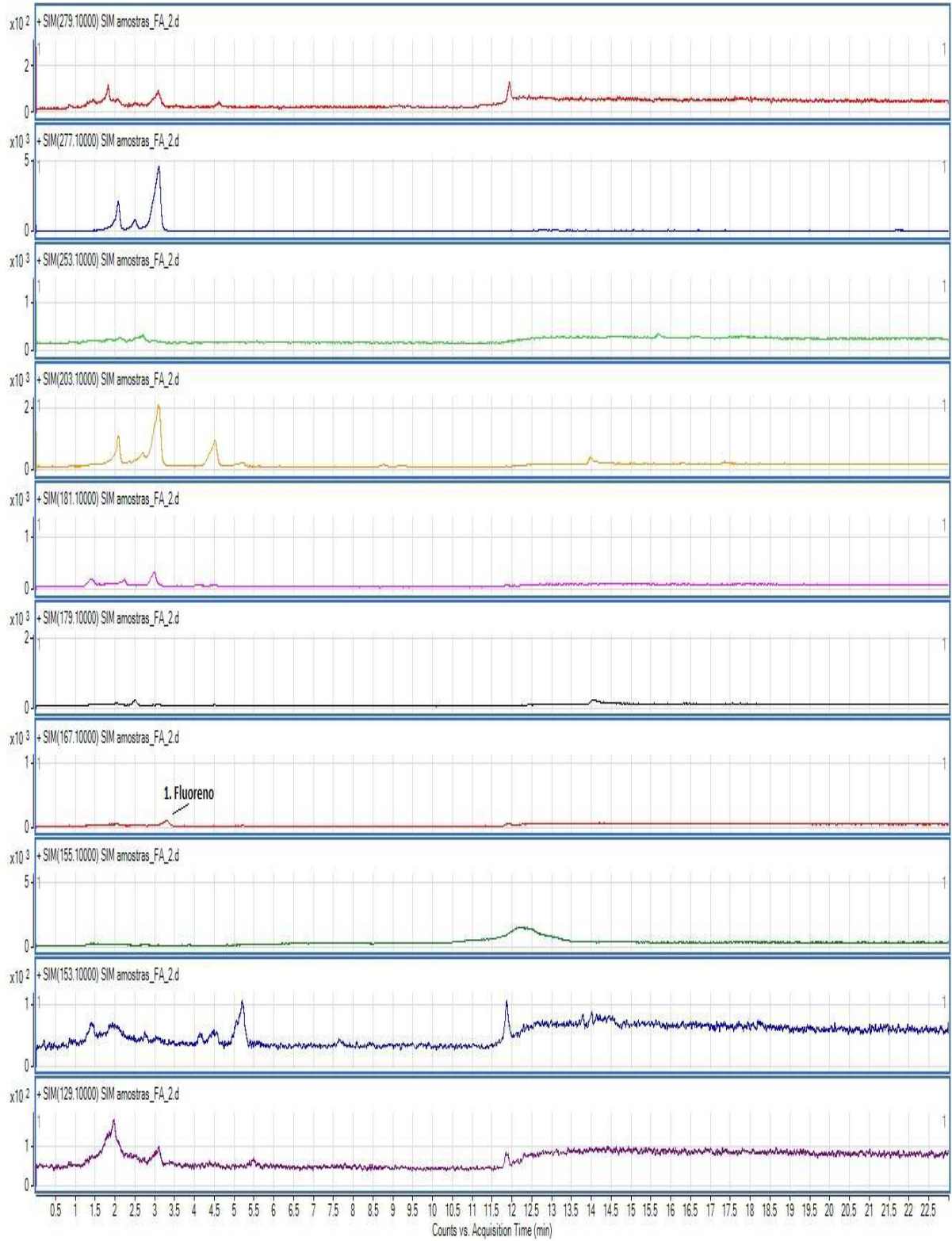


Figura 36. Cromatograma extraído da fração ácida para cada m/z dos HPAs monitorada.

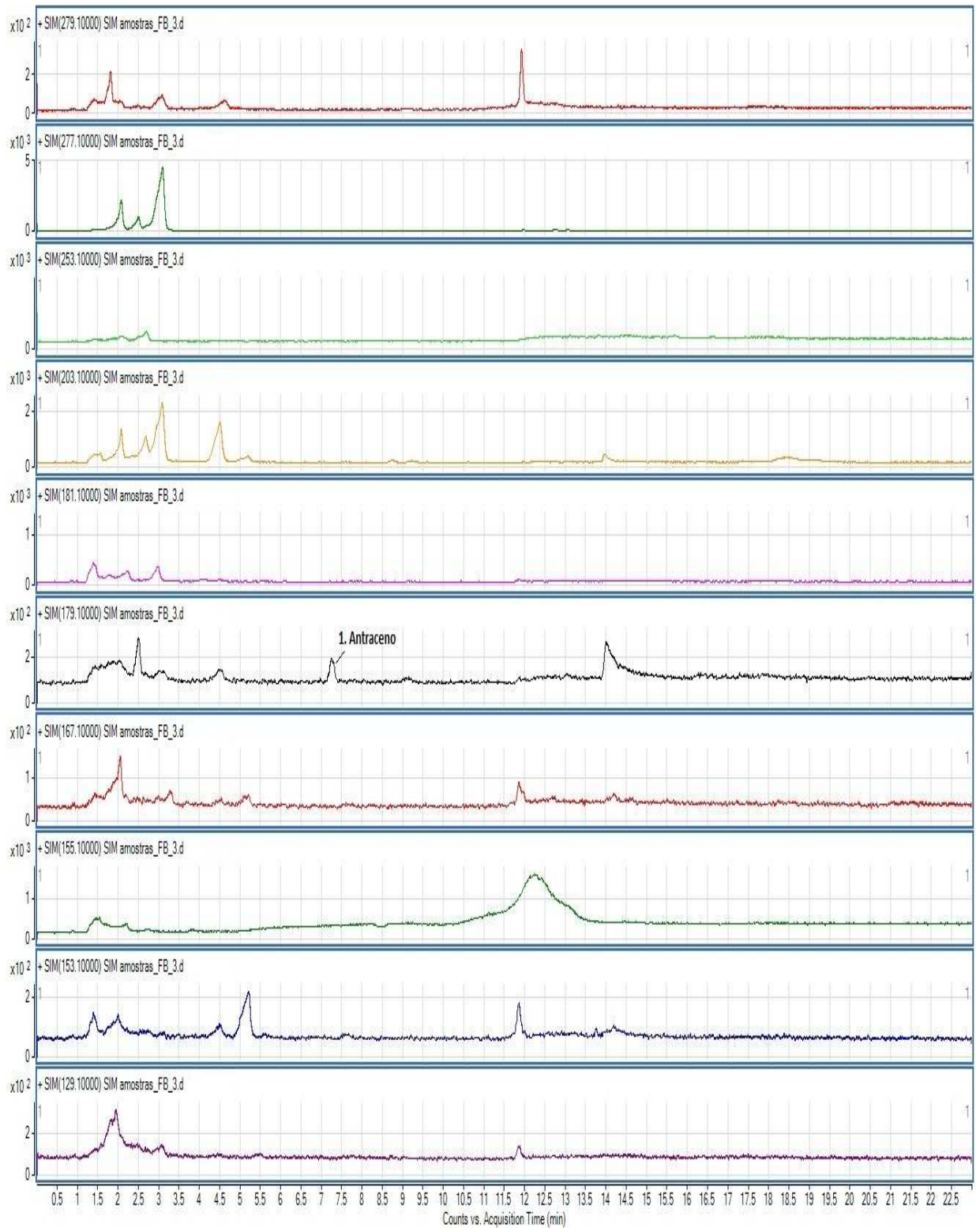


Figura 37. Cromatograma extraído da fração básica para cada m/z dos HPAs monitorada.

