

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**DETECÇÃO E DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DE
ACRILAMIDA RESIDUAL EM ÁGUA PARA
CONSUMO HUMANO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Suzan Costa Zilli

Santa Maria, RS, Brasil

2015

DETECÇÃO E DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DE ACRILAMIDA RESIDUAL EM ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

Suzan Costa Zilli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Área de Concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Civil.**

Orientador: Prof. Dr. Elvis Carissimi

Co-orientadora: Profa. Dr^a. Tânia Mara Pizzolato

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**DETECÇÃO E DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DE ACRILAMIDA
RESIDUAL EM ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO**

elaborada por
Suzan Costa Zilli

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Civil

COMISSÃO EXAMINADORA:

Elvis Carissimi, Dr.
(Presidente/Orientador)

Martha Fogliato S. Lima Richter, Dr^a. (UFRGS)

Delmira Beatriz Wolff, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 25 de março de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à vida, pela oportunidade e pelas condições favoráveis para conclusão dessa etapa.

À minha família, pelo incentivo ao estudo desde sempre.

Ao meu orientador professor Dr. Elvis Carissimi pela confiança em mim depositada, pela parceria, dedicação, incentivo e palavras de conforto nas situações mais difíceis.

À minha co-orientadora professora Dr^a Tânia Mara Pizzolato, pela fundamental contribuição, acolhimento, ensinamentos, dedicação e boas risadas.

Ao Laboratório de Química Analítica Ambiental do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob coordenação da professora Dr^a. Tânia Mara Pizzolato, por toda infraestrutura laboratorial indispensável para a elaboração do trabalho.

À colaboradora Jéssica Martini, por todo comprometimento com as atividades práticas de laboratório e disposição em todo momento de necessidade. Obrigada pelo cuidado e dedicação.

Ao técnico Alexandre Dallegrove do LQAA, por todo ensinamento sobre cromatografia, tempo dispendido na pesquisa e disposição para meus questionamentos.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela infraestrutura disponibilizada para a realização das atividades.

À CAPES pelo incentivo financeiro através de bolsa de estudos e à FAPERGS pelo financiamento deste estudo através do Projeto nº 12/2291-8.

Aos meus colegas de curso do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, especialmente a Lueni Terra, pelo companheirismo e bons momentos.

E por fim, mas não menos importante, ao meu esposo, Bruno Justo de Moraes, meu maior incentivador e apoiador, meu companheiro de jornada e de vida. Obrigada pelo amor de sempre.

Enfim, a todos aqueles que participaram direta ou indiretamente contribuindo para a realização deste trabalho e que não foram aqui nominalmente citados.

RESUMO GERAL

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

DETECÇÃO E DEGRADAÇÃO FOTOQUÍMICA DE ACRILAMIDA RESIDUAL EM ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

Autora: SUZAN COSTA ZILLI

Orientador: ELVIS CARISSIMI
Co-orientadora: TÂNIA MARA PIZZOLATO

Data e Local da Apresentação: Santa Maria, 25 de março de 2015.

A acrilamida é um monômero utilizado principalmente para produção de poliacrilamidas, auxiliares de floculação empregadas em sistemas de abastecimento de água. Embora sua forma polimérica não represente riscos à saúde, a Organização Mundial da Saúde alerta para a presença de residuais de acrilamida nos floculantes, o que seria responsável por liberar esse contaminante na água tratada. Acrilamida é considerada como provavelmente carcinogênica para humanos, e tem seu padrão para água potável estabelecido em $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ no Brasil e nos Estados Unidos da América, e de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ na Europa. Diante da preocupação da possibilidade de ingestão de água potável com a presença de acrilamida e da falta de monitoramento constante desse parâmetro, o objetivo desse trabalho foi avaliar a aplicação de processos fotolíticos para degradação da acrilamida e desenvolver metodologia analítica capaz de quantificar a acrilamida em níveis traço, baseado no valor de referência brasileiro. O estudo foi realizado seguindo-se as seguintes etapas: (I) desenvolvimento de reator fotolítico de bancada no Laboratório de Engenharia do Meio Ambiente - LEMA, na Universidade Federal de Santa Maria – UFSM; (II) realização de testes iniciais de fotólise direta (UV), fotólise conjugada com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂) e uso de peróxido de hidrogênio no reator construído; (III) desenvolvimento de análise de acrilamida na faixa de $0,5$ a 5 mg L^{-1} via cromatografia a líquido com detecção por ultravioleta para acompanhamento da degradação, no Laboratório de Química Analítica Ambiental – LQAA, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – IQ-UFRGS; (IV) adequação dos parâmetros de degradação e realização dos testes finais de fotólise com reator de lâmpada resfriada, bem como análise dos resultados e avaliação da cinética de degradação, no LQAA; (V) definição de parâmetros para escolha do método mais adequado de extração em fase sólida para acrilamida; e (VI) adequação da metodologia de análise de acrilamida via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta para uma menor faixa de concentração e validação do método. Os resultados demonstraram que a acrilamida é lentamente degradada via fotólise direta ($k = 0,0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e, praticamente, de forma instantânea quando se adiciona peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂), embora,

isoladamente, o peróxido não tenha qualquer efeito. Quanto ao método de EFS, de acordo com a literatura, o carvão ativo é o mais eficiente sólido para concentração de acrilamida. Assim, foi utilizado cartucho de carvão ativo para essa etapa, obtendo-se uma recuperação satisfatória de 72 % de acrilamida. O método desenvolvido via CLAE-UV demonstrou bons resultados quanto aos parâmetros de validação em soluções padrão. No entanto, os resultados não foram tão bons quando esta metodologia (EFS-CLAE-UV) foi aplicada à amostra real fortificada, provavelmente pela presença de grande quantidade de interferentes na água potável, aliada à grande solubilidade da acrilamida e dificuldade da sua retenção. A melhoria dessas condições analíticas deve ser pretendida a fim de tornar viável a utilização do método para análise de acrilamida em água potável.

Palavras-chave: fotólise; cinética de degradação; peróxido de hidrogênio; radiação uv; cromatografia a líquido.

DETECTION AND PHOTOCHEMICAL DEGRADATION OF ACRYLAMIDE IN WATER

GENERAL ABSTRACT

The acrylamide monomer is used mainly for the production of polyacrylamides, flocculation aids used in water supply systems. While its polymeric form does not pose health risks, the World Health Organization warns of the presence of residual acrylamide in flocculants, which would be responsible for releasing this contaminant in tap water. Acrylamide is considered as probably carcinogenic to humans, and has its standard for drinking water set at $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ in Brazil and in the United States, and $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ in Europe. Given the concern of the possibility of drinking water intake with the presence of acrylamide and lack of constant monitoring of this parameter, the objective of this study was to evaluate the application of photolytic processes for degradation of acrylamide and develop analytical methodology to quantify the acrylamide levels in trait, based on the Brazilian benchmark. The study was conducted following up the following steps: (I) development of bench photolytic reactor in Engineering Laboratory of Environment - LEMA, the Federal University of Santa Maria - UFSM; (II) conducting initial tests of direct photolysis (UV) photolysis combined with hydrogen peroxide (UV / H_2O_2) and use of hydrogen peroxide in the built reactor; (III) acrylamide analysis of development in the range of 0.5 to 5 mg L^{-1} via liquid chromatography with ultraviolet detection for monitoring the degradation in Environmental Analytical Chemistry Laboratory - LQAA, from the Chemistry Institute of the Federal University of Rio Grande do Sul - IQ-UFRGS; (IV) adequacy of degradation parameters and carrying out final tests of photolysis with lamp cooled reactor and analysis of results and preparation of the degradation kinetics, the LQAA; (V) defining parameters for most appropriate method of solid phase extraction to acrylamide; and (VI) adequacy of liquid chromatography via acrylamide analysis methodology of high efficiency with ultraviolet detection for a lower concentration range and validation of the method. The results demonstrated that acrylamide is slowly degraded via direct photolysis ($k = 0.0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and almost instantaneously when adding hydrogen peroxide (UV/ H_2O_2), although alone peroxide has no effect. As for the method SPE according to the literature, active carbon is the most efficient for solid concentration of acrylamide. Thus, activated carbon was used cartridge for this step to give a satisfactory recovery of 72% acrylamide. The method developed via HPLC-UV showed good results as to the validation parameters of standard solutions. Same quality was not obtained when evaluated SPE-HPLC-UV conjunction with real fortified sample, probably due to the large number of possible interferences present in drinking water, coupled with the high solubility of acrylamide and difficulty of retention. The improvement of these analytical conditions should be required to make feasible the use of this method for the analysis of drinking water.

Keywords: photolysis; degradation kinetics; hydrogen peroxide; UV radiation; liquid chromatography.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos	11
ARTIGO 1 - Degradação de acrilamida por processos de fotólise direta (UV) e fotólise conjugada (UV/H ₂ O ₂)		
Resumo.....		
1	INTRODUÇÃO	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1	Reagentes	16
2.2	Acompanhamento da degradação via CLAE/UV	16
2.3	Testes preliminares para degradação de AA.....	17
2.4	Experimentos de degradação	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1	Definição dos parâmetros para detecção de acrilamida via CLAE-UV	20
3.2	Degradação da AA por processos fotolíticos.....	24
3.2.1	Degradação da AA por fotólise conjugada (UV/H ₂ O ₂).....	24
3.2.2	Degradação da AA por fotólise direta (UV).....	26
3.2.3	Degradação da AA com H ₂ O ₂	29
3.2.4	Discussão da cinética de degradação da acrilamida	29
3.3	Processos de fotólise e fotocatalise em outros sistemas	31
4	CONCLUSÃO	32
ARTIGO 2 – Determinação de acrilamida em água potável por cromatografia líquida com detecção por ultravioleta		
37		
1	INTRODUÇÃO	39
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	Reagentes e equipamentos.....	41
2.2	Análise Instrumental.....	41
2.2.1	Análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	41
2.2.2	Análise por cromatografia a líquido com detector de Ultra-violeta/Visível (CLAE-UV)	41
2.3	Coleta e preparo da amostra.....	42
2.4	Etapa de concentração: extração em fase sólida	42
2.5	Validação do método.....	43
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1	Condições da análise instrumental	44
3.1.1	Cromatografia a gás com detecção por espectrômetro de massas	44
3.1.2	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta/visível	46
3.2	Ajuste das condições de extração em fase sólida	48
3.3	Validação do método.....	51
4	CONCLUSÃO	54
AGRADECIMENTOS.....		
54		
REFERÊNCIAS		
55		
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

4	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
	APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

A criação de novos processos e produtos, se por um lado torna mais cômoda a vida dos seres humanos, por outro tem sido responsável pelo aumento de substâncias tóxicas às quais acabam sendo expostos todos os seres. Dentre essas substâncias, há um grupo denominado de desreguladores endócrinos (DE), definido como substâncias capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo, que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos. Por todo o planeta, populações de diversas espécies têm sofrido com efeitos nocivos atribuídos aos DE, principalmente em relação ao sistema de reprodução e de desenvolvimento de cânceres.

Inúmeros desreguladores endócrinos estão presentes no dia-a-dia da população humana, desde em materiais plásticos de mamadeiras para crianças, a detergentes e tecidos domésticos. Exemplos são os agrotóxicos, fármacos, retardadores de chama, inseticidas, dentre um grande número de substâncias. Embora qualquer exposição a esses compostos seja potencialmente prejudicial, há de se dar a devida importância à água distribuída à população, visto que a água captada dos mananciais detém uma carga considerável de substâncias que não são eliminadas no processo de tratamento convencional. Além desta carga, o próprio processo de tratamento pode ser responsável por adicionar um desregulador endócrino na água tratada, pela adição de polímeros floculantes sintetizados contendo acrilamidas.

A acrilamida é um monômero que, quando polimerizado, é utilizado como auxiliar de floculação nas Estações de Tratamento de Água (ETA). Estudos recentes comprovaram a ação tóxica e carcinogênica desse monômero, que está presente mesmo na forma polimerizada. Considerando os riscos associados, faz-se necessária a investigação de uma metodologia capaz de eliminá-los. De acordo com alguns autores, processos oxidativos avançados são recomendados para degradar os desreguladores endócrinos orgânicos. O objetivo principal deste trabalho foi a aplicação de processos fotolíticos, fotólise direta e combinada, em soluções aquosas contendo acrilamida. Também foi desenvolvida metodologia de detecção da acrilamida em água potável via cromatografia líquida com detecção por ultravioleta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi investigar a eficiência de aplicação da fotólise direta e conjugada para degradação de acrilamida em solução aquosa e definição de metodologia analítica via cromatografia a líquido.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a eficiência de degradação de acrilamida via processo de fotólise direta e fotólise conjugada;
- Estabelecer metodologia analítica apropriada para acompanhamento da degradação da acrilamida e avaliação da cinética de degradação;
- Definir metodologia de análise adequada para determinação de níveis traço de acrilamida em água potável via cromatografia líquida com detecção por ultravioleta.

ARTIGO 1 - Degradação de acrilamida por processos de fotólise direta (UV) e fotólise conjugada (UV/H₂O₂)

Resumo

Poliacrilamidas são empregadas em estações de tratamento de água como auxiliar de floculação na etapa de clarificação da água bruta. Embora eficiente no seu propósito, há a possibilidade de liberação de acrilamida residual na água, motivo de apreensão considerando a classificação dessa como “possivelmente carcinogênico” para humanos. Dessa forma, esse estudo avaliou a ação de processos fotolíticos sobre a acrilamida, monômero residual das poliacrilamidas. Foram empregados fotólise direta (UV), fotólise conjugada com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂) e peróxido de hidrogênio isoladamente em fotorreator com lâmpada resfriada. As soluções de acrilamida utilizadas foram preparadas em água ultrapura. Foram monitorados pH, temperatura e a concentração de acrilamida na solução em intervalos de tempo definidos. O monitoramento da concentração de acrilamida se deu pelo acompanhamento da área do pico cromatográfico, via metodologia desenvolvida de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (CLAE-UV). A fotólise direta resultou em degradação total da acrilamida após 360 minutos de experimento, com constante cinética de ordem zero igual a $k = 0,0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. A fotólise conjugada, além de degradar rapidamente a acrilamida (tempo < 5min), resultou na formação de subprodutos. A utilização de peróxido de hidrogênio isoladamente não demonstrou qualquer alteração significativa na concentração de acrilamida. A avaliação dos resultados obtidos permite a conclusão de que, no caso da fotólise direta, espécies reativas intermediárias de oxigênio são os agentes atuantes na degradação. Na presença de peróxido, a radiação é capaz de dissociar a molécula do oxidante e gerar radicais HO• que atacam a molécula de acrilamida. A metodologia de quantificação de acrilamida via CLAE-UV apresentou boa linearidade na faixa de trabalho e permitiu o bom monitoramento da concentração de acrilamida durante a degradação.

Palavras-chave: poliacrilamida; processos oxidativos avançados; cinética de degradação; cromatografia a líquido.

ARTICLE 1 – Acrylamide degradation by direct photolysis (UV) and combining photolysis (UV/H₂O₂)

Abstract

Acrylamide (AA) is a monomer used mainly in the production of polyacrylamides used as flocculation aid in water treatment plants. This study evaluated the action of photolytic processes on acrylamide, polyacrylamides residual monomer applied for water treatment systems. It were employed direct photolysis (UV) photolysis combined with hydrogen peroxide (UV/ H₂O₂) and hydrogen peroxide alone in a photoreactor with a cold lamp. The acrylamide solutions used were prepared in ultrapure water. Temperature, pH and the concentration of acrylamide in the solution at set time intervals were monitored. Monitoring the concentration of acrylamide was due to the monitoring of the chromatographic peak area, via developed methodology of high performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV). Direct photolysis resulted in complete degradation of acrylamide after 360 minutes of experiment under constant zero-order kinetics equal to $k = 0.0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. The combined photolysis, resulted in formation of by-products and degraded quickly acrylamide (time <5 minutes). The use of hydrogen peroxide alone showed no significant change in the concentration of acrylamide. The evaluation of the results support the conclusion that in the case of direct photolysis, intermediate reactive oxygen species are agents active in degradation. In the presence of peroxide, radiation is able to dissociate the molecule and generate oxidant OH[•] radicals which attack the acrylamide molecule. The methodology of HPLC-UV via acrylamide quantification showed good linearity in the working range and allowed the proper monitoring of acrylamide concentration during degradation.

Keywords: polyacrylamide; advanced oxidation processes; degradation kinetics; liquid chromatography.

1 INTRODUÇÃO

A acrilamida (AA) é um sólido cristalino de cor branca, de fórmula molecular C_3H_5NO , cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1. A maioria da acrilamida produzida é usada como monômero na produção de poliacrilamida, a qual é empregada como floculante para clarificação de água potável, assim como de efluentes industriais e sanitários (World Health Organization, WHO, 2011). Ambas as substâncias, seja na forma mono ou polimérica, foram inseridas na listagem de compostos químicos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (Environmental Protection Agency, US.EPA, 2012) para serem triados e avaliados com relação ao seu potencial de desregulação endócrina.

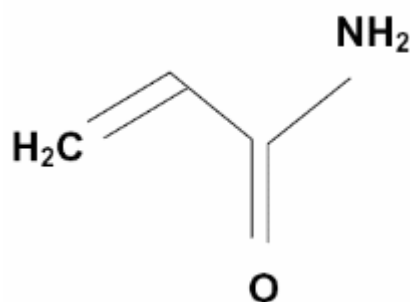


Figura 1 – Fórmula molecular da acrilamida.

