

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

Lucas Paines Bressan

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS UTILIZANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Santa Maria, RS
2017

Lucas Paines Bressan

**Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizando
calibração multivariada**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Santa Maria, RS
2017

Bressan, Lucas Paines

Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
utilizando calibração multivariada / Lucas Paines

Bressan.- 2017.

83 p.; 30 cm

Orientador: Paulo Cícero Do Nascimento

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2017

1. Hidrocarbonetos 2. Multivariado 3. Quantificação 4.
Quimiometria I. Do Nascimento, Paulo Cícero II. Título.

Lucas Paines Bressan

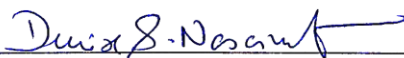
**Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizando
calibração multivariada**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Aprovado em 31 de janeiro de 2017:



Paulo Cícero do Nascimento, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Denise Bohrer do Nascimento, Dra. (UFSM)



Daiane Dias, Dra. (FURG)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Àqueles que, de alguma maneira, envolveram-se no meu girar dos dias

AGRADECIMENTOS

À banca, por estarem presentes em três momentos muito importantes da minha vida acadêmica: Professora Denise, por ter sido a minha maior fonte de inspiração no início do curso de Química, levando-me a pensar analítica e criticamente em todas as etapas de uma metodologia química e, além do mais, por ter aberto as portas do LACHEM para me receber. Daiane Dias, por ter sido uma colega de laboratório da qual pude absorver ensinamentos de persistência, raciocínio e bom humor. Professor Paulo, por ter sido meu orientador no final da graduação e no mestrado, pelas suas valiosas dicas e por todos os ensinamentos que me ofereceu, sou grato.

Aos meus pais, Edson e Cláudia, aos meus irmãos, Vinicius e Matheus, à minha tia, Mari, por terem sido meu porto seguro nos momentos difíceis e por estarem ao meu lado sempre.

Aos Schmidt, Alex, Denise e Júlia, por terem sido minha segunda família por oito anos e por terem me acolhido e me ajudado ao longo de todos esses anos.

À Marcella, que me alegra quando estou triste, que me anima quando fico desanimado e que me dá forças quando estou esgotado.

Aos amigos de sempre, Aline, Lisandro e Henrique, agradeço pela presença mesmo quando nossos caminhos se separaram por motivos inevitáveis.

À Larissa, por ter sido uma amiga que me ajudou a ver o lado bom que existe em nós, a abnegação e os sorrisos fáceis. À Géssica, por ter sido um dos meus maiores exemplos no ambiente de trabalho, de garra e trabalho incansável. À Luciana, por ter me ensinado a maneira dela de encontrar equilíbrio em todas as etapas. Ao Luis Ferraz, por ter sido amigo e companheiro, por ter me passado todos os conhecimentos na absorção atômica e por ter me dado broncas e conselhos aos quais dou muito valor.

Ao Yeriah e ao Bruno, por terem sido amigos que encontrei no meio desse caminho do mestrado e terem estado junto para risadas e alegrias.

A todos aqueles que encontrei no LACHEM e que de, alguma maneira, contribuíram para o meu crescimento pessoal.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

*Nam in omni adversitate fortunæ
infelicissimum est genus infortunii fuisse
felicem*

Boethio, De consolazione philosophiæ

*Primeiro, vem as risadas; depois, as mentiras. Por último, o tiroteio
Stephen King*

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS UTILIZANDO CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

AUTOR: Lucas Paines Bressan

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Um método foi desenvolvido para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixo peso molecular (naftaleno, antraceno, fluoreno, acenafteno e fenantreno) em lixiviados aquosos de solos e sedimentos utilizando uma extração líquido-líquido assistida por *salting-out*, espectrometria de fluorescência síncrona e calibração multivariada. Diversos parâmetros experimentais foram controlados e as condições otimizadas foram: carbonato de sódio como agente de *salting-out* em concentração de 2 mol L^{-1} , 3 mL de acetonitrila como solvente de extração, 6 mL de lixiviado aquoso, agitação com vórtex por 5 minutos e centrifugação a 4000 rotações por minutos por 5 minutos. A calibração por mínimos quadrados parciais foi otimizada para os menores valores da raiz do erro médio quadrático e cinco variáveis latentes foram escolhidas para cada um dos compostos de interesse. Os coeficientes de correlação para as concentrações preditas *versus* medida foram maiores que 0,99. Figuras de mérito para o método multivariado foram calculadas (sensibilidade, limite de detecção multivariado e limite de quantificação multivariado). A seletividade também foi avaliada e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos não interferiram na análise. Além disto, cromatografia líquida de alta performance foi utilizada como um método de comparação e as análises de regressão entre os métodos não mostraram diferença estatística (teste t). O método proposto foi aplicado a solos e sedimentos do rio Xingú e as recuperações dos ensaios de fortificação foram de 74,3% a 105,8%. De maneira geral, o método proposto teve êxito na análise dos compostos de interesse, mostrando que o método de extração pode ser aplicado a análises espectrofluorimétricas e que a calibração multivariada também é aplicável a estes compostos em lixiviados de amostras reais. Ainda, um método de calibração multivariada como *proof of concept* foi desenvolvido para a determinação de outros sete hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (2-naftol, hidroxipireno, hidroxifluoreno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e benzo(b)pireno) e seus valores da raiz do erro médio quadrático foram utilizados para a escolha de sete variáveis latentes para a calibração. Os coeficientes de correlação entre as concentrações preditas *versus* medidas ficaram acima de 0,99. De maneira geral, este método se mostrou promissor a aplicações em amostras reais.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Metodologia de extração, Método multivariado, Quantificação, Amostras reais.

ABSTRACT

POLYCYCLIC AROMATIC HIDROCARBONS DETERMINATION USING MULTIVARIATE CALIBRATION

AUTHOR: Lucas Paines Bressan
ADVISOR: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

A method was developed to determine low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, anthracene, fluorantene, phenanthrene and acenaphthene) in aqueous leachates from soils and sediments using a salting-out assisted liquid-liquid extraction, synchronous fluorescence spectrometry and a multivariate calibration technique. Several experimental parameters were controlled and the optimum conditions were: sodium carbonate as the salting-out agent at concentration of 2 mol L⁻¹, 3 mL of acetonitrile as extraction solvent, 6 mL of aqueous leachate, vortexing for 5 min and centrifuging at 4000 rpm for 5 min. The partial least squares calibration was optimized to the lowest values of root mean squared error and five latent variables were chosen for each of the targeted compounds. The regression coefficients for the true versus predicted concentrations were higher than 0.99. Figures of merit for the multivariate method were calculated, namely sensitivity, multivariate detection limit and multivariate quantification limit. The selectivity was also evaluated and other polycyclic aromatic hydrocarbons did not interfere in the analysis. Likewise, high performance liquid chromatography was used as a comparative methodology, and the regression analysis between the methods showed no statistical difference (t-test). The proposed methodology was applied to soils and sediments of a Brazilian river and the recoveries ranged from 74.3% to 105.8%. Overall, the proposed methodology was suitable for the targeted compounds, showing that the extraction method can be applied to spectrofluorometric analysis and that the multivariate calibration is also suitable for these compounds in leachates from real samples. Moreover, a proof of concept multivariate method to determine seven other polycyclic aromatic hydrocarbons (2-naphthol, hydroxypyrene, hydroxyfluorene, crysene, benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene and benzo(b)pyrene) was developed and its figure of merits were calculated. The built method had its prediction ability evaluated and it showed to be promising for application in real samples.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Extraction methodology, Multivariate methods, Quantification, Real samples

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura representativa de 16 HPAs	21
Figura 2 - Estruturas representativas de três OH-PAHs	24
Figura 3 - Representação do fenômeno de salting-out.....	26
Figura 4 - Série de Hofmeister.....	27
Figura 5 - Diagrama de Jablonski genérico indicando o fenômeno de fluorescência	29
Figura 6 - Diagrama de Jablonski exemplificando a espectrometria de fluorescência síncrona.....	30
Figura 7 - Diferença nos espectros de excitação, emissão e síncrono para o perileno	31
Figura 8 - Gráfico de duas variáveis x e seus componentes principais	33
Figura 9 - Exemplo de conjunto de dados sem e com centralização na média.....	34
Figura 10 - Diversos comportamentos do RMSE.....	38
Figura 11- Espectro de fluorescência síncrona dos HPAs em estudo	49
Figura 12 - Espectro de fluorescência síncrona de uma mistura de HPAs em acetonitrila após a ELLAS.....	51
Figura 13 – Efeito dos sais na intensidade fluorescente dos HPAs em estudo.....	52
Figura 14 – Intensidade relativa dos analitos após extração em diferentes concentrações de carbonato de sódio.....	53
Figura 15 – Intensidade fluorescente dos analitos após extração com diferentes razões de água/acetonitrila.....	54
Figura 16 – RMSEC em função do número de variáveis latentes	56
Figura 17 - Gráfico entre concentrações preditas e medidas para o Naf	57
Figura 18 - Análise de regressão entre a metodologia proposta e de referência	62
Figura 20 - Variação do RMSEC em função das variáveis latentes	64
Figura 19 - Sobreposição do EFS de 25 padrões de HPAs.....	66
Figura 21 - Gráfico de concentrações preditas versus medidas para OHN	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de 16 HPAs	22
Tabela 2 – Misturas dos analitos utilizadas na construção e validação do modelo multivariado.....	43
Tabela 3 - Concentrações dos analitos para avaliação da recuperação.....	44
Tabela 4 - Misturas dos analitos utilizadas na construção e validação do modelo multivariado.....	45
Tabela 5 - Concentração de fortificação das amostras analisadas por HPLC e PLS-2	46
Tabela 6 – Características do modelo de calibração multivariada.....	58
Tabela 7 - Figuras de mérito do método multivariado.....	59
Tabela 8 - Determinação de HPAs em amostras reais.....	61
Tabela 9 - Características do modelo de calibração multivariada	65
Tabela 10 - Figuras de mérito do método multivariado	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ace – Acenafteno
- Aci – Acenaftileno
- Ant – Antraceno
- BaA – Benzo(a)antraceno
- BaP – Benzo(a)pireno
- BbF – Benzo(b)fluoranteno
- BkF – Benzo(k)fluoranteno
- Cris – Criseno
- DahA – Dibenzo(a,h)antraceno
- EFS – Espectrometria de fluorescência síncrona
- ELLAS – Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*
- Fen – Fenantreno
- HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- HPAs-BPM – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de baixo peso molecular
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance, do inglês *high performance liquid chromatography*
- Ind – Indeno(1,2,3-cd)pireno
- IR – Infravermelho
- Log K_{ow} – Logaritmo do coeficiente de partição octanol-água
- MDL – Limite de detecção multivariado, do inglês *multivariate detection limit*
- MQL – Limite de quantificação multivariado, do inglês *multivariate qualification limit*
- Naf – Naftaleno
- N-PLS – Mínimos quadrados parciais de diversos caminhos, do inglês *multi-way partial least squares*
- OH-HPAs – Derivados hidroxilados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- PC – Componente principal, do inglês *principal componente*
- PLS-R – Regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *partial least squares regression*

RMSE – Raiz do erro quadrático médio, do inglês *root mean squared error*

RMSEC – Raiz do erro quadrático médio de calibração, do inglês *root mean squared error of calibration*

RMSEP – Raiz do erro quadrático médio de predição, do inglês *root mean squared error of prediction*

RMSEV – Raiz do erro quadrático médio de validação, do inglês *root mean squared error of validation*

SEN – Sensibilidade

U-PLS – Mínimos quadrados parciais desdobrados, do inglês *unfolded partial least squares*

USEPA – Agência Nacional de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

UV-Vís – Ultravioleta-visível

$\Delta\lambda$ – Diferença de comprimento de onda

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo Geral.....	18
1.2.2 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	20
2.2 LIXIVIADOS AQUOSOS E EXTRAÇÃO	24
2.2.1 Lixiviados aquosos	24
2.2.2 Extração líquido-líquido assistida por <i>salting-out</i>	25
2.3 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA E MÉTODOS MULTIVARIADOS DE CALIBRAÇÃO	27
2.3.1 Espectrometria de Fluorescência Molecular Síncrona	27
2.3.2 Métodos multivariados de calibração	31
2.3.2.1 <i>Universo multivariado e componentes principais</i>	<i>32</i>
2.3.2.2 <i>A regressão multivariada</i>	<i>35</i>
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	40
3.2 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E DE FLUORESCÊNCIA SÍNCRONA	40
3.2.1 Determinação de HPAs de baixo peso molecular	40
3.3 COLETA.....	41
3.4 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA	41
3.4.1 Extração de HPAs de baixo peso molecular	42
3.4.1.1 <i>PROCEDIMENTO ELLAS</i>	<i>42</i>

3.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	43
3.5.1 Modelo experimental para HPAs de baixo peso molecular	43
<i>3.5.1.1 Testes de interferência.....</i>	<i>45</i>
3.5.2 Modelo experimental para HPAs prioritários e derivados hidroxilados	45
3.6 MÉTODO DE COMPARAÇÃO.....	46
3.6.1 Análise de HPAs de baixo peso molecular.....	46
3.7 FIGURAS DE MÉRITO.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 HPAS DE BAIXO PESO MOLECULAR	48
4.1.1 Otimização das condições de fluorescência síncrona	48
4.1.2 Otimização da extração líquido-líquido assistida por <i>salting-out</i>	49
<i>4.1.2.1 Escolha do solvente orgânico e agente de salting-out</i>	<i>49</i>
<i>4.1.2.2 Concentração de carbonato de sódio.....</i>	<i>52</i>
<i>4.1.2.3 Razão água/acetonitrila.....</i>	<i>54</i>
4.1.3 Criação de um modelo de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais	55
<i>4.1.3.1 Figuras de mérito</i>	<i>58</i>
4.1.4 Aplicação da metodologia em amostras reais de sedimentos e solos.	59
<i>4.1.4.1 Estudo de interferência.....</i>	<i>60</i>
<i>4.1.4.2 Metodologia de comparação</i>	<i>63</i>
4.2 ANÁLISE DE QUATRO HPAS PRIORITÁRIOS DA UNIÃO EUROPEIA E DERIVADOS OXIGENADOS	63
4.2.1 Criação de um modelo de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais	63
<i>5.1.3.1 Figuras de mérito</i>	<i>68</i>

5 CONCLUSÃO.....	69
6 REFERÊNCIAS.....	70
7 ANEXOS.....	76
7.1 ARTIGO PUBLICADO	76

1 INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos orgânicos onipresentes no meio ambiente que causam riscos à saúde humana devido a seus efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (HEALTH, 1995). São formados principalmente via combustão incompleta ou processos pirolíticos que envolvem combustíveis fósseis. Tais compostos são poluentes no solo, ar e água (BAEK et al., 1991). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) lista 16 HPAs como poluentes prioritários devido a seus efeitos à saúde e sua grande presença no ambiente (USEPA, 2002). Dentre estes HPAs, uma subclasse é formada por aqueles que possuem dois ou três anéis benzênicos em sua estrutura e, devido à sua baixa massa molecular, são chamados de HPAs de baixo peso molecular (HPAs-BPM). Estes compostos apresentam uma toxicidade aguda quando comparada a outros HPAs que contenham mais anéis (MAHLER et al., 2014). A União Europeia classifica quatro HPAs prioritários no monitoramento ambiental e em produtos alimentícios (benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e criseno) (UNIÃO EUROPEIA, 2006). Além disto, alguns HPAs podem sofrer reações e serem transformados em seus derivados hidroxilados, que apresentam características toxicológicas maiores ou idênticas que aqueles de origem (LUNDSTEDT et al., 2007).

Um lixiviado pode ser produzido a partir de resíduos sólidos e ser analisado para revelar a presença de HPAs no ambiente originários de diferentes fontes como pavimentação asfáltica, combustíveis fósseis e processos de combustão natural (KRÜGER et al., 2015). Os lixiviados podem ser produzidos a partir de testes de batelada, onde o material sólido fica em contato direto com a solução extratora (ABNT, 2004) ou testes de coluna, onde o solvente percorre o material sólido (ASTM, 1995), utilizando solventes orgânicos ou aquosos, sendo estes últimos mais próximos aos processos que ocorrem naturalmente, através da passagem de água através do material sólido, liberando compostos químicos aderidos a ele. Como solos e sedimentos podem absorver HPAs, eles também podem liberar os mesmos para corpos aquáticos, levando a uma grande preocupação ambiental (WHITE e CLAXTON, 2004).

Desta maneira, analisar tais materiais pode ser um bom indicador do nível de contaminação de uma determinada localização (BISPO et al., 1999). Como o lixiviado

apresenta turbidez e alto conteúdo de matéria orgânica (KRÜGER et al., 2015), procedimentos de extração devem ser aplicados a ele para permitir a análise.

A extração líquido-líquido assistida por *salting-out* (ELLAS) pode ser uma boa alternativa para a extração de HPAs em amostras aquosas. A mudança da força iônica do meio faz os analitos migrarem da fase aquosa para uma fase orgânica, permitindo a análise por técnicas analíticas. É utilizada, normalmente, em conjunto com a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) devido à grande quantidade de compostos coextraídos (JAIN et al., 2014; RAMOS et al., 2014). Contudo, aplicações em conjunto com espectrometria no ultravioleta-visível (UV-Vis) e fluorescência são reportadas na literatura (RAZMARA et al., 2011; XIA et al., 2012).

A espectrometria de fluorescência síncrona (EFS) pode ser utilizada em conjunto com a ELLAS porque o espectro obtido é simplificado através do uso de uma diferença fixa entre comprimentos de onda de excitação e emissão (PATRA e MISHRA, 2002). Como técnicas de separação são morosas, métodos multivariados podem ser utilizados como alternativa, explorando a poderosa resolução dos modelos para quantificação em misturas complexas (WOLD et al., 2001). Diversos métodos são aplicados à análise de diferentes compostos em misturas complexas. Estas metodologias diferem na complexidade e um método chamado regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-R, do inglês *Partial Least Squares Regression*) pode ser utilizado na quantificação de HPAs (NASCIMENTO et al., 2006; ABDEL-AZIZ et al., 2014; FORSBERG et al., 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico capaz de quantificar HPAs-BPM (naftaleno, antraceno, fluoreno, acenafteno e fenantreno) em amostras reais de solos e sedimentos utilizando calibração multivariada e um método analítico para quantificar outros sete HPAs (2-naftol, hidroxipireno, hidroxifluoreno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno e benzo(b)pireno) sem aplicação em amostras.

1.2.2 Objetivos Específicos

Otimizar a análise por fluorescência de todos os HPAs utilizados neste trabalho, utilizando EFS.

Produzir lixiviados aquosos de solos e sedimentos a partir de metodologias estabelecidas.

Otimizar uma metodologia de extração baseada no princípio de *salting-out*, otimizando todas as variáveis possíveis, de maneira univariada, a fim de obter a maior recuperação possível dos analitos estudados. Esta extração será aplicada nos lixiviados aquosos outrora obtidos.

Realizar a calibração multivariada para doze diferentes HPAs em dois momentos diferentes: primeiramente com os HPAs-BPM, aplicando esta calibração a extrato de solos e sedimentos; depois, com quatro HPAs prioritários da União Europeia e mais três derivados hidroxilados, como *proof of concept*, sem aplicação em amostras reais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

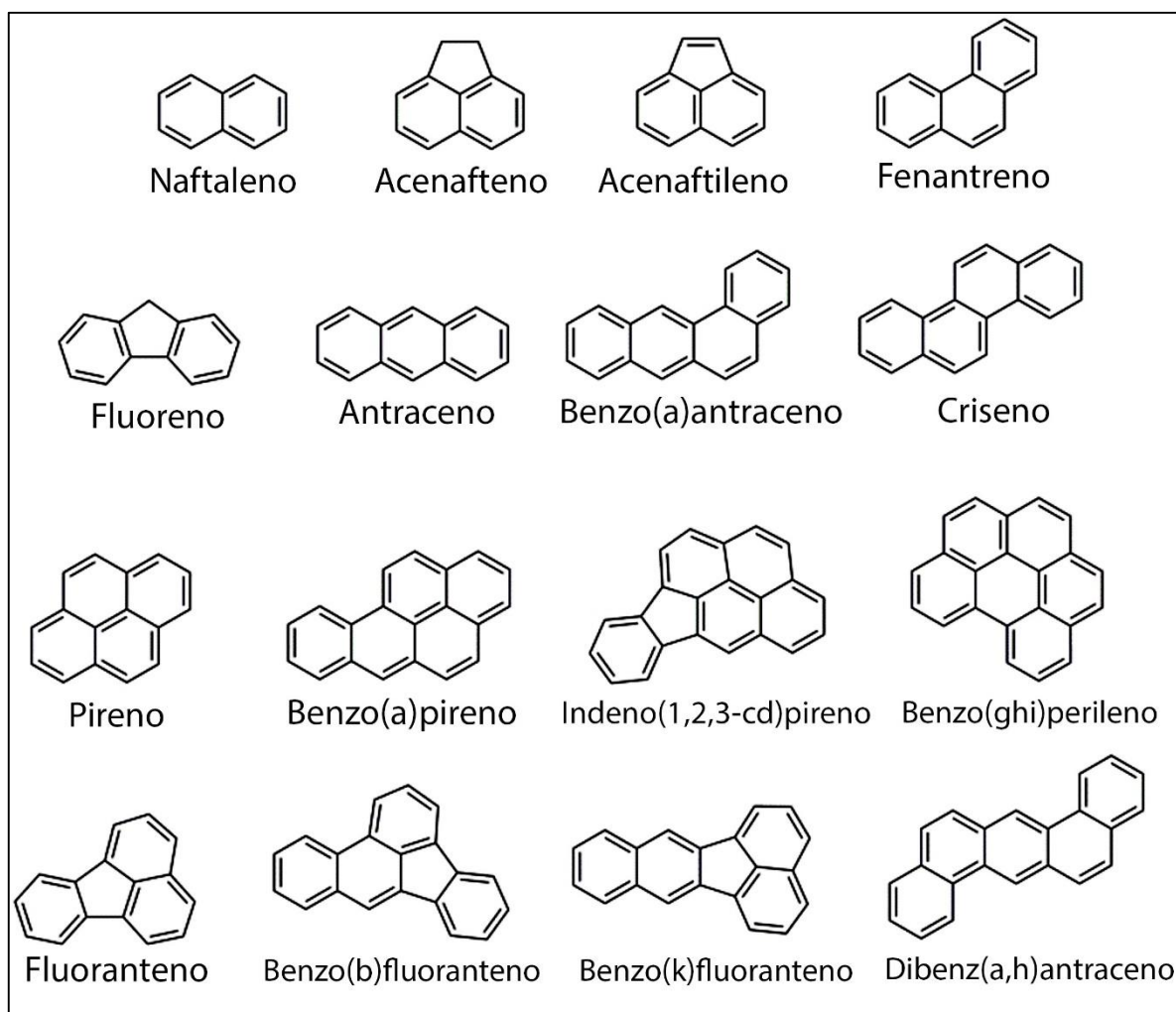
2.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

HPAs são uma classe de compostos caracterizada pela presença de dois ou mais anéis benzênicos fundidos em arranjos lineares, angulares ou na forma de clusters. Por definição, eles contêm apenas C e H em sua constituição (BAEK et al., 1991). Ainda assim, compostos derivados dos HPAs são conhecidos, principalmente aqueles que fazem a classe dos derivados contendo oxigênio (LUNDSTEDT et al., 2007) e nitrogênio (NIELSEN et al., 1984).

A principal via de formação dos HPAs é através da combustão incompleta de combustíveis fósseis e pirólise da matéria inorgânica. Estes HPAs são lançados na atmosfera ou no meio ambiente, onde atuam como poluidores, devido a sua atuação como particulados, absorvendo radiação e atuando no efeito estufa assim como através de suas características carcinogênicas e mutagênicas (LENZI e FAVERO, 2000). Cerca de 90% da emissão de HPAs é antropogênica e, em cidades, o tráfego veicular é considerado o maior contribuinte para a carga de HPAs na atmosfera (SCHAUER et al., 2003). Em ambientes aquáticos, os HPAs são originários da deposição atmosférica, do escoamento urbano, dos efluentes municipais e industriais e de derramamentos de petróleo (HUANG e BATTERMAN, 2014). A presença destes HPAs é grande em solos e sedimentos devido à baixa solubilidade que apresentam; desta maneira, o escoamento dos HPAs provenientes de fontes atmosféricas encontra no solo uma barreira física, tal qual uma peneira. Assim, solos e sedimentos tornaram-se uma espécie de ralo para esta classe de compostos, acumulando-os conforme o passar do tempo e promovendo uma grande preocupação ambiental (BISPO et al., 1999).