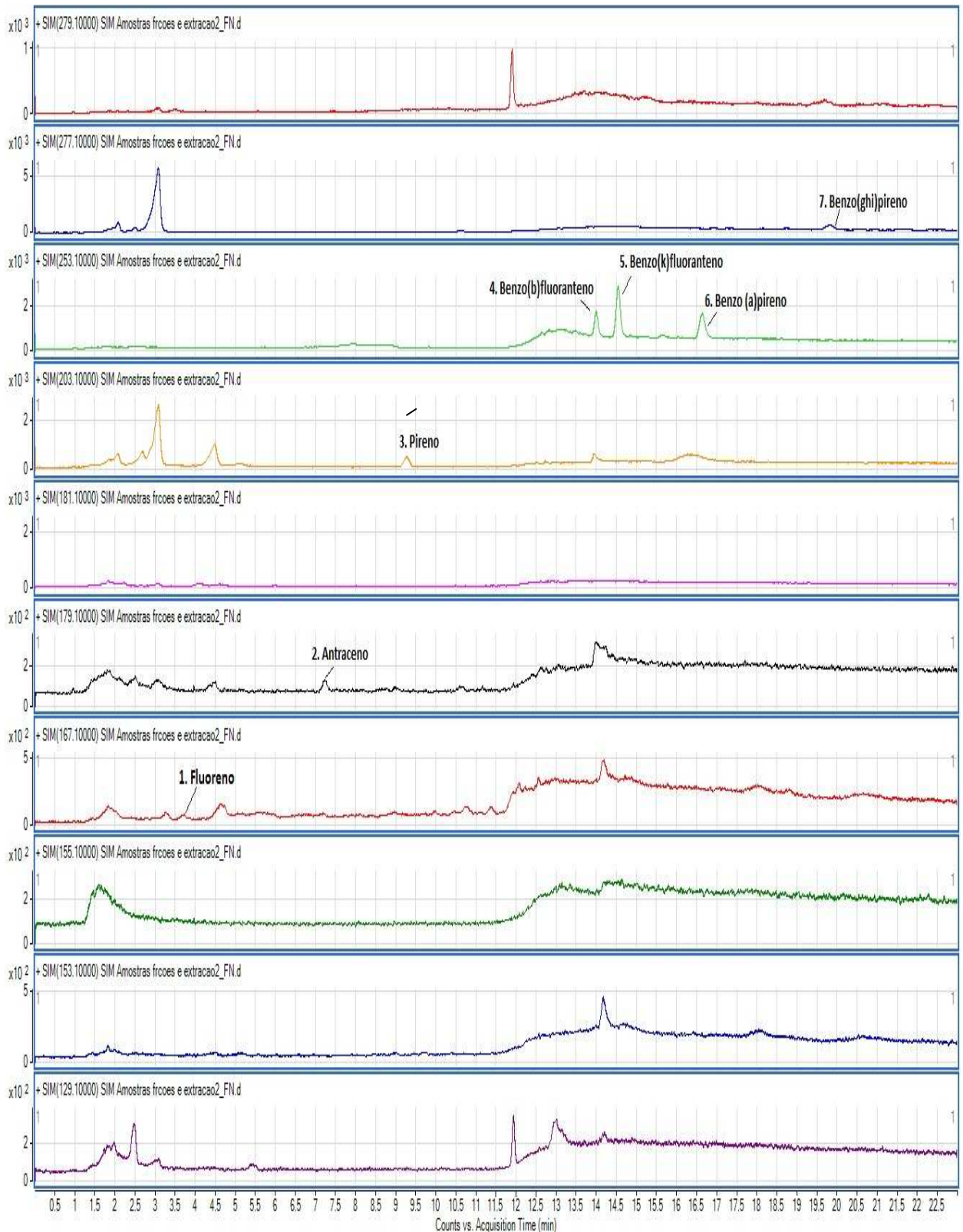


Figura 38. Cromatograma extraído da fração neutra para cada m/z dos HPAs monitorada.

Podemos identificar a presença de antraceno na fração básica, fluoreno na fração ácida, e na fração neutra, fluoreno, antraceno, pireno, benzo(b)fluoranteno,

benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno e benzo(ghi)pireno. Observa-se uma maior quantidade de HPAs na fração neutra, o que se justifica devido ao caráter apolar destes compostos. Outro dado interessante é a presença de benzo(a)pireno, um marcador toxicológico. A presença deste composto mostra um possível potencial carcinogênico desta matriz.

As tabelas 23, 24 e 25 apresentam a concentração de cada um dos HPAs, nas frações analisadas bem como a recuperação do padrão de cada composto adicionado à fração. Podemos verificar um desvio padrão aceitável inferior a 20% para todos os compostos e recuperações satisfatórias dentro da faixa de 80 a 120 % para todos os compostos

Tabela 23. Resultados da determinação e ensaios de recuperação de cada um dos HPAs na fração maltênica (n = 3).

	Fluoreno			Acenaftileno			Naftaleno			Acenafteno			Fenantreno		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A*	11,171	2,73	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.A	0,30	0,62	105,96	0,48	0,65	103,63	0,09	16,00	98,01	0,39	3,98	97,13	0,12	2,57	105,65
F.B*	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.B	0,28	6,45	100,79	0,90	2,14	101,39	0,14	11,60	109,10	0,38	4,67	94,75	0,12	0,45	108,09
F.N*	0,53	7,20	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.N	1,67	3,29	83,26	1,60	1,70	88,50	0,78	5,19	96,95	1,80	1,09	99,46	0,77	0,38	84,17

Tabela 234. Resultados da determinação e ensaios de recuperação de cada um dos HPAs na fração maltênica (n = 3).