Atualmente, a fonte de contaminação por acrilamida da água para consumo humano de maior relevância é o uso de polímeros de poliacrilamidas como coagulante, que contem níveis residuais do monômero (WHO, 2011 e DEARFIELD et al., 1995). Em estações de tratamento convencionais, o polímero facilita o processo de clarificação da água já que, por efeitos de adsorção e formação de pontes intermoleculares de partículas em suspensão, é possível formar agregados maiores que são mais facilmente separados do meio (BIGGS et al., 2000).

Assim, a acrilamida é um contaminante residual do processo de tratamento de água. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em geral, a concentração máxima de polímero autorizada é 1 mg L^{-1} . Sabendo-se que o conteúdo de monômero é cerca de 0,05%, a concentração máxima teórica de monômero na água tratada seria de $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2011). Em função disso, é recomendado como limite máximo permitido a concentração de $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de acrilamida em água potável. O risco de

câncer associado a essa concentração é de 10^{-5} , o que representa um caso de câncer por 100.000 habitantes ingerindo água com a concentração de referência por um período de 70 anos (WHO, 2011). A legislação brasileira segue a recomendação da WHO, conforme determinado pela Portaria do Ministério da Saúde nº 2914 de 2011 (BRASIL, 2011).

Pesquisas com objetivo de avaliar os efeitos da acrilamida em ratos de laboratório são realizadas desde a década de 1980, com resultados que comprovam sua toxicidade, principalmente nas funções cerebrais, com interferência em neurotransmissores (BOND et al., 1981; ALI, 1983; AGRAWAL et al., 1981). Paralelamente, outros pesquisadores comprovaram, em laboratório, o efeito carcinogênico da substância (BULL et al., 1984; JOHNSON et al., 1986). Embora a principal preocupação, à época, fosse a exposição à acrilamida de trabalhadores durante a produção de polímeros ou na construção civil (com seu uso para impermeabilização de estruturas), já era levantada a hipótese de que a poli(acrilamida) utilizada no tratamento de água poderia, também, representar riscos à saúde humana ao consumir a água tratada (BULL, 1985). Em humanos, sabe-se que o metabólito da acrilamida (glicidamida) forma um epóxido reativo com o DNA, o que confere potencial genotóxico (KIRMAN et al. 2003 apud SOARES, 2007).

Métodos de tratamento para eliminação residual da acrilamida da água ou do esgoto não são empregados, bem como não há registro de estudos que investiguem a remoção ou degradação da mesma. Nesse sentido, os processos oxidativos avançados (POA) tornam-se uma tecnologia promissora para o tratamento de efluentes contendo compostos orgânicos de difícil biodegradabilidade (AYOUB et al., 2010; BILA E DEZOTTI, 2007), tais processos podem agir sobre a AA e transformá-la em compostos menos perigosos, ou mesmo, mineralizá-la completamente.

Os POAs representam um grupo de processos químico-oxidativos caracterizado pela geração de radicais hidroxila (HO^{\bullet}), que são os mais fortes oxidantes após o flúor e capazes de oxidar e mineralizar quase todas as moléculas orgânicas a dióxido de carbono e íons inorgânicos (ESPLUGAS et al., 2007). Tais tecnologias são, inclusive, recomendadas pela Associação Americana de Trabalho sobre Água como técnicas mais efetivas para a remoção de concentrações traços de desreguladores endócrinos (AWWARF, 2007).

Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi investigar a eficiência dos processos de fotólise direta (UV) e conjugada com peróxido de hidrogênio (UV/ H_2O_2)

na degradação da acrilamida em solução aquosa, bem como definir método de acompanhamento dessa degradação via cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ultravioleta (CLAE-UV).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Acrilamida (99%) e catalase (de fígado bovino) (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio PA 30% (Merck) foram empregados nos processos de degradação. Água ultrapura utilizada para soluções e fase móvel foi obtida por sistema Milli-Q (Integral 5). Acetonitrila e Metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich) também empregados como fase móvel para análise cromatográfica.

2.2 Acompanhamento da degradação via CLAE/UV

O acompanhamento da degradação da acrilamida foi realizado via monitoramento da área do pico cromatográfico em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (modelo LC-20AD) acoplado a detector por UV-VIS (modelo SPD-20A) no Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química da UFRGS (IQ-UFRGS) (Figura 2). A separação cromatográfica ocorreu em coluna C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) (Thermo Scientific) com fase móvel composta por (A) água (60%) e (B) acetonitrila (40%) em modo isocrático com vazão 0,8 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL e o tempo total de análise de 7 minutos. Para detecção, utilizou-se comprimento de onda de 210 nm. Antes da injeção, amostras foram filtradas em filtro de seringa PTFE 0,45 µm (Vertical Chromatography). Quando oriunda do processo UV/H₂O₂, a mesma recebeu uma pequena dose de catalase para consumo do peróxido de hidrogênio residual antes da filtração.



Figura 2 - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu modelo LC-20AD acoplado a detector por UV-VIS modelo SPD-20A. Laboratório de Análises Ambientais, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.3 Testes preliminares para degradação de AA

Foram realizados experimentos de fotólise direta, de fotólise com peróxido de hidrogênio (UV/H₂O₂) e apenas com peróxido de hidrogênio, com solução aquosa de concentração inicial 15 mg L⁻¹ de acrilamida. Para isso, foi utilizado reator de bancada do Laboratório de Meio Ambiente (LEMA) da UFSM. O reator consiste em um cilindro de vidro espelhado internamente, com volume aproximado de 1,8 litros, no qual, axialmente, é inserida lâmpada de vapor de mercúrio, sem o bulbo externo de 80 W (Empalux) encapsulada por um bulbo de quartzo. O sistema de resfriamento é assegurado por um resfriador em espiral, conectado à torneira de água potável. O fluxo da solução entre o reator e o sistema de resfriamento é garantido por uma bomba peristáltica operada a uma rotação de 100 rpm. A conexão via mangueiras de silicone entre os sistemas permite a coleta de amostras e a inserção do peróxido no reator com a utilização de seringas (Figura 3).

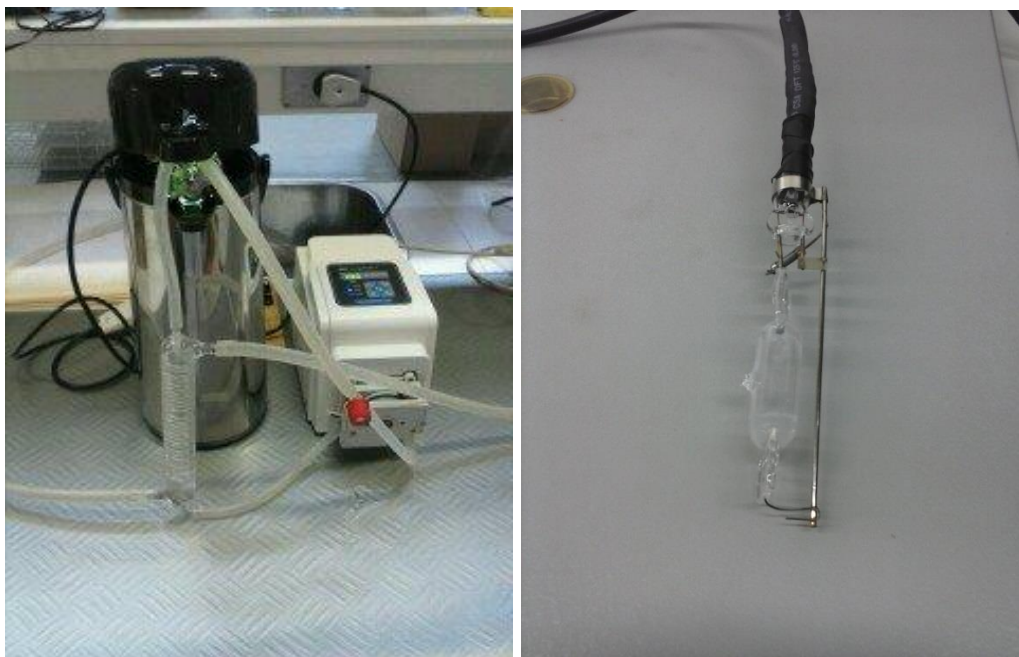


Figura 3 – Sistema reator-resfriador-bomba peristáltica utilizado para processos de fotólise direta, fotólise conjugada e degradação com peróxido de hidrogênio, à esquerda; Detalhe da lâmpada de vapor de mercúrio sem o bulbo externo empregada nos experimentos de fotólise, à direita.

Para os três processos, foram mantidos os mesmos parâmetros e procedimentos, diferenciando-se cada um deles pela adição do peróxido (5,0 mL de H_2O_2 30%) no processo UV/ H_2O_2 e pelo não acionamento da lâmpada no sistema em que se empregou apenas H_2O_2 . São eles: 1,25 L de solução de AA no reator; ativação da lâmpada e início da contagem do tempo após 5 min de aquecimento inicial da lâmpada; adição do peróxido; coleta de amostra a cada 10 min (alíquota de 1,5 mL, aproximadamente); filtração da amostra (filtro PTFE) e transferência para vial; medição da temperatura interna do reator a cada instante de coleta; duração total da irradiação de 150 min.

A partir dos resultados desse experimento inicial, foram otimizados os intervalos de coleta em cada processo, bem como o tempo de duração total dos experimentos e o volume de H_2O_2 a ser utilizado nos ensaios posteriores. Tais definições estão descritas no item 2.4.

Com as primeiras análises via CLAE/UV do processo de degradação foi possível também a adequação do processo cromatográfico e de detecção, visto que o H_2O_2 residual mostrou-se um interferente na análise. Nessa etapa, identificou-se a necessidade do uso da catalase para remoção do H_2O_2 das amostras (conforme descrito no item 2.2).

2.4 Experimentos de degradação

Os experimentos foram realizados em batelada, em reator do Laboratório de Química Analítica e Ambiental, IQ-UFRGS. O reator é um fotorreator com lâmpada resfriada, constituído de quartzo, com volume útil de 225 mL, ao qual foi inserida axialmente a lâmpada de vapor de mercúrio sem o bulbo externo de 80 W (Empalux). A temperatura do sistema foi mantida por um fluxo de água da torneira no entorno da lâmpada. Um agitador magnético foi responsável por manter a solução em agitação. As coletas foram realizadas por seringa e a temperatura monitorada por termômetro digital tipo espeto (Incoterm). O sistema foi mantido dentro de uma caixa de madeira para bloqueio da radiação (Figura 4). Foram realizados experimentos de fotólise direta (UV), de fotólise conjugada (UV/H₂O₂) e com a utilização apenas do oxidante H₂O₂.



Figura 4 – Fotorreator de lâmpada resfriada de bancada com sistema de resfriamento e agitação. À direita, estrutura para isolamento da radiação durante a utilização do fotorreator, com detalhe para o ponto de coleta via seringa.

Utilizou-se solução de AA em água na concentração de 5 mg L⁻¹, diferentemente dos testes iniciais, em função da formação de subprodutos que interferiam na quantificação do pico correspondente ao analito de interesse. Além disso, a boa sensibilidade do método CLAE/UV permitiu essa redução de concentração mantendo uma boa detecção. Para cada experimento foram definidos os tempos para coletas de amostras para acompanhamento da degradação. Amostras para análise de AA via CLAE-UV continham cerca de 1,5 mL. Para todos

os conjuntos foram mantidos os mesmos procedimentos: após acendimento da lâmpada, eram aguardados 5 minutos para o aquecimento inicial, ligadas a água de resfriamento e a agitação. Ao início e final de cada batelada mediu-se o pH da solução (pHmetro Digimed DM-22).

Os experimentos de fotólise direta (UV) foram realizados em três bateladas para mínima interferência da variação do volume durante o processo e coleta das alíquotas. Sendo: (a) primeiro conjunto: coletas de amostras no tempo de 0; 10; 20; 30 e 60 min; (b) segundo conjunto: coletas nos tempos de 0; 120; 180; 240 e 300 min; (c) terceiro conjunto: coletas nos tempos de 0; 360; 420; 480 e 600 min.

Para os experimentos de fotólise conjugada (UV/H₂O₂), a organização das coletas foi a seguinte: (a) primeiro conjunto: tempos de 0; 2; 5; e 10 min; (b) segundo conjunto: tempos de 0; 10; 12; 14; 20 e 30 min. Nesse experimento, utilizou-se 0,5 mL de H₂O₂ 30%, injetado no sistema ao início do processo (tempo 0).

Nos experimentos em que se utilizou apenas H₂O₂, o volume de oxidante utilizado foram os mesmos 0,5 mL. A organização das bateladas foi a seguinte: (a) primeiro conjunto: coletas nos tempos de 0; 15; 30; 60 e 120 minutos; (b) segundo conjunto: coletas nos tempos de 0; 180; 240; 300 e 420 min.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Definição dos parâmetros para detecção de acrilamida via CLAE-UV

O espectro UV da acrilamida em solução aquosa, na concentração de 100 mg L⁻¹ apresenta máximo de absorção no comprimento de onda 210 nm (Figura 5). Portanto este comprimento de onda foi selecionado para o monitoramento no CLAE-UV, a fim de obter-se a melhor resposta e sensibilidade. Esta mesma condição, também foi utilizada por Wang et al. (2008 e 2013), precedida por separação via CLAE, porém, para detecção de AA em alimentos.

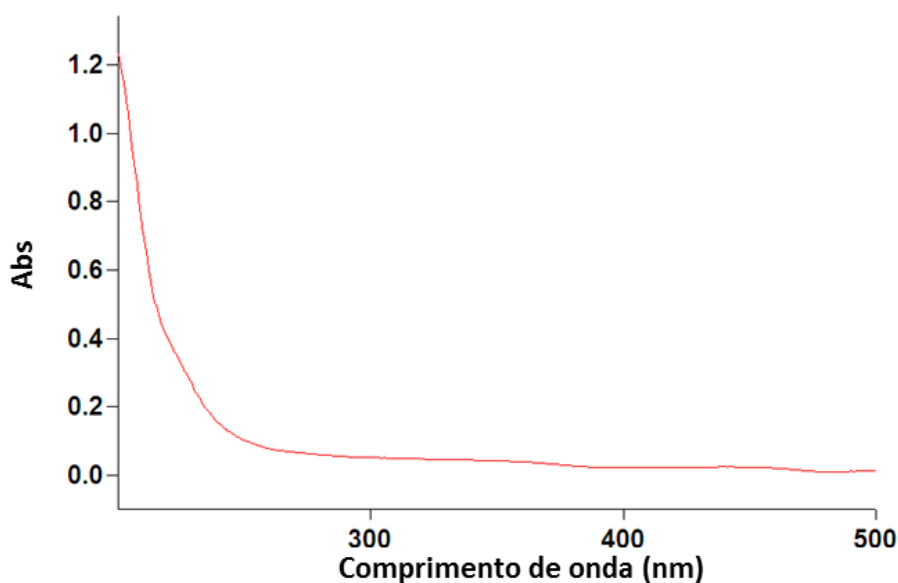


Figura 5 – Espectro de absorção de solução de acrilamida em água ultra pura com concentração de 100 mg L^{-1} .

Para o método cromatográfico, utilizou-se, primeiramente, como fase móvel água:metanol, 60:40, no modo isocrático com vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. A injeção de amostras de solução aquosa de AA com concentrações 100 , 20 e 2 mg L^{-1} apresentaram picos bem definidos e proporcionais, com mesmo tempo de retenção, confirmando a detecção da AA. Foi testada também a acetonitrila na fase móvel, substituindo-se o metanol por essa, mantendo os demais parâmetros. A substituição resultou em respostas semelhantes, com diferença apenas nos t_R do pico da AA de $3,94 \text{ min}$ com metanol para $3,59 \text{ min}$ com acetonitrila.

A substituição do metanol pela acetonitrila na fase móvel teve o inconveniente de que os tempos de retenção do pico referente ao peróxido residual da degradação e do pico da acrilamida ficarem muito próximos (Figura 6), dificultando a quantificação da mesma. Para resolver esta questão, utilizou-se a catalase para consumo do peróxido residual dos experimentos. Esta enzima age sobre o peróxido de hidrogênio liberando água e oxigênio (NICHOLLS, 2012) (Equação 1).



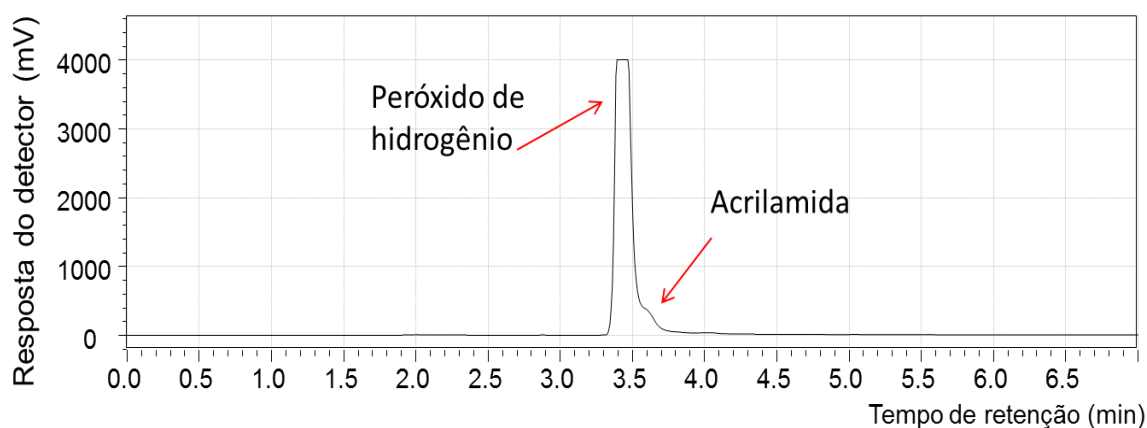


Figura 6 – Cromatograma da solução de acrilamida e peróxido de hidrogênio. Fase móvel água:acetonitrila (60:40).