A USEPA listou 16 HPAs como poluidores prioritários devido a seus efeitos na saúde e sua presença por todo o meio ambiente (HEALTH, 1995). Suas estruturas estão representadas na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura representativa de 16 HPAs



Fonte: Do Autor.

Suas características físico-químicas, como solubilidade e coeficiente de partição octanol-água, são definidas pela ausência de grupos funcionais nas estruturas. Estas características estão listadas na Tabela 1. Percebe-se que, conforme ocorre um aumento da massa molecular dos compostos, a solubilidade dos compostos listados diminui, bem como aumenta $\log K_{ow}$ (SVERDRUP et al., 2002). Além destas propriedades, sabe-se que a pressão de vapor dos HPAs e sua lipofilicidade são inversa e diretamente proporcional a sua massa molecular, respectivamente (AKYÜZ e ÇABUK, 2010).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de 16 HPAs

Substância	Massa Molecular	Solubilidade em água (µg/L)	log K_{ow}
Naftaleno	128,2	31700	3,32
Acenaftileno	152,2	3930	4,07
Acenafteno	154,2	16100	3,94
Fluoreno	166,2	1980	4,23
Antraceno	178,2	73	4,50
Fenantreno	178,2	1290	4,60
Pireno	202,2	135	5,20
Fluoranteno	202,2	260	5,20
Benz(a)antraceno	228,3	14	5,66
Criseno	228,3	2,0	5,80
Benzo(b)fluoranteno	252,3	1,5	6,40
Benzo(k)fluoranteno	252,3	0,8	6,40
Perileno	252,3	0,4	6,40
Benzo(a)pireno	252,3	3,8	6,20
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276,3	0,19	6,70
Dibenz[a,h]antraceno	278,4	0,6	6,50

Fonte: SVERDRUP et al. (2002), adaptado.

Estas propriedades levam a uma subclasse destes compostos, chamados HPAs-BPM, constituída daqueles que possuem dois ou três anéis aromáticos em suas estruturas, a saber: Naftaleno (Naf), Acenaftileno (Aci), Acenafteno (Ace), Fluoreno (Flu), Fenantreno (Fen) e Antraceno (Ant). Nota-se que esta classe de compostos apresenta a maior solubilidade em água dentre todos os 16 HPAs prioritários, fazendo com que apresentem um risco de toxicidade aguda quando comparados com os outros compostos de maior número de anéis (MAHLER et al., 2014), podendo causar problemas como irritação ocular, náusea, vômitos e diarreia (UNWIN et al., 2006). A União Europeia regulamenta quatro HPAs prioritários, benzo(a)antraceno (BaA), benzo(a)pireno (BaP), benzo(b)fluoranteno (BbF) e criseno (Cris), que devem ser monitorados em alimentos, já que estes compostos apresentam risco elevado à saúde humana dentre os 16 HPAs principais (EUROPEAN UNION, 2001).

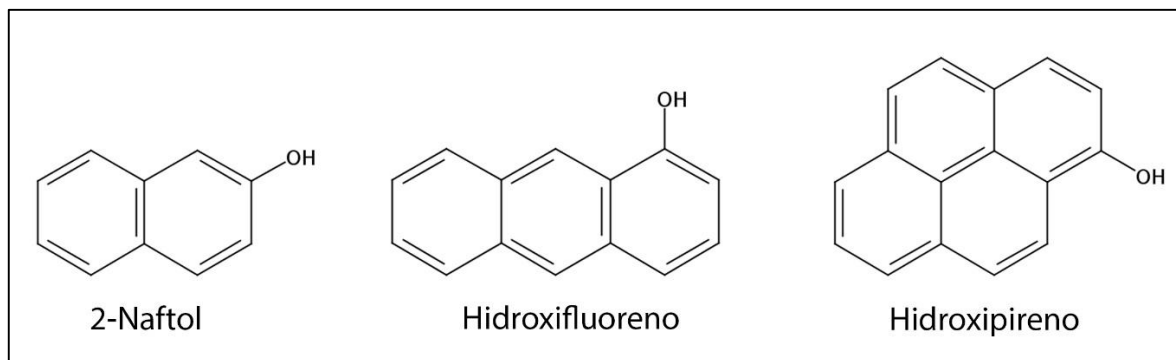
O ser humano está amplamente exposto aos HPAs no seu dia-a-dia, sendo a respiração do ar atmosférico, a ingestão de alimentos contaminados com HPAs, o fumo de cigarros e a respiração de fumaça de queimadas as principais causas de exposição. A partir do solo é

possível estar exposto a HPAs através de algumas culturas como o trigo, centeio e lentilhas (CIECIERSKA e OBIEDZIŃSKI, 2013). Além disto, a absorção de HPAs pode se dar pelo solo através da ingestão, inalação ou exposição a este (WANG et al., 2012).

O efeito carcinógeno dos HPAs vem de seus metabólitos, como epóxidos e dihidrodíols, que podem se ligar a proteínas celular e DNA causando efeitos tóxicos. O dano celular pode levar a mutações, tumores e cânceres (ARMSTRONG et al., 2004). De acordo com a USEPA, sete HPAs foram classificados como carcinogênicos, sendo eles BaA, BaP, BbF, benzo(k)fluoranteno (BkF), Cris, Dibenzo(a,h)antraceno (DahA) e indeno(1,2,3-cd)pireno (Ind). O efeito embriotóxico dos HPAs, teratogenicidade, foi descrito na literatura para os compostos BaA, BaP e Naf; efeitos como diminuição do peso do neonato, parto prematuro, desenvolvimento retardado da criança, menor quociente de inteligência, aumento dos problemas comportamentais na faixa dos seis aos oito anos e asma infantil foram reportados (WASSENBERG e DI GIULIO, 2004; PERERA et al., 2005).

Os derivados de HPAs contendo oxigênio são formados através de processos de oxidação, foto-oxidação e transformação biológica. Estes processos podem ocorrer através de reações com oxigênio singleto, peróxidos, radicais peroxil e hidroxil; podem também ocorrer diretamente através da absorção da luz ultravioleta pelos HPAs e reação com oxigênio; além destes fatores, os HPAs podem ser transformados no meio ambiente através de reações catalisadas por micro-organismos, como bactérias e fungos (LUNDSTEDT et al., 2007). Devido a estes fatores, eles são amplamente encontrados no meio ambiente e podem afetar a saúde humana e a cadeia ecológica através de seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos, além de alguns destes derivados apresentarem efeitos estrogênicos (efeitos de alteração hormonal relacionada ao sexo oposto, estrogênio/testosterona) (POJANA e MARCOMINI, 2007). A Figura 2 mostra a estrutura de três compostos hidroxilados derivados de HPAs (OH-HPAs). Devido à presença do grupamento OH na sua cadeia hidrocarbônica, os OH-HPAs são mais solúveis que os compostos de origem, facilitando sua difusão pelo meio ambiente. Aliás, estes compostos também são utilizados como marcadores biológicos para a exposição aos HPAs de origem, já que estes são processados metabolicamente no corpo humano dando origem aos OH-HPAs correspondentes (ELOVAARA et al., 2006).

Figura 2 - Estruturas representativas de três OH-PAHs



Fonte: Do autor.

2.2 LIXIVIADOS AQUOSOS E EXTRAÇÃO

2.2.1 Lixiviados aquosos

Um lixiviado pode ser produzido a partir de resíduos sólidos e analisado para revelar a presença de HPAs no meio ambiente, originários de diferentes fontes, tais como asfaltamento, combustíveis fósseis e processos naturais de combustão (GADE et al., 1996; NORIN e STRÖMVAIX, 2004; COTTIN e MERLIN, 2008; ELGH-DALGREN et al., 2009; KRÜGER et al., 2015; VAN PRAAGH et al., 2015).

Existem diversos testes de lixiviação que podem ser aplicados na análise destes poluidores, incluindo testes de batelada onde a amostra é submetida à agitação constante juntamente com o extrator (ABNT, 2004) e testes de coluna, onde um fluxo do extrator passa através de uma coluna contendo a amostra (ASTM, 1995) usando tanto solventes orgânicos quanto soluções aquosas como extrator. As últimas vão ao encontro da necessidade de reproduzir fenômenos de ocorrência natural onde apenas uma fração destes poluidores seja lixiviada do resíduo material.

Lixiviados aquosos podem ser obtidos naturalmente quando a água passa através de um material sólido e libera compostos químicos que estavam previamente aderidos a ele por processos químicos ou físicos. De modo que solos e sedimentos podem absorver HPAs em seus constituintes orgânicos, eles podem também liberar estes materiais para fontes próximas

de água, como lagos e rios, quando ocorre grandes volumes de precipitação e este fato gera graves preocupações ambientais (WHITE e CLAXTON, 2004). Assim sendo, analisar estes materiais pode ser um bom indicador do nível de contaminação de determinado local. O lixiviado obtido após a extração de solos e sedimentos geralmente apresenta características indesejadas, como turbidez, grande conteúdo de material orgânico e altos níveis de sais. Para resolver estes problemas, procedimentos de extração podem ser aplicados aos lixiviados a fim de obter os analitos de interesse.

2.2.2 Extração líquido-líquido assistida por *salting-out*

O fenômeno de *salting-out* ocorre pela adição de um eletrólito a uma solução aquosa para aumentar a razão da distribuição de um soluto na mesma. Basicamente, a adição deste eletrólito leva a um enfraquecimento das forças de solvatação entre um soluto orgânico ou inorgânico e o solvente (VALENTE et al., 2013).

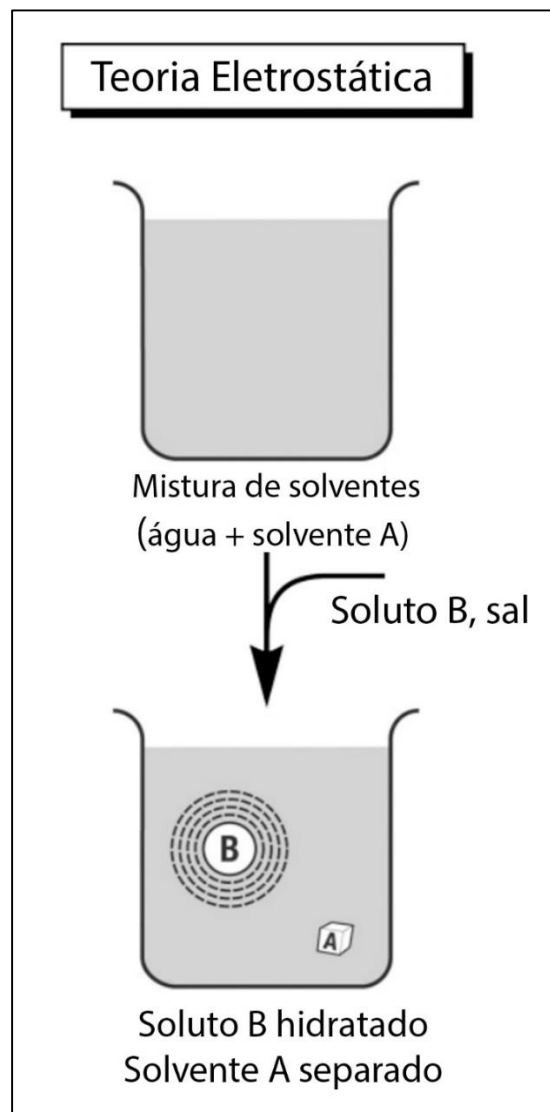
Uma das principais aplicações do fenômeno de *salting-out* é o processo de separação de solventes orgânicos miscíveis em água pela formação de um sistema bifásico. A ELLAS foi introduzida por MATKOVICH e CHRISTIAN (1973), na extração de quelatos usando um sistema homogêneo entre acetona e água.

Uma das principais teorias aceitas para a explicação do fenômeno é aquela proposta por DEBYE e MACAULAY (1925), tratando o comportamento do fenômeno através das mudanças das constantes dielétricas dos solventes. Em outras palavras, se a uma solução homogênea entre água e um solvente com menor constante dielétrica é adicionado um sal, ocorrerá a solvatação deste eletrólito. Desta maneira, a disponibilidade de solvatação do solvente será diminuída e ocorrerá uma separação entre as fases (GROVER e RYALL, 2005). Após a adição de um soluto B, o eletrólito, ocorre a separação do solvente A, miscível com água, conforme observado na Figura 3.

A eficiência com a qual os íons promovem o *salting-out* e, portanto, a ELLAS, é explicado pela série de Hofmeister (ZHANG e CREMER, 2006). Nela, é explicada a ordem de influência dos íons no comportamento de uma ampla variedade de processos aquosos. Convém notar que estas influências são extremamente pronunciadas para os ânions, enquanto os cátions apresentam pouca ou nenhuma influência. Dois tipos principais de íons são

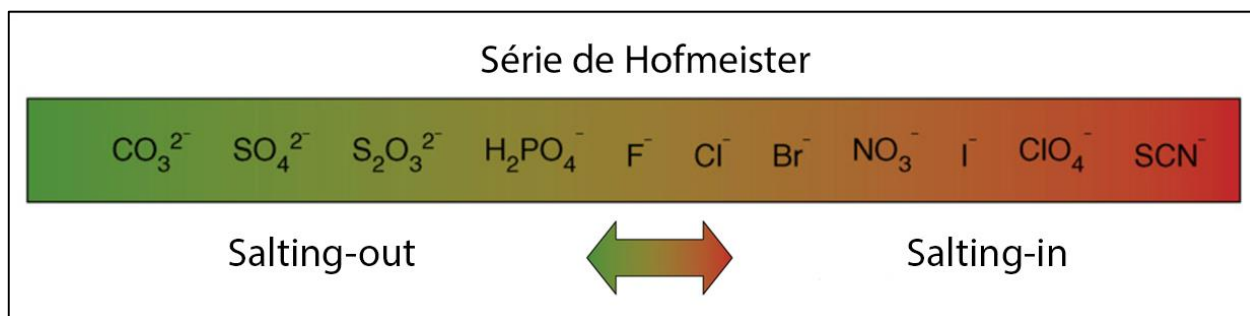
classificados de acordo com esta teoria: os anticaotrópicos e caotrópicos. Os primeiros são amplamente hidratados e contribuem para a estabilização da estrutura da água, no que diz respeito a suas ligações de hidrogênio, contribuindo para o efeito de *salting-out*. Os íons caotrópicos, ao contrário, são chamados de desestabilizadores da estrutura aquosa e favorecem o efeito de *salting-in*. A Figura 4 mostra a ordem destes íons, onde aqueles com carga dupla e maior tamanho afetam mais proeminentemente as características da solução do que aqueles com menor tamanho e carga.

Figura 3 – Representação do fenômeno de salting-out



Fonte: GROVER e RYALL (2005), adaptado.

Figura 4 - Série de Hofmeister



Fonte: ZHANG e CREMER (2006), adaptado.

Um dos principais solventes utilizados neste tipo de técnica de extração é a acetonitrila, devido à sua miscibilidade com água em todas as proporções, à sua polaridade compatível com uma ampla variedade de compostos estudados e sua compatibilidade com diversas técnicas de análise química (VALENTE et al., 2013). A ELLAS pode ser usada em combinação com técnicas de UV-Vís e espectrometria de fluorescência (RAZMARA et al., 2011; XIA et al., 2012), bem como em técnicas de cromatografia líquida e gasosa (VALENTE et al., 2013; DU et al., 2014; JAIN et al., 2014; RAMOS et al., 2014).

2.3 ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA E MÉTODOS MULTIVARIADOS DE CALIBRAÇÃO

2.3.1 Espectrometria de Fluorescência Molecular Síncrona

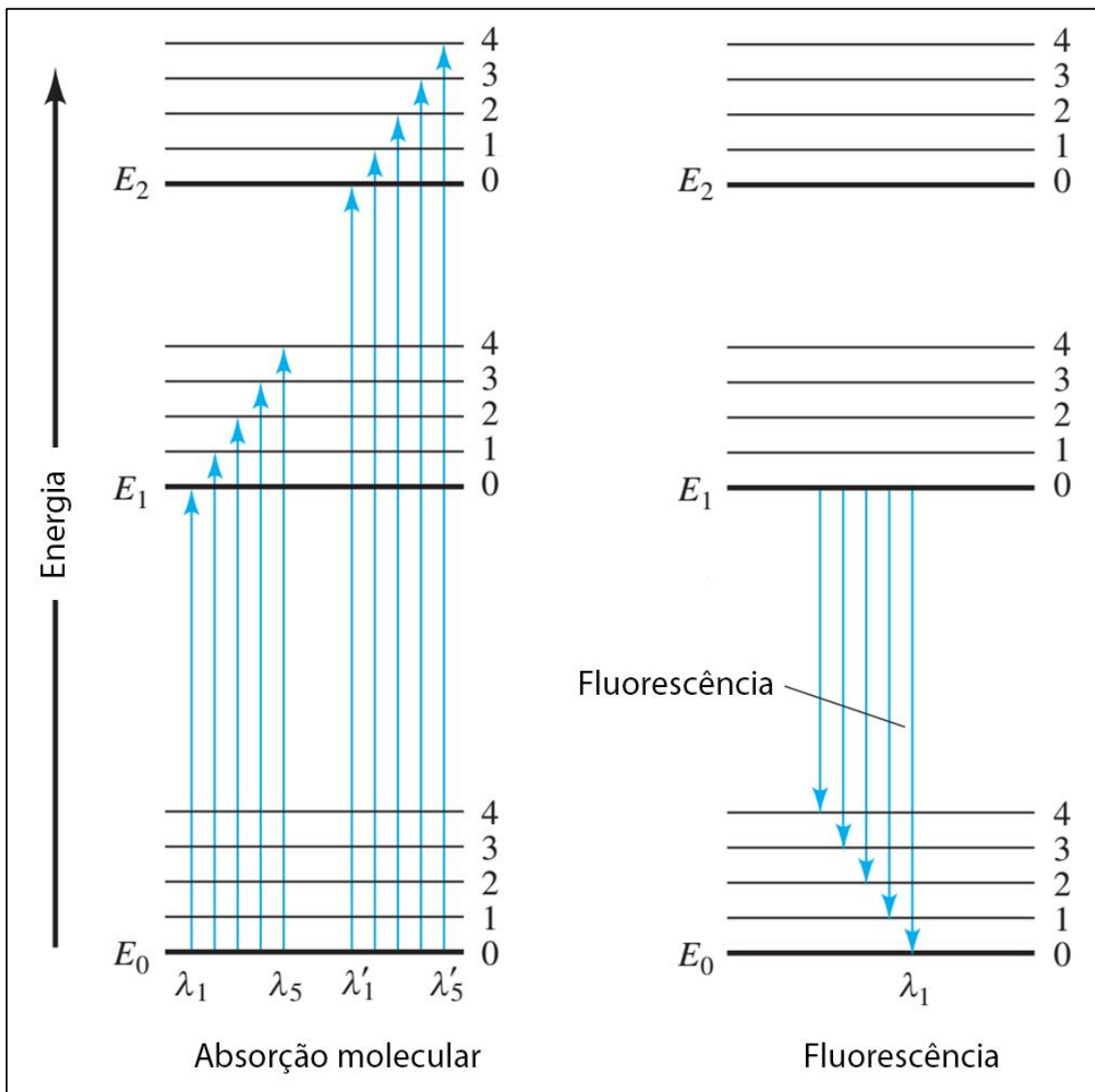
A espectrometria de fluorescência molecular está baseada na transição de um elétron do estado fundamental singleto até um estado excitado singleto e, posteriormente, na relaxamento deste elétron excitado até o retorno ao seu estado fundamental. A energia liberada no relaxamento deste elétron pode ser observada na região do ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, resultando no fenômeno de fluorescência molecular. Sinteticamente, a Figura 5 mostra um diagrama de Jablonksi genérico para o fenômeno

explicado acima. A linha E_0 representa o estado fundamental e as linhas E_1 e E_2 representam, respectivamente, o primeiro e o segundo estado excitado singleto. Quando um fóton é absorvido por um elétron E_0 , ele pode atingir níveis de energia como o E_1 ou E_2 . Este processo ocorre rapidamente e a perda da energia absorvida acontece através de processos de desativação. Se um processo radioativo, isto é, com emissão de luz, ocorre mais favoravelmente, então a fluorescência é observada como fenômeno de desativação, conforme mostrado pelas setas grossas na Figura 5 (HOLLER et al., 2007).

A fluorescência origina-se, principalmente, da transição de um estado vibracional mais baixo de E_1 para um dos níveis vibracionais de E_0 . Assim, a radiação é produzida por uma transição $\pi^* \rightarrow n$ ou $\pi^* \rightarrow \pi$, favorecendo a transição menos energética. Observa-se que a fluorescência é muito mais observada para transições do tipo $\pi^* \rightarrow \pi$ porque a absorção de energia é muito mais favorável de acontecer em transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ (HOLLER et al., 2007).

Devido ao fato observado acima, a fluorescência é encontrada em compostos que contenham grupos aromáticos com transições $\pi \rightarrow \pi^*$, como, por exemplo, os HPAs. A eficiência com que as moléculas fluorescem está diretamente ligada ao número de anéis que estas apresentam, bem como a sua rigidez estrutural e a qualidade dos ligantes destas estruturas. Conforme ocorre um aumento no número de anéis, ocorre também um deslocamento no comprimento de onda de fluorescência devido à diminuição da energia de transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Além do mais, a rigidez pode ser uma das principais causas da fluorescência exacerbada do fluoreno; isto porque esta estrutura rígida impede interconversões energéticas não radioativas, aumentando a eficiência com que o processo de fluorescência irá ocorrer. Por fim, grupamentos retiradores de elétrons, como grupamentos carbonílicos, desfavorecem a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, resultando numa diminuição da fluorescência, a ponto de não ser observada. Ao contrário, grupamentos doadores de elétrons, como halogênios e hidroxilas, favorecem a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, resultando no aumento da intensidade fluorescente (HOLLER et al., 2007).

Figura 5 - Diagrama de Jablonski genérico indicando o fenômeno de fluorescência

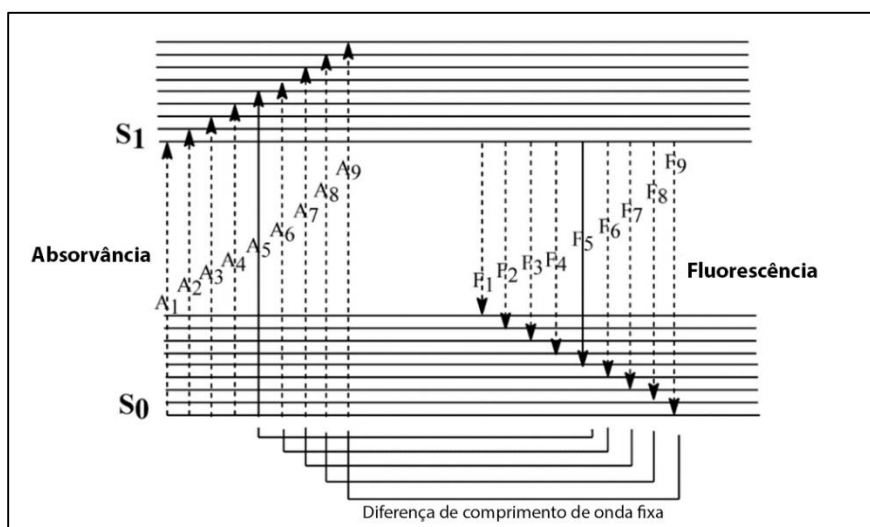


Fonte: SKOOG et al. (2013), adaptado.

Na fluorescência convencional, o espectro é obtido a partir da varredura do monocromador em diversos comprimentos de onda de emissão (λ_{em}) em um comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) fixo. Uma outra possibilidade é a varredura de ambos monocromadores de excitação e emissão simultaneamente, o que é chamado de espectrometria de fluorescência síncrona (EFS). Esta técnica oferece diversas vantagens

porque mantém uma diferença de comprimento de onda ($\Delta\lambda$) fixo entre os dois monocromadores enquanto a varredura é realizada. Este $\Delta\lambda$ resulta em algumas mudanças positivas na EFS quando comparada com a técnica de fluorescência comum, a saber: estreitamento das bandas espectrais, simplificação do espectro de emissão e contração da janela espectral (PATRA e MISHRA, 2002).