	Antraceno			Fluoranteno			Pireno			Benzo(b)fluoranteno			Benzo(k)fluoranteno		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A*	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.A	0,03	3,13	92,52	2,55	3,15	89,01	0,009	14,69	100,48	0,82	7,67	91,75	0,38	1,72	94,57
F.B*	0,98	0,86	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.B	0,03	1,12	91,12	2,62	9,55	91,42	0,01	9,59	95,52	0,46	0,61	115,24	0,41	2,84	101,55
F.N*	0,07	16,07	---	---	---	---	0,18	0,55	---	40,24	7,65	---	1,33	11,84	---
Spike F.N	0,11	2,87	117,44	16,588	0,85	82,94	0,09	12,47	115,04	3,67	9,13	91,68	3,23	0,84	80,79

Tabela 245. Resultados da determinação e ensaios de recuperação de cada um dos HPAs na fração maltênica (n = 3).

	Benzo(a)pireno			Benzo(ghi)pireno			Dibenzo(a,h)antraceno			Indeno(1,2,3-cd)pireno		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A*	----	---	---	----	---	---	----	---	---	----	---	---
Spike F.A	0,008	1,56	97,83	0,008	0,60	98,33	0,02	3,09	97,29	0,07	6,01	90,32
F.B*	----	---	---	----	---	---	----	---	---	----	---	---
Spike F.B	0,009	1,37	93,14	0,009	0,55	96,64	0,02	3,41	102,51	0,08	1,56	98,41
F.N*	0,82	1,91	----	0,05	6,75	----	---	---	---	----	---	---
Spike F.N	0,08	4,32	91,10	0,07	0,60	90,09	0,17	2,60	84,42	0,35	1,84	104,44

* FA = Fração ácida

FB = Fração básica

FN = Fração neutra

A concentração de NHPAs nas frações variou de 0,49 a 156 mg L⁻¹ com o desvio padrão variando de 0,78 a 18,46 %. Os cromatogramas obtidos para cada uma das frações e suas respectivas adições de padrão estão apresentados nas figuras 39, 40 e 41.

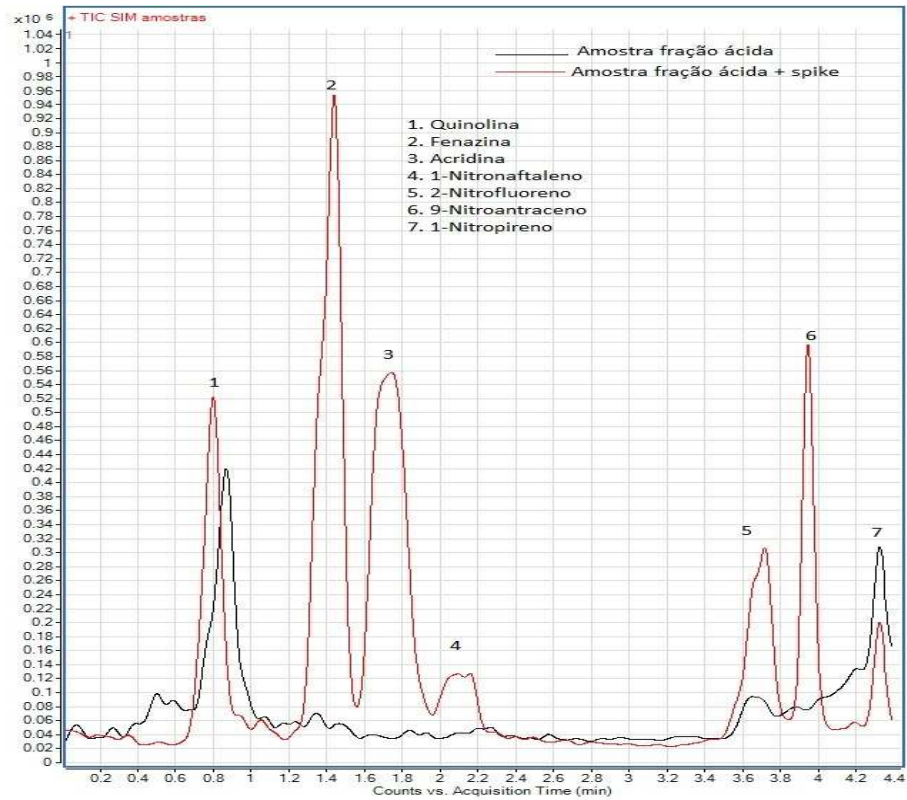


Figura 39. Cromatograma dos NHPAs obtido para a fração ácida e fração ácida + Spike.

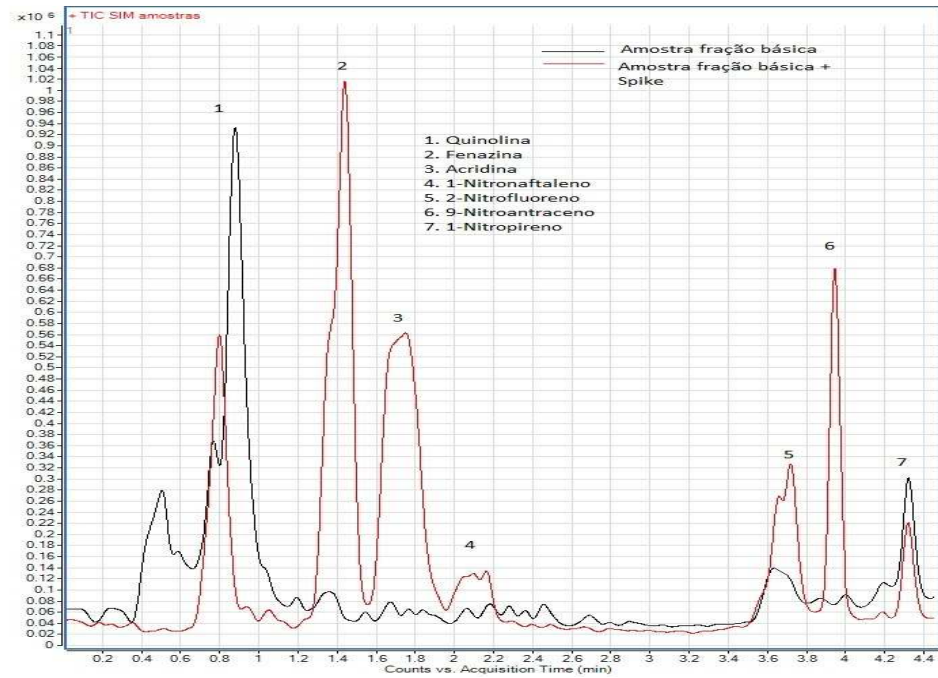


Figura 40. Cromatograma dos NHPAs obtido para a fração básica e fração básica + Spike.