A catalase foi eficiente no seu propósito de remover o peróxido de hidrogênio da amostra, como mostrado nas figuras 7 e 8. Na figura 7, estão indicados os picos correspondentes ao peróxido ($t_R = 3,61\text{min}$) e à acrilamida ($t_R = 3,958\text{ min}$) para uma solução aquosa na concentração de 20 mg L^{-1} de AA e de 3 g L^{-1} para o peróxido de hidrogênio. Na figura 8, tem-se o cromatograma da solução aquosa de AA após a adição de catalase, mostrando o desaparecimento do pico referente ao peróxido.

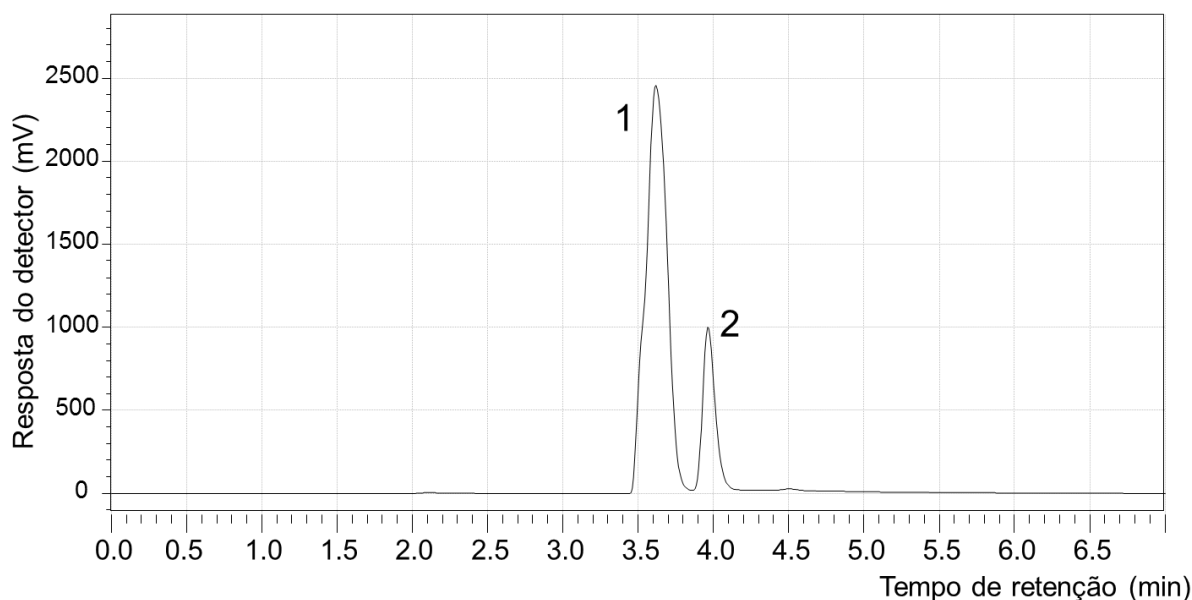


Figura 7 – Cromatograma da solução aquosa de acrilamida com peróxido de hidrogênio (picos indicados). Pico 1: peróxido de hidrogênio, $t_R = 3,61\text{ min}$. Pico 2: acrilamida, $t_R = 3,95\text{ min}$. Fase móvel água:metanol, 60:40.

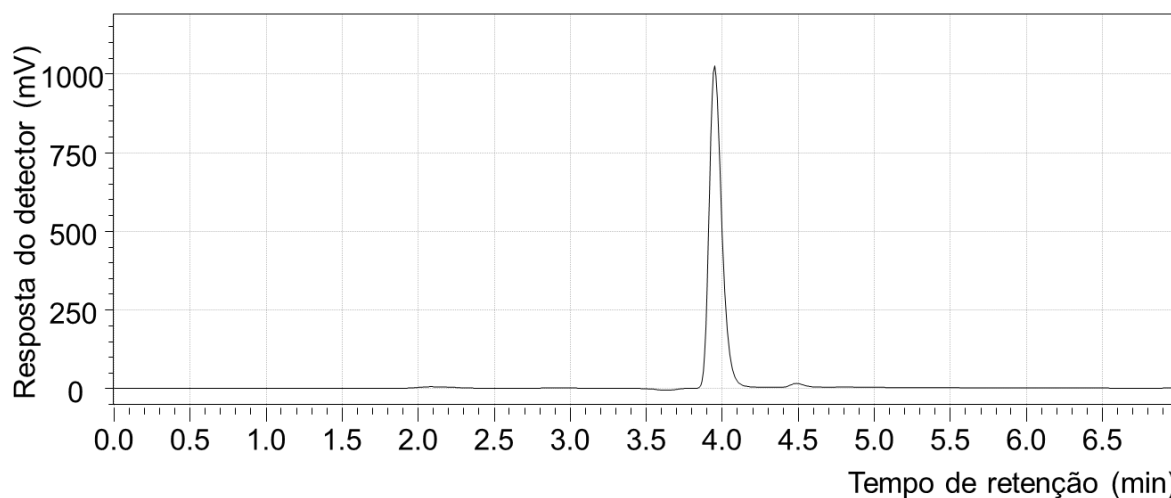


Figura 8 – Cromatograma da solução aquosa de acrilamina tratada com peróxido, após a adição da catalase. O pico corresponde à acrilamida. Fase móvel água:metanol, 60:40.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência é amplamente difundido para separação de analitos em meio aquoso. No caso do método desenvolvido, a CLAE-UV demonstrou ótimo resultado, permitindo a separação e a detecção da AA de forma rápida e eficiente, com nenhuma exigência de preparo adicional da amostra além da sempre necessária filtração e do uso da catalase quando amostra contendo H_2O_2 . A curva de calibração do método (pontos correspondentes às concentrações de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 $mg L^{-1}$) é apresentado na figura 9.

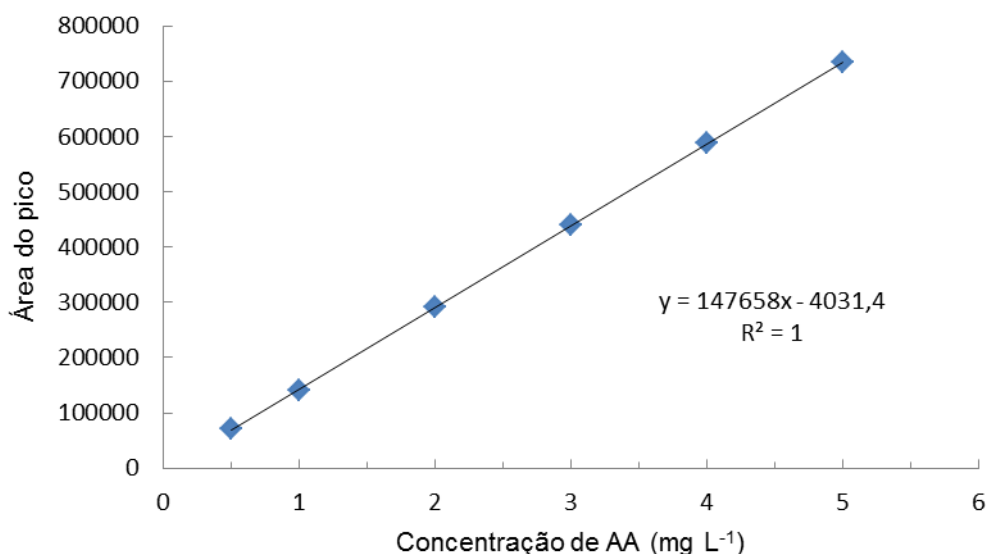


Figura 9 – Curva de calibração do método por CLAE/UV. Concentrações das soluções aquosas de acrilamida: 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 $mg L^{-1}$.

3.2 Degradação da AA por processos fotolíticos

3.2.1 Degradação da AA por fotólise conjugada (UV/H₂O₂)

A utilização do processo conjugado (UV/H₂O₂) resultou em uma degradação praticamente instantânea da acrilamida. A amostra no tempo de 2 minutos já apresentou uma concentração de AA de 0,5 mg L⁻¹; ou seja, uma redução de 89,3% (Figura 10). Na figura 11 observa-se a rápida redução do pico da AA ($t_R \approx 3,6$ min) no tempo inicial (em preto) para o tempo de 2 minutos (em rosa). Em função dessa alta taxa de degradação, não foi possível determinar a cinética da reação. O pH da solução reduziu de 7,3 no tempo de 0, para 4,8 no tempo de 3 min, provavelmente em função da dissociação do H₂O₂, resultando em íons H⁺.

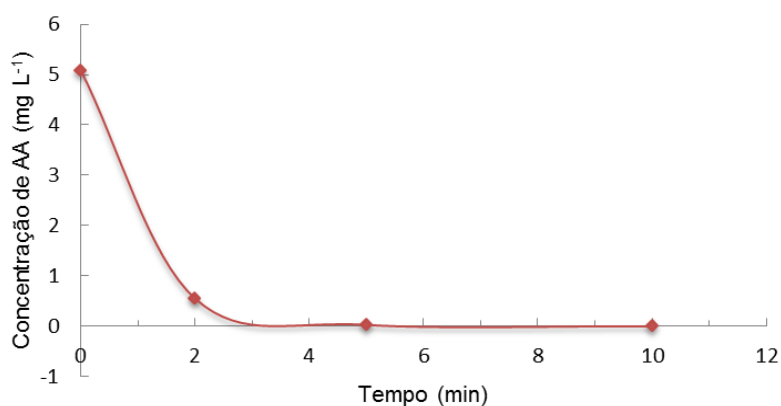


Figura 10 – Variação da concentração da acrilamida em solução aquosa em relação ao tempo, empregando o processo de fotólise conjugada. (Amostras de tempo de irradiação: 0, 2, 5 e 10 minutos).

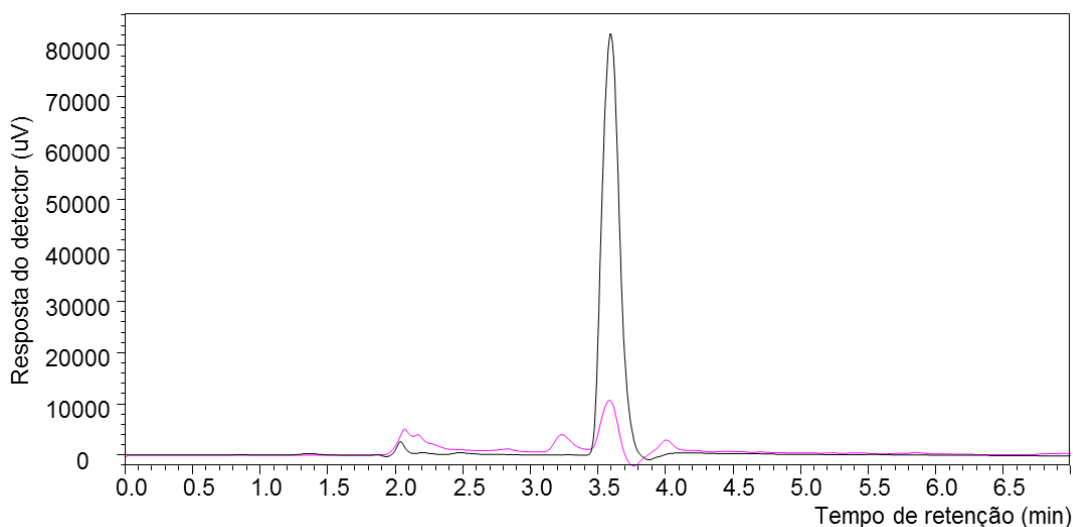
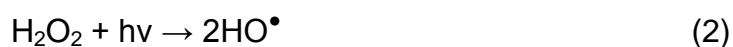


Figura 11 – Cromatogramas sobrepostos do tempo 0, em preto, e tempo 2 minutos, em rosa, do experimento de degradação da AA com radiação UV e peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio, na presença de radiação UV, gera radicais hidroxila (GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996; LIU et al., 2015) e quanto maior essa concentração, maior é a geração do radical. Assim, a rápida degradação da AA pode ser atribuída à geração de grandes quantidades de radicais hidroxila (equação 2, ORBECI, 2014). Sendo o radical HO• um oxidante não seletivo e com alto poder de oxidação em moléculas complexas (KLAVARIOTI et al., 2009; ESPUGLAS et al., 1994), a atuação desse sobre a molécula simples de AA se deu de forma muito eficaz.



Além da degradação da AA, houve a formação de subprodutos, como mostrado nos cromatogramas das figuras 12 e 13. Há a possibilidade de que esses subprodutos sejam uma forma intermediária de polimerização da acrilamida, com característica mais polar que o monômero, pela antecipação do tempo de retenção. Porém, não foi realizada a identificação destes compostos, o que seria de grande importância para o conhecimento e a avaliação da toxicidade destes no que diz respeito ao potencial de risco à saúde.

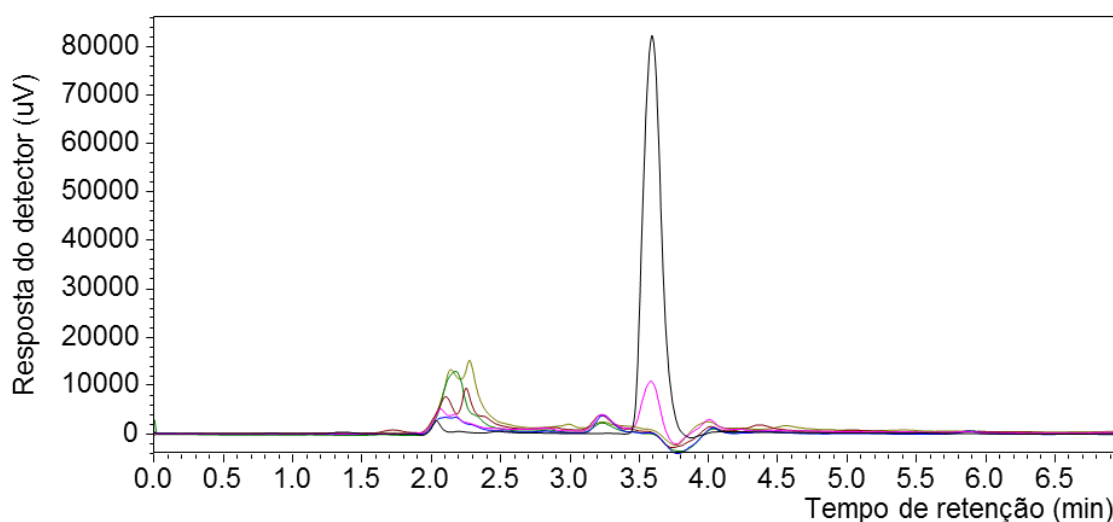


Figura 12 – Cromatogramas sobrepostos correspondentes aos tempos 0; 2; 5; 10; 20 e 30 minutos do experimento com radiação e peróxido de hidrogênio.

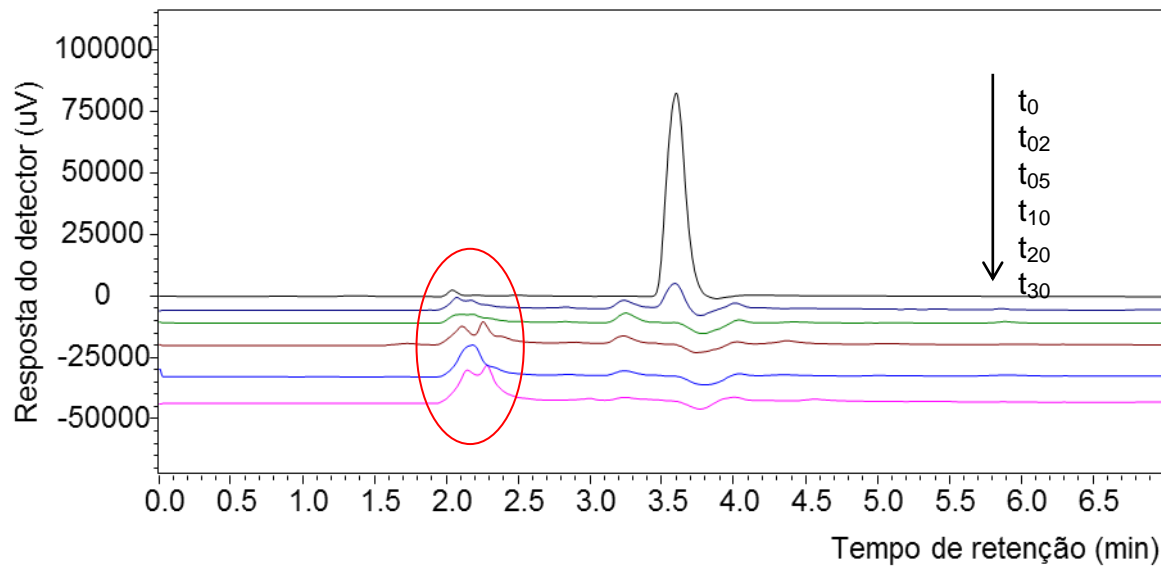


Figura 13 – Cromatogramas sobrepostos dos tempos 0, 2, 5, 10, 20 e 30 minutos do experimento com radiação e peróxido de hidrogênio com ênfase aos subprodutos detectados.