Figura 6 - Diagrama de Jablonski exemplificando a espectrometria de fluorescência síncrona

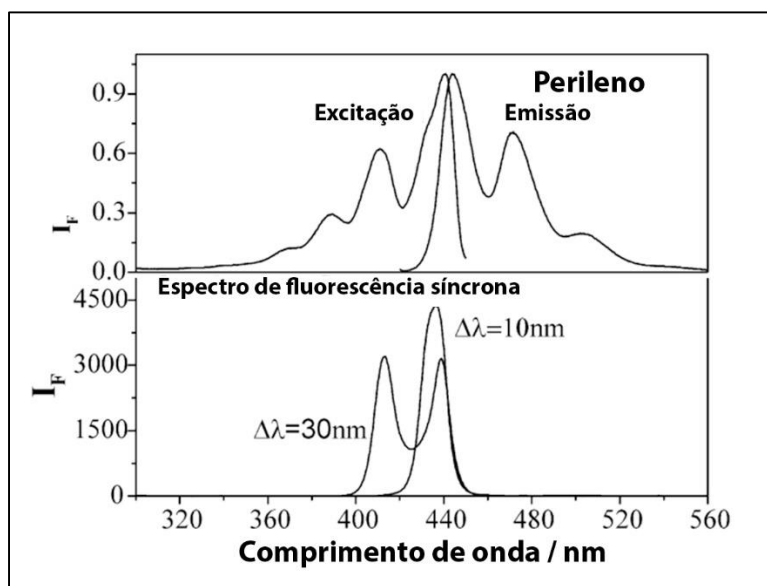


Fonte: PATRA e MISHRA (2002), adaptado.

O estreitamento das bandas pode ser visualizado em um diagrama de Jablonski (Figura 6), onde $\Delta\lambda$ é escolhido de maneira que se encaixe perfeitamente entre o máximo de absorção de energia e o máximo de emissão de energia para uma dada espécie ou uma série de analitos. Por exemplo, caso $\Delta\lambda$ seja a diferença entre A5 e F5, não haverá fluorescência até que o monocromador esteja em A5 e o comprimento de onda de fluorescência esteja em F5. Após, a molécula passará a ser excitada em A6, A7... e a fluorescência monitorada em F6, F7..., respectivamente, até que todo o espectro seja adquirido. Na Figura 7, pode-se observar que devido a intensidade da emissão ser uma função dos comprimentos de onda de excitação e sendo $\Delta\lambda$ a diferença entre as bandas de emissão, obtém-se picos mais estreitos na EFS (PATRA e MISHRA, 2002).

A técnica de EFS já foi aplicada a análise de HPAs utilizando extração em fase sólida para reduzir as interferências que surgiriam devido ao preparo da amostra (ALGARRA et al., 2005). Esta técnica pode ser utilizada em conjunto com a ELLAS porque o benefício da simplificação do espectro de fluorescência das espécies analisadas juntamente com a vantagem da extração seletiva favorece uma análise simples e rápida para os compostos de interesse.

Figura 7 - Diferença nos espectros de excitação, emissão e síncrona para o perileno



Fonte: PATRA e MISHRA (2002), adaptado.

2.3.2 Métodos multivariados de calibração

Técnicas de separação geralmente consomem muito tempo. De maneira a solucionar este problema, metodologias multivariadas podem ser úteis, já que exploram a poderosa resolução dos modelos para quantificações em misturas mais complexas (WOLD et al., 2001). Diversos métodos multivariados – como PLS-R (ALGARRA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2006; ABDEL-AZIZ et al., 2014; FORSBERG et al., 2014; OKPARANMA et al., 2014), mínimos quadrados parciais desdobrados (U-PLS, do inglês *Unfolded Partial Least Squares*) (BORTOLATO et al., 2008; ALARCÓN et al., 2013) e

mínimos quadrados parciais de diversos caminhos (N-PLS, do inglês *Multi-way Partial Least Squares*) (GOICOECHEA et al., 2012) – foram aplicados à análise de diferentes compostos. Estas metodologias diferem em complexidade e aplicação, sendo a PLS-R satisfatória para a análise de HPAs, conforme discutido na seção 4.1.3.

2.3.2.1 Universo multivariado e componentes principais

Um modelo multivariado é aquele que leva em consideração diversos fatores, simultaneamente, na explicação de um certo fenômeno observável (MASSART et al., 1988). Um exemplo típico de análise multivariada é a visualização da temperatura de um alto-forno. Uma medida direta e univariada, como colocar um termômetro de vidro dentro do forno, é impossível. Assim, uma medida indireta e multivariada pode ser aplicada através da espectroscopia de infravermelho (IR, do inglês *Infra-red*), onde as variáveis de caracterização são todo o espectro de IR.

Um requerimento dos métodos multivariados e, por conseguinte, da calibração multivariada, é que exista uma relação modelável entre um conjunto de variáveis medidas e a propriedade de interesse. Em uma linguagem matemática, as propriedades observáveis Y devem ser funções das variáveis mensuráveis X . No modelo de calibração multivariada, as variáveis Y podem ser modeladas por diversas variáveis X e o conjunto de variáveis passa a se tornar uma matriz contendo os diversos valores (ESBENSEN et al., 1996).

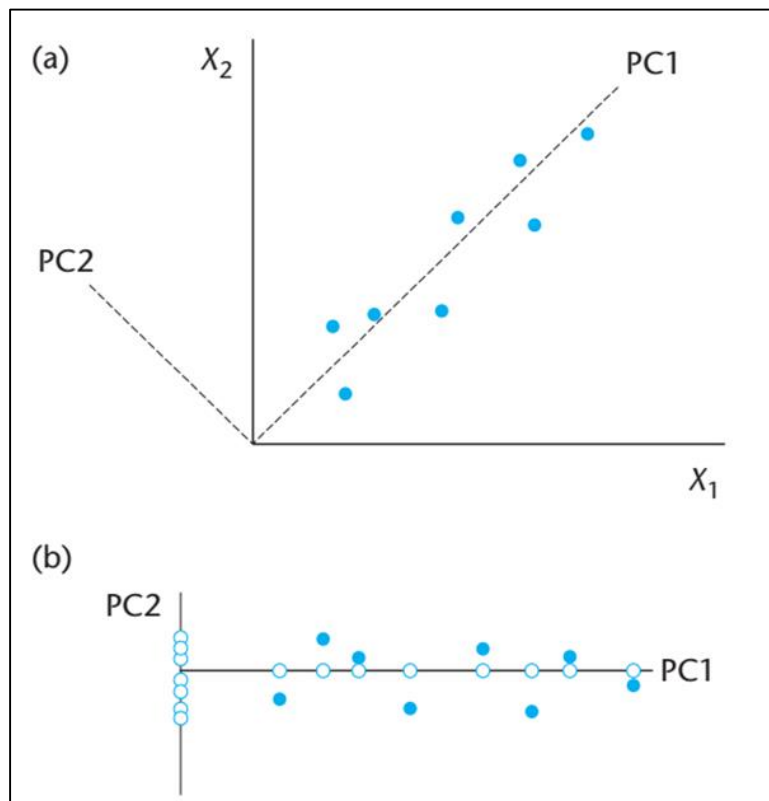
Uma matriz de dados X é construída a partir de n objetos e p variáveis. Os objetos são observações, experimentos, etc., enquanto as variáveis são as medidas dentro de cada observação, experimento, etc. A matriz X é, então, designada por $n \times p$. O objetivo da montagem desta matriz é encontrar uma propriedade desconhecida através da análise da variância dos dados que ela contém. Variância é o termo estatístico para a dispersão dos valores das variáveis, definida por

$$var(x) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (1)$$

onde x_i é o valor medido, \bar{x} é a média dos valores e n é o número de amostras. Muitas vezes, ela é expressa como o desvio padrão, que é a raiz quadrática da variância, por se apresentar nas mesmas unidades que as medidas (MILLER e MILLER, 2005).

A Figura 8 mostra a representação de uma matriz de dados X em duas dimensões. Os dados estão dispostos conforme foram obtidos e os eixos representam os valores originais das variáveis em estudo. Visualmente, é possível observar um agrupamento das variáveis em uma certa região do espaço de tal modo que um novo eixo pode atravessar este conjunto de dados. Este eixo passa através do máximo de variância que os dados apresentam. A esta nova reta é dada o nome de componentes principal (PC, do inglês *principal component*) ou variável latente. O primeiro PC é chamado de PC1, porque ele contém o máximo de variância dos dados, enquanto o PC2 apresenta o segundo máximo das variâncias. Encontrar o PC1 é razoavelmente simples em uma análise com até três variáveis. Contudo, em análises espectroscópicas, por exemplo, a grande quantidade de dados requer uma apreciação mais cuidadosa através de um modelo multivariado baseado na estrutura dos PCs (ESBENSEN et al., 1996).

Figura 8 - Gráfico de duas variáveis x e seus componentes principais

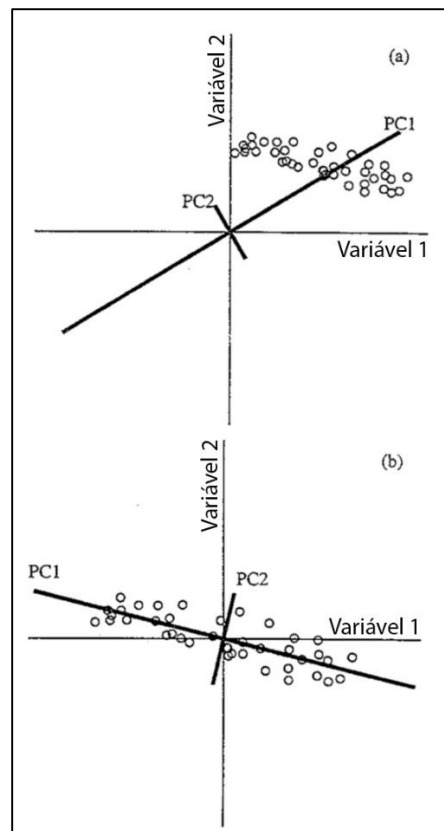


Fonte: MILLER e MILLER (2005), adaptado.

Perceba-se que sistema final consiste de um certo número de PCs ortogonais entre si, cada qual ao longo da direção de maior variância em uma ordem decrescente. Este sistema representa um novo sistema de coordenadas em relação ao “antigo” com p variáveis. Possui-se agora um novo conjunto de variáveis, uma para cada PC, que não são correlacionadas. (ESBENSEN et al., 1996)

Este novo conjunto de variáveis pode ter diversas origens; uma escolha frequente para a origem do sistema de PCs é a centralização na média, que ocorre com a translação da origem do sistema no espaço das variáveis ao centro do amontoado de dados. Este centro dos dados é o ponto médio, definido como a média dos valores do conjunto de dados para um certo objeto. Na Figura 9 é possível identificar um conjunto de dados onde não foi realizada a centralização na média (a) e outro onde essa centralização foi realizada (b).

Figura 9 - Exemplo de conjunto de dados sem e com centralização na média



Fonte: BEEBE et al. (1998), adaptado.

Os modelos multivariados são criados após sua centralização na média e decompõe a matriz de dados brutos X em uma parte estrutural e outra composta pelo ruído dos dados. Essa relação pode ser escrita como $X = P + E$, onde X é a matriz de dados brutos, P é a matriz produto e E é a matriz residual. A matriz residual não faz parte do modelo e, portanto, é considerada como uma indicação da falta de ajuste, ou seja, uma indicação de quão perto o modelo está dos dados originais reais (ESBENSEN et al., 1996).

Uma das principais vantagens de um modelo multivariado é a redução de dimensões a partir dos dados apresentados. Esta redução é apresentada pela escolha de um número de PCs otimizado, indicada por A , que inclui apenas as informações importantes ao modelo, P , e deixa de fora as informações irrelevantes, E . Neste contexto, a escolha de A corresponde a determinação da divisão entre estrutura e ruído. Este valor de A é escolhido pelo usuário, porque o modelo pode ser criado com um número de PCs menor ou igual ao número de objetos incluídos na matriz X . Um número grande de PCs leva a modelagem de ruído no modelo, sem a redução de dimensões. Um número pequeno de PCs resultaria em um modelo falho, que deixa informações importantes de fora (ESBENSEN et al., 1996).

2.3.2.2 *A regressão multivariada*

Na análise dos PCs apresentada anteriormente, apenas a matriz de dados X foi levada em consideração. Contudo, na criação de um modelo multivariado para a regressão, é preciso incluir a matriz de dados Y , constituída das variáveis Y . Um modelo multivariado para X e Y é, basicamente, a regressão entre as relações empíricas (X, Y) . Desta maneira, o primeiro passo é a calibração de um modelo de regressão, que ocorre simultaneamente com a validação do mesmo. Posteriormente, o modelo é aplicado a uma análise de predição de amostras que possuem a matriz Y desconhecida (WEHRENS, 2011).

No estágio de criação de um conjunto de calibração para um modelo multivariado é de extrema importância que este seja representativo para a futura população da qual as novas medidas de X serão amostradas. Assim, experimentos especialmente desenvolvidos tem um papel fundamental nessa etapa. Neste trabalho, buscou-se a aplicação de um design

experimental criado por BRERETON (1997), onde cinco níveis de concentrações diferentes são utilizados para a calibração de até 25 diferentes analitos. Esta tabela de design experimental leva em consideração uma das principais características da análise multivariada, ortogonalidade. Dois fatores são ortogonais quando seu coeficiente de correlação é zero. Isto indica que os fatores estão distribuídos uniformemente no espaço amostral um do outro. Levando em consideração estes fatores, a tabela apresentada pelo autor promove uma ortogonalidade entre os analitos, auxiliando o modelo multivariado na sua capacidade de predição de amostras desconhecidas, já que o espaço amostral é bem representado pelo modelo de calibração.

A validação de um modelo de calibração tem como objetivo certificar que o modelo funcionará no futuro para novos dados. Uma das maneiras de validar um modelo é através do método de validação cruzada, onde o conjunto de dados de calibração é dividido em subconjuntos de calibração e predição. Neste contexto, a validação cruzada do tipo “*leave one out*” é a mais desejável. Nela, os subconjuntos de dados possuem n-1 amostras e uma amostra. O subconjunto “n-1” é utilizado para construir o modelo, deixando de fora uma amostra, a qual é utilizada para a predição do modelo. Este processo é repetido até que cada amostra do conjunto original tenha sido deixada de fora uma vez (BEEBE et al., 1998).

Após os dados passarem pela validação, o modelo multivariado gera um relatório de erro na forma da raiz do erro quadrático médio (RMSE, do inglês *root mean squared error*). Este valor é definido por

$$RMSE = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

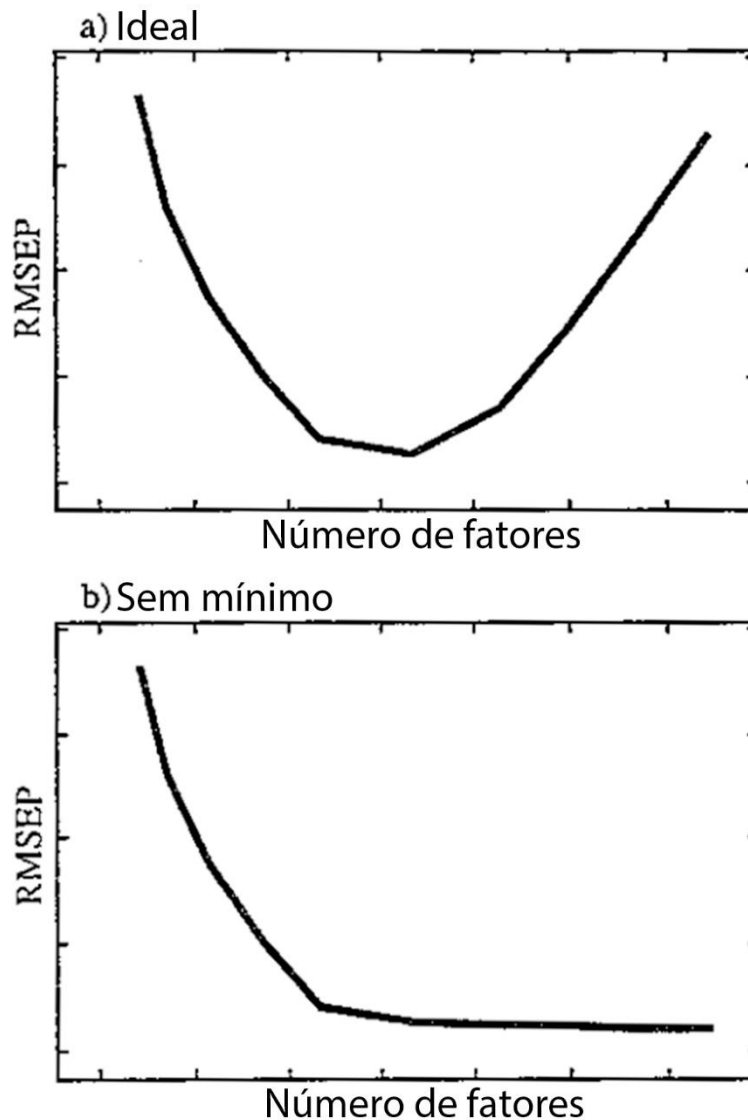
Onde \hat{y}_i e y_i são as concentrações dadas pelo modelo e verdadeiras dos analitos, respectivamente, e N é o número de amostras no conjunto utilizado. Este erro é dado nas unidades de origem de medida. Esse valor é gerado para três diferentes momentos do modelo: RMSE de calibração, também chamado de RMSEC (do inglês *root mean squared error of calibration*); RMSE de validação, RMSEV (do inglês *root mean squared error of validation*) e RMSE de predição, RMSEP (do inglês *root mean squared error of prediction*) (WOLD et al., 2001).

A análise deste erro ocorre na forma de um gráfico conforme mostrado na Figura 10, onde o RMSE é plotado contra os números de fatores ou número de PCs utilizados pelo modelo multivariado. No exemplo dado em (a), um comportamento ideal para o RMSE é observado. Em um primeiro momento, a complexidade do modelo aumenta conforme mais informação dos compostos de interesse são adicionados e o erro diminui. Quando mais PCs são utilizados, mais ruído é adicionado ao modelo, o que aumenta a incerteza estatística, levando a um aumento do erro. Neste gráfico é possível encontrar um número ótimo de PCs a serem utilizados para criação do modelo, o valor de A descrito anteriormente. Em (b), um formato mais realista da curva de RMSE em relação aos PCs é mostrado, onde o valor do erro decresce até uma região onde ocorre uma nivelção do erro. O valor A de PCs para criação do modelo ocorre para a menor quantidade de PCs onde é percebido o nivelamento (BEEBE et al., 1998).

Após a avaliação do gráfico de RMSE para a calibração e validação do modelo multivariado, este também pode ser avaliado conforme seu gráfico de concentrações medidas *versus* preditas das variáveis Y. Este tipo de gráfico indica tendências e a falta de ajuste do modelo. É de se esperar que os valores se ajustem randomicamente ao redor da linha de inclinação unitária e de intercepto zero (BEEBE et al., 1998).

Por fim, após o modelo ter sido devidamente avaliado através de fatores como o gráfico de RMSE *versus* PCs e o gráfico de concentrações medidas *vs* preditas, ele pode ser aplicado a um subconjunto de amostras que não fizeram parte do modelo de calibração. Neste momento, são avaliadas as recuperações, definidas de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (ANVISA, 2003) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) (INMETRO, 2003). De posse de recuperações dentro dos níveis aceitáveis, o modelo pode, então, ser aplicado a amostras reais.

Figura 10 - Diversos comportamentos do RMSE



Fonte: BEEBE et al. (1998), adaptado.

2.3.2.2.1 Regressão por mínimos quadrados parciais

Existem distintas maneiras de proceder a calibração multivariada. Dentre elas, destaca-se PLS-R. A explicação estatística e matemática deste algoritmo se encontra fora do escopo desta dissertação. Contudo, uma visão geral dos termos de funcionamento é que a regressão por PLS leva em consideração ambas matrizes Y e X simultaneamente. Em outras palavras, as informações contidas na matriz das variáveis dependentes conduzem a

descoberta de uma estrutura relevante em X para predizer Y (ESBENSEN et al., 1996; WOLD et al., 2001). Dois modos de operação de PLS existem, a saber: PLS-1, onde apenas uma variável Y é modelada e PLS-2, onde todas as variáveis Y são modeladas simultaneamente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou maior. Naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno, acenafteno, fluoranteno, criseno, pireno, benz(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, 2-naftol, hidroxifluoreno e hidroxipireno foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os sais cloreto de sódio (NaCl), acetato de sódio (CH₃COONa), sulfato de sódio (Na₂SO₃), cloreto de amônio (NH₄Cl), sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), nitrato de amônio (NH₄NO₃) e carbonato de sódio (Na₂CO₃) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Acetonitrila (grau HPLC) foi obtida da Panreac (Castellar del Vallès, Espanha). Soluções estoque de HPAs (1000 mg L⁻¹) foram preparados através da dissolução das quantidades necessárias em acetonitrila. Todas as soluções foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar a -30 °C. Soluções de trabalho dos HPAs foram preparados através das diluições das soluções estoque em acetonitrila.

3.2 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS E DE FLUORESCÊNCIA SÍNCRONA

3.2.1 Determinação de HPAs de baixo peso molecular

Todas as análises fluorimétricas foram realizadas com um espectrômetro de fluorescência Agilent Cary Eclipse (Santa Clara, EUA) com uma cubeta de quartzo de 1 cm. O software Agilent Cary Eclipse Scan controlou a operação do instrumento e a aquisição dos espectros. Durante as análises, as larguras de fenda foram ajustadas para 2.5 nm tanto para a excitação quanto emissão e a voltagem da fotomultiplicadora foi fixada em 900 V. O espectro de fluorescência síncrona foi adquirido entre 200 e 450 nm de excitação com uma diferença de comprimentos de onda $\Delta\lambda$ de 50 nm. No total, 250 pontos de dados foram coletados e

importados para o software Unscrambler, Versão 9.7 (CAMO A/S, Trondheim, Noruega) a fim de realizar a modelagem quimiométrica.

Para as análises fluorimétricas com os derivados hidroxilados e os quatro HPAs prioritários da União Europeia, todas as análises fluorimétricas foram realizadas com um espectrômetro de fluorescência Agilent Cary Eclipse (Santa Clara, EUA) com uma cubeta de quartzo de 1 cm. O software Agilent Cary Eclipse Scan controlou a operação do instrumento e a aquisição dos espectros. Durante as medidas, as larguras de fenda foram ajustadas para 2.5 nm tanto para a excitação quanto emissão e a voltagem da fotomultiplicadora foi fixada em 900 V. O espectro de fluorescência síncrona foi adquirido entre 190 e 400 nm de excitação com uma diferença de comprimentos de onda $\Delta\lambda$ de 100 nm. No total, 210 pontos de dados foram coletados e importados para o software Unscrambler, Versão 9.7 (CAMO A/S, Trondheim, Noruega) a fim de realizar a modelagem quimiométrica.

3.3 COLETA

As amostras foram coletadas em duas regiões do Rio Xingú médio: Bom Jardim (amostras de sedimento e solo A; S07°00'11,3'' W 052°25'06,7'') e Canopus (amostras de sedimento e solo B; S 06°49'42,8'' W 052°00'19,7''), devido a seu distinto histórico de contaminação. As amostras A em de uma área com baixo contato antropológico, próximo a uma reserva indígena. As amostras B vem de uma área que é próxima a sítios de mineração de cassiterita.

Neste estudo, uma amostra de solo e uma de sedimento de cada localidade foram utilizadas para as análises. As amostras de solo foram coletadas com um coletor manual do tipo *core*; 20 cm do perfil vertical foi removido e acondicionado em sacolas plásticas transparentes. As amostras de sedimento foram coletadas com uma draga Van Veen e estocadas em sacos plásticos. No laboratório, as amostras foram transferidas para sacos de papel, identificadas e secas a 50 °C para remoção da água em excesso. As amostras foram então guardadas em dessecadores à temperatura ambiente sem aplicação de vácuo até a análise.

3.4 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA

3.4.1 Extração de HPAs de baixo peso molecular

As amostras de solos e sedimentos foram submetidas a testes de lixiviação aquosa em batelada, de acordo com o método US EPA 1311 (USEPA, T., 1990). Todas as amostras apresentavam um conteúdo sólido de 100% e moagem não se fez necessária, devido ao tamanho das partículas serem menores que a rede pelas quais foram passadas. Após, cada amostra foi pesada para uma massa exata de 5 g e transferida para frascos de vidro limpos. Então, 100 mL de uma solução extratora de tampão acetato com pH 4,93 foram adicionados às amostras; todos os frascos foram então tampados e submetidos à agitação em um agitador de mesa com 18 rpm por 24 horas. A agitação foi suprimida até o conteúdo sólido decantar, seguiu-se com uma etapa de filtração em um filtro de fibra de vidro de 0,7 μm . O pH do lixiviado aquoso foi medido utilizando um pHmetro 827 pHlab (Metrohm, Heriseau, Suíça) corrigido para valores de 8-9 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. O lixiviado foi acondicionado por 4 °C até a análise.

3.4.1.1 PROCEDIMENTO ELLAS

Para a otimização do procedimento de ELLAS, foi utilizado um lixiviado aquoso produzido a partir de uma amostra branca de solo com fortificação de cinco diferentes HPAs (naftaleno, antraceno, fluoreno, fenantreno e acenafteno), tomando o cuidado de que não mais que 3% (v/v) de solventes orgânicos estivessem presentes, provenientes estes das soluções estoque dos analitos.