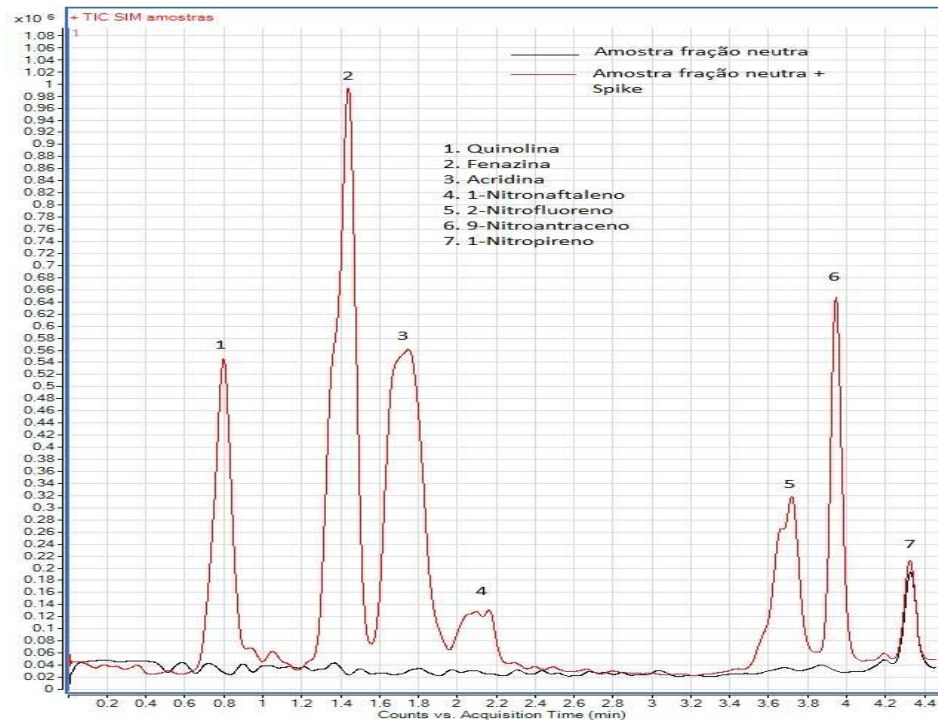


Figura 41. Cromatograma dos NHPAs obtido para a fração neutra e fração neutra + Spike.

Da mesma forma como ocorreu com os HPAs, examinando os cromatogramas obtidos é possível identificar nas frações ácida, básica e neutra alguns picos que podem corresponder aos NHPAs. Logo, extraiu-se o cromatograma

para cada massa monitorada no modo SIM, para que se pudesse confirmar a presença dos NHPAs através do tempo de retenção e m/z. (figuras 42, 43 e 44)

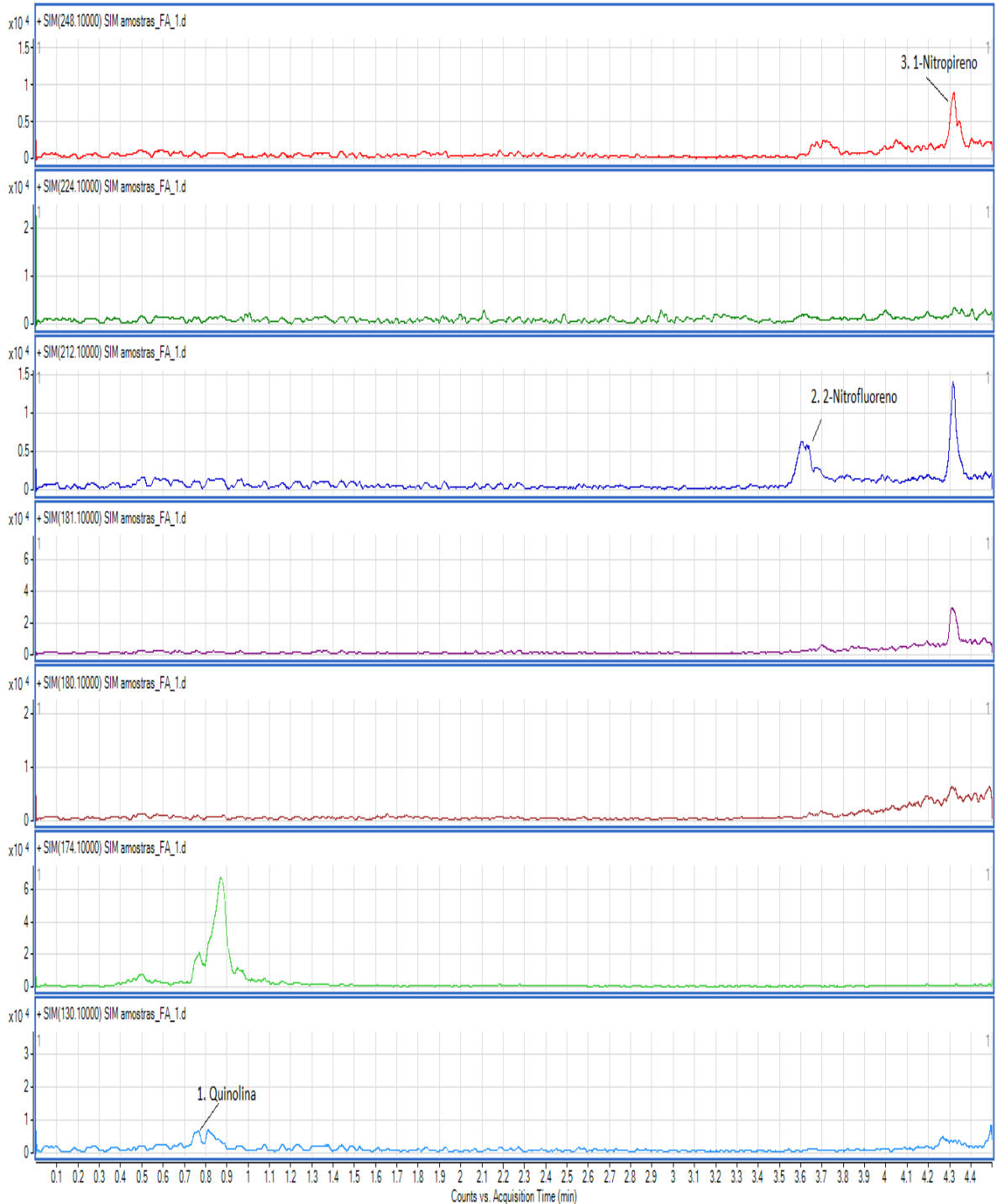


Figura 42. Cromatograma extraído da fração ácida para cada m/z dos NHPAs monitorada.