3.2.2 Degradação da AA por fotólise direta (UV)

A utilização da radiação UV também resultou na degradação total da AA, porém com tempo de exposição de 360 minutos. Relacionando concentração e tempo de experimento, pode-se perceber o decaimento da concentração de AA de forma linear, com $R^2=0,9964$, caracterizando uma cinética de degradação de ordem zero (Figura 14). Assim, tem-se como constante cinética $k = 0,0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e, conseqüentemente, um tempo de meia vida de 174,8 min. O modelo cinético de ordem zero segue a equação:

$$-\frac{dC_A}{dt} = k \quad (3)$$

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} -dC_A = \int_0^t k dt \quad (4)$$

$$C_A = C_{A_0} - kt \quad (5)$$

Conseqüentemente, o tempo de meia vida é dado por:

$$t_{1/2} = \frac{C_{A_0}}{2k} \quad (6)$$

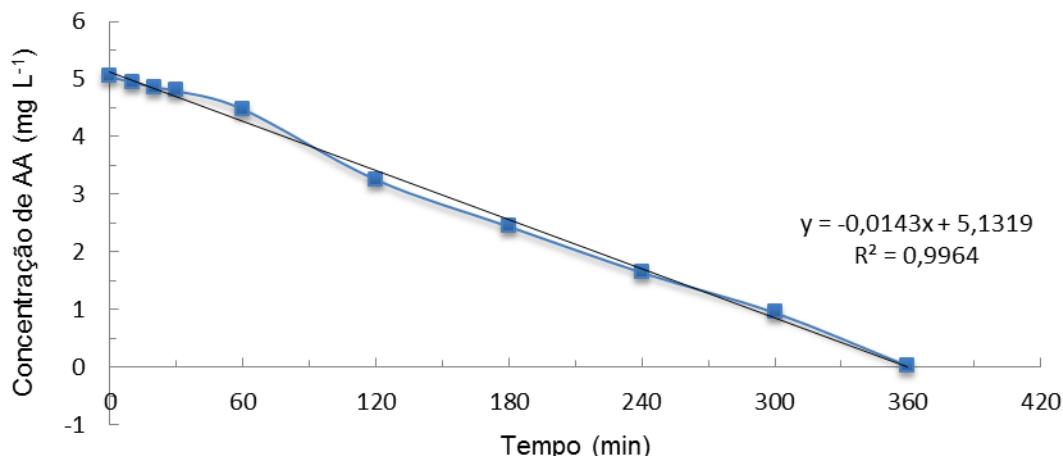


Figura 14 – Cinética de ordem zero para a degradação da acrilamida em solução aquosa, na presença de radiação UV. (Tempo de irradiação: 0, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos). Linha de tendência de R^2 0,9964.

A partir da solução de acrilamida na presença de radiação UV e de oxigênio dissolvido ($H_2O + AA + hv + O_2$) dois conjuntos de reações possíveis entre esses podem ocorrer, culminando na formação de radicais hidroxila: o oxigênio dissolvido, ao ser irradiado ($\lambda = 185\text{nm}$), gera H_2O_2 por intermédio do ozônio (Equação 7-9) (GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996):

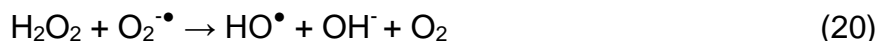


E/ou a radiação excita a molécula de acrilamida (AA), como única molécula orgânica do meio, iniciando uma reação em cadeia envolvendo a formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) até seu desproporcionamento e formação do peróxido de hidrogênio (Equação 6-8, ACHTERBERG e VAN DEN BERG, 1994):



Formado o peróxido de hidrogênio, a geração do radical hidroxila pode ocorrer das seguintes maneiras: por fotólise (Equação 13) (LUO et al., 2012); redução (Equação 14); dissociação espontânea em meio alcalino ($pH > 5,0$) com

consequentes reações em cadeia para formação do superóxido (Equação 15-17) (GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996); e reação do superóxido com o ozônio (Equação 18 e 19) ou com o H_2O_2 para formação do radical hidroxila (20) (WAYNE, 1988 apud CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003):



Diante da complexidade do conjunto de reações responsável pela degradação da acrilamida iniciada pela radiação UV, é de grande dificuldade o estabelecimento do real meio de degradação da mesma. Porém, é visto que, para o processo de fotólise, é indispensável a presença do oxigênio molecular dissolvido (O_2) para a geração do oxidante mais atuante nos POA (LUO et al., 2012): o radical hidroxila. Visando uma aplicação futura desse processo em estações de tratamento de água ou de esgotos/efluentes, a necessidade da presença de O_2 não é um empecilho. Grande parte dessas estações realizam processos de tratamento na presença de oxigênio, seja naturalmente, seja adicionado, principalmente quando se trata de tratamento biológico (com exceção de processos anaeróbios).

No caso do reator de bancada utilizado no ensaio, enquanto o O_2 era consumido pelas reações, o próprio contato do meio com a atmosfera e o processo de agitação foi responsável pela adição natural do O_2 na solução, seguindo o equilíbrio descrito pela Lei de Henry (BAIRD, 2002), assim como ocorre nos sistemas naturais. Além da entrada natural de oxigênio no meio, as próprias reações intermediárias de formação de radical hidroxila liberam oxigênio molecular em certas etapas, que auxiliam no restabelecimento da saturação da solução (Equações 9, 18-20).

3.2.3 Degradação da AA com H₂O₂

A realização de experimento de degradação apenas com H₂O₂, mesmo com tempo de reação de 360 minutos, não demonstrou qualquer resultado de modificação da AA. A constância das concentrações durante o experimento pode ser observada na figura 15.

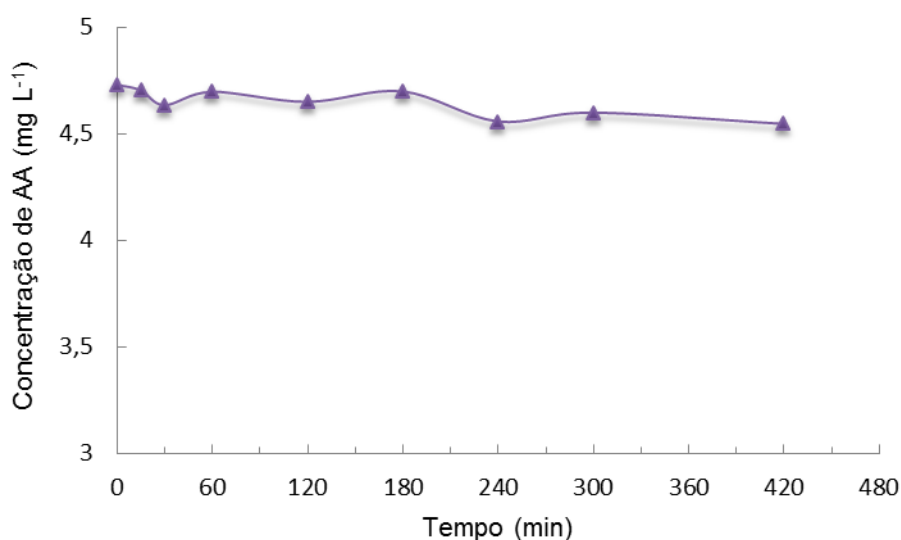


Figura 15 – Concentrações da acrilamida em solução aquosa quando empregando peróxido de hidrogênio nos tempos de: 0; 15; 30; 60; 120; 180; 240; 300 e 360 minutos.

A presença do oxidante não é suficiente para uma degradação, visto que é necessária a radiação para sua dissociação em radicais hidroxila. Mesmo que tenha havido a dissociação espontânea em íon peroxidrila (HO₂⁻) e íon H⁺ (como descrito na equação 11), a peroxidrila necessita de ozônio (formado apenas com irradiação) para desencadear uma série de reações até a formação do radical hidroxila, bem como de outras espécies de oxigênio reativas intermediárias, o que não é possível sem uma fonte de energia.

3.2.4 Discussão da cinética de degradação da acrilamida

Comparando os resultados de cinética da degradação da acrilamida apresentados, nas Figuras 10, 14 e 15, respectivamente para: (a) utilização simultânea de radiação UV e peróxido de hidrogênio; (b) apenas radiação UV e (c) apenas peróxido; são conduzidas as discussões a seguir.

Segundo Cavicchioli e Gutz (2003), as lâmpadas de vapor de mercúrio de alta pressão (como a utilizada no estudo) emitem radiação principalmente na faixa de 200 a 450 nm e em torno de 550 nm. Na figura 16 é apresentado o espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão. Comparando com o espectro de absorção do peróxido de hidrogênio, que tem seu máximo em torno de 200 nm (Figura 17; LEGRINI et al., 1993), conclui-se que este sistema é adequado para a geração dos radicais hidroxila.

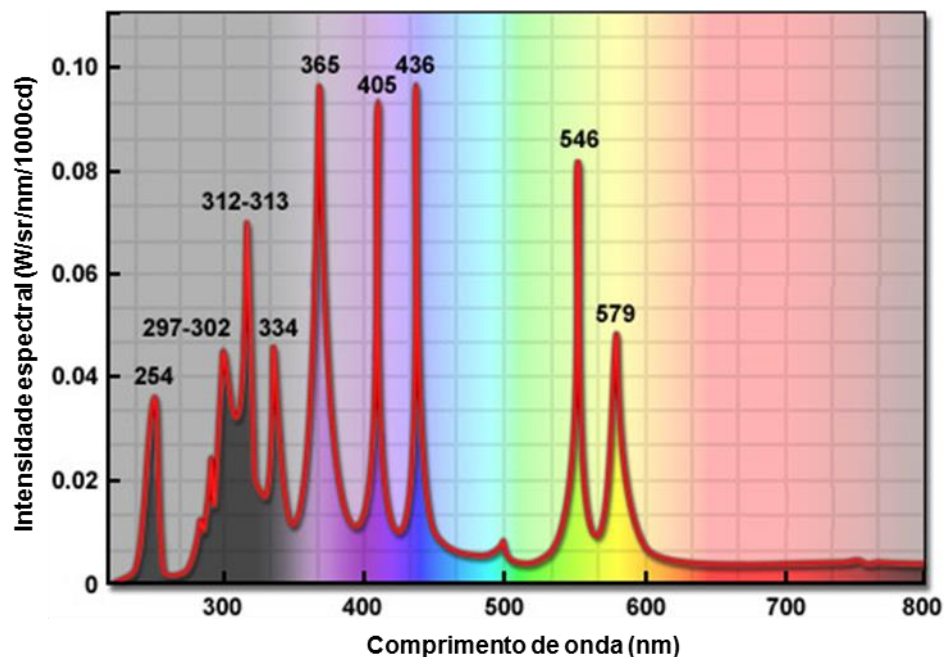


Figura 16 – Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão.
 FONTE: adaptado de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/lightsources/mercuryarc-print.html>

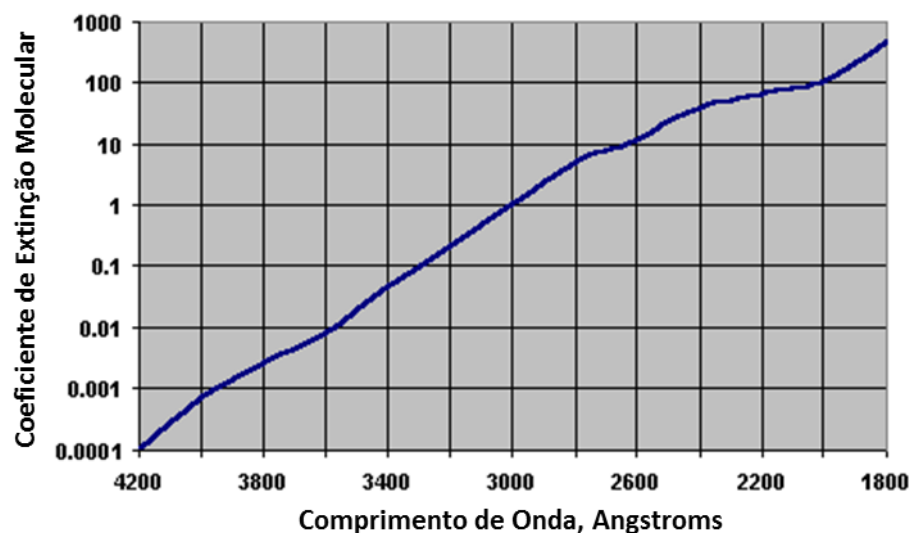


Figura 17 - Espectro de absorção do peróxido de hidrogênio.
 FONTE: adaptado de <http://www.h2o2.com/>

De acordo com o espectro de absorção da acrilamida, a faixa de 200 a 220 nm corresponde ao máximo de absorção (Figura 5). Nestas condições, a radiação emitida pela lâmpada de mercúrio, tem pouca ação sobre a acrilamida, sendo capaz apenas de ionizá-la para desencadear as reações intermediárias de formação dos radicais (ACHTERBERG e VAN DEN BERG, 1994). Pelos resultados obtidos, pode-se dizer que este é o caso do processo de fotólise, em que podem ocorrer diversas reações envolvendo a radiação UV, moléculas de água, de acrilamida e de oxigênio dissolvido. Nessa situação, a formação de espécies reativas intermediárias de oxigênio é de extrema importância para a geração do radical hidroxila e consequente degradação da acrilamida. Para o experimento utilizando apenas H_2O_2 a taxa de degradação foi muito baixa, comprovando a necessidade da utilização da radiação para que o processo ocorra (Figura 18).

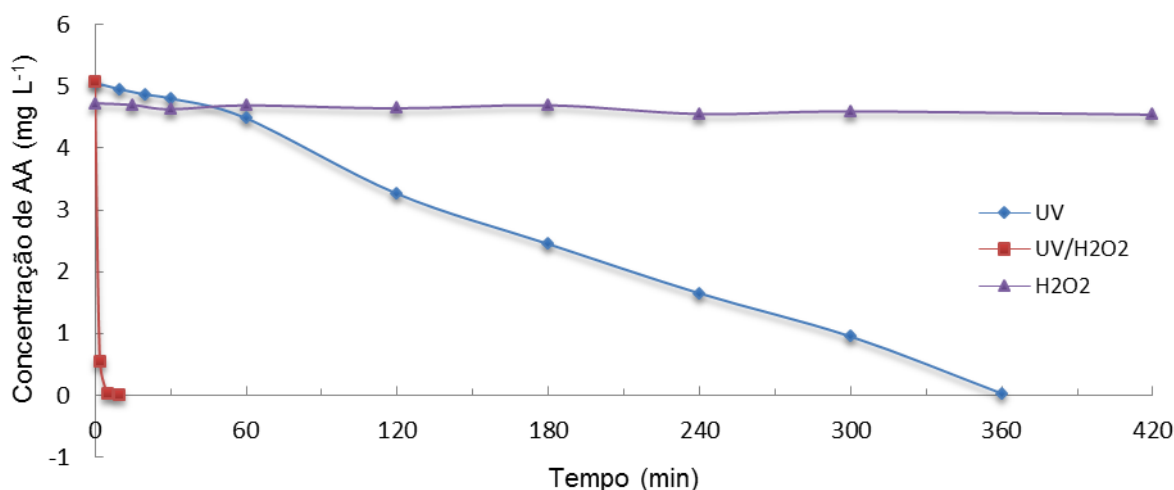


Figura 18 – Cinéticas das degradações resultantes dos experimentos de fotólise (UV), fotólise conjugada (UV/ H_2O_2) e com peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

3.3 Processos de fotólise e fotocatalise em outros sistemas

Processos utilizando UV e UV/ H_2O_2 são empregados para degradação de diversos compostos presentes em efluentes sanitários e industriais, que, geralmente, não são removidos nos sistemas convencionais de tratamento. Pode-se citar o caso de antibióticos florfenicol e tianfenicol (LIU et al., 2015), fármacos (WOLS et al., 2013; DE LA CRUZ et al., 2012; ARANY et al., 2013; DONNER et al., 2013), biocidas e pesticidas (DE LA CRUZ et al., 2012), surfactantes (KARCI et al., 2014), ftalatos

(XU et al., 2007), corantes (TIMCHAK e GITIS, 2012), parabenos (SÁNCHEZ-MARTÍN et al., 2013), dentre tantos outros.