Uma alíquota de seis mL de cada amostra aquosa (branca ou fortificada) foi transferida para um tubo de vidro para centrífuga de 15 mL. Então, 1,27 g (2 mol L⁻¹) de Na₂CO₃ foi adicionado ao tubo e uma agitação suave foi aplicada para permitir a dissolução do sal. A seguir, três mL de acetonitrila foram transferidos para o tubo e este foi selado com uma fita de PTFE. Para agilizar a separação das fases, um tempo de agitação em vórtex para a amostra foi fixado em 5 minutos (WEN et al., 2013) seguido de um período de centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos (KOLTSAKIDOU et al., 2015). Uma porção de 1,5 mL da acetonitrila obtida foi transferida para uma cubeta e 1,5 mL de acetonitrila foi adicionada. A amostra estava, então, pronta para a próxima etapa da análise.

Para o teste de verificação da separação de fases através de mudanças de pH, utilizou-se os seguintes equipamentos e soluções: um pHmetro 827 pHlab (Metrohm, Heriseau, Suíça), solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e solução de HCl 1,0 mol L⁻¹. Uma solução foi preparada conforme descrito acima, exceto pela presença do sal. Esta solução foi então submetida a mudanças no valor do pH desde a unidade até 13. Todas as observações foram realizadas visualmente.

3.5 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

3.5.1 Modelo experimental para HPAs de baixo peso molecular

Um total de 20 amostras foi utilizada como conjunto de calibração para construir o modelo de PLS-2 e cinco amostras foram utilizadas como um conjunto independente de predição, conforme mostrado na Tabela 2. Todas as concentrações estão em unidades de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 2 – Misturas dos analitos utilizadas na construção e validação do modelo multivariado

Padrão	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	Naf	Ant	Fen	Flu	Ace
1 ^a	0,468	0,084	0,337	0,018	0,097
2 ^a	0,468	0,028	0,112	0,030	0,065
3 ^a	0,156	0,028	0,561	0,012	0,162
4 ^a	0,156	0,140	0,224	0,030	0,097
5 ^a	0,780	0,056	0,561	0,018	0,065
6	0,312	0,140	0,337	0,012	0,065
7	0,780	0,084	0,224	0,012	0,130
8	0,468	0,056	0,224	0,024	0,162
9	0,312	0,056	0,449	0,030	0,130
10	0,312	0,112	0,561	0,024	0,097
11	0,624	0,140	0,449	0,018	0,162
12	0,780	0,112	0,337	0,030	0,162
13	0,624	0,084	0,561	0,030	0,032
14	0,468	0,140	0,561	0,006	0,130

15	0,780	0,140	0,112	0,024	0,032
16	0,780	0,028	0,449	0,006	0,097
17	0,156	0,112	0,112	0,018	0,130
18	0,624	0,028	0,337	0,024	0,130
19	0,156	0,084	0,449	0,024	0,065
20	0,468	0,112	0,449	0,012	0,032
21	0,624	0,112	0,224	0,006	0,065
22	0,624	0,056	0,112	0,012	0,097
23	0,312	0,028	0,224	0,018	0,032
24	0,156	0,056	0,337	0,006	0,032
25	0,312	0,084	0,112	0,006	0,162

Fonte: Do autor.

^a Amostras do conjunto de predição

O RMSE foi determinada para os conjuntos de calibração, validação e predição, de acordo com a Equação 2.

Os testes de recuperação foram realizados com fortificações realizados nas amostras reais, após o processo de lixiviação estar completo. As amostras foram submetidas ao método de ELLAS e, posteriormente, analisadas pelo método multivariado. As concentrações das fortificações podem ser vistas na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentrações dos analitos para avaliação da recuperação

Analito	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Nível 1	Nível 2
Naftaleno	0,312	0,624
Antraceno	0,056	0,112
Fluoreno	0,012	0,024
Acenafteno	0,065	0,130
Fenantreno	0,224	0,449

Fonte: Do autor.

3.5.1.1 Testes de interferência

Os testes de interferência foram realizados com os seguintes HPAs: fluoranteno, criseno, pireno e benz(a)antraceno. Estes foram adicionados à fase aquosa antes do processo de ELLAS em concentrações de $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$. Após, todas as medidas foram realizadas normalmente.

3.5.2 Modelo experimental para HPAs prioritários e derivados hidroxilados

O procedimento realizado foi o mesmo descrito no item 3.5.1, com as concentrações mostradas na Tabela 4, em unidades de $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 4 - Misturas dos analitos utilizadas na construção e validação do modelo multivariado

Padrão	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)						
	OHN	OHP	OHF	Cris	BaA	BbF	BaP
1 ^a	0,3468	0,1375	0,1646	0,1314	0,1314	0,1189	0,1189
2 ^a	0,3468	0,0458	0,0549	0,219	0,0876	0,1982	0,1189
3 ^a	0,1387	0,0458	0,2744	0,0876	0,219	0,1189	0,0793
4 ^a	0,1387	0,2291	0,1098	0,219	0,1314	0,0793	0,0793
5 ^a	0,6243	0,0916	0,2744	0,1314	0,0876	0,0793	0,1585
6	0,2081	0,2291	0,1646	0,0876	0,0876	0,1585	0,1982
7	0,6243	0,1375	0,1098	0,0876	0,1752	0,1982	0,1585
8	0,3468	0,0916	0,1098	0,1752	0,219	0,1585	0,1189
9	0,2081	0,0916	0,2195	0,219	0,1752	0,1189	0,1982
10	0,2081	0,1833	0,2744	0,1752	0,1314	0,1982	0,1982
11	0,4855	0,2291	0,2195	0,1314	0,219	0,1982	0,0396
12	0,6243	0,1833	0,1646	0,219	0,219	0,0396	0,1585
13	0,4855	0,1375	0,2744	0,219	0,0438	0,1585	0,0396
14	0,3468	0,2291	0,2744	0,0438	0,1752	0,0396	0,1189
15	0,6243	0,2291	0,0549	0,1752	0,0438	0,1189	0,1585
16	0,6243	0,0458	0,2195	0,0438	0,1314	0,1585	0,1585
17	0,1387	0,1833	0,0549	0,1314	0,1752	0,1585	0,0793
18	0,4855	0,0458	0,1646	0,1752	0,1752	0,0793	0,0396
19	0,1387	0,1375	0,2195	0,1752	0,0876	0,0396	0,0793
20	0,3468	0,1833	0,2195	0,0876	0,0438	0,0793	0,1189
21	0,4855	0,1833	0,1098	0,0438	0,0876	0,1189	0,0396

22	0,4855	0,0916	0,0549	0,0876	0,1314	0,0396	0,0396
23	0,2081	0,0458	0,1098	0,1314	0,0438	0,0396	0,1982
24	0,1387	0,0916	0,1646	0,0438	0,0438	0,1982	0,0793
25	0,2081	0,1375	0,0549	0,0438	0,219	0,0793	0,1982

Fonte: Do autor.

^a Amostras utilizadas na predição.

3.6 MÉTODO DE COMPARAÇÃO

3.6.1 Análise de HPAs de baixo peso molecular

HPLC foi utilizada como método comparativo. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Dionex® modelo P680 (Sunnyvale, EUA) equipado com um detector de fluorescência, válvula de injeção Rheodyne® modelo 8125 (Cotati, Califórnia, EUA) com uma alça de injeção de 100 µl. As análises foram realizadas em uma coluna de fase reversa Kinetex C18 (250 mm × 4.6 mm, D.I., 5 µm de diâmetro de partícula; Phenomenex, Torrance, EUA) precedida de uma pré coluna C18 (Phenomenex, Torrance, EUA). A metodologia foi baseada no trabalho de BUSETTI et al. (2006), com uma adaptação: a fase móvel foi mantida na proporção 80:20 acetonitrila:água, devido ao equipamento apresentar eluição isocrática. As condições de fluorescência foram as mesmas descritas no trabalho citado anteriormente. As amostras foram analisadas tanto pelo método de comparação quanto pelo método proposto após todo o procedimento de extração. Todas as amostras analisadas foram fortificadas com as concentrações desejadas, sendo elas descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de fortificação das amostras analisadas por HPLC e PLS-2

Analito	Concentração (µmol L ⁻¹)				
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
Naftaleno	0,156	0,312	0,468	0,624	0,78
Antraceno	0,028	0,056	0,084	0,112	0,14
Fluoreno	0,006	0,012	0,018	0,024	0,03
Acenafteno	0,032	0,065	0,097	0,13	0,162
Fenantreno	0,112	0,224	0,337	0,449	0,561

Fonte: Do autor.

3.7 FIGURAS DE MÉRITO

As figuras de mérito aplicadas ao universo multivariado são pouco difundidas e estabelecidas. Isto se dá pelo surgimento de diversas interpretações matemáticas e químicas de cada uma segundo vários autores (VALDERRAMA et al., 2009). Algumas figuras de mérito amplamente abordadas são a sensibilidade (SEN), o limite de detecção multivariado (MDL, do inglês, *multivariate detection limit*) e o limite de quantificação multivariado (MQL, do inglês *multivariate quantification limit*).

Apesar de existirem diversos modelos para o cálculo destes parâmetros, o estudo de LORBER et al. (1997) é utilizado nesta dissertação, considerando a definição de sensibilidade como $SEN = 1/\|\mathbf{b}\|$, onde $\|\mathbf{b}\|$ é a norma Euclidiana do vetor de regressão PLS obtido após a construção do modelo multivariado.

O MDL foi calculado de acordo com o estudo realizado por BOQUÉ et al. (1999), de acordo com $MDL = \Delta(\alpha,\beta)\text{var}(c,k)^{1/2}$, onde $\Delta(\alpha,\beta)$ é o parâmetro não-central de uma distribuição-t não-central. Os valores utilizados neste trabalho foram $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.05$. O termo $\text{var}(c,k)^{1/2}$ leva em consideração a estimativa da variância em uma concentração de nível zero. O MQL foi definido como 3,3 MDL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 HPAS DE BAIXO PESO MOLECULAR

4.1.1 Otimização das condições de fluorescência síncrona

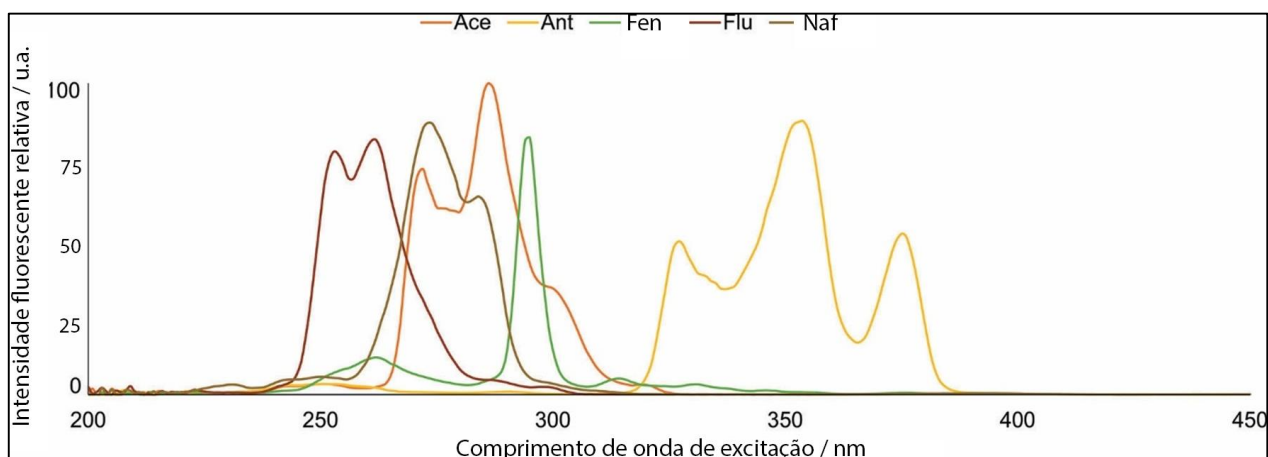
A espectroscopia de fluorescência síncrona é uma técnica na qual a diferença entre os comprimentos de onda de excitação e emissão é mantida constante durante a aquisição do espectro de fluorescência. Conforme mencionado por PATRA e MISHRA (2002), esta metodologia permite o estreitamento das bandas espectrais enquanto simplifica o espectro de emissão, o que é particularmente bom para a análise multivariada devido à redução significativa do conjunto de dados quando comparado com matrizes de excitação vs emissão.

Esta técnica tem sido aplicada à análise de misturas complexas já que permite a identificação dos compostos de interesse pela variação do intervalo de comprimento de onda ($\Delta\lambda$). Quatro dos HPAs estudados apresentaram espectros fortemente sobrepostos, sendo estes Naf, Flu, Ace e Fen. Baseado em um estudo anterior (FERRER et al., 1998), testes iniciais foram realizados para avaliar o melhor intervalo de comprimentos de onda; a melhor distinção entre picos foi obtida quando um $\Delta\lambda$ de 50 nm foi aplicado. Este valor baixo de $\Delta\lambda$ é especialmente útil na análise de HPAs-BPM porque a melhor diferença entre comprimentos de onda de excitação e emissão aumenta com o número de anéis. A explicação deste fenômeno vem da transição eletrônica entre o orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, do inglês *highest occupied molecular orbital*) e o orbital molecular desocupado mais baixo (LUMO, do inglês *lowest unoccupied molecular orbital*). Quanto maior a quantidade de anéis aromáticos em uma molécula de HPAs, menor a diferença de energia entre estes dois orbitais. Como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda absorvido por uma espécie, é de se esperar que $\Delta\lambda$ seja menor para menos anéis e, da mesma maneira, maior para uma maior quantidade de anéis (ATKINS e JONES, 2009).

A figura 11 mostra o EFS do Naf, Fen, Flu, Ace e Ant em concentrações de 10, 10, 0,5, 2 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, quando uma diferença de 50 nm foi aplicada no intervalo de 200-450 nm para o comprimento de onda de excitação; espectros sobrepostos

ocorreram para os quatro primeiros compostos (Naf, Fen, Flu e Ace), enquanto o Ant apresentou fluorescência em uma região mais distinta do espectro.

Figura 11- Espectro de fluorescência síncrona dos HPAs em estudo



Fonte: Do autor.

4.1.2 Otimização da extração líquido-líquido assistida por *salting-out*

4.1.2.1 Escolha do solvente orgânico e agente de *salting-out*

A eficiência da ELLAS depende na diferença de afinidades dos analitos entre as fases orgânicas e aquosas. Desta maneira, a escolha de um solvente orgânico miscível coma fase aquosa antes da adição do agente de *salting-out* é mandatória para uma extração efetiva. Usualmente, solventes como acetonitrila, metanol e acetona são utilizados. ZHAO et al. (2009) demonstraram que a acetonitrila foi o solvente de extração mais adequado quando comparado com acetona e o metanol para a análise de HPAs em vegetais, já que rendimentos de extração mais altos foram obtidos. De maneira semelhante, KOLTSAKIDOU et al. (2015) também utilizaram acetonitrila para analisar HPAs no mel. Outros estudos envolvendo diferentes analitos e meios (RAZMARA et al., 2011; XIA et al., 2012; DU et al., 2014; JAIN

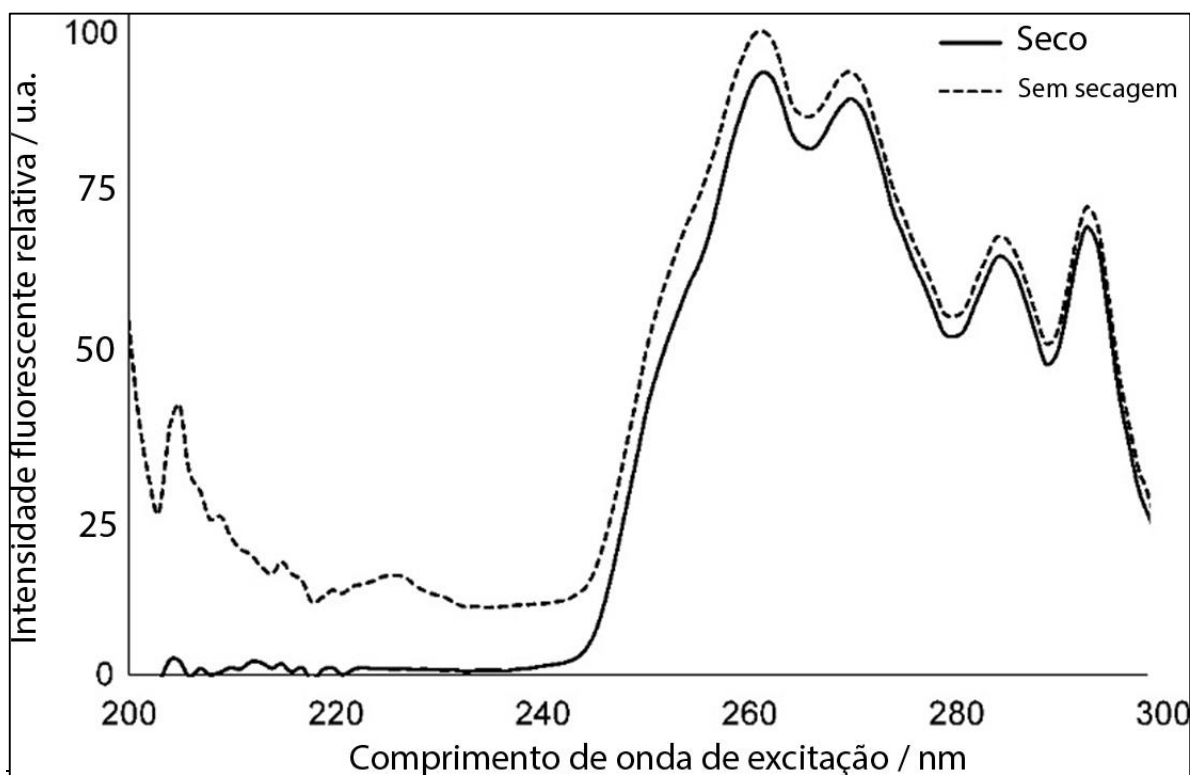
et al., 2014; FARAJZADEH et al., 2016) também identificaram a acetonitrila como o melhor solvente orgânico para ELLAS. Assim sendo, acetonitrila foi utilizada neste trabalho.

Alguns sais foram testados frente a capacidade de promover separação de fases. As concentrações destes sais em água foram ajustadas para 1 mol L^{-1} e os volumes de água e acetonitrila foram 6 e 3 mL, respectivamente. Os sais testados foram NaCl, CH_3COONa , Na_2SO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , Na_2CO_3 e Na_2HPO_4 .

Entre eles, apenas Na_2SO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Na_2CO_3 promoveram a separação de fases adequadamente. Apesar de alguns destes sais promoverem a separação de fases, o volume de acetonitrila obtido não foi o suficiente para uma manipulação desejável. Os resultados experimentais obtidos neste trabalho estão de acordo com outros estudos (ZHANG e CREMER, 2006; VALENTE et al., 2013) que demonstraram que os ânions contribuem mais significativamente para a separação de fases. Estes resultados seguem uma ordem teórica chamada série de Hoffmeister, conforme discutido na revisão da literatura. Grupamentos aniônicos como SO_3^{2-} , CO_3^{2-} e SO_4^{2-} induziram uma separação de fases melhor comparada a ânions como CH_3COO^- , Cl^- , HPO_4^{2-} e NO_3^- . Os cátions não possuem um papel fundamental na separação.

Preliminarmente, durante o procedimento de separação de fases entre água e acetonitrila, uma solução turva foi observada na cubeta de quartzo, provavelmente devido à formação de uma suspensão de água no solvente devido à baixa eficiência de extração nas condições testadas. Deste modo, uma etapa de secagem com 0,5 g de MgSO_4 foi introduzida após a obtenção da amostra. O secante foi mantido em contato com a acetonitrila por dois minutos e decantado antes das medidas por EFS. Medidas realizadas na acetonitrila livre desta solução turva mostraram pouco ruído e um espectro com bandas bem separadas (Figura 12). Alternativamente, o procedimento de secagem pôde ser facilmente eliminado pelo aumento da concentração do agente de *salting-out*.

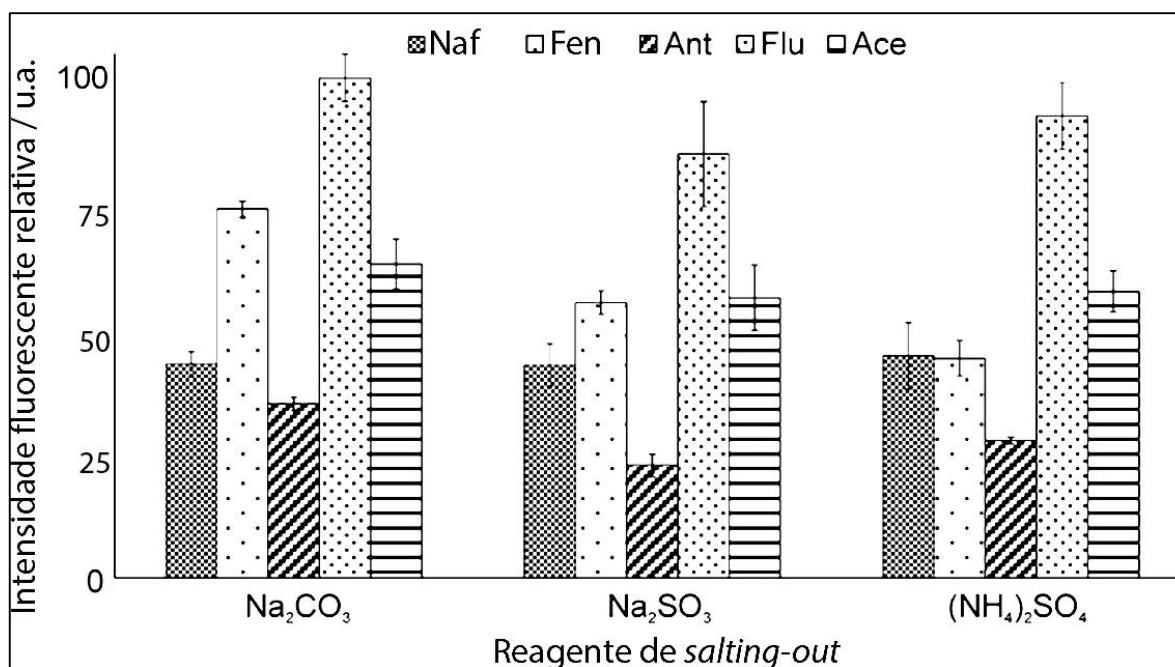
Figura 12 - Espectro de fluorescência síncrona de uma mistura de HPAs em acetonitrila após a ELLAS



Fonte: Do autor.

A Figura 13 mostra as intensidades relativas dos cinco HPAs medidos por EFS ($n = 3$) depois do procedimento de ELLAS. As intensidades relativas mostraram que Na_2CO_3 promoveram melhores rendimentos do que outros sais, assim como melhor separação de fases baseado nos volumes de acetonitrila obtidos. Os volumes da fase orgânica coletada foram $2,4 \pm 0,1$, $2,2 \pm 0,1$ e $1,7 \pm 0,1$ mL para Na_2CO_3 , Na_2SO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente, quando três mL de acetonitrila foram adicionados a seis mL da fase aquosa. Adicionalmente, Na_2CO_3 resultou em maior precisão quando comparado a outros sais, para alguns analitos. Convém notar que alguns analitos, como o Naf, não apresentam mudança de valores de intensidade fluorescente conforme ocorre a mudança do sal. Ainda assim, foi buscada uma condição onde fosse possível obter um balanço de maior intensidade fluorescente e menor desvios entre as medidas para todos os analitos. Isto foi realizado para todas as etapas de otimização da ELLAS.

Figura 13 – Efeito dos sais na intensidade fluorescente dos HPAs em estudo



Fonte: Do autor.