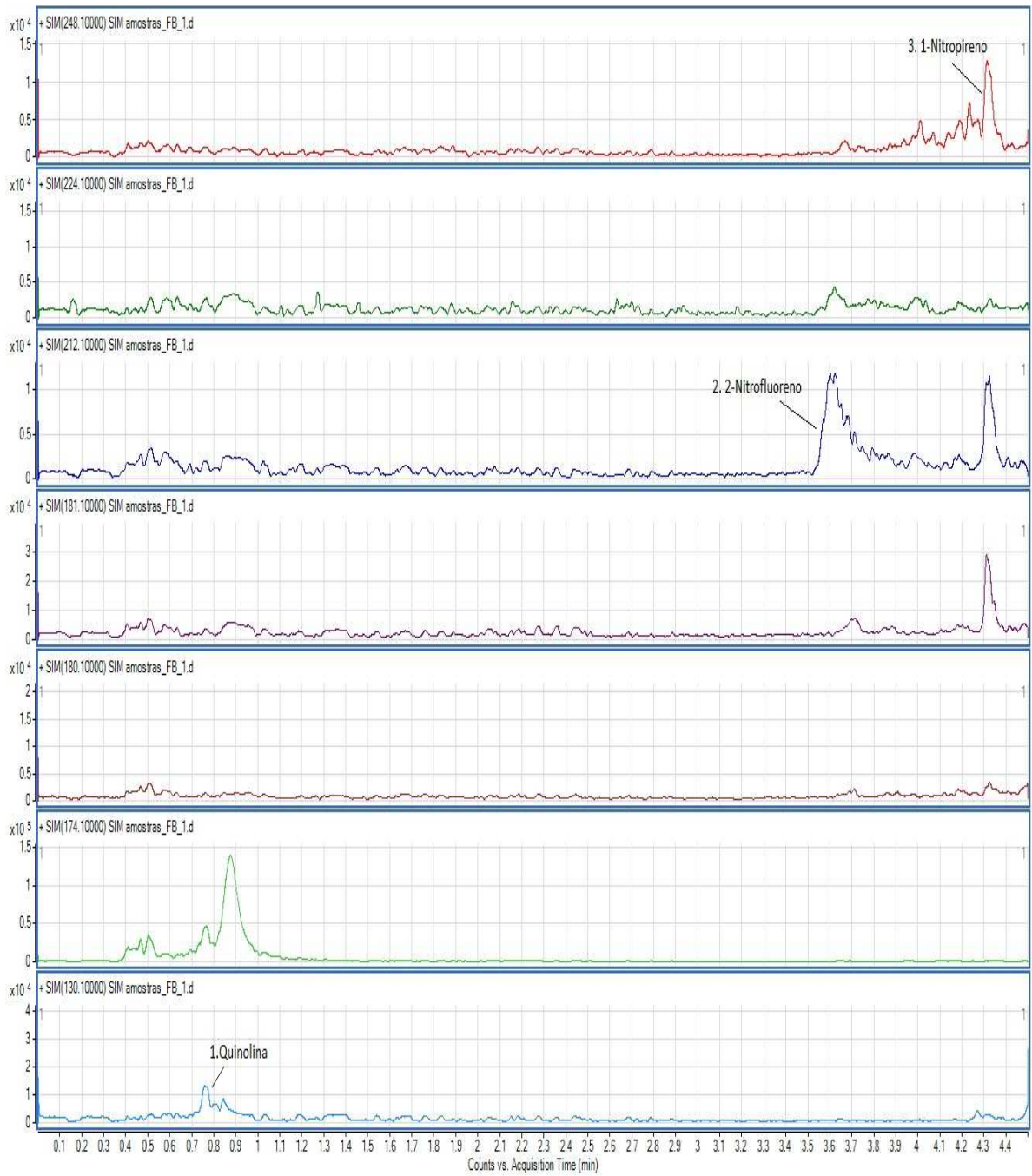


Figura 43. Cromatograma extraído da fração básica para cada m/z dos NHPAs monitorada.

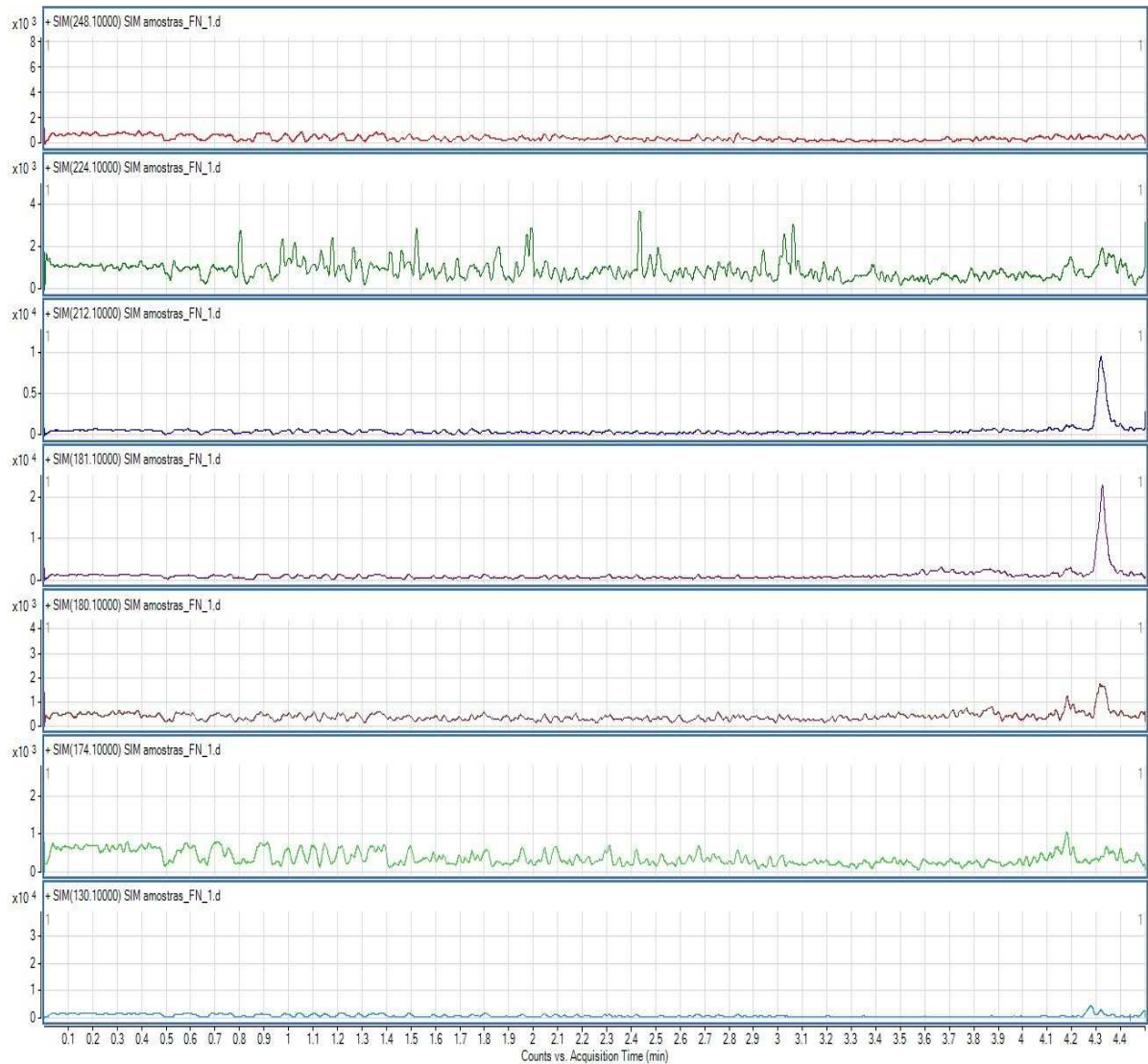


Figura 44. Cromatograma extraído da fração neutra para cada m/z dos NHPAs monitorada.