A grande vantagem dos processos de fotólise direta ou conjugada (inclusive com emprego de catalisadores) é a possibilidade de utilização da radiação solar como fonte de radiação UV, podendo-se citar o caso da degradação por fotólise solar do fármaco propranolol na Plataforma Solar de Almeria (PSA, Espanha) (DE LA CRUZ et al, 2013) e a utilização da radiação solar como ativador do processo de foto-Fenton para degradação do antibiótico trimetoprima na PSA (MICHAEL et al. 2012). Além de tratamentos para remoção de contaminantes, a radiação solar é empregada também para a desinfecção de água, como, por exemplo, no processo de fotocatalise por UV e dióxido de titânio para inativação da bactéria *Escherichia coli* em água, desenvolvido na PSA (FERNÁNDEZ et al, 2005) e também no Coletor Parabólico Composto (compound parabolic collector - CPC) do Instituto Federal de Tecnologia Suíço, Lausanne, Suíça (RINCÓN e PULGARIN, 2004).

Pelos resultados obtidos nesse trabalho, infere-se seja possível a degradação da AA por fotólise solar, com aplicação ou não de peróxido de hidrogênio. Como trabalho futuro, a verificação da eficiência da degradação solar da AA seria de grande importância, bem como a estruturação de um reator de fotólise solar, a partir dos resultados obtidos do reator de bancada. Experimentos que comprovem a viabilidade de tratamento de água com reduzido gasto de energia elétrica, como é o caso do aproveitamento da energia solar, são de grande relevância para uma aplicação futura em escala real desses métodos.

4 CONCLUSÃO

O método via CLAE-UV demonstrou ser uma boa ferramenta para o monitoramento da degradação da acrilamida. Com um tempo de análise de 7 minutos e uma boa linearidade para a faixa de trabalho, foi um método rápido, eficaz e apropriado para o monitoramento.

A acrilamida sofreu degradação quando empregado sistema de fotólise direta e de fotólise conjugada. No primeiro, apresentou uma constante de velocidade $k = 0,0143 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, sendo completamente degradada com 360 minutos de reação; no segundo, um tempo de reação de 2 minutos foi suficiente para degradação de 89,3% da AA presente na solução, estando completamente

degradada aos 5 minutos. O processo conjugado resultou ainda na formação de subprodutos não identificados da AA. A utilização de peróxido de oxigênio isoladamente não demonstrou qualquer resultado na redução da concentração de acrilamida, confirmando a necessidade da presença da radiação para que ocorram as reações de degradação.

Processos de fotólise para tratamento de água e esgotos, nas mais diversas configurações, são responsáveis pela degradação de diversos contaminantes, dentre eles os desreguladores endócrinos, apontados como responsáveis por grande número de doenças. Diante das diversas fontes de contaminação por acrilamida e dos riscos associados ao consumo de água com a mesma, o aprimoramento dessas técnicas e sua incorporação às plantas de tratamento de água e esgoto seriam de grande importância para a saúde da população.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à CAPES e à FAPERGS (Projeto nº 12/2291-8) pelo auxílio financeiro, e ao apoio do Laboratório de Química Analítica Ambiental, do IQ-UFRGS, nomeadamente a prof. Tânia Mara Pizzolato.

REFERÊNCIAS

Achterberg EP, Van den Berg CMG. In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system. *Analytica Chimica Acta* 1994; 291:213-32.

Agrawal AK, Squibb RE, Bondy SC. The effects of acrylamide treatment upon the dopamine receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1981; 58:89-99.

Ali SF. Acrylamide-induced changes in the monoamines and their acid metabolites in different regions of the rat brain. *Toxicology Letters* 1983; 17:101-5.

Arany E, Szabó RK, Apáti L, Alapi T, Ilisz I, Mazellier P, Dombi A, Gajda-Schrantz K. Degradation of naproxen by UV, VUV photolysis and their combination. *Journal of Hazardous Materials* 2013; 262:151-7.

AWWARF. American Water Works Association – Research Foundation. Removal of EDCs and Pharmaceuticals in Drinking and Reuse Treatment Processes. IWA Publishing: Denver, 2007.

Ayoub K, Van Hullebusch E, Cassir M, Bermond A. Application of advanced oxidation processes for TNT removal: A review. *Journal of Hazardous Materials* 2010;178:10-28.

Baird C. *Química Ambiental*. 2ª ed. Trad. M.A.L. Recio e L.C.M Carrera. Porto Alegre: Bookman, 2002

Biggs S, Habgood M, Jameson GJ, Yan Y. Aggregate structures formed via a bridging flocculation mechanism. *Chemical Engineering Journal* 2000;80:13-22.

Bila DM, Dezotti M. Desreguladores Endócrinos no Meio Ambiente: Efeitos e Conseqüências. *Quim. Nova* 2007;30:651

Bond SC, Tilson HA, Agrawal AK. Neurotransmitter Receptors in Brain Regions of Acrylamide-Treated Rats II: Effects of Extended Exposure to Acrylamide. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1981;14:533-7.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

Bull RJ. Carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in drinking water. *The Science of the Total Environment* 1985;47:385-413.

Cavicchioli A, Gutz IGR. O uso da radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. *Quim. Nova* 2003;26:913-21.

Dearfield K, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Segal GA, Brusick DJ. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research* 1995;330:71-99.

De La Cruz, N, Giménez J, Esplugas S, Grandjean D, De Alencastro LF, Pulgarín C. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Research* 2012;46:1947-57.

De La Cruz N, Dantas R, Giménez J, Esplugas S. Photolysis and TiO₂ photocatalysis of the pharmaceutical propranolol: solar and artificial light. *Applied Catalysis B: Environmental* 2013;130-131:249-56.

Donner E, Kosjek T, Qualmann S, Kusk K, Heath E, Revitt D, Ledin A, Andersen H. Ecotoxicity of carbamazepine and its UV photolysis transformation products. *Science of the Total Environment* 2013;443:870-6.

Esplugas S, Bila DM, Krause LGT, Dezotti M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials* 2007;149:631-42.

Fernández P, Blanco J, Sichel C, Malato S. Water disinfection by solar photocatalysis using compound parabolic collectors. *Catalysis Today* 2005;101:345-52.

Golimowski J, Golimowska K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Analytica Chimica Acta* 1996;325:111-33.

Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1986;85:154-68.

Karci A, Arslan-Alaton I, Bekbolet M, Ozhan G, Alpertunga B. H₂O₂/UV-C and Photo-Fenton treatment of a nonylphenol polyethoxylate in synthetic freshwater: Follow-up of degradation products, acute toxicity and genotoxicity. *Chemical Engineering Journal* 2014;241:43–51.

Klavarioti M, Mantzavinos D, Kassinos D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* 2009;35:402-17. doi: 10.1016/j.envint.2008.07.009

Legrini O, Oliveros E, Braun AM. Photochemical Processes for Water Treatment. *Chem. Rev.* 1993;93:671-98.

Liu N, Sijak S, Zheng M, Tang L, Xu G, Wu M. Aquatic photolysis of florfenicol and thiamphenicol under direct UV irradiation, UV/ H₂O₂ and UV/Fe(II) processes. *Chemical Engineering Journal* 2015;260:826-34.

Luo X, Zheng Z, Greaves J, Cooper W, Song W. Trimethoprim: Kinetic and mechanistic considerations in photochemical environmental fate and AOP treatment. *Water Research* 2012;46:1327-36.

Michael I, Hapeshi E, Osorio V, Perez S, Petrovic M, Zapata A, Malato S, Barceló D, Fatta-Kassinos D. Solar photocatalytic treatment of trimethoprim in four environmental matrices at a pilot scale: Transformation products and ecotoxicity evaluation. *Science of the Total Environment* 2012;430:167-73.

Nicholls P. Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2012;525:95–101. doi: 10.1016/j.abb.2012.01.015

Orbeci C, Untea I, Nechifor G, Segneanu AE, Craciun ME. Effect of a modified photo-Fenton procedure on the oxidative degradation of antibiotics in aqueous solutions. *Separation and Purification Technology* 2014;122:290–6.

Rincón A, Pulgarin C. Field solar E. coli inactivation in the absence and presence of TiO₂: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection? *Solar Energy* 2004;77:635–48.

Soares, CMD. Determinação dos Teores de Acrilamida em Alimentos, 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica Ambiental) Universidade do Porto, Porto, 2007.

Timchak E, Gitis V. A combined degradation of dyes and inactivation of viruses by UV and UV/H₂O₂. *Chemical Engineering Journal* 2012;192:164–70.

US.EPA. Universe of Chemicals. 2012. Disponível em: <http://www.epa.gov/endo/pubs/edsp_chemical_universe_list_11_12.pdf>. Acesso em 17 out. 2013.

USPEROXIDE. Ultraviolet Absorption Spectrum. Disponível em: <<http://www.h2o2.com/technical-library/physical-chemical-properties/radiation-properties/default.aspx?pid=65&name=Ultraviolet-Absorption-Spectrum>>. Acesso em 02 mar 2015.

Wols BA, Hofman-Caris CHM, Harmsen DJH, Beerendonk EF. Degradation of 40 selected pharmaceuticals by UV/H₂O₂. Water Research 2013;47:5876-88. doi: 10.1016/j.watres.2013.07.008.

World Health Organization. Acrylamide in Drinking-water, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/acrylamide.pdf> Acesso em 20 jul 2013.

World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/>. Acesso em 16 jan 2014.

Xu B, Gao N, Sun X, Xia S, Rui M, Simonnot M, Causserand C, Zhao J. Photochemical degradation of diethyl phthalate with UV/H₂O₂. Journal of Hazardous Materials 2007;139:132–9.

ZEISS. Fundamentals of Mercury Arc Lamps. Disponível em: <<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/print/lightsources/mercuryarc-print.html>>. Acesso em 02 mar 2015.

ARTIGO 2 – Determinação de acrilamida em água potável por cromatografia líquida com detecção por ultravioleta

Resumo

Acrilamida é um contaminante residual de processos de tratamento de águas que utilizam poliacrilamidas como auxiliar de floculação, dentre diversos outros usos industriais. É considerada como potencialmente carcinogênica em humanos, com comprovada ação neurotóxica em testes laboratoriais em ratos. No Brasil, a concentração máxima permitida em água potável é de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, cinco vezes maior que o padrão europeu, de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Diante disso, o monitoramento das concentrações de acrilamida em água potável é de extrema importância para a saúde da população abastecida. Porém, métodos analíticos de detecção e quantificação de acrilamida são muito trabalhosos e complexos, principalmente em função da alta solubilidade da acrilamida em água e da baixa concentração em que ela se apresenta, resultando em dificuldade de concentração e de separação da mesma. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi definir método de análise para acrilamida via cromatografia a líquido com detecção por ultravioleta para emprego em amostras de água potável. Foi empregada extração em fase sólida com carvão ativo como sólido e metanol como condicionante e eluente. Análises foram realizadas via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas e via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. A EFS resultou em uma recuperação de 72 % da acrilamida. Para o método CLAE-UV, fase móvel com água:metanol (60:40) apresentou maior intensidade de sinal. Validação do método CLAE-UV foi baseada na linearidade, com $R^2 = 0,9984$; na sensibilidade, com bom coeficiente angular da reta de calibração; quanto aos limites de detecção e quantificação, foram obtidos $LD = 1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $LQ > 1 \mu\text{g L}^{-1}$. Quando avaliado o conjunto de procedimento EFS-CLAE-UV, com amostra real fortificada, a recuperação foi de apenas 21,8 %, provavelmente pelos diversos possíveis interferentes presentes na amostra real. Dessa forma, os parâmetros desenvolvidos devem ser aprimorados para garantir melhor extração e concentração da acrilamida em amostras reais, para uma real aplicabilidade em amostras de água potável.

Palavras-chave: potencial carcinogênico; água potável; extração em fase sólida; carvão ativo; cromatografia a líquido.

ARTICLE 2 – Determination of acrylamide in potable water by high performance liquid chromatography with UV detection

Abstract

Acrylamide is a residual contaminant water treatment processes using polyacrylamide as a flocculating aid, among many other industrial uses. It is considered as potentially carcinogenic in humans, with proven neurotoxic action in laboratory tests in rats. In Brazil, the maximum allowable concentration in drinking water is $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, five times higher than the European standard of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Thus, the monitoring of acrylamide concentrations in drinking water is extremely important for the health of the population abastecida. Porém, analytical detection methods and quantification of acrylamide are very laborious and complex, mainly due to the high solubility of acrylamide in water and the low concentration in which it is presented, resulting in difficulty in concentration and separation of the same. Thus, the aim of this study was to define the method of analysis for acrylamide via liquid chromatography with ultraviolet detection for use in drinking water samples. Was used solid phase extraction with activated carbon as solid and methanol as eluent and conditioning. Analyzes were carried out via gas chromatography coupled to mass spectrometry and via high performance liquid chromatography with detection by ultraviolet efficiency. SPE resulted in a recovery of 72% acrylamide. For the HPLC-UV method, mobile phase of water:methanol (60:40) showed higher signal intensity. Validation of the HPLC-UV method was based on linearity, with $R^2 = 0.9984$; sensitivity, with good slope of the calibration line; regarding the limits of detection and quantification were obtained $LD = 1 \text{ g L}^{-1}$ and $LQ > 1 \text{ g L}^{-1}$. Investigation of the set of SPE-HPLC-UV procedure, with real fortified sample the recovery was only 21.8%, probably by the various possible interferences present in the actual sample. Thus, the developed parameters must be improved to ensure better extraction and acrylamide concentration in real samples for real applicability in drinking water samples.

Key words: carcinogenic potential; drinking water; solid phase extraction; activated carbon; liquid chromatography.

1 INTRODUÇÃO

Acrilamida é uma molécula altamente solúvel em água e de baixo peso molecular (71 g mol^{-1}). Em água, a solubilidade chega a 2115 g L^{-1} , a 30°C . Solúvel também em metanol (1.555 g L^{-1}), etanol (862 g L^{-1}), acetona (631 g L^{-1}), acetato de etila (126 g L^{-1}) (EU, 2002). Seu principal uso é como matéria prima para a produção de poliacrilamidas, empregadas no tratamento de água e efluentes, dentre outros usos menos expressivos como agentes de impermeabilização de reservatórios de água e poços (WHO, 2011a). A utilização de poliacrilamida como parte do tratamento de água é a principal fonte de contaminação da água potável com acrilamida, presente de forma residual no polímero em 0,05 %, segundo a WHO (2011a).

Croll et al. (1970) já alertaram sobre a falta de conhecimento e de controle das concentrações de acrilamida presentes na água potável e efluentes, resultado do uso de poliacrilamidas como floculantes. Salientando como mais preocupante o fato de que os efluentes lançados em corpos d'água ainda seriam captados e tratados novamente com poliacrilamidas, resultando em um acúmulo de acrilamida na água tratada, mesmo respeitando-se a dosagem máxima de aplicação de $1,0\text{ mg L}^{-1}$ de polímero. Isto porque a acrilamida residual presente na poliacrilamida utilizada nos processos convencionais de tratamento de água não é retida durante as etapas seguintes a coagulação e floculação (CROLL et al., 1970), assim como não é degradada em estações de tratamento de esgotos (BROWN et al., 1982).

Segundo o International Programme on Chemical Safety (IPCS, 1999), a acrilamida é uma neurotoxina capaz de afetar os sistemas nervosos central e periférico, variando a magnitude do efeito em função da duração da exposição e da dose total. A *International Agency for Research on Cancer*, da *World Health Organization* (WHO/IARC, 1994) classifica a acrilamida como uma substância pertencente ao grupo 2A, ou seja, um agente provavelmente carcinogênico para humanos baseado em estudos em animais.

Em função dos riscos associados à ingestão de acrilamida pelo consumo da água potável tratada com poliacrilamidas, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011b), no seu Guia de Qualidade para Água Potável, recomenda que o valor máximo permitido de acrilamida seja de $0,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Tal concentração seria resultado da utilização de polímeros com 0,05 % de monômero livre, aplicado no tratamento a

uma concentração de 1 mg L^{-1} . Essa recomendação é seguida pelo governo brasileiro, que definiu como valor máximo permitido de acrilamida na água potável a concentração de $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, conforme publicado na Portaria do Ministério da Saúde nº2914/2011. Diferentemente, a União Europeia mantém um padrão mais restritivo de permissibilidade de acrilamida na água potável, sendo esse de $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (EU 2014).

Embora a presença de acrilamida em água potável seja causa de preocupação, a partir de 2002, com a publicação do estudo de Tareke et al. (2002) comprovando a formação de acrilamida durante o processo de aquecimento de alimentos ricos em carboidratos, pode-se perceber uma tendência a discutir o assunto e desenvolver pesquisas na área de alimentos. Desde então, muitas metodologias de detecção e quantificação de AA em alimentos são desenvolvidas para as mais diversas matrizes, seja café (e.g. BORTOLOMEAZZI et al., 2012), batatas (e.g. GÖKMEN et al., 2005; KAYKHALI e ABDI, 2013), comida para bebês a base de cereais (e.g. MICHALAK et al., 2013), outros alimentos ricos em carboidratos (e.g. ZHANG et al., 2007; NEMOTO et al., 2012; TAKATSUKI et al., 2003; ROACH et al., 2003; MASTOVSKA e LEHOTAY, 2006).