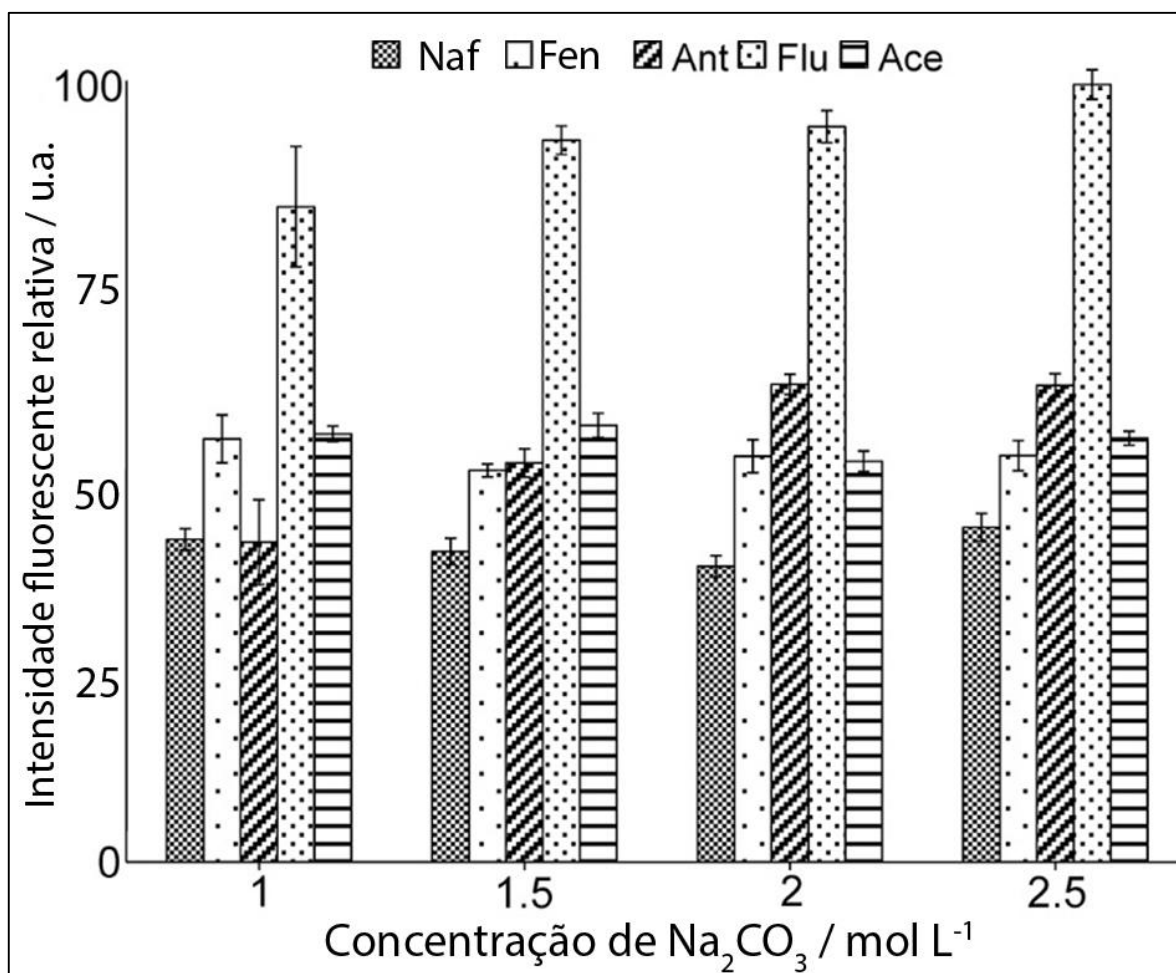
A fim de investigar a influência do pH na separação de fases, ensaios de extração na ausência de Na_2CO_3 foram realizados em níveis de pH de 1 a 13, com mudanças sendo realizadas a intervalos unitários. As mudanças nos valores de pH não promoveram a separação de fases, conforme atestado de maneira visual. Eliminou-se, assim, a participação da hidrólise salina do carbonato de sódio como fator predominante no efeito de *salting-out*, já que mudanças no pH, sozinhas, não indicam o efeito encontrado quando o sal está presente.

4.1.2.2 Concentração de carbonato de sódio

Nesta etapa, variou-se a concentração da solução de Na_2CO_3 de 0,5 a 2,5 mol L⁻¹. Em termos gerais, quanto maior a concentração do sal, mais intensa é a fluorescência relativa (Figura 14). A força iônica variou de 1,50 a 7,50 mol L⁻¹ baseado na concentração de Na_2CO_3 , considerando a dissolução completa do sal e desconsiderando a formação de pares iônicos,

de maneira que diferentes volumes de acetonitrila também foram obtidos. Deveras, exceto para a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, as outras concentrações produziram volumes muito próximos dos 3 mL adicionados de acetonitrila. Dentre estes, a concentração de 2 mol L^{-1} foi a que demonstrou melhores rendimentos de separação de fase e dissolução completa do sal adicionado no período de agitação, facilitando a manipulação experimental.

Figura 14 – Intensidade relativa dos analitos após extração em diferentes concentrações de carbonato de sódio

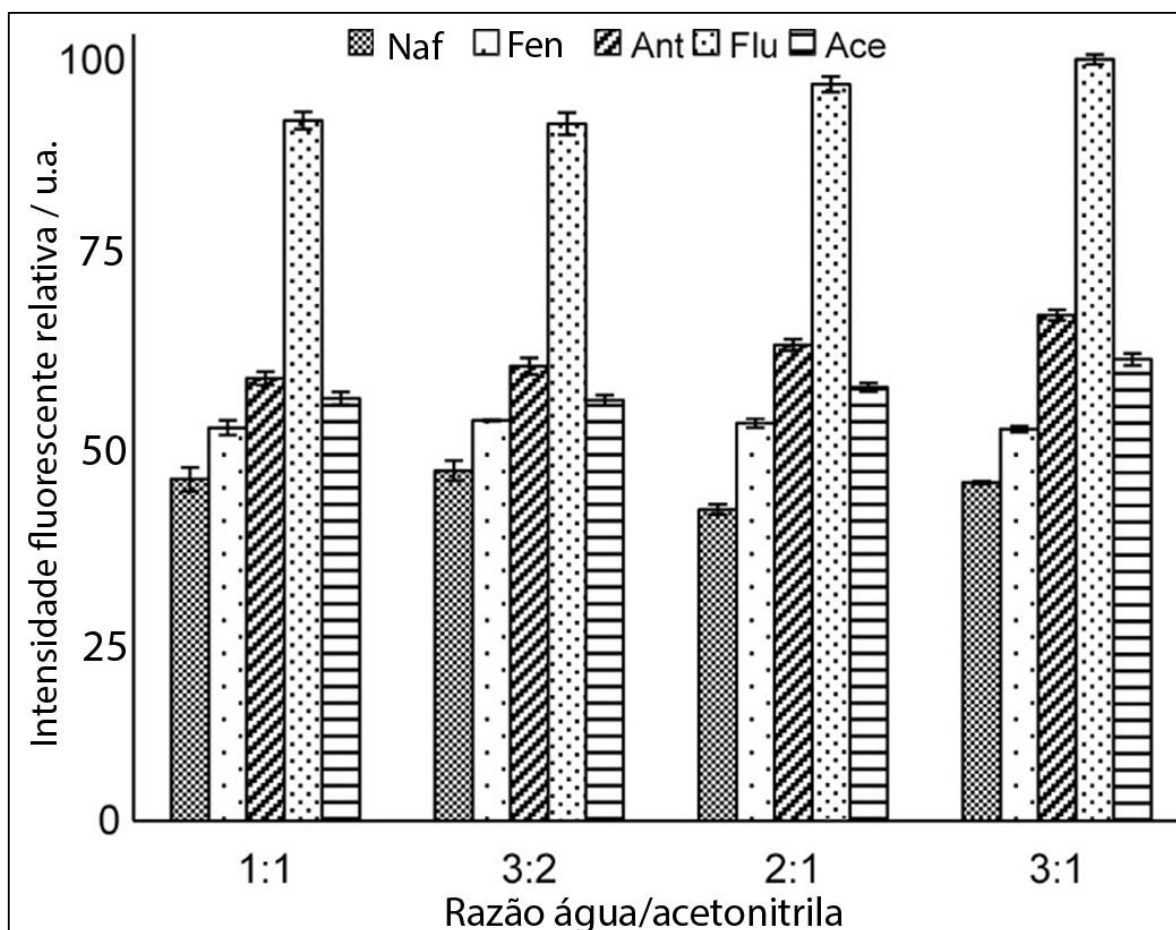


Fonte: Do autor.

4.1.2.3 Razão água/acetonitrila

Nestes testes, o volume da fase aquosa foi mantido constante a 6 mL e o volume de acetonitrila foi variado para obter razões de água/acetonitrila de 1:1, 3:2, 2:1 e 3:1. A concentração de Na_2CO_3 foi fixada em 2 mol L^{-1} .

Figura 15 – Intensidade fluorescente dos analitos após extração com diferentes razões de água/acetonitrila



Fonte: Do autor.

A razão 3:1 de água/acetonitrila mostrou melhores resultados de extração devido à maior intensidade de sinal obtida. Contudo, a razão 2:1 foi utilizada, já que um maior volume de acetonitrila permite uma manipulação experimental mais fácil na transferência do extrato

para a cubeta, minimizando a perda de volume ou a retirada de água para a ponteira da pipeta (Figura 15).

4.1.3 Criação de um modelo de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais

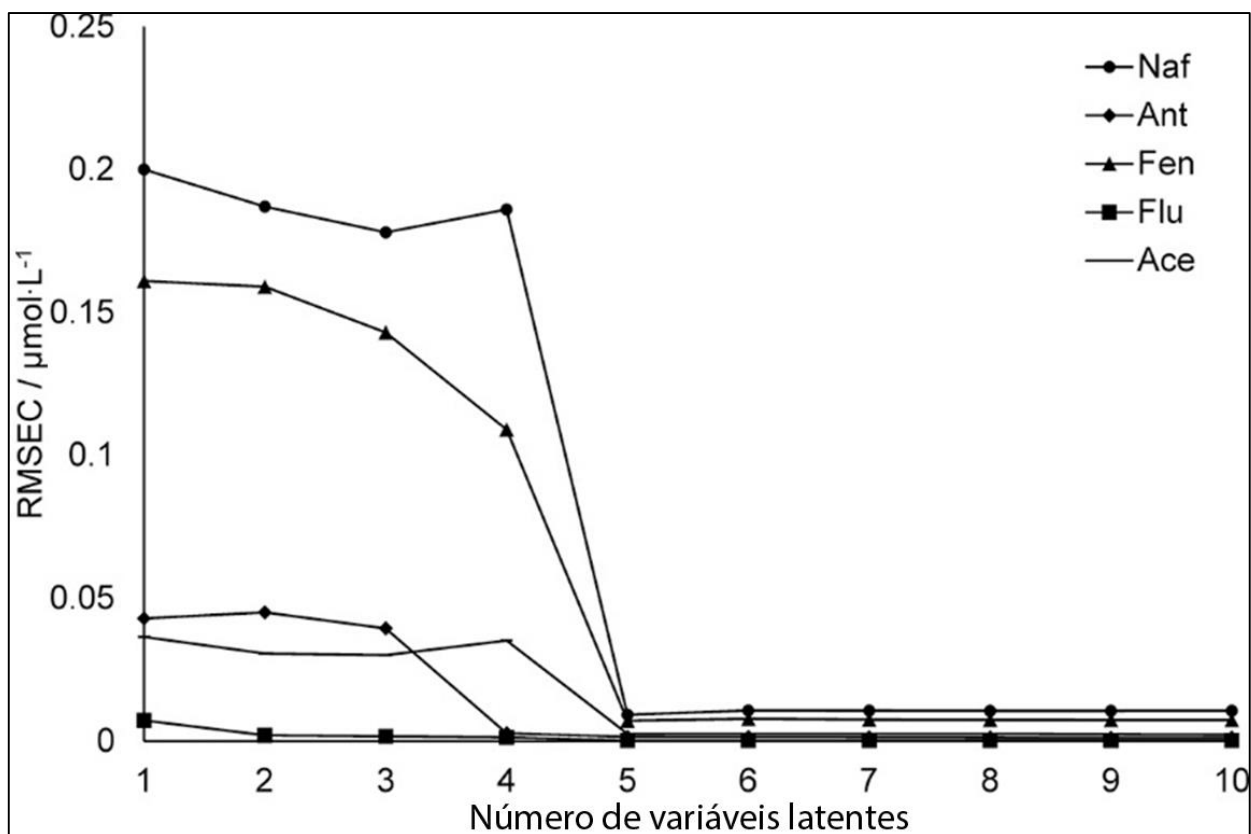
Em um primeiro momento, o modelo de calibração foi construído utilizando padrões mais concentrados (concentração utilizadas para Naf, Fen, Flu, Ace e Ant foram de 10, 10, 0,5, 2 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente), já que a voltagem da fotomultiplicadora estava em 600 V. Contudo, a sensibilidade obtida não foi suficientemente alta para avaliar os analitos nas amostras desejadas, tendo em vista que a intensidade do sinal de fluorescência depende diretamente deste parâmetro. Este problema foi facilmente solucionado ao aumentar a voltagem para 900 V. Esta estratégia não aumentou o ruído de fundo além de não requerer etapas de pré-concentração.

Foram testadas as técnicas de calibração disponíveis no software utilizado. Entre elas, PLS-2 foi utilizado para as calibrações porque demonstrou melhores resultados, em termos da capacidade de predição, que a regressão por componentes múltiplos (MCR, do inglês *multiple component regression*), regressão por componentes parciais (PCR, do inglês *partial componente regression*) e PLS-1. Adicionalmente, PLS-2 é recomendado para espectros fortemente sobrepostos (FERRER et al., 1998), assim como oferece a vantagem de modelar simultaneamente todas as variáveis Y com a redução do tempo de processamento (WOLD et al., 2001). Os conjuntos de predição e calibração incluíam cinco e 20 amostras, respectivamente. Todas estas eram misturas com composição conhecida (amostras artificiais). O modelo experimental (Tabela 2) consistiu dos conjuntos de calibração e predição construídos com cinco níveis de concentração e 25 experimentos (BRERETON, 1997).

Devido à forte sobreposição dos espectros para Naf, Fen, Flu e Ace, a regressão PLS-2 foi utilizada para as quantificações. Os dados brutos foram centrados na média seguidos por validação cruzada (*leave-one-out*). O número de variáveis latentes foi definido seguindo a diminuição do RMSEC até um mínimo que não diferia significativamente do outro quando outra variável latente fosse adicionada. Este procedimento foi realizado tanto

para minimizar o sobreajuste quanto a possibilidade de deixar informação importante fora do modelo. A variação do RMSEC contra o número de variáveis latentes (Figura 16) mostrou que cinco componentes principais (PCs) são suficientes para explicar quase 100% das variâncias. Nesta figura é possível observar que o maior valor de RMSEC é observado para o Naf e o Ant, devido às suas maiores concentrações no modelo de calibração. Conforme aumenta o número de componentes principais, estes valores vão até um mínimo. Para os outros analitos, os valores também encontram um mínimo em cinco componentes principais, devido ao número de compostos que fazem parte do conjunto (cinco HPAs).

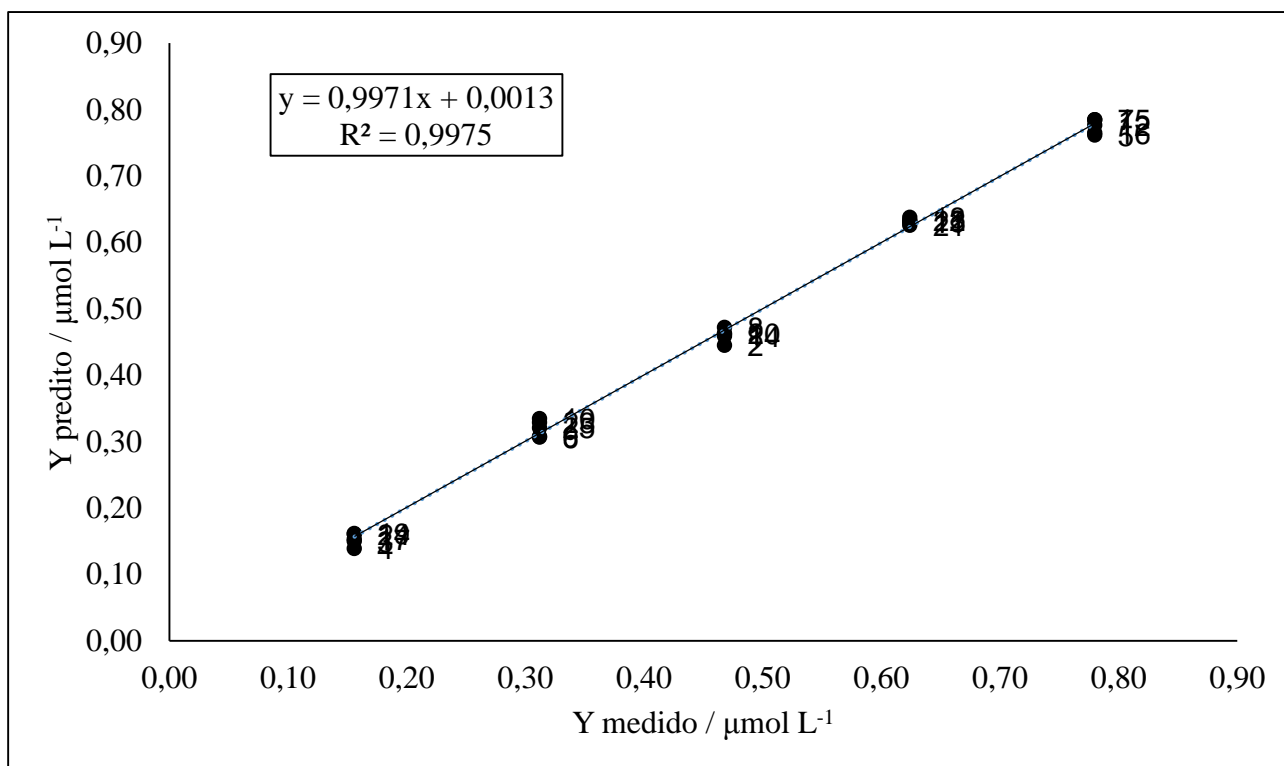
Figura 16 – RMSEC em função do número de variáveis latentes



Fonte: Do autor.

O desempenho do modelo de calibração com cinco PCs foi avaliado através da plotagem das concentrações verdadeiras e preditas para cada analito, conforme pode ser observado na Figura 17 e na Tabela 6. Na Figura 17 temos um exemplo de um gráfico de concentrações preditas vs medidas pelo modelo de calibração para o Naf. Pode-se ver que este é um gráfico de correlação onde valores ótimos são obtidos quando a inclinação da reta de regressão é próxima da unidade e o intercepto é próximo de zero. Todos os analitos mostraram coeficientes de correlação maiores que 0.99. Naf e Fen foram os analitos com maiores valores de RMSE, em geral, o que pode ser explicado pela baixa sensibilidade obtida na espectrometria de fluorescência para estes compostos e a forte sobreposição espectral entre eles. As informações da correlação entre os pontos da Figura 17 encontram-se na Tabela 6.

Figura 17 - Gráfico entre concentrações preditas e medidas para o Naf



Fonte: Do autor.

Tabela 6 – Características do modelo de calibração multivariada

Parâmetro	Naf	Ant	Fen	Flu	Ace
Faixa de Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,156 – 0,780	0,028 – 0,140	0,112 – 0,561	0,012 – 0,060	0,032 – 0,162
Número de fatores	5	5	5	5	5
RMSEC ^a	0,0061	0,001	0,0051	0,0001	0,0019
RMSEV ^b	0,0091	0,0014	0,0071	0,0002	0,0025
RMSEP ^c	0,0167	0,0020	0,0225	0,0004	0,0036
Intercepto	0,0029	0,0002	0,0019	0,0000	0,0006
Inclinação	0,9930	0,9986	0,9943	0,9991	0,9948
Coefficiente de correlação	0,9983	0,9987	0,998	0,9995	0,9975

Fonte: Do autor.

^a Raiz do erro médio quadrático de calibração

^b Raiz do erro médio quadrático de validação

^c Raiz do erro médio quadrático de predição

Para validar o modelo com base em sua resposta frente a amostras desconhecidas, um conjunto independente de cinco amostras foi construído para cálculos de recuperação. Estas amostras estão destacadas na Tabela 2. As recuperações médias variaram de 89,1% a 98,3% para o Naf, 89,9% a 102,4% para o Ant, 88,9% a 97,9% para o Fen, 95,1% a 100,2% para o Flu e 94,5% a 97,5% para o Ace. Todas as recuperações estão de acordo com os limites propostos (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

4.1.3.1 Figuras de mérito

Os valores calculados para as figuras de mérito (SEN, MDL e MQL) são mostrados na Tabela 7. É possível observar que Naf e Fen são os analitos com a menor sensibilidade assim como o mais alto MDL, devido aos menores sinais de resposta utilizando SFS e seus espectros sobrepostos.

Tabela 7 - Figuras de mérito do método multivariado

Figuras de mérito	Naf	Ant	Fen	Flu	Ace
Sensibilidade	16,10	177,4	23,59	610,0	95,94
MDL ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,040	0,006	0,049	$9,9 \times 10^{-3}$	0,010
MQL ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,133	0,019	0,160	0,003	0,033

Fonte: Do autor.

^a Limite de detecção multivariado

^b Limite de quantificação multivariado

4.1.4 Aplicação da metodologia em amostras reais de sedimentos e solos

Os sedimentos e solos coletados foram submetidos a um teste de lixiviamento por batelada de acordo com o procedimento EPA 1311 (US EPA, 1990). A metodologia foi previamente explicada na seção 3.4. Tratou-se as amostras como resíduos devido ao fato de haverem sido coletadas em regiões onde a atividade industrial se intensificou nas últimas décadas, mesmo não sendo provenientes diretamente de uma fonte de poluição. Além do mais, a lixiviação direta de HPAs utilizando solventes não foi aplicada, já que o objetivo deste trabalho era a medida de HPAs de baixa massa que poderiam ser lixiviados dos solos e sedimentos em caso de água proveniente de uma fonte natural passar pelos mesmos como, por exemplo, da chuva ou de uma bacia hidrográfica. Apesar do escopo deste trabalho não focar nos níveis de contaminação da área, a metodologia se mostrou promissora para avaliar o impacto humano em regiões onde a atividade antropológica é proeminente, levando a contaminação de tal área com HPAs.

Nenhuma das amostras de solo ou sedimentos produziu soluções básicas quando testadas para o pH e a solução de extração empregada foi o tampão acetato com pH 4,93. Após, todas as amostras foram submetidas ao procedimento conforme descrito na seção.

Os pH das soluções obtidas foram corrigidos a valores acima da neutralidade já que estas seriam submetidas ao procedimento ELLAS que envolveria o uso do sal básico Na_2CO_3 , o qual poderia produzir CO_2 e prevenir a separação de fases. Depois da correção do pH, as amostras foram submetidas ao procedimento ELLAS e a fase orgânica foi coletada e analisada utilizando EFS.

Para avaliar a exatidão da metodologia, os lixiviados foram fortificados com dois níveis de concentrações de analitos e submetidos a toda metodologia ELLAS e, então, quantificados com o modelo PLS-2 construído previamente. As recuperações variaram de 74,3% a 105,8%, de acordo com os critérios estabelecidos nas normativas (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003). O RSD variou de 3,8 a 8,8% para os níveis de concentração 1, 2,2 a 6,7% para o nível 2 (Tabela 8). Naf apresentou a menor recuperação, de maneira geral, provavelmente devido às características das figuras de mérito obtidas para este composto, o que vai ao encontro dos resultados encontrados em outro estudo (ABDEL-AZIZ et al., 2014).

4.1.4.1 Estudo de interferência

O principal problema da ELLAS é a coextração de compostos que também são solúveis no solvente extrator. Assim, as fontes de interferências são moléculas que exibem espectro de fluorescência semelhante aos analitos de interesse. Devido à semelhança nas suas estruturas, testes realizados com as moléculas de fluoranteno, criseno, pireno e benz(a)antraceno não apresentaram mudanças observáveis visualmente no espectro de EFS dos HPAs analisados (conforme seção 3.5.1.1). Estes compostos apresentam quatro anéis em suas estruturas, o que diminui sua solubilidade em água (SVERDRUP et al., 2002). Assim, a presença destes HPAs no lixiviado em baixas concentrações não apresentará riscos à metodologia. De fato, o $\Delta\lambda$ fixo de 50 nm (EIROA et al., 1998) e o uso de acetonitrila como solvente (VALENTE et al., 2013) podem limitar a extensão das interferências resultantes de compostos coextraídos (PATRA e MISHRA, 2002).

Tabela 8 - Determinação de HPAs em amostras reais

HPA	Amostra de sedimento A			Amostra de sedimento B			Amostra de solo A			Amostra de solo B		
	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nível de fortificação		Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nível de fortificação		Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nível de fortificação		Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Nível de fortificação	
		Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)			Recuperação (%)	
		1 ^a	2 ^b		1 ^a	2 ^b		1 ^a	2 ^b		1 ^a	2 ^b
Naf	N.D. ^c	79,1	92,6	N.D.	76,3	78,9	0,332	74,3	102,2	N.D.	78,9	80,8
Ant	0,197	101,5	95,5	0,280	83,6	91,1	0,092	89,7	100,9	0,299	84,5	100
Fen	< MQL ^d	105,8	94,8	< MQL	90,6	94,3	0,351	92,8	101,5	0,191	93,4	94,6
Flu	0,042	103,1	99,1	0,032	92,3	87,6	0,017	92,5	100	0,014	94,6	96,5
Ace	0,434	102,7	98,7	0,302	92,7	94,8	0,219	94,9	100,3	0,201	81,2	97,2

Fonte: Do autor.