A presença de quinolina, 2-nitrofluoreno e 1-nitropireno foi identificada em ambas as frações ácida e básica, já na fração neutra não foi detectada a presença de nenhum dos NHPAs. O que se justifica devido ao caráter mais polar destes compostos quando comparados com os HPAs.

Novamente foi determinada a concentração de cada um dos NHPAs identificados nas frações, estes resultados podem ser verificados nas tabelas 26 e 27 juntamente com os resultados de recuperação. Assim como os HPAs, os NHPAs apresentaram resultados satisfatórios com desvio padrão inferior a 20% para todos os compostos e recuperações dentro da faixa de 80 a 120 % para todos os compostos

Tabela 256. Resultados da determinação e ensaios de recuperação de cada um dos NHPAs na fração maltênica (n = 3).

	Fenazina			Acridina			Quinolina			Nitronaftaleno		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A	---	---	---	---	---	---	0,46	18,46	---	---	---	---
Spike F.A	0,004	7,07	80,00	0,004	12,86	88,00	0,006	14,14	120,00	1,214	14,25	121,37
F.B	---	---	---	---	---	---	0,69	9,52	---	---	---	---
Spike F.B	0,004	12,48	80,67	0,006	16,67	120,75	0,005	12,60	99,00	1,155	11,97	115,53
F.N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.N	0,008	13,76	82,67	0,009	4,04	86,15	0,008	17,76	84,73	0,939	7,92	93,88

Tabela 267. Resultados da determinação e ensaios de recuperação de cada um dos NHPAs na fração maltênica (n = 3).

	Nitrofluoreno			Nitroantraceno			Nitropireno		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A	110	5,24	---	---	---	---	<LQ	---	---
Spike F.A	0,90	18,60	89,82	0,30	4,78	101,02	0,06	5,77	120,27
F.B	156,	0,78	---	---	---	---	<LQ	---	---
Spike F.B	0,87	12,53	87,28	0,33	17,03	109,07	0,05	16,97	96,00
F.N	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.N	1,03	5,77	103,35	0,68	1,70	112,61	0,09	14,22	81,02

Quanto aos OHPAs, estes não foram detectados em nenhuma das frações da amostra analisada como pode ser visualizado nos cromatogramas das figuras 45, 46 e 47.

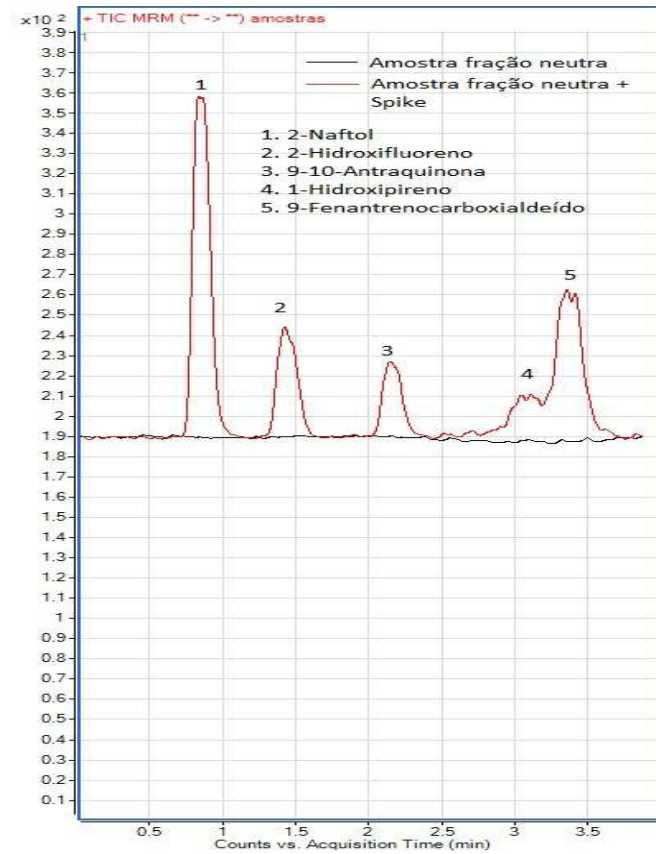


Figura 45. Cromatograma dos OHPAs obtido para a fração ácida e fração ácida + Spike.

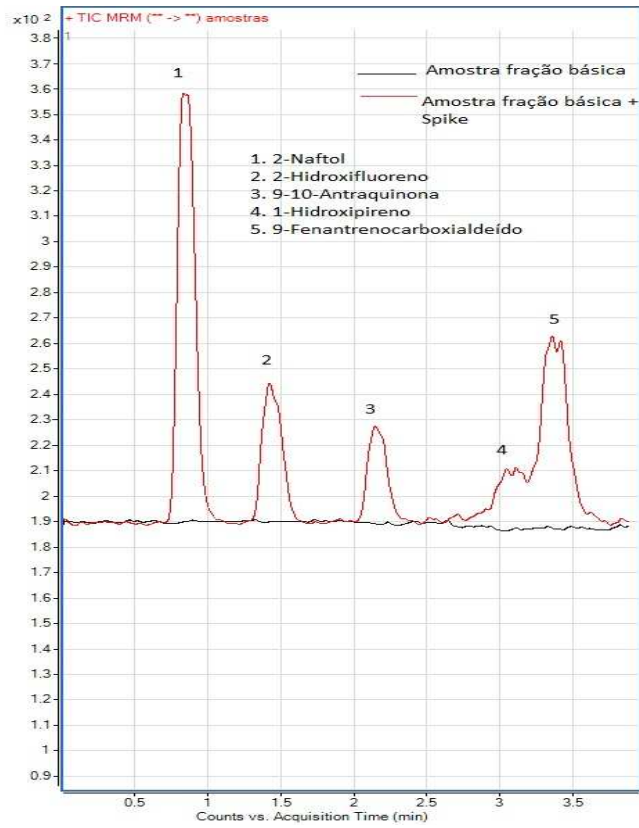


Figura 46. Cromatograma dos OHPAs obtido para a fração básica e fração básica + Spike.