Métodos analíticos de detecção/quantificação da acrilamida em água são muito trabalhosos, caros e demandam tempo para o preparo das amostras em função da baixa concentração em que se apresenta nas amostras de água, potável ou ambiental. Geralmente, baseiam-se em etapas de pré-concentração do analito, remoção de interferentes (quando amostra ambiental, principalmente), derivatização e análise via cromatografia (a líquido ou a gás) acoplada a detectores diversos. A reduzida concentração do analito (faixa de microgramas por litro) aliada à alta solubilidade da AA em água (2150 g L^{-1} , a 30°C (HINTERMAINER-ERHARD, 2002)) são fatores que dificultam a eficiência dos processos de preparo da amostra (CHU e METCALFE, 2007). Devido a essa dificuldade, métodos são desenvolvidos por pesquisadores com objetivo de facilitar esse preparo, reduzir o número de etapas de preparação (ou mesmo eliminá-las) ou adequar métodos de análise existentes para aumento da sensibilidade e da precisão.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer método de detecção e quantificação de acrilamida em água potável por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por ultravioleta com etapa de pré-concentração via extração em fase sólida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e equipamentos

Acrilamida P.A., acetona e metanol grau HPLC (Sigma-Aldrich), água ultrapura obtida por sistema Milli-Q (Integral 5), cartucho de carvão ativo Sep-Pak Plus AC-2 (400 mg; 85 μm de partícula, Waters).

2.2 Análise Instrumental

A acrilamida foi analisada por cromatografia a líquido e a gás. As condições instrumentais são descritas na sequência.

2.2.1 Análise por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Para análise por cromatografia a gás, foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas modelo QP2010SE (Shimadzu) equipado com injetor automático (AOC-20i, Shimadzu) e com coluna capilar RTX-5MS (30m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1 ml min^{-1} . Os parâmetros de injeção foram: 1 μL , modo *splitless*; 50°C por 3 min; 15°C/min até 100°C; 40°C/min até 250°C mantido por 1 min. As temperaturas do injetor e da interface foram 250°C e 310°C, respectivamente. A energia de ionização utilizada foi de 30 eV.

2.2.2 Análise por cromatografia a líquido com detector de Ultra-violeta/Visível (CLAE-UV)

A análise da acrilamida foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (modelo LC-20AD) com detector de UV-VIS (modelo SPD-20A) no Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química da UFRGS (IQ-UFRGS). Para a separação cromatográfica utilizou-se coluna C18 (250 mm \times 4,6 mm; 5 μm) (Thermo Scientific) com fase móvel composta por (A) água (60%) e (B)

metanol (40%) em modo isocrático com vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e o tempo total de análise de 7 minutos. No detector, utilizou-se comprimento de onda de 210 nm .

2.3 Coleta e preparo da amostra

Foram coletadas amostras de água tratada na saída da estação de tratamento de água da cidade de Cachoeirinha/RS, operada pela Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) e que faz uso da poliacrilamida como auxiliar de floculação. Amostras foram coletadas em frasco de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração para encaminhamento ao laboratório. No laboratório, foram filtradas em filtro PTFE $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Vertical Chromatography), e fracionadas em três amostras de 100 mL cada (triplicatas A, B e C). As coletas ocorreram por um período de quatro dias consecutivos no mês de janeiro de 2015.

2.4 Etapa de concentração: extração em fase sólida

Para pré-concentração da acrilamida presente na amostra utilizou-se cartucho de carvão ativo Sep-Pak Plus AC-2 (400 mg ; $85 \text{ }\mu\text{m}$ de partícula, Waters) em sistema Supelco. O condicionamento se deu com uso de 3 mL de metanol seguidos de 5 mL de água. Volume de amostra percolada pelo cartucho foi de 100 mL . A eluição foi realizada com 5 mL de metanol seguida de redução de volume por fluxo de nitrogênio a 1 mL em evaporador (Reacti-Therm, Thermo Scientific). A Figura 1 apresenta as etapas de EFS realizadas e a Figura 2, a estrutura utilizada para procedimento. A otimização da etapa de extração considerou os parâmetros volume de quebra de solução em água ultrapura (25 , 100 e 250 mL) e volume do solvente de eluição (2 , 5 , 7 e 10 mL).

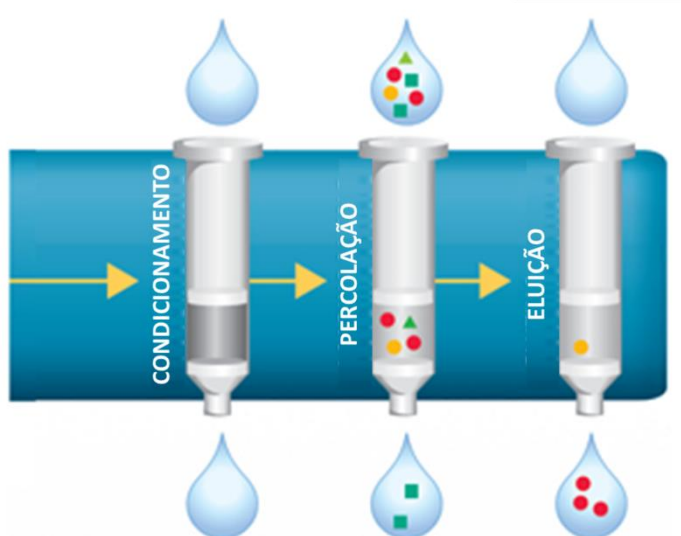


Figura 1 - Etapas da extração em fase sólida: condicionamento, percolação da amostra e eluição.
FONTE: adaptado de <http://www.johnmorris.com.au>



Figura 2 – Sistema utilizado para etapa de extração em fase sólida: cartucho de carvão ativo Waters, acoplado em manifold equipado com bomba de vácuo.

2.5 Validação do método

O método foi validado usando soluções padrões de acrilamida em solvente e em água, nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Parâmetros como linearidade, sensibilidade, precisão, recuperação, limite de detecção e limite de

quantificação foram avaliados no processo de validação, conforme recomendações do Instituto Brasileiro de Metrologia (INMETRO).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condições da análise instrumental

3.1.1 Cromatografia a gás com detecção por espectrômetro de massas

Utilizando solução padrão de acrilamida em acetona, determinaram-se as condições para a análise instrumental. A avaliação inicial da eficiência do método de EFS foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas modelo QP2010SE (Shimadzu) equipado com injetor automático (AOC-20i, Shimadzu) e com coluna capilar RTX-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1 ml min⁻¹. Os parâmetros de injeção foram: 1 μL, modo *splitless*; 50°C por 3 min; 15°C/min até 100°C; 40°C/min até 250°C mantido por 1 min. As temperaturas do injetor e da interface foram 250°C e 310°C, respectivamente. Foram avaliadas as energias de ionização de 30, 45 e 70 eV.

A acrilamida em solução com acetona (12 mg L⁻¹) foi analisada no modo SCAN (Figura 3), com satisfatória similaridade quando comparada ao espectro de massas da biblioteca NIST/EPA/NIH 2008, sendo os íons mais representativos os de relação massa/carga (*m/z*) 44, 55 e 71 (com energia de ionização de 30 eV). Os espectros de massa da acrilamida detectado (a) e o da biblioteca (b) são apresentados na Figura 4. Energias de ionização maiores que 30 eV resultaram em grande fragmentação da acrilamida, o que impediu a identificação da mesma pela análise do espectro de massas. Solução padrão de acrilamida em metanol também apresentou bons resultados quando utilizada coluna RTX-5MS, porém, com menor intensidade do sinal.

Conhecido o espectro da acrilamida, selecionaram-se os íons de *m/z* 55 e 71 para monitoramento, visto que 44 é também característico da molécula de dióxido de carbono, naturalmente presente no ar e um possível interferente. Foi definida

também a energia de ionização necessária como 30 eV e o solvente apropriado a acetona.

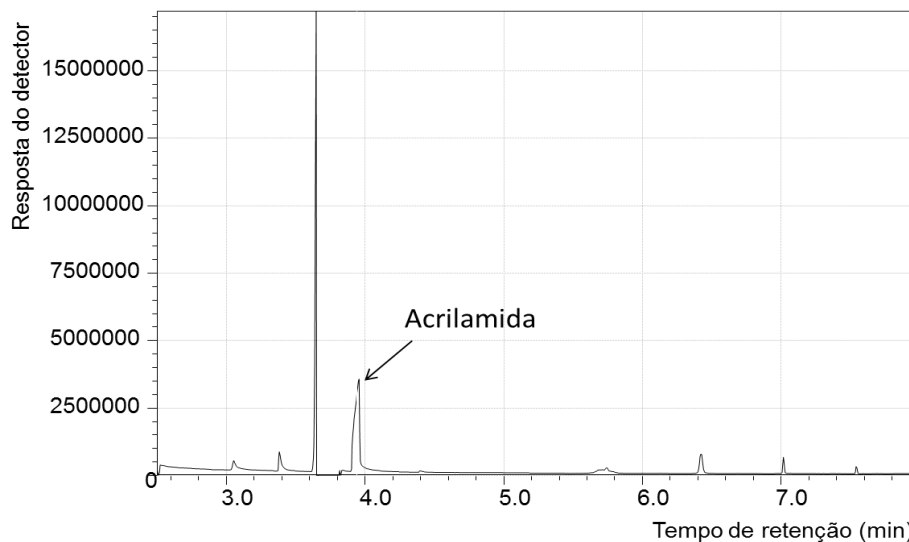


Figura 3 - Cromatograma de solução de acrilamida em acetona na concentração de 12 mg L^{-1} obtido via cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas com energia de ionização de 30 eV.

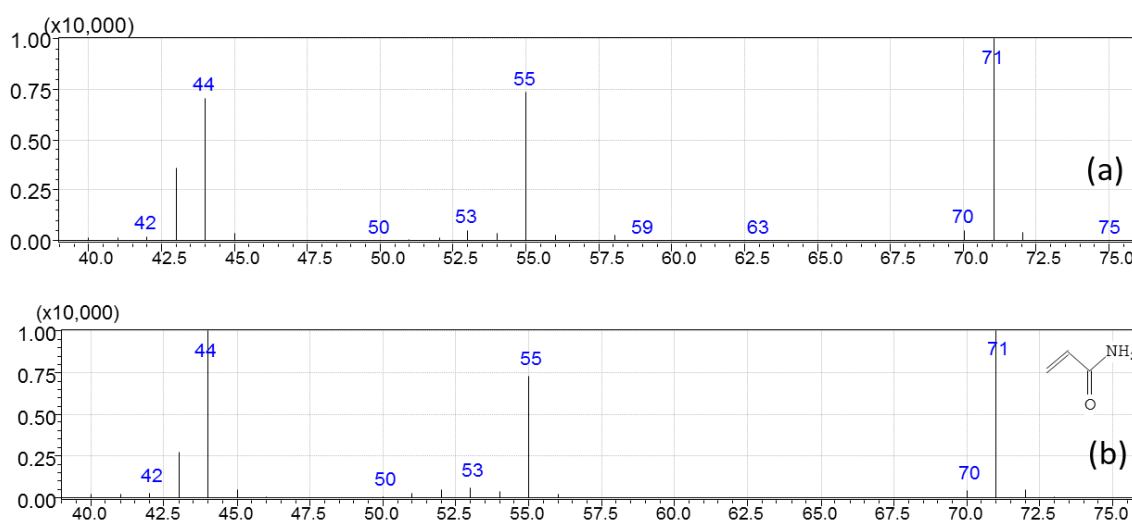


Figura 4 – (a) Espectro de massas da acrilamida em solução de acetona via CG-EM com energia de ionização de 30 eV; e (b) espectro de massas característico da acrilamida segundo NIST/EPA/NIH (2008).

Foi avaliada também a coluna DB-WAX ($30\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$) sob as seguintes condições de injeção: $1 \mu\text{L}$, modo *splitless*; 80°C por 1 min; $12^\circ\text{C}/\text{min}$ até 240°C mantido por 5 min. As temperaturas do injetor e da interface foram 220°C e 250°C , respectivamente. A análise foi realizada no método SIM, com monitoramento dos íons de m/z 71 e 55, e utilizados os padrões de acrilamida em acetona e em metanol ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) para avaliação do método. A Figura 5 apresenta o

cromatograma da solução padrão de acrilamida em acetona; a Figura 6, em metanol. Não houve muita alteração em relação ao tempo de retenção da acrilamida, porém, o sinal gerado como resposta pela acrilamida quando em solução em acetona foi consideravelmente mais intenso.

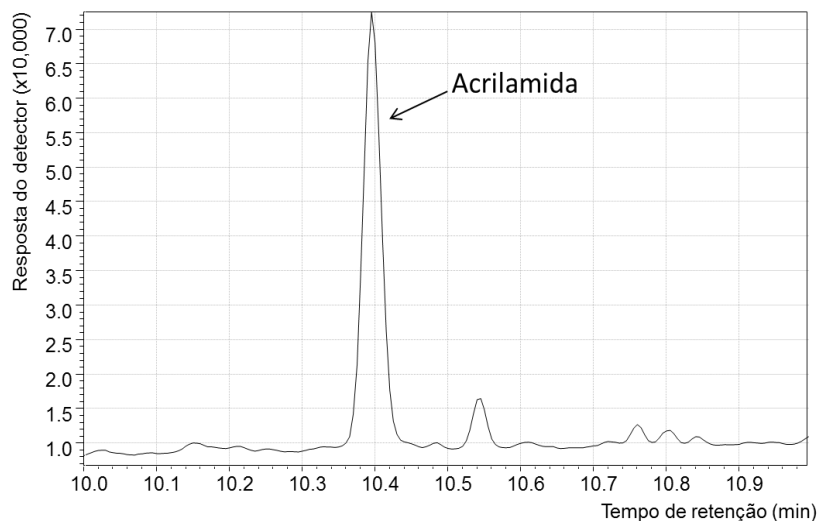


Figura 5 - Cromatograma da acrilamida em solução em acetona. Concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; $t_R \approx 10,4 \text{ min}$. Coluna cromatográfica: DB-WAX.

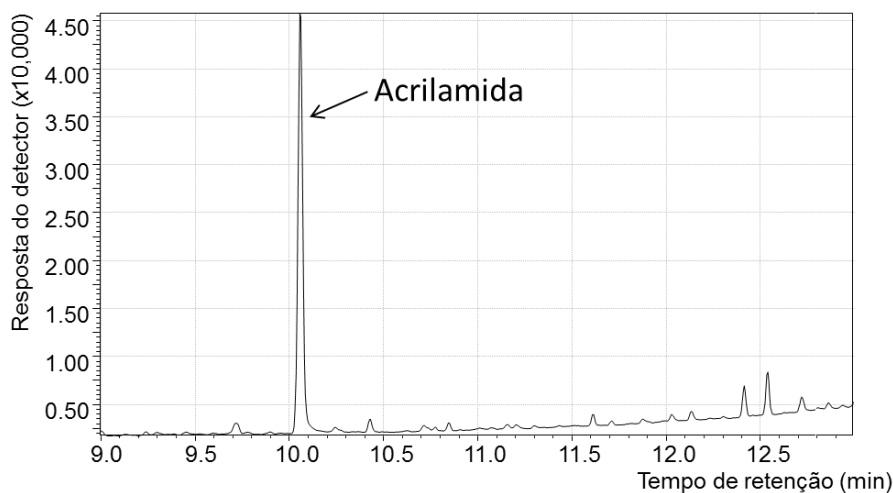


Figura 6 - Cromatograma da acrilamida em solução em metanol. Concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; $t_R \approx 10,09 \text{ min}$. Coluna cromatográfica: DB-WAX.

3.1.2 Cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta/visível

Para utilização da CLAE-UV como método analítico, as melhores condições foram: amostra em metanol e fase móvel composta por água:metanol (60:40). Na Figura 7 é apresentado cromatograma da acrilamida em solução em metanol (em preto "a") e em solução mista água:metanol, 50:50, (em rosa "b").

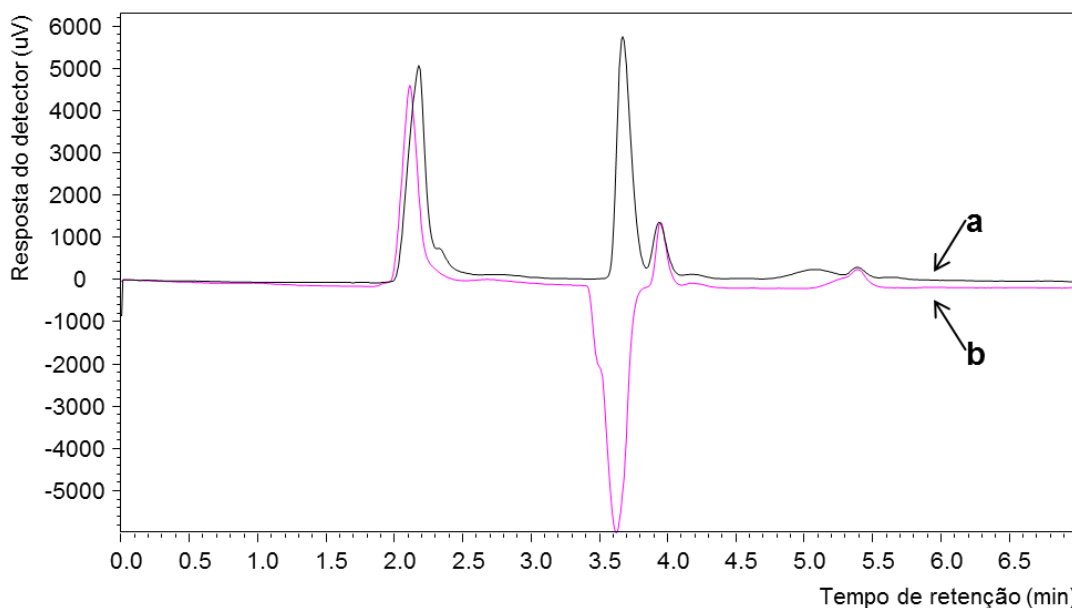


Figura 7 - Cromatogramas sobrepostos de acrilamida em solução em metanol (a) e em água:metanol (50:50) (b).