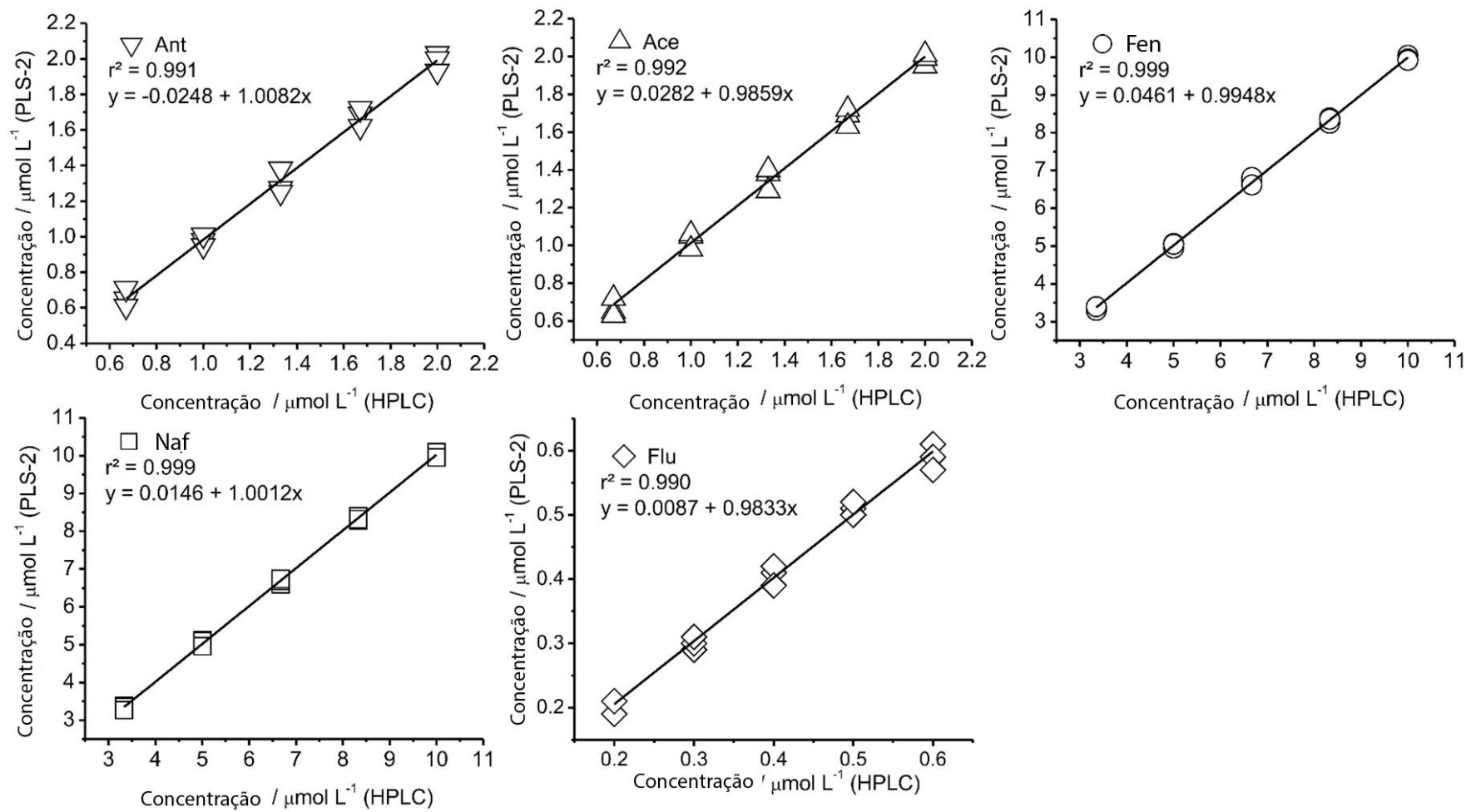
^a Concentrações das fortificações do nível 1 são 0,312 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Naf, 0,056 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Ant, 0,224 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Fen, 0,012 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Flu and 0,065 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Ace.

^b Concentrações das fortificações do nível 2 são 0,624 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Naf, 0,112 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Ant, 0,449 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Fen, 0,024 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Flu and 0,130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para Ace

^c Não detectado

^d Menor que o limite de quantificação multivariado

Figura 18 - Análise de regressão entre a metodologia proposta e de referência



Fonte: Do autor.

4.1.4.2 Metodologia de comparação

Um conjunto de amostras fortificadas com os HPAs foram simultaneamente analisados por um método cromatográfico (BUSETTI et al., 2006) tomado como referências e pela metodologia proposta neste trabalho. As análises de regressão (Figura 18) mostraram que ambos os métodos produziram resultados similares, já que as curvas de regressão mostraram inclinação e intercepto próximos de 1 e 0, respectivamente (FAJGELJ e AMBRUS, 2000). Esta conclusão foi amparada pela aplicação de um teste-t aos parâmetros de regressão (inclinação e intercepto) para um intervalo de confiança de 95% (MASSART et al., 1988). Todas as medidas foram realizadas em acetonitrila obtida após os procedimentos de extração das amostras fortificadas com concentrações conhecidas dos analitos (n = 3).

4.2 ANÁLISE DE QUATRO HPAS PRIORITÁRIOS DA UNIÃO EUROPEIA E DERIVADOS OXIGENADOS

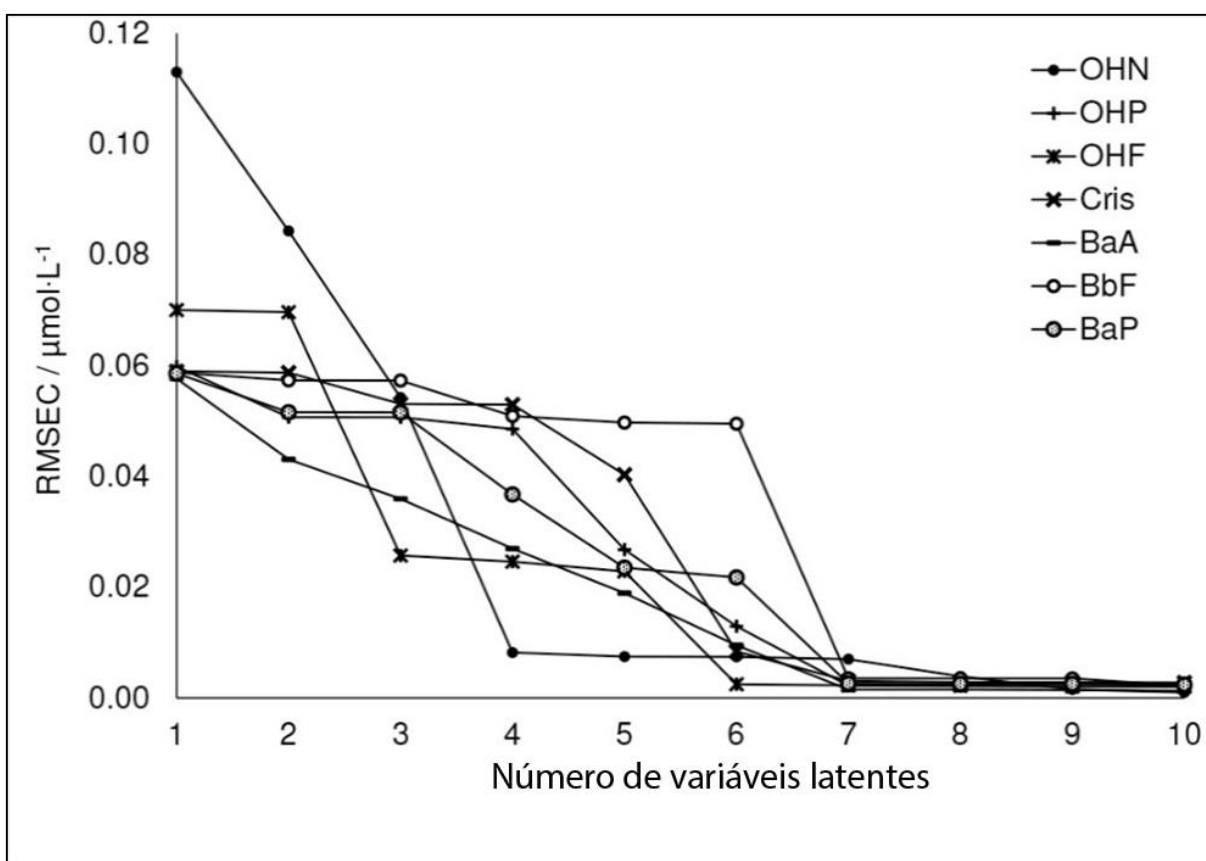
4.2.1 Criação de um modelo de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais

Os procedimentos realizados nesta etapa são semelhantes aos realizados para os HPAs de baixo peso molecular. Os conjuntos de calibração e predição incluíam 20 e cinco amostras, respectivamente. Todas estas eram misturas com composição conhecida (amostras artificiais). O design experimental (Tabela 3) consiste dos conjuntos de calibração e predição construídos com cinco níveis de concentração e 25 experimentos (BRERETON, 1997).

Utilizando um $\Delta\lambda$ de 100 nm foi possível evitar que a sobreposição entre as bandas dos analitos fosse completa. Desta forma, foi possível identificar a banda correspondente a cada analito obtendo uma boa intensidade fluorescente (Figura 19). Convém observar que durante a calibração de diversos analitos, a escolha de um $\Delta\lambda$ ótimo, onde todos os analitos tenham a melhor intensidade e distinção de picos, fica prejudicada. Desta maneira, a escolha deve levar em consideração o poder de resolução do método multivariado para fazer a identificação das bandas fluorescentes de acordo com cada analito. Assim, o modelo foi construído utilizando 210 pontos de dados obtidos da região espectral entre 190 – 400 nm com $\Delta\lambda$ de 100 nm como as variáveis X.

Os dados brutos foram centrados na média seguidos por validação cruzada (*leave-one-out*). O número de variáveis latentes foi definido seguindo a diminuição do RMSEC até um mínimo que não diferia significativamente do outro quando outra variável latente fosse adicionada. Este procedimento foi realizado tanto para minimizar o sobreajuste quanto a possibilidade de deixar informação importante fora do modelo. A variação do RMSEC contra o número de variáveis latentes (Figura 20) mostrou que sete PCs são suficientes para explicar quase 100% das variâncias.

Figura 19 - Variação do RMSEC em função das variáveis latentes



Fonte: Do autor

Tabela 9 - Características do modelo de calibração multivariada

Parâmetro	OHN	OHP	OHF	Cris	BaA	BbF	BaP
Faixa de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,139-0,624	0,046-0,229	0,055-0,274	0,044-0,219	0,044-0,219	0,040-0,198	0,040-0,198
Número de fatores	7	7	7	7	7	7	7
RMSEC ^a	0,0070	0,0022	0,0023	0,0031	0,0015	0,0036	0,0026
RMSEV ^b	0,0117	0,0035	0,0039	0,0050	0,0028	0,0062	0,0044
RMSEP ^c	0,0243	0,0027	0,0053	0,0021	0,0024	0,0038	0,0052
Intercepto	-0,0004	0,0003	0,0010	0,0008	0,0003	0,0007	0,0006
Inclinação	1,0033	0,9988	0,9946	0,9948	0,9985	0,9965	0,9987
Coefficiente de correlação	0,9960	0,9971	0,9975	0,9942	0,9983	0,9899	0,9953

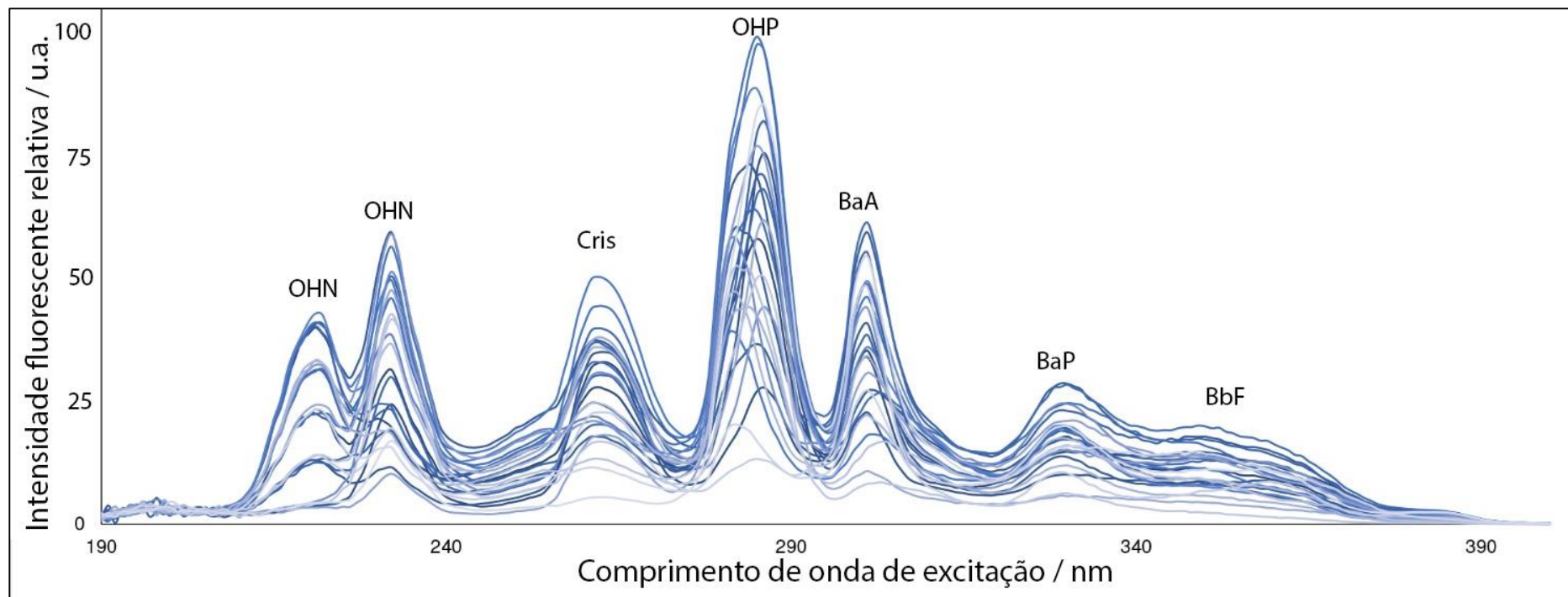
Fonte: Do autor.

Legenda: ^a Raiz do erro médio quadrático de calibração

^b Raiz do erro médio quadrático de validação

^c Raiz do erro médio quadrático de predição

Figura 20 - Sobreposição do EFS de 25 padrões de HPAs

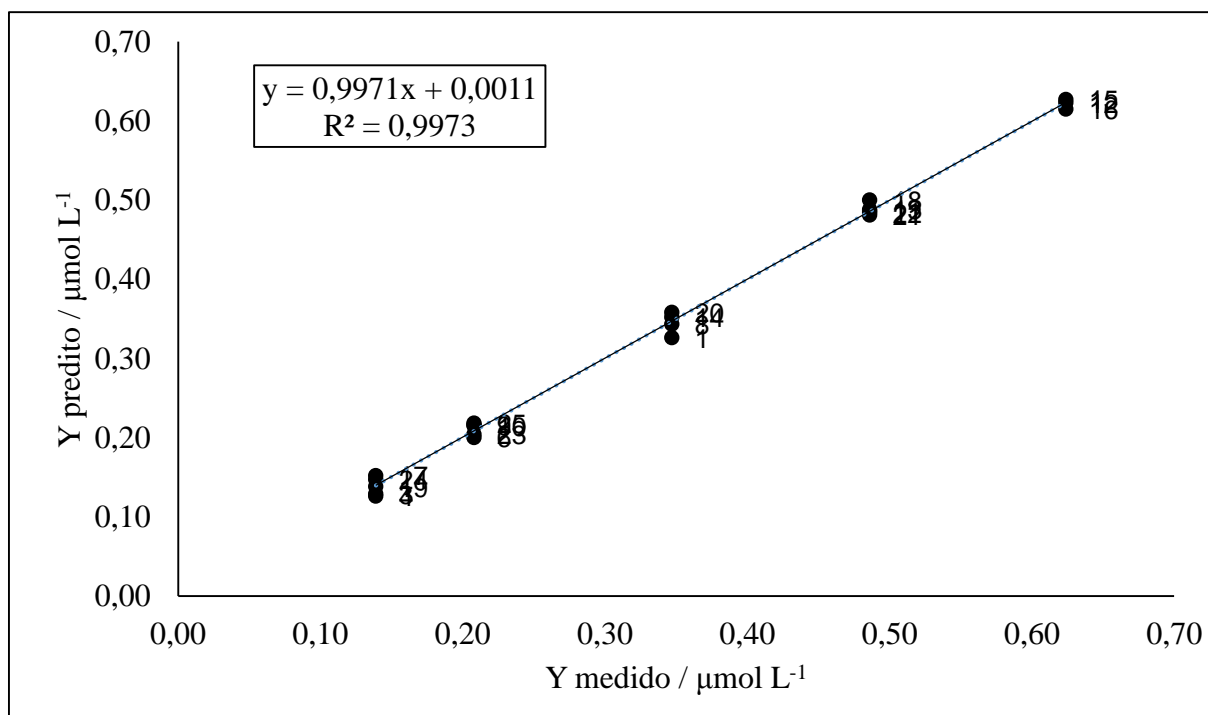


Fonte: Do autor.

O desempenho do modelo de calibração com sete PCs foi avaliado através da plotagem das concentrações verdadeiras e preditas (Tabela 9 e Figura 20). Todos os analitos mostraram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Dentre todos os analitos, o único que apresentou RMSEP maior que $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi o OHN, condizente com os valores de RMSEP encontrados para o HPA de origem, Naf. Os outros analitos apresentaram bons resultados, apresentando RMSE geral na ordem dos nmol L^{-1} , mostrando que o modelo criado é satisfatório para análise dos compostos de interesse.

Para validar o modelo, um conjunto independente de cinco amostras foi construído para cálculos de recuperação, conforme a Tabela 3. As recuperações médias variaram de 85,6 a 96,1 para OHN, 97,1% a 107,2% para OHP, 96,7% a 106,4% para OHF, 97,7% a 101,5% para Cris, 98,2% a 102,3% para BaA, 92,4% a 102,5% para BbF e 91,6% a 97,5% para BaP. Todas as recuperações estão de acordo com os valores propostos pelas agências reguladoras (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Figura 21 - Gráfico de concentrações preditas versus medidas para OHN



Fonte: Do autor.

5.1.3.1 Figuras de mérito

Da mesma forma que para os outros HPAs, aqui SEN e o MDL foram calculados. Os valores obtidos para estas figuras de mérito e os MQL, definido também como 3,3 MDL são mostrados na Tabela 10. É possível observar que as sensibilidades são razoavelmente similares entre todos os analitos estudados, exceto para o OHN. Este desvio está relacionado ao valor da norma euclidiana do vetor de coeficientes de regressão, que é menor que o encontrado para os outros analitos.

Tabela 10 - Figuras de mérito do método multivariado

Padrões	OHN	OHP	OHF	Cris	BaA	BbF	BaP
Sensibilidade	108,1	44,4	48,0	42,5	41,7	37,2	45,1
MDL ^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,004	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002
MQL ^b ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,141	0,042	0,048	0,061	0,034	0,076	0,053

Fonte: Do autor.

Legenda: ^a Limite de detecção multivariado

^b Limite de quantificação multivariado

O modelo se mostrou satisfatório de acordo com suas figuras de mérito e poderá ser aplicado em amostras futuras, assim como aquele desenvolvido para os HPAs-BPM

5 CONCLUSÃO

Na presente dissertação, criou-se uma metodologia para a análise de HPAs sem a necessidade de uma etapa de separação através de métodos cromatográficos. Para tanto, utilizou-se a calibração multivariada como ferramenta quimiométrica na análise dos referidos compostos.

A fluorescência síncrona foi utilizada para todos os analitos como ferramenta de obtenção de dados. Os espectros de fluorescência obtidos foram selecionados a partir de $\Delta\lambda$ capazes de oferecer a melhor resolução e sensibilidade. Todos os espectros obtidos foram tratados por metodologias quimiométricas devido a sobreposição dos espectros obtidos.

Duas metodologias de calibração multivariada foram criadas: uma para análise de HPAs-BPM e outra para análise de sete HPAs, quatro deles recomendados pela União Europeia e três derivados hidroxilados. Através da análise do desempenho das metodologias multivariadas, pode-se perceber que ambas se mostraram promissoras para a análise de amostras reais que tivessem apelo humano e ambiental. Ambas metodologias tiveram duas figuras de mérito avaliada, obtendo-se bons resultados.

Desta maneira, aplicou-se a primeira metodologia, referente a análise de cinco HPAs-BPM em amostras de solos e sedimentos. Para tanto, otimizou-se uma extração líquido-líquido assistida por *salting-out* que foi empregada em lixiviados aquosos obtidos a partir de amostras reais de solos e sedimentos. Diversos parâmetros foram estudados para otimização da ELLAS e todos levaram a resultados otimizados. De maneira geral, este método desenvolvido se mostrou de baixo custo e rápido, resultando em uma alternativa de baixo custo e rápida quando comparada com metodologias já estabelecidas.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, O.; EL KOSASY, A.; OKEIL, S. E.-S. Comparative study for determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons 'PAHs' by a new spectrophotometric method and multivariate calibration coupled with dispersive liquid-liquid extraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 119-129, 2014.
- ABNT, N. 10005: **Procedimento para Obtenção de Extrato lixiviado de Resíduos Sólidos**. Rio de Janeiro 2004.
- AKYÜZ, M.; ÇABUK, H. Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey. **Science of the total environment**, v. 408, n. 22, p. 5550-5558, 2010.
- ALARCÓN, F. et al. Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices. **Talanta**, v. 103, p. 361-370, 2013.
- ALGARRA, M. et al. Detection and quantification of PAH in drinking water by front-face fluorimetry on a solid sorbent and PLS analysis. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 382, n. 4, p. 1103-1110, 2005.
- ANVISA. **nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para Validação de Métodos Analíticos 2003.
- ARMSTRONG, B. et al. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. **Environmental health perspectives**, p. 970-978, 2004.
- ASTM, D. **4874. Standard Test Method for Leaching Solid in a Column Apparatus**. American Society for Testing and Materials, Annual Book of ASTM Standards. 11: 78-84 p. 1995.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de Química:- Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Bookman Editora, 2009.
- BAEK, S. et al. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. **Water, air, and soil pollution**, v. 60, n. 3-4, p. 279-300, 1991.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. Wiley-Interscience, 1998.
- BISPO, A.; JOURDAIN, M. J.; JAUZEIN, M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Organic Geochemistry**, v. 30, n. 8, p. 947-952, 1999.
- BOQUÉ, R.; LARRECHI, M.; RIUS, F. Multivariate detection limits with fixed probabilities of error. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 45, n. 1, p. 397-408, 1999.

BORTOLATO, S. A.; ARANCIBIA, J. A.; ESCANDAR, G. M. Chemometrics-Assisted Excitation– Emission Fluorescence Spectroscopy on Nylon Membranes. Simultaneous Determination of Benzo [a] pyrene and Dibenz [a, h] anthracene at Parts-Per-Trillion Levels in the Presence of the Remaining EPA PAH Priority Pollutants As Interferences. **Analytical chemistry**, v. 80, n. 21, p. 8276-8286, 2008.

BRERETON, R. G. Multilevel multifactor designs for multivariate calibration. **Analyst**, v. 122, n. 12, p. 1521-1529, 1997.

BUSETTI, F. et al. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. **Journal of chromatography A**, v. 1102, n. 1, p. 104-115, 2006.

CIECIERSKA, M.; OBIEDZIŃSKI, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bakery chain. **Food chemistry**, v. 141, n. 1, p. 1-9, 2013.

COTTIN, N.; MERLIN, G. Removal of PAHs from laboratory columns simulating the humus upper layer of vertical flow constructed wetlands. **Chemosphere**, v. 73, n. 5, p. 711-716, 2008.

DEBYE, P. J. W.; MACAULAY, J. **Das elektrische Feld der Ionen und die Neutralsalzwirkung**. Hirzel, 1925.

DU, D. et al. Salting-out induced liquid–liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6973-6980, 2014.

EIROA, A. A. et al. Simultaneous determination of 11 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by second-derivative synchronous spectrofluorimetry considering the possibility of quenching by some PAHs in the mixture. **Analyst**, v. 123, n. 10, p. 2113-2117, 1998.

ELGH-DALGREN, K. et al. Laboratory and pilot scale soil washing of PAH and arsenic from a wood preservation site: changes in concentration and toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2, p. 1033-1040, 2009.