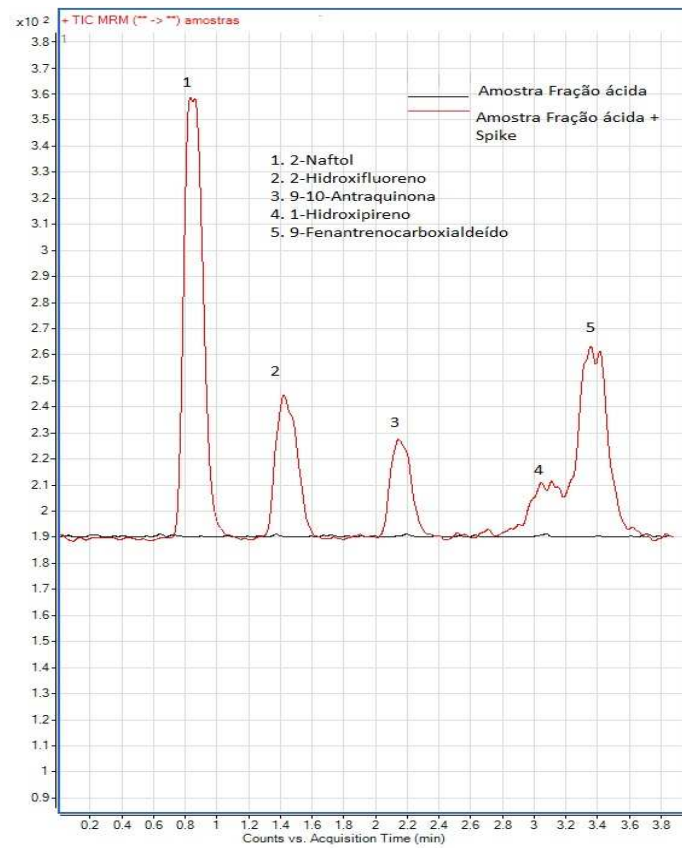


Figura 47. Cromatograma dos OHPAs obtido para a fração neutra e fração neutra + Spike.

A tabela 28 mostra os resultados do ensaio de recuperação dos OHPAs nas frações ácida, básica e neutra da fração maltênica. Observando a tabela e os cromatogramas das figuras 45, 46 e 47 podemos verificar que o método possibilitaria a determinação destes compostos caso estes estivessem presentes na amostra. Observamos também que o 9-fenantrenocarboxialdeído, 1-hidroxipireno, e 9-10-antraquinona que apresentaram recuperações abaixo de 80% na fração ácida, o que nos sugere que tais compostos possam apresentar alguma interação com a matriz ou ainda que possam ter sido perdidos em alguma etapa do tratamento da amostra.

Tabela 278. Resultados do ensaios de recuperação de cada um dos OHPAs na fração maltênica (n = 3).

	2-Naftol			2-Hidroxifluoreno			9-10-Antraquinona			1-Hidroxi pireno			9-Fenantreno-carboxialdeído		
	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)	Conc. (mg L ⁻¹)	DPR (%)	Rec. (%)
F.A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.A	0,13	3,76	102,05	0,10	13,84	82,56	0,04	7,02	64,48	0,03	13,48	61,90	0,03	13,11	51,80
F.B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.B	0,14	11,07	108,11	0,09	8,25	74,76	0,05	5,64	86,07	0,05	7,57	89,52	0,04	3,52	82,77
F.N	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Spike F.N	0,30	9,79	118,05	0,27	7,31	107,24	0,13	0,78	103,15	0,05	8,38	98,60	0,06	18,74	119,20

Tabela 289. Resultados da recuperação média dos HPAs, NHPAs e OHPAs na amostra de asfalto (n = 3).

HPAs, NHPAs e OHPAs	Recuperação média na fração maltênica (%)	DPR(%)
Fluoreno	96,67	12,31
Acenaftileno	97,84	8,34
Naftaleno	101,35	6,64
Acenafteno	97,11	2,42
Fenantreno	99,30	13,26
Antraceno	100,36	14,76
Fluoranteno	87,79	4,98
Pireno	103,68	9,79
Benzo(b)fluoranteno	99,56	13,64
Benzo(k)fluoranteno	92,31	11,45
Benzo(a)pireno	94,02	3,67
Benzo(ghi)pireno	95,02	4,58
Dibenzo(a,h)antraceno	94,74	9,83
Indeno(1,2,3-cd)pireno	97,72	7,25
Fenazina	81,11	1,71
Acridina	98,30	19,80
Quinolina	103,24	14,02
Nitronaftaleno	110,26	5,39
Nitrofluoreno	93,49	9,24
Nitroantraceno	107,57	5,52
Nitropireno	99,09	19,99
2-Naftol	109,40	7,38
2-Hidroxifluoreno	88,19	19,23
9-10-Antraquinona	84,57	14,28
1-Hidroxipireno	83,34	7,71
9-Fenantrenocarboxialdeído	84,59	30,46

O conjunto dos resultados obtidos mostra que os métodos desenvolvidos respondem bem a esta aplicação, podendo ser empregados para a determinação de HPAs e seus derivados neste tipo de matriz. Isto se justifica também pela recuperação média dos compostos na fração maltênica, que apresenta resultados excelentes. (tabela 29)

Após a análise foi possível calcular a partir da fração maltênica, a quantidade de HPAs e NHPAs no asfalto. Uma vez que estes compostos são solúveis em n-heptano eles estarão presentes apenas na fração maltênica, pois a fração dos asfaltenos é insolúvel neste solvente, caracterizando-se por ser uma fração mais polar. Estes resultados estão descritos na tabela 30.

Tabela 29. Concentração calculada de HPAs e NHPAs na amostra de asfalto.

HPAs e derivados presentes na amostra de asfalto	Concentração mg Kg⁻¹
Fluoreno	98,32
Antraceno	8,97
Pireno	2,97
Benzo(a)pireno	13,21
Benzo(ghi)pireno	0,86
Benzo(b)fluoranteno	647,22
Benzo(k)fluoranteno	2,01
Quinolina	9,26
2-Nitrofluoreno	2146,8
1-Nitropireno	<LQ

O Asphalt institute e a Eurobitume (2011), reportam a presença HPAs no betume como mostra a tabela 3 no item 3.2. É possível perceber que os compostos encontrados no presente trabalho são alguns dos reportados pelas publicações. As concentrações encontradas para o pireno e benzo(ghi)pireno estão dentro das faixas de concentrações referidas. Os demais compostos quantificados apresentam valores superiores, devido às diferenças entre as amostra, pois esta é uma matriz muito complexa e uma amostra é muito diferente da outra.

6 CONCLUSÃO:

Os métodos desenvolvidos apresentam sensibilidade adequada para a determinação de HPAs, NHPAs e OHPAs, mostrando boa precisão e exatidão, bem como uma ampla faixa linear. Os limites de detecção e quantificação obtidos mostram que os métodos possibilitam a determinação de quantidades traços destes compostos. A aplicação da metodologia nas frações do asfalto mostrou a presença de 10 compostos nas amostras analisadas.

Os métodos desenvolvidos permitiram a identificação e quantificação dos HPAs e seus derivados em um rápido tempo de análise, 23 minutos para 14 HPAs, 4,5 minutos para 7 NHPAs e 4 minutos para 5 OHPAs. Totalizando assim 26 compostos de grande importância toxicológica e ambiental.

Como os HPAs e seus derivados nitrogenados e oxigenados possuem um grande potencial toxicológico podendo ser relacionados a inúmeras patologias entre elas a incidência de câncer, metodologias para a determinação destes compostos são relevantes.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, maio, 2003

ARDREY, B.. Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction. 1^a edição, Wiley, 2003.