A Figura 8 apresenta cromatogramas correspondentes às soluções em metanol com concentrações de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de acrilamida. Na Figura 9, se vê que a amostra composta apenas por metanol não apresenta qualquer sinal no tempo de retenção da acrilamida e mantém o pico correspondente ao solvente ($t_R \approx 3,6 \text{ min}$), não interferindo na quantificação do analito.

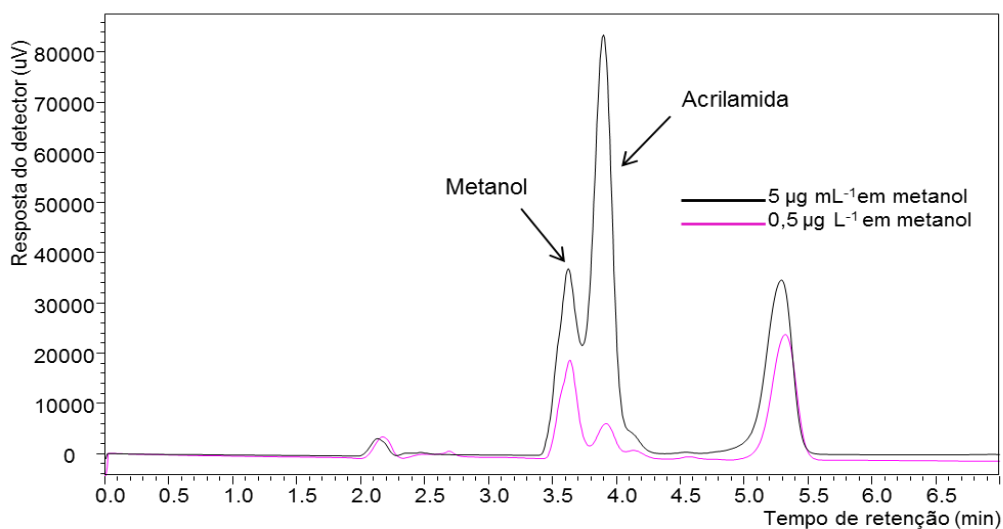


Figura 8 - Cromatogramas sobrepostos de soluções padrões de acrilamida em metanol com concentrações de $0,5$ e $5 \mu\text{g L}^{-1}$, obtidos via CLAE-UV.

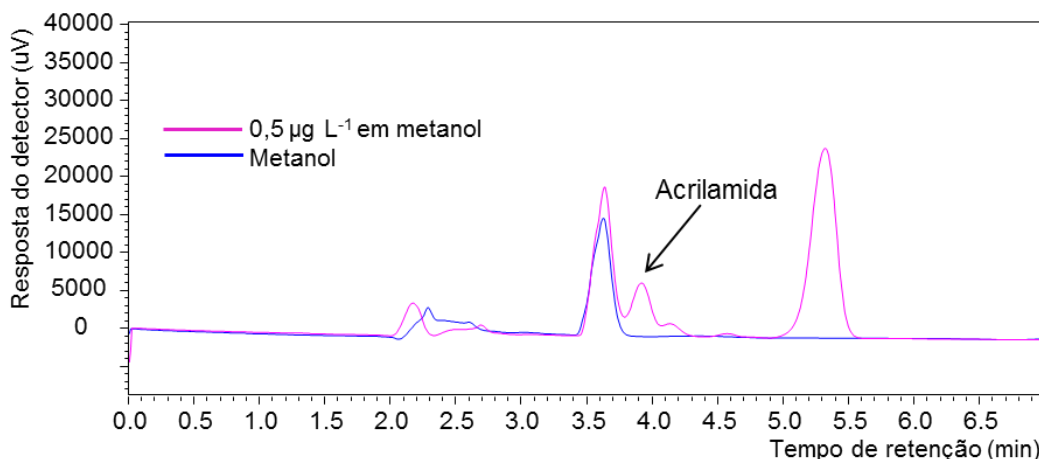


Figura 9 - Cromatogramas sobrepostos de metanol e de solução padrão de acrilamida em metanol, obtidos via CLAE-UV, como indicação da não interferência do metanol na detecção e quantificação da acrilamida.

3.2 Ajuste das condições de extração em fase sólida

Para etapa de otimização do volume de quebra do processo de extração em fase sólida foram utilizados, inicialmente, os volumes de 25 e 250 mL de solução aquosa de acrilamida, com concentrações correspondentes a concentração final (após processo de EFS) de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com eluição realizada com 5 mL de acetona. Na Figura 10, vê-se os cromatogramas correspondentes aos eluídos das soluções de 25 e 250 mL. Análise realizada via CG-MS, com coluna RTX-5MS ($30\text{m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$) no modo SIM, com monitoramento dos íons de m/z 55 e 71.

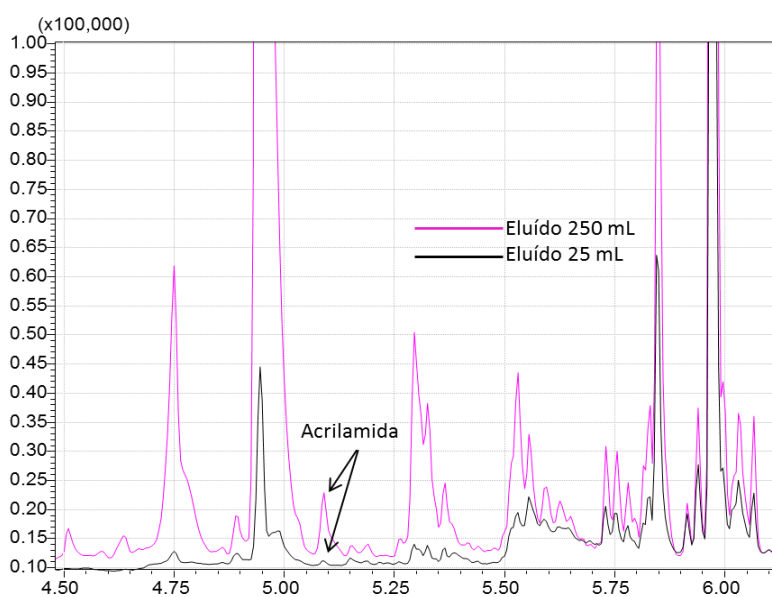


Figura 10 - Cromatogramas dos eluídos em metanol da fase de EFS correspondentes às soluções iniciais com volumes de 250 mL (concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$) e de 25 mL (concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$).

Devido à baixa intensidade da resposta do detector para a amostra correspondente à solução de 25 mL, a coluna RTX-5MS foi substituída pela DB-WAX (30m × 0.25 mm × 0.25 μm). A reinjeção das amostras sob condições cromatográficas e de detecção para coluna DB-WAX (modo SIM: íons monitorados 55 e 71) resultou em sinais mais intensos dos íons monitorados da acrilamida e alteração do tempo de retenção para 10,4 min. Porém, a recuperação do analito não foi satisfatória, como pode ser visto na Figura 11 (c), em que se compara a solução padrão 0,5 μg L⁻¹ em acetona e os eluídos da EFS. Embora a acetona tenha se demonstrado melhor solvente para as condições cromatográficas, não teve um bom desempenho como eluente da acrilamida.

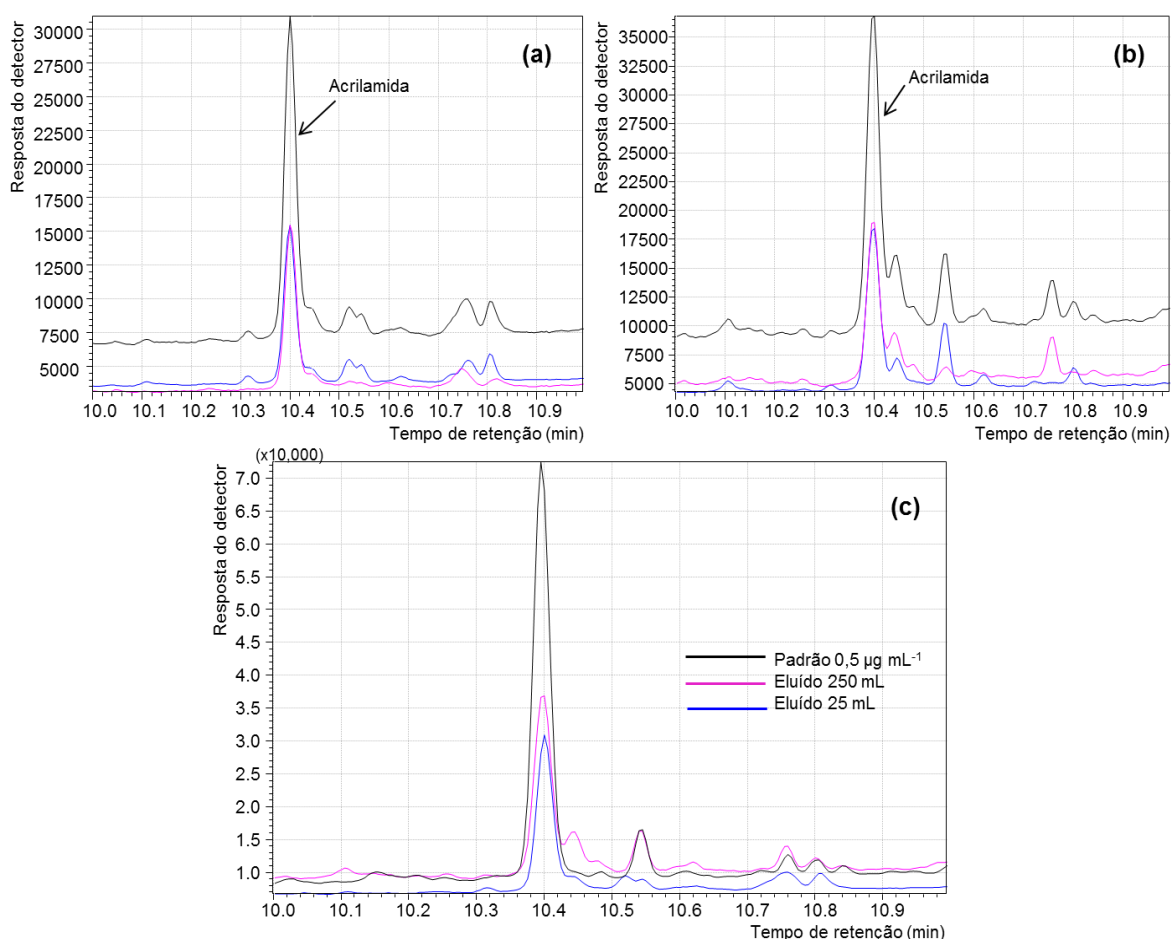


Figura 11 - Cromatogramas obtidos via CG-MS com coluna DB-WAX: (a) eluído em acetona da solução aquosa de AA com volume inicial de 25 mL; (b) eluído em acetona da solução aquosa de AA com volume inicial de 250 mL; e (c) sobreposição do cromatograma do padrão e dos eluídos.

A partir desses resultados, foi substituído o solvente de eluição da EFS por metanol, em função da maior solubilidade da acrilamida nesse quando comparado à acetona. Repetido o processo de EFS com solução aquosa de volume 250 mL e

mesma concentração, foi obtida uma recuperação de 72% da acrilamida da concentração inicial (Figura 12).

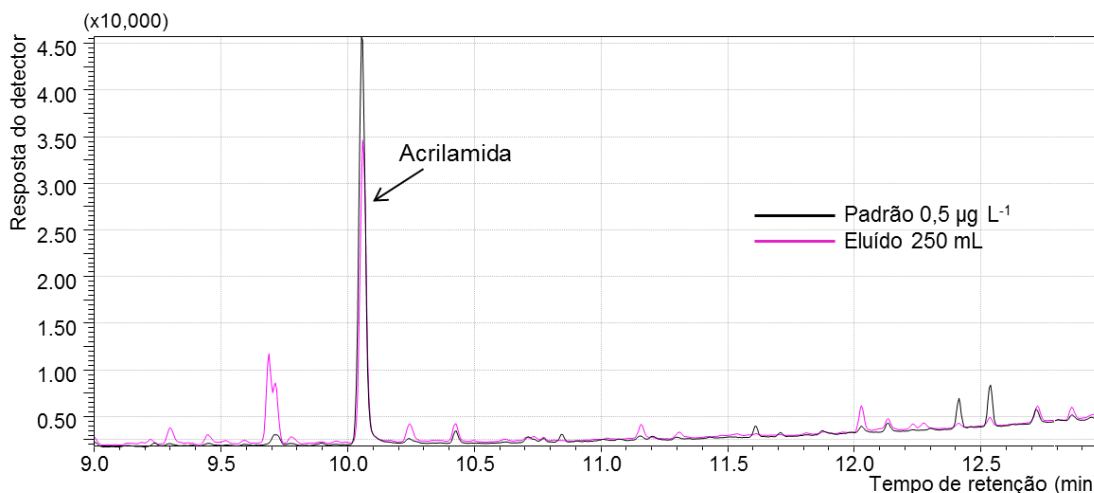


Figura 12 – Sobreposição do cromatograma do padrão em metanol e do eluído em metanol obtidos via CG-EM com coluna DB-WAX.

Definidos parâmetros da EFS para o volume de 250 mL, procurou-se reduzir esse volume para maior agilidade do processo. Trabalhou-se, então, com solução aquosa de 100 mL, com concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Na fase de eluição, o mesmo cartucho foi eluído com um total de 10 mL de metanol com coleta em 4 etapas: eluído (1) com 2 mL; eluído (2) com 3 mL; eluído (3) com 2 mL; e eluído (4) com 3 mL. Esses foram reduzidos a 1 mL em evaporador por fluxo de N_2 e posteriormente analisados via CLAE-UV para definição do volume de metanol necessário para eluição mais eficiente. A Figura 13 mostra que apenas os eluídos (1) e (2) apresentam sinais de acrilamida, o que representa um total de 5 mL de metanol, sendo esse o volume mais adequado para eluição.

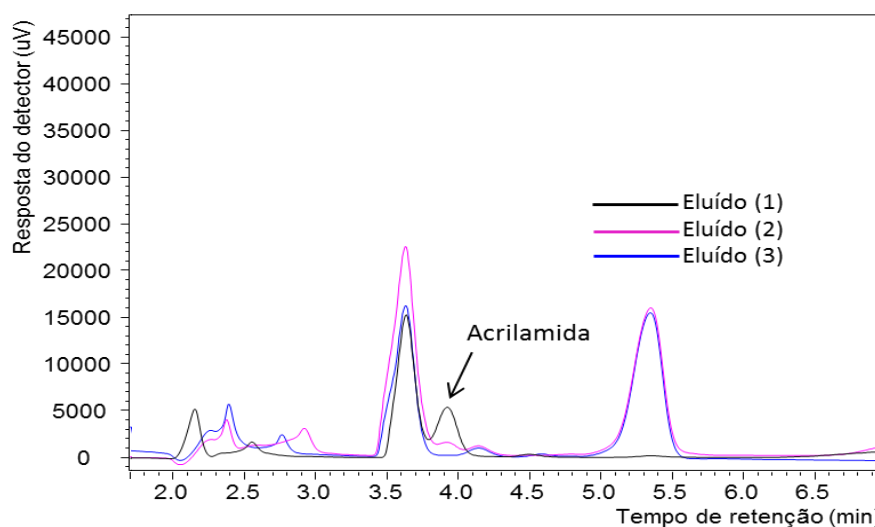


Figura 13 – Cromatogramas dos eluídos da EFS com 2 mL (eluído 1), com 3 mL (eluído 2) e com 2 mL (eluído 3). Acrilamida é detectada apenas nos dois primeiros, ou seja, nos primeiros 5 mL de eluição. Cromatogramas obtidos via CLAE-UV.

3.3 Validação do método

A linearidade do método de análise foi obtida para uma faixa de concentrações de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com injeções em triplicata, correspondendo a um coeficiente de determinação de 0,9984, conforme mostrado na Figura 14. As concentrações utilizadas na curva, 10; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondem às concentrações iniciais na solução aquosa para a EFS de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. O valor central é o padrão estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde como valor máximo permitido de acrilamida na água potável. A relação das concentrações das soluções iniciais e das concentrações finais (após EFS) é apresentada na Tabela 1.