ELOVAARA, E. et al. Assessment of soil remediation workers' exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): biomonitoring of naphthols, phenanthrols, and 1-hydroxypyrene in urine. **Toxicology letters**, v. 162, n. 2, p. 158-163, 2006.

ESBENSEN, K.; MIDTGAARD, T.; SCHÖNKOPF, S. **Multivariate Analysis in Practice: A Training Package**. Camo As, 1996.

EUROPEAN UNION, C. **Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. Brussels: European Commission 2001.

FAJGELJ, A.; AMBRUS, Á. **Principles and practices of method validation**. Royal Society of Chemistry, 2000.

- FARAJZADEH, M. A.; FERIDUNI, B.; MOGADDAM, M. R. A. Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction: Application for the extraction and preconcentration of widely used pesticides from fruit juices. **Talanta**, v. 146, p. 772-779, 2016.
- FERRER, R.; BELTRAN, J.; GUITERAS, J. Multivariate calibration applied to synchronous fluorescence spectrometry. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Talanta**, v. 45, n. 6, p. 1073-1080, 1998.
- FORSBERG, N. D. et al. Predicting polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in resident aquatic organisms using passive samplers and partial least-squares calibration. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 11, p. 6291-6299, 2014.
- GADE, B. et al. Determination of organic parameters in waste and leachates from the hazardous waste landfill of Raindorf; Germany. **Waste management & research**, v. 14, n. 6, p. 553-569, 1996.
- GOICOECHEA, H. C.; CALIMAG-WILLIAMS, K.; CAMPIGLIA, A. D. Multi-way partial least-squares and residual bi-linearization for the direct determination of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons on octadecyl membranes via room-temperature fluorescence excitation emission matrices. **Analytica chimica acta**, v. 717, p. 100-109, 2012.
- GROVER, P. K.; RYALL, R. L. Critical appraisal of salting-out and its implications for chemical and biological sciences. **Chemical reviews**, v. 105, n. 1, p. 1-10, 2005.
- HEALTH, U. S. D. O. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Ge., USA: 19 p. 1995.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. Belmont: Thomson, 2007.
- HUANG, L.; BATTERMAN, S. A. Multimedia model for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs in Lake Michigan. **Environmental science & technology**, v. 48, n. 23, p. 13817-13825, 2014.
- INMETRO. **008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos** 2003.
- JAIN, D. et al. Double-salting out assisted liquid–liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of temozolomide from biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 970, p. 86-94, 2014.
- KOLTSAKIDOU, A.; ZACHARIS, C. K.; FYTIANOS, K. A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid–liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, p. 46-54, 2015.
- KRÜGER, O. et al. Comparison of Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Solid Phase Microextraction (SPME) for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Complex Aqueous Soil Leachates. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 12, p. 1-9, 2015.

LENZI, E.; FAVERO, L. O. B. **Introdução à Química da Atmosfera: Ciência, vida e sobrevivência**. Grupo Gen-LTC, 2000.

LORBER, A.; FABER, K.; KOWALSKI, B. R. Net analyte signal calculation in multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 1620-1626, 1997.

LUNDSTEDT, S. et al. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 36, n. 6, p. 475-485, 2007.

MAHLER, B. J.; VAN METRE, P. C.; FOREMAN, W. T. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and azaarenes in runoff from coal-tar-and asphalt-sealcoated pavement. **Environmental Pollution**, v. 188, p. 81-87, 2014.

MASSART, D. L. et al. **Chemometrics: a textbook**. 1988.

MATKOVICH, C. E.; CHRISTIAN, G. D. Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system. **analytical Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 1915-1921, 1973.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 2005.

NASCIMENTO, P. C. et al. Simultaneous determination of Al (III) and Fe (III) in post-hemodialysis fluids by spectrophotometry and multivariate calibration. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 540-545, 2006.

NIELSEN, T.; SEITZ, B.; RAMDAHL, T. Occurrence of nitro-PAH in the atmosphere in a rural area. **Atmospheric Environment (1967)**, v. 18, n. 10, p. 2159-2165, 1984.

NORIN, M.; STRÖMVAIX, A. M. Leaching of organic contaminants from storage of reclaimed asphalt pavement. **Environmental technology**, v. 25, n. 3, p. 323-340, 2004.

OKPARANMA, R. N.; COULON, F.; MOUAZEN, A. M. Analysis of petroleum-contaminated soils by diffuse reflectance spectroscopy and sequential ultrasonic solvent extraction-gas chromatography. **Environmental Pollution**, v. 184, p. 298-305, 2014.

PATRA, D.; MISHRA, A. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 787-798, 2002.

PERERA, F. et al. DNA damage from polycyclic aromatic hydrocarbons measured by benzo [a] pyrene-DNA adducts in mothers and newborns from Northern Manhattan, the World Trade Center Area, Poland, and China. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 3, p. 709-714, 2005.

POJANA, G.; MARCOMINI, A. Determination of monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs) from wastewater-treatment plants. **International Journal of Environmental and Analytical Chemistry**, v. 87, n. 9, p. 627-636, 2007.

RAMOS, R. M.; VALENTE, I. M.; RODRIGUES, J. A. Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Talanta**, v. 124, p. 146-151, 2014.

RAZMARA, R. S.; DANESHFAR, A.; SAHRAI, R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid–liquid extraction. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 533-536, 2011.

SCHAUER, C.; NIESSNER, R.; PÖSCHL, U. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 13, p. 2861-2868, 2003.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of analytical chemistry**. Nelson Education, 2013.

SVERDRUP, L. E.; NIELSEN, T.; KROGH, P. H. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 11, p. 2429-2435, 2002.

UNIÃO; EUROPEIA. **Comission regulation setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. European Union: Official Journal of the European Union. 1881/2006 2006.

UNWIN, J. et al. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. **Annals of Occupational Hygiene**, v. 50, n. 4, p. 395-403, 2006.

USEPA. **Guidelines establishing test procedures for the Analysis of Pollutants**. Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency. 209 2002.

USEPA, T. **EPA method 1311**. Washington, US 1990.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, 2009.

VALENTE, I. M.; GONÇALVES, L. M.; RODRIGUES, J. A. Another glimpse over the salting-out assisted liquid–liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 1308, p. 58-62, 2013.

VAN PRAAGH, M.; MODIN, H.; TRYGG, J. Organic compounds in concrete from demolition works. **Waste Management**, v. 45, p. 186-193, 2015.

WANG, Y. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils and vegetation near an e-waste recycling site in South China: concentration, distribution, source, and risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 439, p. 187-193, 2012.

WASSENBERG, D. M.; DI GIULIO, R. T. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. **Environmental health perspectives**, p. 1658-1664, 2004.

WEHRENS, R. **Chemometrics with R: multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences**. Springer Science & Business Media, 2011.

WEN, Y. et al. Salting-out assisted liquid–liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 106, p. 119-126, 2013.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 227-345, 2004.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.

XIA, Q.; YANG, Y.; LIU, M. Aluminium sensitized spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in milk samples coupled with salting-out assisted liquid–liquid ultrasonic extraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 96, p. 358-364, 2012.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 6, p. 658-663, 2006.

ZHAO, X. et al. Homogeneous liquid–liquid extraction combined with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables. **Journal of separation science**, v. 32, n. 12, p. 2051-2057, 2009.

7 ANEXOS

7.1 ARTIGO PUBLICADO

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 173 (2017) 749–756



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Salting-out assisted liquid-liquid extraction and partial least squares regression to assay low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons leached from soils and sediments



Lucas P. Bressan, Paulo Cícero do Nascimento*, Marcella E.P. Schmidt, Henrique Faccin, Leandro Carvalho de Machado, Denise Bohrer

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97111-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2016
 Received in revised form 19 October 2016
 Accepted 20 October 2016
 Available online 21 October 2016

Keywords:

Salting-out assisted liquid-liquid extraction
 Synchronous fluorescence
 Polycyclic aromatic hydrocarbons
 Multivariate calibration
 Partial least squares
 Aqueous leachates

ABSTRACT

A novel method was developed to determine low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous leachates from soils and sediments using a salting-out assisted liquid-liquid extraction, synchronous fluorescence spectrometry and a multivariate calibration technique. Several experimental parameters were controlled and the optimum conditions were: sodium carbonate as the salting-out agent at concentration of 2 mol L^{-1} , 3 mL of acetonitrile as extraction solvent, 6 mL of aqueous leachate, vortexing for 5 min and centrifuging at 4000 rpm for 5 min. The partial least squares calibration was optimized to the lowest values of root mean squared error and five latent variables were chosen for each of the targeted compounds. The regression coefficients for the true versus predicted concentrations were higher than 0.99. Figures of merit for the multivariate method were calculated, namely sensitivity, multivariate detection limit and multivariate quantification limit. The selectivity was also evaluated and other polycyclic aromatic hydrocarbons did not interfere in the analysis. Likewise, high performance liquid chromatography was used as a comparative methodology, and the regression analysis between the methods showed no statistical difference (*t*-test). The proposed methodology was applied to soils and sediments of a Brazilian river and the recoveries ranged from 74.3% to 105.8%. Overall, the proposed methodology was suitable for the targeted compounds, showing that the extraction method can be applied to spectrofluorometric analysis and that the multivariate calibration is also suitable for these compounds in leachates from real samples.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of ubiquitous organic compounds that pose risks to human health due to their carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects [1]. They are mainly formed via incomplete combustion or pyrolytic processes involving fossil fuels. Such compounds are omnipresent pollutants in soil, air and water [2]. The US Environmental Protection Agency listed 16 PAHs as priority pollutants due to their health effects and their widespread presence in the environment [3]. Among these PAHs, a sub-class is formed by those that have only two or three benzene rings in their structure and, due to their low mass, are called low molecular weight PAHs (LMW-PAHs). These compounds present an acute toxicity when compared to other PAHs containing more rings [4].

A leachate can be produced from solid wastes and analyzed to reveal the presence of PAHs in the environment originating from different

sources such as asphalt pavements, fossil fuels and natural combustion processes [5–10]. There are several leaching tests that can be applied to the analysis of these pollutants including batch tests in which the sample is submitted to a constant agitation with the extractor [11] and columns tests in which a flow of the extractor passes through a column containing the sample [12], using either organic solvents or an aqueous solution as the extractor. The latter is more suitable to reproduce a naturally occurring phenomenon where only a fraction of these pollutants will be leached from the waste material. Aqueous leachates can be obtained naturally when water passes through a solid material and liberates chemical compounds that have been previously attached to it by chemical or physical processes. Because soils and sediments can absorb PAHs into their organic constituents, they can also leach those materials into a nearby water source such as a lake or a river when there is heavy precipitation, and that poses serious environmental concerns [13]. Therefore, analyzing such materials can be a good indicator of the contamination level of a determined location [14]. The leachate obtained after the extraction of soils and sediments often presents undesired characteristics such as turbidity, high organic material content and

* Corresponding author.
 E-mail address: pcn1954@gmail.com (P.C. do Nascimento).

high levels of salt [5]. To circumvent these problems, extraction procedures should be applied to the leachate.

Salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) can be a good choice for analyzing PAHs in aqueous samples. This procedure is based on changing the ionic strength of the mixture by adding salt to an aqueous mixture containing a miscible organic solvent. Ideally, when the phase separation occurs the analytes of interest migrate toward the organic phase. SALLE can be used in combination with UV-Vis and fluorescence spectrometry [15,16] although special attention must be paid to the presence of co-extracted unwanted species. In many cases, liquid chromatography must be used to separate interferences following the SALLE methodology [17–20].

Synchronous fluorescence spectrometry (SFS) can be used along with SALLE, because in SFS the spectra obtained from a mixture are simplified by setting a fixed difference between the excitation and emission wavelengths during the data acquisition [21], narrowing the spectral bands and producing spectral data that can be easily analyzed afterward. This technique was already applied to the analysis of PAHs using solid-phase extraction to overcome the interferences that would arise from the sample preparation [22].

Separation techniques are often time consuming. To circumvent this problem, multivariate methods can be used instead, exploiting the powerful resolution of the models for quantifications in complex mixtures [23]. Several multivariate methods—such as partial least squares regression (PLS-R) [22,24–27], unfolded partial least squares (U-PLS) [28,29], multi-way partial least squares (N-PLS) [30] and unsupervised component analysis (UCA) [31]—have been applied to the measurement of different compounds in complex mixtures. These methodologies differ in complexity and application, being PLS-R suitable for the analysis of PAHs.

In the present work, the combination of SALLE-SFS methodology was investigated for the measurement of naphthalene (Naph), phenanthrene (Phen), anthracene (Ant), fluorene (Flu) and acenaphthene (Ace). For the extraction procedure a range of experimental parameters were investigated and PLS-R (PLS-2 method) was used to quantify simultaneously the targeted compounds. The methodology was applied to real aqueous leachates obtained from soil and sediment samples from the medium Xingú River, an Amazonian river in Brazil. To the best of our knowledge, this work presents the first methodology combining SALLE procedure, SFS and PLS-2 for the simultaneous determination of LMW-PAHs in aqueous leachate.

2. Experimental

2.1. Reagents and Solutions

All reagents used were of analytical grade or higher. Naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluorene, acenaphthene, fluoranthene, chrysene, pyrene and benz(a)anthracene were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The salts NaCl, CH₃COONa, Na₂SO₄, NH₄Cl,

(NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ and Na₂CO₃ were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Stock solutions of PAHs (1000 mg L⁻¹) were prepared by dissolving the proper amounts in acetonitrile. All of the solutions were stored in amber glass flasks at -30 °C. Working solutions of PAHs were prepared by diluting the stock solutions.

2.2. Instrumental and Synchronous Fluorescence Conditions

All the fluorometric measurements were performed with a commercial Agilent Cary Eclipse Fluorescence spectrometer (Santa Clara, United States) with a 1 cm quartz cuvette. The software Agilent Cary Eclipse Scan controlled the operation of the instrument as well as the spectra acquisition. During the measurements the slit widths were set to 2.5 nm for both excitation and emission and the photomultiplier voltage was fixed at 900 V. The synchronous fluorescence spectra were recorded in the excitation range of 200 and 450 nm with a wavelength difference $\Delta\lambda$ of 50 nm. In total, 250 data points were collected and imported to the software Unscrambler, Version 6.11 (CAMO A/S, Trondheim, Norway; available at www.camo.com) to perform the chemometric modeling.

2.3. Sampling

The samples were collected in two different regions of the medium Xingú River: Bom Jardim (Sediment and soil samples A; S07°00'11,3" W 052°25'06,7") and Canopus (Sediments and soil samples B; S 06°49'42,8" W 052°00'19,7"), due to their distinct history of contamination. Samples A come from an area with low anthropological contact close to aboriginal reserves. Samples B come from an area that is close to cassiterite mining sites.

In this study, one soil sample and one sediment sample from each site were used in the analysis. The soil samples were collected with a manual collector of the core type; 20 cm of the vertical profile were removed and stored in transparent plastic bags. The sediment samples were collected with a Van Veen dredge and stored in transparent plastic bags as well. In the laboratory, the samples were transferred to paper bags, labeled and dried at 50 °C to remove excess water. The samples were then stored in desiccators at room temperature with no vacuum applied until the analysis.

2.4. Extraction Procedure and Sample Preparation

The soil and sediment samples were subjected to aqueous batch-leaching tests according to the Environmental Protection Agency test method EPA 1311 [32]. All the samples presented 100% content of solids and grinding was not needed. After that, each sample was weighted to an exact mass of 5 g and transferred to clean glass flasks. Then,

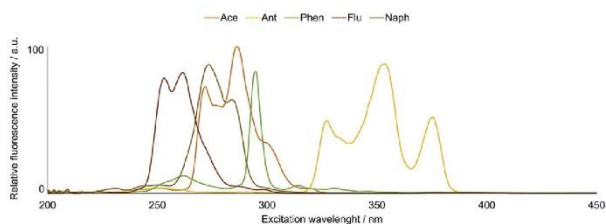


Fig. 1. Synchronous fluorescence spectra $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ naphthalene, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ phenanthrene, $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ fluorene, $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ acenaphthene and $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ anthracene. Excitation wavelength from 200 nm to 450 nm, $\Delta\lambda$ 50 nm.

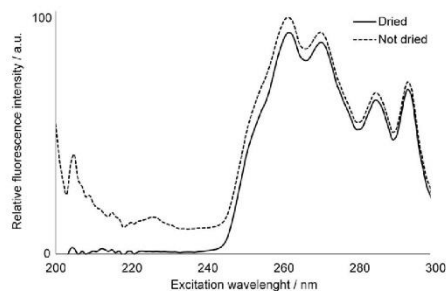


Fig. 2. Synchronous fluorescence spectra of a mixture of PAHs in acetonitrile after SALLE procedure. Solid and dashed lines match to samples dried and not dried (with MgSO_4), respectively.

100 mL of an extraction solution of acetate buffer with a pH of 4.93 was added to the samples; all the flasks were then sealed and subjected to agitation in a rotatory agitator at 18 rpm for 24 h. The agitation was stopped and the solid was allowed to settle, followed by filtration with a $0.7 \mu\text{m}$ glass fiber filter. The pH of the aqueous leachate was measured and corrected to a value of 8–9 with $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ solution. The leachate was then stored at 4°C until the analysis.

2.5. SALLE Procedure

For the optimization of the SALLE procedure, an aqueous leachate produced from a blank soil sample spiked with five different LMW-PAHs was used, assuring that it contained no more than 3% (v/v) of the organic solvents from the stock solutions of the analytes.

An aliquot of 6 mL of each aqueous sample (blank or spiked) was transferred into a 15 mL glass centrifuge tube with conical bottom. Then, 1.27 g (2 mol L^{-1}) of Na_2CO_3 was added to the tube and a gentle agitation was applied to ensure that the salt would dissolve. Next, 3 mL of acetonitrile was transferred to the tube and it was sealed with a PTFE film. The mixture was then vortexed for 5 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. A portion of 1.5 mL from the obtained acetonitrile was transferred to a cuvette and 1.5 mL of acetonitrile was added. The sample was then ready for analysis.

2.6. Multivariate Calibration

A total of 20 samples were used as a calibration set to build the PLS-2 models, and five samples were used as an independent prediction set.

The root mean squared error (RMSE) was determined for the calibration (RMSEC), validation (RMSEV) and prediction (RMSEP) sets, according to the equation.

$$\text{RMSE} = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N} \right]^{1/2}$$

where \hat{y}_i and y_i are the predicted and the known analyte concentration, respectively, and N is the number of mixtures involved in the data set. For the calculations, calibrations samples ($N = 20$) were used for RMSEC, as well as prediction samples ($N = 5$) were used for RMSEP. The model validation was done by cross-validation leave-one-out.

2.7. Comparison Method

High pressure liquid chromatography (HPLC) was used as a comparison method, using the procedure described by Busetti, et al. [33] with no further modifications. The samples were analyzed by both the comparative method and the proposed method after the extraction. All the samples analyzed were spiked with the desired concentrations.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of Synchronous Fluorescence Conditions

Synchronous fluorescence spectroscopy is a technique in which the difference between the excitation (λ_{ex}) and the emission wavelengths (λ_{em}) is kept constant during the measurements of the fluorescence spectra. As pointed out by Patra [21], this methodology allows the narrower spectral bands while also simplifying the emission spectra, which is particularly good for multivariate analysis because the size of the dataset decreases significantly compared to excitation vs. emission matrices.

This technique has been applied to the analysis of complex mixtures as it allows the identification of target compounds by the variation of the wavelength interval ($\Delta\lambda$) where high values of $\Delta\lambda$ result in sensitive broad signals and low values of $\Delta\lambda$ result in less sensitive peaks with a sharper profile [34]. Four of the targeted PAHs presented strongly overlapping spectra, namely Naph, Flu, Ace and Phen. Based on a previous study [35], initial tests were performed to assess the best wavelength

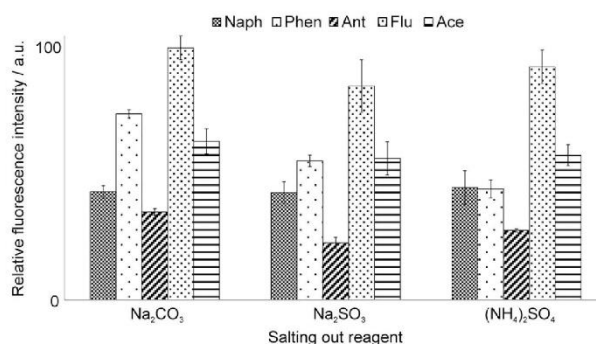


Fig. 3. Effect of the salting-out reagents in the fluorescence intensity of low molecular weight PAHs ($n = 3$) after submitted to the extraction procedure. Experimental conditions: see text.

interval; the better distinction between peaks was obtained with a wavelength interval of 50 nm. This lower value of $\Delta\lambda$ is especially suitable for LMW-PAHs because the optimum difference between the excitation and emission wavelengths increases with the number of rings. Fig. 1 shows the SFS of Naph, Phen, Flu, Ace and Ant at concentrations of 10, 10, 0.5, 2 and 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, when an offset of 50 nm was applied in the range of 200–450 nm for the excitation wavelength (Fig. 1); overlapped spectra appeared for the first four compounds, while Ant presented fluorescence in a more distinct region.

3.2. Optimization of the SALLE Conditions

3.2.1. Organic Solvent and Salting-out Agent

The SALLE efficiency depends on differences in the affinities of the analytes between organic and aqueous phases. Hence, the choice of an organic solvent miscible in the water phase before the addition of the salting-out agent is mandatory for an effective extraction. Usually, solvents as acetonitrile, methanol and acetone are used. Zhao, et al. [36] pointed out that acetonitrile was the most suitable extraction solvent when compared with acetone and methanol for the analysis of PAHs in vegetables, as higher extraction yields are obtained. Similarly, Koltsakidou, et al. [37] also used acetonitrile as extraction solvent to assay PAHs in honey. Other studies involving different analytes and media [15,16,19,20,38] also identified acetonitrile as the best organic solvent for SALLE. Therefore, acetonitrile was used in the present work.

Some salts were tested to evaluate whether they would promote phase separation. The concentration of these salts in water was set at 1 mol L^{-1} and the volumes of water and acetonitrile were 6 and 3 mL, respectively. The tested salts were NaCl, CH_3COONa , Na_2SO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , Na_2CO_3 and Na_2HPO_4 . Among them only Na_2SO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Na_2CO_3 adequately separated the phases. Although some other salts also promoted phase separation, the volume of acetonitrile obtained was not enough for a proper manipulation. The experimental results obtained in this work are in agreement with other studies [17,39] that found anions contribute the most to phase separation. Anions such as SO_3^{2-} , CO_3^{2-} and SO_4^{2-} induced better phase separation compared to anions such CH_3COO^- , Cl^- , HPO_4^{2-} and NO_3^- . The cations did not play a major role.

For the optimization of the extraction process, we assumed that all of the PAH content should migrate completely from the aqueous solution to the organic phase. This assumption was used until a proper recovery study was done after the optimization of the methodology. In all cases, fluorescence intensity values were normalized for the evaluations.

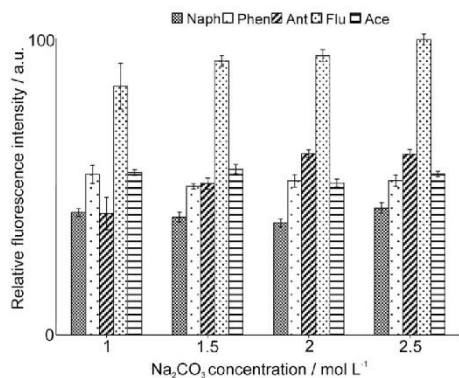


Fig. 4. Effects of the salting-out reagent concentration in the fluorescence intensity of low molecular weight PAHs ($n = 3$) after submitted to the extraction procedure. Experimental conditions: see text.

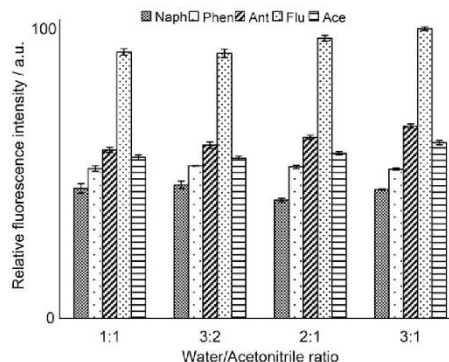


Fig. 5. Effect of the ratio between water and acetonitrile in the fluorescence intensity of low molecular weight PAHs ($n = 3$) after submitted to the extraction procedure. Experimental conditions: see text.

Indeed, this procedure was used aiming to correct the differences in volumes of phase separation observed in many cases.