ASPHALT INSTITUTE, EURBITUME..The bitume industry – A global perspective production, chemistry, use, specification and occupational exposure. 2^a edição, Asphalt institute Inc. and European Bitumen Association – Eurobitume, 2011.

ASTM Standard Test Method, **Separation of Asphalt into Four Fractions**, D4124 – 09, Julho, 2013.

BARRETO, R. P.; ALBUQUERQUE, F. C.; NETTO, A. D. P.. Optimization of an improved analytical method for the determination of 1-nitropyrene in milligram diesel soot samples by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Niterói, nº 1163, p 219 – 227, 2007.

BOTARO, R. V.; et al..Obtenção e caracterização de blendas de asfalto CAP 20, modificado com poliestireno reciclado, resíduos de pneu e lignina organossolve. **Metalurgia e materiais**, Ouro preto, nº59, p 117 – 122, 2006.

BOSCO, G. L.. The development of LC-MS – the marriage of the bird and the fish. **Trends in Analytical Chemistry**, nº8, p 781 – 794, 2010.

BRANDT, H.C.A.; DE GROOT, P.C.. Aqueous leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from bitumen and asphalt. **Pergamon**, Amsterdam, nº 17, p 4200 – 4207, 2001.

BRITO, N. M.; et al.. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, nº13, p. 129 – 146, 2003.

CAVALCANTE, R. M.; et al.. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. **Química Nova**, Fortaleza, nº3, p 560 – 564, 2007.

COLLINS, C.; et al.. Fundamentos de Cromatografia, 1^a edição, Unicamp, 2006.

COLLINS, J. F.; et al.. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. **Regul toxicol pharmacol**, nº28, p 45 – 54, 1998.

COULING, N. R.; et al.. Biodegradation of PAHs in soil: Influence of chemical structure, concentration and multiple amendment. **Environmental Pollution**, Lancaster, nº158, p 3411- 3420, 2010.

DELGADO-SABORIT, J. M.; STARK, C.; HARRISON, R. M.. Carcinogenic potential, levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in indoor and outdoor environments and their implications for air quality standards. **Environment International**, n°37, p 383 – 392, 2011.

DELHOMME, O.; MILLET, M.; HERKES, P..Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosol samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, n°74, p 703 – 710, 2008.

EPA, Environmental Protection Agency, **Polynuclear Aromatic Hidrocarbons**. Method 8100, setembro de 1986.

FERNANDES, P. R. N.; CAVALCANTE, R. M.;SOARES, J. B..Avaliação da presença de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)em ligante asfáltico Brasileiro. In **4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás**, Campinas, ABPG, 2007, p7.

GRENN, J. B.; et al.. Analysis of sulfur compound types in asphalt. **Energy Fuels**, n°7, p 119 – 126, 1993.

GROSS, J.H.. Mass Spectrometry. 2ª edição, Springer, 2011.

HARRIS, D. C.. Análise Química Quantitativa, 6ª edição, LTC editora, 2005.

HUTZIER, C.; LUCH, A.; FILSER, J.G.. Analysis or carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in complex environmental mixtures by LC-APPI-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, Munich, n°702, p 218 – 224, 2011.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**;DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, Fevereiro, 2010.

KNECHT, A.L.; et al., Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.006>

KOBETICOVA, K.; et al..Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n°71, p 650 – 660, 2008.

KUO, C. T.; CHEN, H. W.; LIN, S. T.. Trace determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbonsusi ng liquid chromatography with on-line electrochemical reduction and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, Taiwan, n°482, p 219 – 228, 2003.

LINS, V. F. C.; et al.. Photodegradation of hot-mix asphalt.**Fuel**, Belo Horizonte, n°87, p 3254 – 3261, 2008.

LINTELMANN, J.; FISHER, K.; MATUSCHEK, G..Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter using high-performance liquid

chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Neuherberg, n°1133, p 241–247, 2006

LISTER, A. S..Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**, Nova York, p 191-217, 2005.

NIOSH, The National Institute for Occupational Safety and Health, **Hazard Review: Health Effects of Occupational Exposure to Asphalt**. DHHS (NIOSH) Publication n. 2011-110, 2000.

PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. **Journal of Chromatography A**, Almeria, n°1217, p 6303 – 6326, 2010.

NETTO, A. D. P.; et al.. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, Niterói, n°23, p 765 – 773, 2000.

RIBANI, M.; et al.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Curitiba, n°5, p 771 – 780, 2004.

RINGET, J.; et al.. Reactivity of polycyclic aromatic compounds (PAHs, NPAHs and OPAHs) adsorbed on natural aerosol particles exposed to atmospheric oxidants. **Atmospheric Environment**, Talence, n°61, p 15 – 22, 2012.

RUBIO, M. C.; et al.. Comparative analysis of emissions from the manufacture and use of hot and half-warm mix asphalt. **Journal of Cleaner Production**, Granada, n°41, p 1 – 6, 2013.

SILVA, A. A. R.; et al.. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soils using ultrasonic agitation, heater/mini condenser tube and gaseous chromatography. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, n°2, p 105 – 112, 2006.

SMITH, D. R.; ROBB, D. B.; BLADES, M. W.. Comparison of Dopants for Charge Exchange Ionization of Nonpolar Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Reversed-Phase LC-APPI-MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, n°20, p 73 – 79, 2009.

SCHREINER, C.. Review of mechanistic studies relevant potential carcinogenicity of asphalts. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Meadowbrook, n°59, p 270 – 284, 2011.

SKOOG, D. A.; et al.. Princípios de análise instrumental, 6ª edição, Bookman, 2009.

TOLEDO, M.; LANÇAS, F. M.; CARRILHO, E.. Solid-Phase Extraction of Nitro-PAH from Aquatic Samples and its Separation by Reverse-Phase Capillary Liquid Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, n°5, p 1004 – 1010, 2007.

VESSECCHI, R.; et al.. Nomenclatura de espectrometria de massas em língua Portuguesa, **Química Nova**, Ribeirão Preto, nº10 , p. 1875 - 1887, 2011.

WALGRAEVE, C.; et al.. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. **Atmospheric Environment**, Ghent, nº44, p 1831 – 1846, 2010.

WANG, Z.; et al.. Correlations between physicochemical properties of PAHs and their distribution in soil, moss and reindeer dung at Ny-Ålesund of the Arctic. **Environmental Pollution**, nº157, p 3132 – 3136, 2009.

WANG, J. J.; et al.. Characterization of DNA adducts from lung tissue of asphaltfume-exposed mice by nanoflow liquid chromatographyquadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, Morgantown, nº322, p 79 – 88, 2003.

ZHANG, Y.; et al.. Nitration of particle-associated PAHs and their derivatives (nitro-, oxy-, and hydroxy-PAHs) with NO₃ radicals. **Atmospheric Environment**, Beijing, nº45, p 2515 – 2521, 2011.

ZIELINSKA, B.; SAMY, S.. Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, nº386, p 883 – 890, 2006.