Preliminarily, during the water-acetonitrile phase separation procedure, an interfering cloudy solution was observed in the quartz cuvette. Therefore, a drying step with 0.5 g of MgSO_4 was introduced in the acetonitrile phase. The secant was maintained for 2 min in contact with acetonitrile and decanted before the measurements by SFS. Measurements in the cloudy-free acetonitrile showed low noise and a spectrum with well-separated bands (Fig. 2). Alternatively, the drying step could be easily eliminated by increasing the concentration of the salting out agent.

Fig. 3 shows the relative intensities of the five PAHs measured by SFS ($n = 3$) after the SALLE procedure. The relative intensities show that Na_2CO_3 promotes better yields than the other salts, as well as better phase separation based on the obtained volume of acetonitrile phase.

Table 1
Concentration of each analyte in different mixtures used as the calibration and prediction sets.

Mixture no.	Naph ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ant ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Phen ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Flu ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ace ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1 ^a	0.468	0.084	0.337	0.018	0.097
2 ^a	0.468	0.028	0.112	0.030	0.065
3 ^a	0.156	0.028	0.561	0.012	0.162
4 ^a	0.156	0.140	0.224	0.030	0.097
5 ^a	0.780	0.056	0.561	0.018	0.065
6	0.312	0.140	0.337	0.012	0.065
7	0.780	0.084	0.224	0.012	0.130
8	0.468	0.056	0.224	0.024	0.162
9	0.312	0.056	0.449	0.030	0.130
10	0.312	0.112	0.561	0.024	0.097
11	0.624	0.140	0.449	0.018	0.162
12	0.780	0.112	0.337	0.030	0.162
13	0.624	0.084	0.561	0.030	0.032
14	0.468	0.140	0.561	0.006	0.130
15	0.780	0.140	0.112	0.024	0.032
16	0.780	0.028	0.449	0.006	0.097
17	0.156	0.112	0.112	0.018	0.130
18	0.624	0.028	0.337	0.024	0.130
19	0.156	0.084	0.449	0.024	0.065
20	0.468	0.112	0.449	0.012	0.032
21	0.624	0.112	0.224	0.006	0.065
22	0.624	0.056	0.112	0.012	0.097
23	0.312	0.028	0.224	0.018	0.032
24	0.156	0.056	0.337	0.006	0.032
25	0.312	0.048	0.112	0.006	0.162

^a Prediction set.

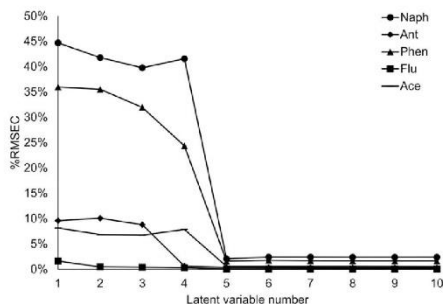


Fig. 6. %RMSEC to assess the optimum number of latent variables.

The volumes of the collected organic phase were 2.4 ± 0.1 , 2.2 ± 0.1 and 1.7 ± 0.1 mL for Na_2CO_3 , Na_2SO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectively, when 3 mL of acetonitrile was added to 6 mL of the aqueous phase. Additionally, Na_2CO_3 resulted in lower standard deviations compared to the other salts.

To assess the influence of pH on the phase separation, extraction assays in the absence of Na_2CO_3 were done at pH levels ranging from 1 to 13, changing at unitary intervals. The visual inspection of phase separation showed no changes associated with pH.

3.2.2. Sodium Carbonate Concentration

In this step, the concentration of the Na_2CO_3 solution was changed from 0.5 to 2.5 mol L^{-1} . In general terms, the higher the salt concentration, the more intense the relative fluorescence will be (Fig. 4). The ionic strength varied from 1.50 to 7.50 mol L^{-1} based on the concentration of Na_2CO_3 , so that different volumes of the acetonitrile phase were also obtained. Indeed, except for the concentration of 0.5 mol L^{-1} , the other concentrations produced volumes of organic phase very close to the added 3 mL of acetonitrile. Among them, the Na_2CO_3 concentration of 2 mol L^{-1} was found to present the best compromise between phase separation yields and promptness of salt dissolution. Moreover, Na_2CO_3 is a non-harmful, cheap reagent, which brings advantages to the proposed methodology.

3.2.3. Water/Acetonitrile Ratio

In these tests, the volume of the aqueous phase was kept constant at 6 mL and the volume of acetonitrile in the mixtures was changed to obtain water/acetonitrile ratios of 1:1, 3:2, 2:1 and 3:1. The Na_2CO_3 concentration was fixed at 2 mol L^{-1} .

The 3:1 ratio of water/acetonitrile showed better results in extraction due to the higher signal intensity obtained. However, the ratio of 2:1 was used, because a higher volume of acetonitrile allows a better experimental manipulation when transferring the extract to the cuvette,

Table 2

Validation parameters for the optimized model built with PLS-2 regression.

Parameter	Naph	Ant	Phen	Flu	Ace
Concentration range ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.156–0.780	0.028–0.140	0.112–0.561	0.012–0.060	0.032–0.162
Number of factors	5	5	5	5	5
RMSEC ^a	0.0061	0.0010	0.0051	0.0001	0.0019
RMSEV ^b	0.0091	0.0014	0.0071	0.0002	0.0025
RMSEP ^c	0.0167	0.0020	0.0225	0.0004	0.0036
Offset	0.0029	0.0002	0.0019	0.0000	0.0006
Slope	0.9930	0.9986	0.9943	0.9991	0.9948
Correlation coefficient	0.9983	0.9987	0.9980	0.9995	0.9975

^a Root mean square error of calibration ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

^b Root mean square error of validation ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

^c Root mean square error of prediction ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Table 3
Figures of merit.

Figures of merit	Naph	Ant	Phen	Flu	Ace
Sensitivity	16.10	177.4	23.59	610.0	95.94
MDL (nmol L^{-1})	40.3	5.8	48.7	0.99	10.0
MQL (nmol L^{-1})	133.0	19.14	160.7	3.27	33.0

minimizing volume loss or the uptake of water into the pipette tip (Fig. 5).

To speed up the phase separation, a sample vortexing time of 5 min was adopted [40] followed by a centrifugation time at 4000 rpm during 5 min [37].

3.3. Multivariate Method

In a first approach, the calibration model was built by using more concentrated standards since the photomultiplier voltage was set at 600 V. However, the obtained sensitivity was not high enough to assay the analytes in the targeted samples. This problem was easily overcome by setting the photomultiplier voltage at 900 V (see Section 2.2). This strategy did not increase the background as well as no additional pre-concentration steps were necessary.

We tested the calibration techniques available in the software used. Among them, PLS-2 was used for the calibrations because it showed better results than MCR (multiple components regression), PCR (partial components regression) and PLS-1, in terms of prediction ability. Additionally, PLS-2 is recommended for strong overlapped spectra [35], as well as it offers the advantage of simultaneous modeling of all Y variables with the reduction of processing time [23]. The calibration and prediction sets included 20 and five samples, respectively. All of these samples were mixtures with known compositions (artificial samples). The experimental design (Table 1) comprises calibration and prediction sets built with five concentration levels and 25 experiments [39].

Because strongly overlapped spectra were observed for Naph, Phen, Flu and Ace, PLS-2 regression was used for the quantifications. The model was built using the 250 data points obtained from the spectral range of 200–450 nm with $\Delta\lambda$ of 50 nm as the X-variables.

The raw data was mean-centered followed by cross validation (leave-one-out). The number of latent variables was set following the decrease of the root mean squared error of calibration (RMSEC) to a point where the minimum was reached and did not significantly differ from the next when another latent variable was added. This was done to minimize both overfitting and the possibility of leaving out important information for the modeling. The variation of RMSEC against the number of latent variables (Fig. 6) shows that five principal components (PCs) are enough to explain nearly 100% of variances.

The performance of the calibration model with five PCs was assessed by plotting true and predicted concentrations (Table 2). All analytes showed correlation coefficients higher than 0.99. Naph and Phen are the analytes with the lowest calculated sensitivities and highest multivariate detection limit (MDL) and multivariate quantification limits

Table 4
Determination of PAHs in samples from Xingú River, Brazil.

PAH	Sediment sample A			Sediment sample B			Soil sample A			Soil sample B		
	Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fortification level recovery (%)		Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fortification level recovery (%)		Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fortification level recovery (%)		Found ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fortification level recovery (%)	
		1 ^a	2 ^b		1	2		1	2		1	2
Naph	N.D. ^c	79.1	92.6	N.D.	76.3	78.9	0.332	74.3	102.2	N.D.	78.9	80.8
Ant	0.197	101.5	95.5	0.280	83.6	91.1	0.092	89.7	100.9	0.299	84.5	100
Phen	<LOQ ^d	105.8	94.8	<LOQ	90.6	94.3	0.351	92.8	101.5	0.191	93.4	94.6
Flu	0.042	103.1	99.1	0.032	92.3	87.6	0.017	92.5	100	0.014	94.6	96.5
Ace	0.434	102.7	98.7	0.302	92.7	94.8	0.219	94.9	100.3	0.201	81.2	97.2

^a Level 1 spiked concentrations are 0.312 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Naph, 0.056 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Ant, 0.224 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Phen, 0.012 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Flu and 0.065 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Ace.

^b Level 2 spiked concentrations are 0.624 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Naph, 0.112 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Ant, 0.449 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Phen, 0.024 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Flu and 0.130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Ace.

^c Not detected.

^d Below quantification limit.

(MQL), defined in Section 3.3.1, as well as the highest RMSE overall, which can be explained by the low sensitivity obtained by fluorescence spectrometry for these compounds and their strong spectral overlap with each other.

To validate the model, an independent set of five samples was built for recovery calculations. The mean recoveries ranged from 89.1% to 98.3% for Naph, 89.9% to 102.4% for Ant, 88.9% to 97.9% for Phen, 95.1% to 100.2% for Flu and 94.5% to 97.5% for Ace.

3.3.1. Figures of Merit

Sensitivity (SEN) and MDL are important figures of merit for multivariate models. Although there are several methods for calculating each of these parameters, the work by Lorber, et al. [41] was used considering the definition of sensitivity, as $\text{SEN} = 1/\|\mathbf{b}\|$, where $\|\mathbf{b}\|$ is the Euclidian norm of the PLS regression vector obtained after building the multivariate model. The MDL was calculated according to the work of Boqué, et al. [42] from the expression $\text{MDL} = \Delta(\alpha, \beta) \text{var}(\mathbf{c}, \mathbf{k})^{1/2}$, where $\Delta(\alpha, \beta)$ is the non-centrality parameter of a non-central t-distribution. The values used in this work were $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.05$. The term $\text{var}(\mathbf{c}, \mathbf{k})^{1/2}$ accounts for the estimation of variance at a concentration

level of zero. The calculated values for these figures of merit and the MQL, defined as 3.3 MDL, are shown in Table 3. It is possible to see that Naph and Phen are the analytes with the lowest sensitivity as well as the highest MDL, which is due to their lowest signal responses when using synchronous fluorescence spectrometry and their strongly overlapping spectra.

3.4. Analysis of Soil and Sediment Samples from Xingú River

The sediments and soils collected were submitted to a leaching batch test according to the EPA 1311 procedure [32]. The overall methodology is described in Section 2.4. Because the samples were collected from areas where industrial activity has intensified in the last decades, they were treated as waste even though they did not come directly from a source of pollution. Moreover, the direct leaching of PAHs using solvents was not applied, as the present work aimed to measure the low-weight PAHs that would leach from the soil or sediments by water. Although the scope of this work did not stress the contamination level of the area, the methodology showed to be promising to assess

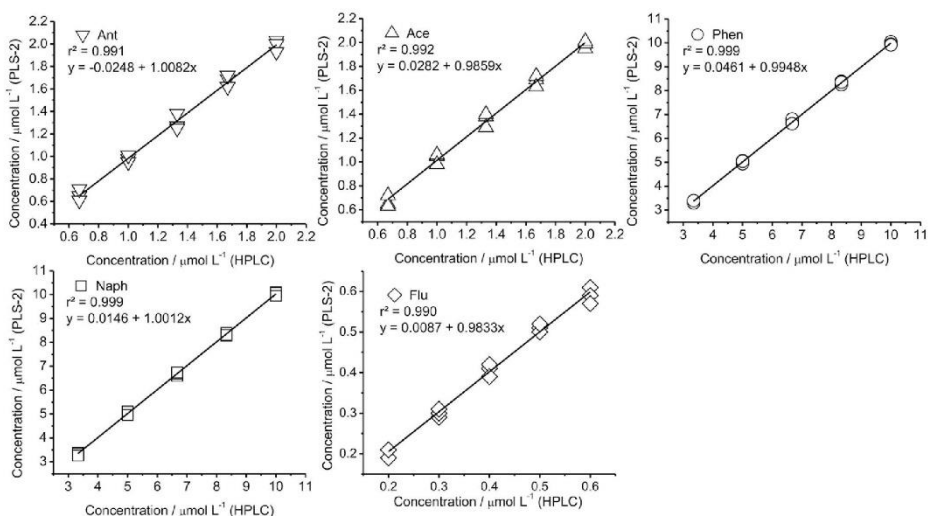


Fig. 7. Regression analysis of the low molecular weight PAHs determined by HPLC and the presented method in spiked samples after the extraction procedure ($n = 3$).

human impact in areas where the anthropological activity is prominent, leading to contamination of such area with PAHs.

None of the soil and sediment samples were found to produce basic solutions when tested for pH and the extraction solution employed was the acetate buffer pH 4.93. Then, all the samples were submitted to the procedure described in Section 2.4.

The pH of the obtained samples was then corrected to values above neutrality as they were going to be submitted to the SALLE procedure that involves the use of the basic salt Na_2CO_3 , which would otherwise produce CO_2 and prevent phase separation from occurring. After the pH correction, the samples were submitted to the SALLE procedure and the organic phase collected was analyzed using SFS.

To assess the accuracy of the methodology the leachates were spiked with two different concentration levels of the analytes, subjected to the whole SALLE methodology, and quantified by the PLS-2 model built before. Recoveries ranged from 74.3% to 105.8% (Table 4). A sample was chosen randomly and a series of five replications was performed for each analyte concentration. The RSD ranged from 3.8 to 8.8% for the concentration level 1 and 2.2 to 6.7% for level 2. Naph presented the lowest recovery of all, probably due to the low values for figures of merit presented, which is in accord with another study [25].

3.5. Interference Study

The main problem arising from the SALLE procedure is the coextraction of compounds also soluble in the extraction solvent. This way, the sources of interference are molecules exhibiting similar fluorescence spectra. Due to the similarity of structure, fluoranthene, chrysene, pyrene and benz(a)anthracene were added to the aqueous phase prior to extraction at a concentration of $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$, and no differences in the SFS spectra of the analyzed PAHs were visually observed. These compounds present four rings in their structure, which decreases their water solubility [43]. Therefore, the presence of those PAHs in the leachate in low concentrations will not present interference risks to the methodology. Indeed, the fixed $\Delta\lambda$ of 50 nm [44] and the use of acetonitrile as solvent [17] can limit the extent of interference resulting from coextracted compounds as other PAHs [21].

3.6. Validation

A set of samples spiked with the PAHs were simultaneously analyzed by a liquid chromatographic method [33] taken as reference and by the method proposed in this work. Regression analysis (Fig. 7) showed that both methods produced similar results, as the regression curves showed slope and intercept around 1 and 0, respectively [45]. This conclusion was supported by applying the *t*-test to the regression parameters (slope and intercept) for a confidence interval of 95% [46]. All the measurements were performed on the acetonitrile obtained after the extraction procedure spiked with known concentrations of the analytes ($n = 3$).

4. Conclusion

In this study, a method of SALLE was developed using Na_2CO_3 as the salting-out agent and acetonitrile as the organic solvent for the determination of five LMW-PAHs in leachates from soils and sediments from the Amazonian river Xingú. The extracted solvent was analyzed using SFS and multivariate calibration (PLS-2) to overcome the interference caused by strongly overlapping spectra. Parameters affecting the extraction efficiency were evaluated and optimized to obtain the strongest fluorescence signal for the LMW-PAHs.

The results presented in this work show that the proposed methodology using salting-out assisted liquid-liquid extraction together with synchronous fluorescence spectrometry and partial least squares regression for the determination of LMW-PAHs in aqueous leachates is a

simple, sensitive and time-saving method for analyzing these compounds in the environment with good precision and accuracy.

Acknowledgments

This study was supported by National Council of Technological and Scientific Development – CNPq (process 103744/2015-0), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – Fapergs*. The authors also thank Lilian Amado and Danielle Ribeiro for supplying the samples used in this study.

References

- [1] ATSDR, Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA: U.S., 1995
- [2] S.O. Baek, R.A. Field, M.E. Goldstone, P.W. Kirk, J.N. Lester, R. Perry, A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior, *Water Air Soil Pollut.* 60 (1991) 279–300.
- [3] US Environmental Protection Agency, Guidelines establishing test procedures for the analysis of pollutants. Proposed Regulations. Federal Register, Vol 49, (No 209), USEPA, Washington, DC.
- [4] B.J. Mahler, P.C. Van Metre, W.T. Foreman, Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and azarenes in runoff from coal-tar- and asphalt-sealcoated pavement, *Environ. Pollut.* 188 (2014) 81–87.
- [5] O. Krüger, S. Olberg, R. Senz, F.-G. Simon, Comparison of Stir Bar Sorptive Extraction (SBSSE) and Solid Phase Microextraction (SPME) for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in complex aqueous soil leachates, *Water Air Soil Pollut.* 226 (2015) 1–9.
- [6] K. Elgh-Dalgreen, Z. Arwidsson, A. Camdzija, R. Sjöberg, V. Ribe, S. Waara, B. Allard, T. von Kronhelm, P.A. van Hees, Laboratory and pilot scale soil washing of PAH and arsenic from a wood preservation site: changes in concentration and toxicity, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1033–1040.
- [7] N. Cottin, G. Merlin, Removal of PAHs from laboratory columns simulating the humus upper layer of vertical flow constructed wetlands, *Chemosphere* 73 (2008) 711–716.
- [8] M. Norin, A.M. Stromvall, Leaching of organic contaminants from storage of reclaimed asphalt pavement, *Environ. Technol.* 25 (2004) 323–340.
- [9] B. Gade, M. Layh, H. Westermann, N. Amsonit, Determination of organic parameters in waste and leachates from the hazardous waste landfill of Rindorf, Germany, *Waste Manag. Res.* 14 (1996) 553–569.
- [10] M. Van Praagh, H. Modin, J. Trygg, Organic compounds in concrete from demolition works, *Waste Manag. Res.* 45 (2015) 186–193.
- [11] ISO, Soil quality – Leaching procedures for subsequent chemical and ecotoxicological testing of soil and soil materials, TS 21268–1, International Standardization Organization, Geneva, Switzerland, 2007.
- [12] ASTM, Standard Test Method for Leaching Solid Material in a Column Apparatus, D4874–95, ASTM International, West Conshohocken, PA, USA, 2014.
- [13] P.A. White, L.D. Claxton, Mutagens in contaminated soil: a review, *Mutat. Res.* 567 (2004) 227–345.
- [14] A. Bispo, M.J. Jourdain, M. Jauzein, Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Org. Geochem.* 30 (1999) 947–952.
- [15] R.S. Razmara, A. Daneshfar, R. Sahrai, Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid-liquid extraction, *J. Ind. Eng. Chem.* 17 (2011) 533–536.
- [16] Q. Xia, Y. Yang, M. Liu, Aluminium sensitized spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in milk samples coupled with salting-out assisted liquid-liquid ultrasonic extraction, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 96 (2012) 358–364.
- [17] I.M. Valente, L.M. Gonçalves, J.A. Rodrigues, Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures, *J. Chromatogr. A* 1308 (2013) 58–62.
- [18] R.M. Ramos, I.M. Valente, J.A. Rodrigues, Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *Talanta* 124 (2014) 146–151.
- [19] D. Jain, R. Athawale, A. Bajaj, S. Shrikhande, Double-salting out assisted liquid-liquid extraction (SALLE) HPLC method for estimation of temozolomide from biological samples, *J. Chromatogr. B* 970 (2014) 86–94.
- [20] D. Du, G. Dong, Y. Wu, J. Wang, M. Gao, X. Wang, Y. Li, Salting-out induced liquid-liquid microextraction based on the system of acetonitrile/magnesium sulfate for trace-level quantitative analysis of fluoroquinolones in water, food and biological matrices by high-performance liquid chromatography with a fluorescence detector, *Anal. Methods* 6 (2014) 6973.
- [21] D. Patra, A.K. Mishra, Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 787–798.
- [22] M. Algarra, V. Jimenez, P.F. de Violet, M. Lamotte, Detection and quantification of PAH in drinking water by front-face fluorimetry on a solid sorbent and PLS analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1103–1110.
- [23] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109–130.
- [24] N.D. Forsberg, B.W. Smith, G.J. Sower, K.A. Anderson, Predicting polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in resident aquatic organisms using passive samplers and partial least-squares calibration, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 6291–6299.

- [25] O. Abdel-Aziz, A.M. El Kosasy, S.M. El-Sayed Okeil, Comparative study for determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a new spectrophotometric method and multivariate calibration coupled with dispersive liquid-liquid extraction, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 133 (2014) 119–129.
- [26] R.N. Okparanma, F. Coulon, A.M. Mouazen, Analysis of petroleum-contaminated soils by diffuse reflectance spectroscopy and sequential ultrasonic solvent extraction-gas chromatography, *Environ. Pollut.* 184 (2014) 298–305.
- [27] P.C. Nascimento, C.I. Jost, M.V. Guterres, L.D.D. Fabro, L.M. de Carvalho, D. Bohrer, Simultaneous determination of Al(III) and Fe(III) in post-hemodialysis fluids by spectrophotometry and multivariate calibration, *Talanta* 70 (2006) 540–545.
- [28] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8276–8286.
- [29] F. Alarcon, M.E. Baez, M. Bravo, P. Richter, G.M. Escandar, A.C. Olivieri, E. Fuentes, Feasibility of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils via unfolded partial least-squares/residual bilinearization and parallel factor analysis of fluorescence excitation emission matrices, *Talanta* 103 (2013) 361–370.
- [30] H.C. Goicoechea, K. Calimag-Williams, A.D. Campiglia, Multi-way partial least-squares and residual bi-linearization for the direct determination of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons on octadecyl membranes via room-temperature fluorescence excitation emission matrices, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 100–109.
- [31] J.C. Pereira, J.C. Azevedo, H.G. Knapik, H.D. Burrows, Unsupervised component analysis: PCA, POA and ICA data exploring - connecting the dots, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 165 (2016) 69–84.
- [32] EPA US, Toxicity characteristic leaching procedure, EPA SW 846 Method 1311, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 1992.
- [33] F. Busetti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 104–115.
- [34] F. De Almeida Brehm, J.C. de Azevedo, J. da Costa Pereira, H.D. Burrows, Direct estimation of dissolved organic carbon using synchronous fluorescence and independent component analysis (ICA): advantages of a multivariate calibration, *Environ. Monit. Assess.* 187 (2015) 703.
- [35] R. Ferrer, J.L. Beltran, J. Guiteras, Multivariate calibration applied to synchronous fluorescence spectrometry. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Talanta* 45 (1998) 1073–1080.
- [36] X. Zhao, X. Liu, Z. Zhao, C. Huang, M. Zhang, H. Wang, X. Wang, Homogeneous liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2051–2057.
- [37] A. Koltakidou, C.K. Zacharis, K. Fytianos, A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent, *Journal of Chromatography A* 1377 (2015) 46–54.
- [38] M.A. Farajzadeh, B. Feriduni, M.R. Afshar Mogaddam, Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction: application for the extraction and preconcentration of widely used pesticides from fruit juices, *Talanta* (2015).
- [39] Y. Zhang, P.S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 658–663.
- [40] Y. Wen, J. Li, F. Yang, W. Zhang, W. Li, C. Liao, L. Chen, Salting-out assisted liquid-liquid extraction with the aid of experimental design for determination of benzimidazole fungicides in high salinity samples by high-performance liquid chromatography, *Talanta* 106 (2013) 119–126.
- [41] A. Lorber, K. Faber, B.R. Kowalski, Net analyte signal calculation in multivariate calibration, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1620–1626.
- [42] R. Boqué, M.S. Larrecchi, F.X. Rius, Multivariate detection limits with fixed probabilities of error, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 45 (1999) 397–408.
- [43] L.E. Sverdrup, T. Nielsen, P.H. Krogh, Soil Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2429–2435.
- [44] A. Andrade Eiroa, E. Vázquez Blanco, P. López Mahía, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodríguez, Simultaneous determination of 11 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by second-derivative synchronous spectrofluorimetry considering the possibility of quenching by some PAHs in the mixture, *Analyst* 123 (1998) 2113–2117.
- [45] A. Fajgelj, A. Ambrus, Principles and Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2000.
- [46] S.N.D.D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.