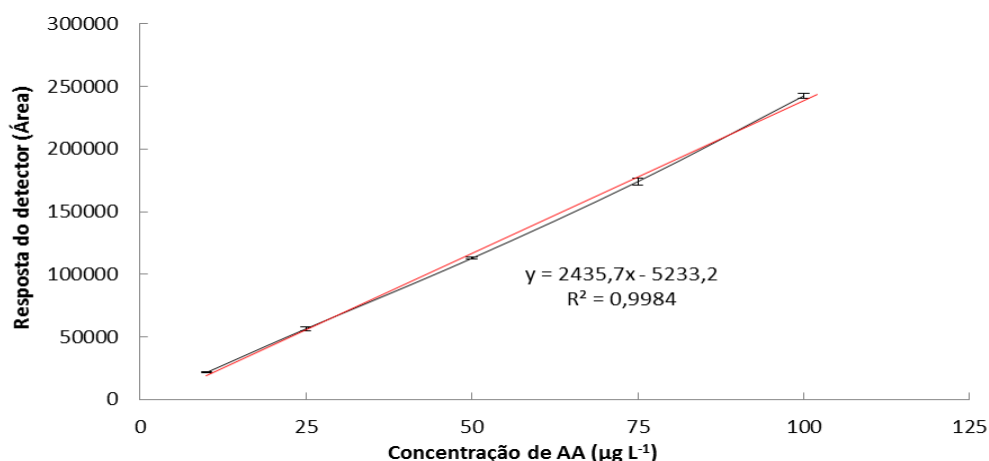


Figura 14 – Curva de calibração para o método na faixa de trabalho de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, com linearidade obtida de 0,9984.

Concentração	
Solução ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Final ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0,10	10
0,25	25
0,50	50
0,75	75
1,00	100

Tabela 1 - Concentrações das soluções aquosas iniciais e correspondentes concentrações das amostras em solvente após extração em fase sólida.

A sensibilidade é avaliada através da inclinação da reta da curva de calibração. Na curva obtida para o método (Figura 15) obteve-se uma reta com boa inclinação, ou seja, próxima de 45° , representando boa sensibilidade do mesmo.

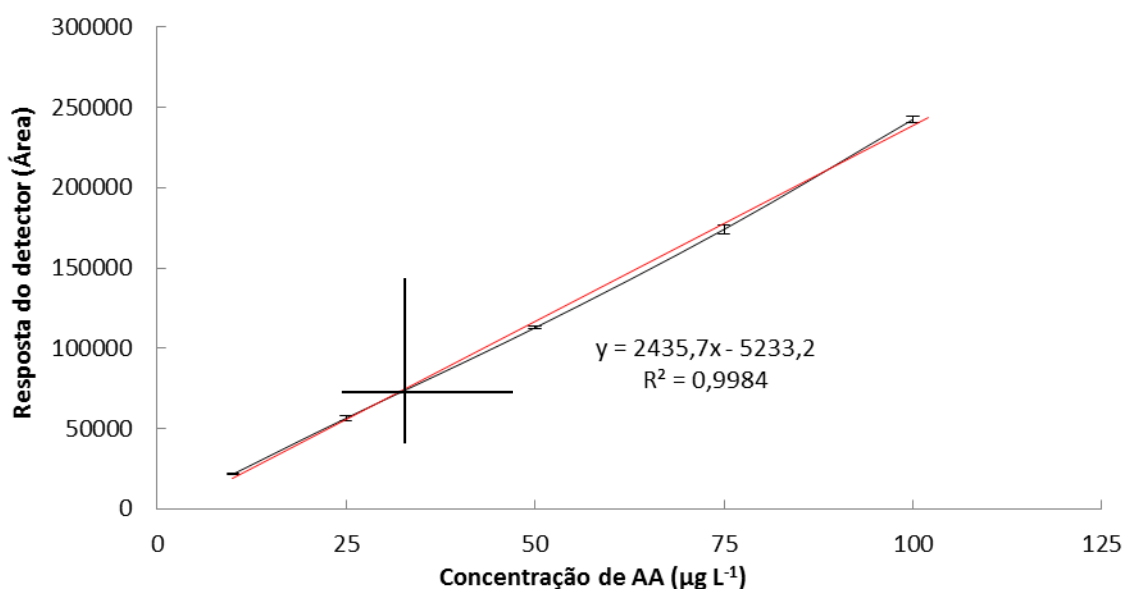


Figura 15 - Curva analítica com indicação da reta, com detalhe da inclinação próxima a 45° .

Para determinação da precisão do método, foram avaliadas a repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi obtida através do coeficiente de variação das análises realizadas em triplicata das amostras em solvente nas concentrações de 10; 25; 50; 75 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Os coeficientes de variação (%) são apresentados na Tabela 2 para cada concentração considerada.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV (%)
10	2,870
25	2,373
50	0,830
75	1,439
100	0,680

Tabela 2 - Repetitividade do método determinada para cinco níveis de concentração através da obtenção do coeficiente de variação relativo às análises realizadas em triplicata, sob mesmas condições.

A precisão intermediária foi avaliada em dois dias diferentes, para os mesmos níveis de concentrações. Os resultados dos coeficientes de variação obtidos são apresentados na Tabela 3.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV (%)
10	0,693
25	1,885
50	0,950
75	1,890
100	0,843

Tabela 3 - Precisão intermediária do método determinada para cinco níveis de concentração considerando o coeficiente de variação de amostras analisadas em dois dias diferentes.

Solução padrão em solvente na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizada para determinação dos limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) instrumentais. Não sendo possível determinar a relação sinal/ruído, embora a AA tenha sido detectada, considerou-se como $\text{LQ} > 1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $\text{LD} = 1 \mu\text{g L}^{-1}$. Essa concentração corresponde a uma concentração na solução inicial de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$.

A recuperação do método EFS-CLAE-UV foi avaliada a partir da fortificação de amostra real com acrilamida, em concentração de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o valor máximo permitido pela Portaria MS 2914/2011. A amostra passou por processo de EFS, sob as condições descritas anteriormente, e foi analisada via CLAE-UV, em duplicata. A concentração da amostra inicial ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) corresponde a uma concentração final após a EFS de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Com os resultados obtidos dessa análise, a recuperação do processo completo foi de 21,8%, ou seja, a concentração de acrilamida quantificada foi de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, ainda dentro da faixa de trabalho. Embora as análises dos padrões tenham resultado em bons parâmetros de validação, quando analisada amostra real fortificada, o processo não demonstrou

qualidade satisfatória, visto que a recuperação recomendada para analitos em concentração de nível de traço é de 70 a 120 % (RIBANI et al, 2004).

Os parâmetros e métodos desenvolvidos devem ser aprimorados para um melhor resultado em amostras reais, visto que podem existir diversos compostos na água tratada atuando como interferentes nos processos de extração e separação. Amostras reais de água tratada não tiveram acrilamida detectada pelo método EFS-CLAE-UV, porém, a partir dos resultados obtidos com a amostra fortificada, a não detecção de acrilamida não é garantia de que a amostra não continha AA. Caso houvesse, seria abaixo do limite máximo permitido estabelecido pelo Ministério da Saúde, considerando a recuperação determinada.

4 CONCLUSÃO

O procedimento de extração em fase sólida desenvolvido com utilização de cartuchos compostos de carvão ativo demonstrou boa recuperação da acrilamida, cerca de 72%. Este valor deve-se à combinação de fatores como componente sólido do cartucho, solvente eluente e condições cromatográficas adequadas. Nesse caso, metanol foi melhor eluente que a acetona para a acrilamida na etapa de EFS.

Com a utilização da CLAE-UV, foi desenvolvido um método com ótima linearidade ($R^2 = 0,9984$), boas sensibilidade, repetitividade e precisão intermediária, na faixa de trabalho de 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quanto aos limites de detecção e quantificação, LD = 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e LQ > 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Quando avaliado processo de EFS-CLAE-UV, a recuperação da acrilamida em amostra real fortificada foi de apenas 21,8%.

AGRADECIMENTOS

A autora agradece à CAPES e à FAPERGS (Projeto nº 12/2291-8) pelo auxílio financeiro, e ao apoio do Laboratório de Química Analítica Ambiental, do IQ-UFRGS, nomeadamente a prof. Tânia Mara Pizzolato. Agradece, também, à CORSAN pela autorização às coletas de amostras de água tratada.

REFERÊNCIAS

Bortolomeazzi R, Munari M, Anese M, Verardo G (2012) Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC–MS/MS. *Food Chemistry* 135:2687-2693. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.057

Brown L, Rhead MM, Hill D, Bancroft KCC (1982) Qualitative and quantitative studies on the in situ adsorption degradation and toxicity of acrylamide by the spiking of the waters of two sewage works and a river. *Water Res.* 16:579-591

Chu C, Metcalfe C (2009) Analysis of acrylamide in water using a coevaporation preparative step and isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79:5093-5096. doi: 10.1021/ac0623179

Croll BT, Arkell GM, Hodge RPJ (1974) Residues of acrylamide in water. *Water Research* 8:989-993

EU – EUROPEAN UNION (2014) Drinking water regulations. <http://www.irishstatutebook.ie/pdf/2014/en.si.2014.0122.pdf>. Acessado em 09 Set 2014

EU – EUROPEAN UNIO (2002) Insitute for Health and Consumer Protection. Risk Assesment: Acrylamide. Disponível em: <http://europa.eu.int> Acessado em 25 Ago 2014

Gökmen V, Senyuva H, Acar J, Sarioglu K (2005) Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1088:193-199. doi: 10.1016/j.chroma.2004.10.094

Hintermainer-Erhard G. (2002) Lebensmittelsicherheit: Acrylamid. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 14:266-267. doi: 10.1007/BF03038832

IPCS (1999) Acrylamide (PIM 652). Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652.htm> Acessado em 09 Mar 2015

JohnMorrisScientific. Solid Phase Extraction. Disponível em: <http://www.johnmorris.com.au/Solid-Phase-Extraction-Automated/ASPEC-C18-50mg-1ml.aspx?pd=181238&CategoryID=1302> Acesso em 09 Mar 2015

Kaykhail M, Abdi A (2013) Rapid and sensitive determination of acrylamide in potato crisps using reversed-phase direct immersion single drop microextraction-gas chromatography. *Anal. Methods* 5:1289-1293. doi: 10.1039/C2AY26560E

Mastovska K, Lehotay S (2006) Rapid Sample Preparation Method for LC–MS/MS or GC–MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. *J. Agric. Food Chem.*54:7001-7008. doi: 10.1021/jf061330r

Michalak J, Gujska E, Kuncewicz A (2013) RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 32:68–73. doi: 10.1016/j.jfca.2013.08.006

Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K, Maitani T (2002) Determination of acrylamide in foods by GC/MS using ¹³C-labeled acrylamide as an internal standard. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 43:371-376

Ribani M et al. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27:771-780

Roach J, Andrzyewski D, Gay M, Norrtrup D, Musser S (2003) Rugged LC-MS/MS Survey Analysis for Acrylamide in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 51:7547-7554. doi: 10.1021/jf0346354

Takatsuki S, Nemoto S, Sasaki K, Maitani T (2003) Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 44:89-95

Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Trnqvist M (2002) Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4998-5006. doi: 10.1021/jf020302

WHO/IARC (1994) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrials chemicals. Vol. 60. IARC, Lyon

WHOa (2011) Acrylamide in Drinking-water. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/acrylamide.pdf. Acessado em 09 Setembro 2014

WHOb (2011) Guidelines for drinking-water quality. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/. Acessado em 09 Set 2014

Zhang Y, Ren Y, Zhao H, Zhang Y (2007) Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 584:322-332. doi: 10.1016/j.aca.2006.10.061

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do trabalho permitiu conhecer o comportamento da acrilamida sob ação da radiação UV, do conjunto UV/H₂O₂ e do H₂O₂. Essas informações permitem utilização desses processos para degradação de acrilamida em conjunto com outros contaminantes presentes na água para abastecimento, que sabidamente não são eliminados ou retidos nos processos convencionais de tratamento de água.

Importante salientar a possibilidade da utilização da radiação solar como fonte de radiação UV, que demonstra ótimos resultados na degradação de outros contaminantes (em fotólise direta, fotólise conjugada, e fotocatalise) e tem possibilidade de ser igualmente eficiente para a acrilamida. Apresenta ainda o benefício adicional de ser uma energia gratuita e de grande disponibilidade.

O desenvolvimento da metodologia analítica resultou em um método eficiente de EFS e de análise via CLAE-UV, na análise de padrões. A partir desses resultados, o método pode ser melhorado e adequado para amostras reais para efetiva utilização e monitoramento da acrilamida na água potável.

Esse trabalho, como primeiro a ser desenvolvido nessa temática dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, área de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, é de grande valia para o Programa. Seu desenvolvimento e os resultados obtidos, assim como a parceria com o LQAA do IQ-UFRGS, apresentam uma grande possibilidade de trabalhos futuros na área de degradação de contaminantes e de métodos analíticos via cromatografia.

4 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar os experimentos de degradação na concentração ambiental, ou seja, na concentração encontrada em amostras de água potável.

Realizar os experimentos de degradação em amostras reais.

Concluir o método com a utilização de cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas com etapa anterior de derivatização (APÊNDICE), para se atingir LD e LQ menores, alcançando o padrão internacional de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Identificar, através de espectrometria de massas, os subprodutos gerados na degradação da acrilamida. Se necessário, realizar testes de toxicidade com os mesmos.

APÊNDICE

BROMAÇÃO DE ACRILAMIDA PARA ANÁLISE POR CG-EM

1 Introdução

Devido a dificuldade de análise da acrilamida, principalmente em função da sua alta solubilidade em água, os principais métodos analíticos desenvolvidos são baseados em processos de derivatização da acrilamida. Papousek et al (2014) desenvolveu método para determinação de acrilamida e acroleína em fumaça de cigarro, após solubilização da mesma em água, via processo de brominação desses analitos.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi aplicar o processo de bromação descrito por Papousek et al (2014) em amostras aquosas de acrilamida e avaliar sua recuperação.

2 Reagentes

Acrilamida P.A e sulfato de magnésio ($MgSO_4$) (Sigma-Aldrich), bromato de potássio ($KBrO_3$), brometo de potássio (KBr), ácido sulfúrico P.A. (H_2SO_4 , Proquimios), tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), acetato de etila grau HPLC . Foram empregados reagentes comerciais.

2.1 Procedimento de derivatização e extração líquido-líquido

Processo de derivatização foi adaptado de Papousek et al. (2014). Para processo de derivatização, foi adicionado à amostra de 10 mL 2 mL de solução 0,1 M de $KBrO_3$, seguido de 0,5 g de KBr e de 4 mL de solução 0,1M H_2SO_4 . Nesse momento inicia o processo de bromação da acrilamida, indicado pela coloração amarelada da amostra. O recipiente permaneceu em banho de gelo e no escuro por 30 min. Ao fim da reação, adicionou-se 3 mL de solução 0,1 M de $Na_2S_2O_3$. A extração foi realizada com acetato de etila, 3 vezes de 2 mL cada. Empregou-se $MgSO_4$ para remoção da umidade. O extrato foi então lentamente reduzido a 1 mL em evaporador (Reacti-Therm, Thermo Scientific) com fluxo de N_2 .

2.2 Análise via GC-MS

Amostras derivatizadas foram analisadas em GC-MS Shimadzu QP-2010SE equipado com injetor automático (AOC-20i, Shimadzu) e coluna capilar Restek Rtx-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL min⁻¹. Parâmetros de injeção foram: 1 μL *splitless*; 50°C por 5 min e 10°C/min até 250°C. As temperaturas do injetor e da interface foram 250°C e 280°C, respectivamente. Analisador de massas quadrupolar foi empregado e os dados foram capturados nos modos SCAN e SIM. A energia de ionização utilizada foi de 30 eV.

3 Resultados e discussão

3.1 Processo de derivatização e de extração líquido-líquido

Derivatização da acrilamida em solução aquosa com concentração de 5 mg L⁻¹ ocorreu de forma esperada. Análise por CG-EM detectou o composto derivatizado 2,3 – dibromopropionamida, com tempo de retenção de 8,7 min, nas condições cromatográficas descritas no item 2.2 (figura 1). Análise do espectro de massas obtido (figura 2a) confirma a detecção quando comparado ao espectro disponível pela biblioteca NIST/EPA/NIH 2008 (figura 2b). A boa correspondência entre os espectros permite a seleção de íons de relação massa/carga característicos para posteriores análises em modo SIM, que torna o método mais sensível.

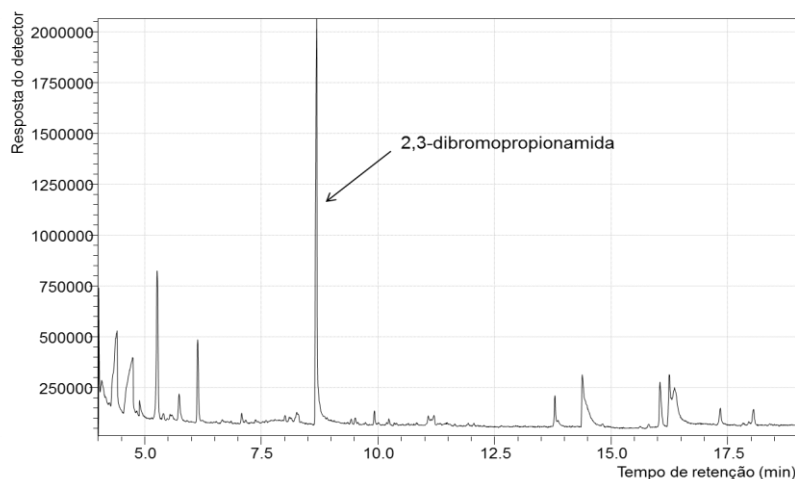


Figura 01 - Cromatograma da acrilamida bromada, ou 2,3 - dibromopropionamida.

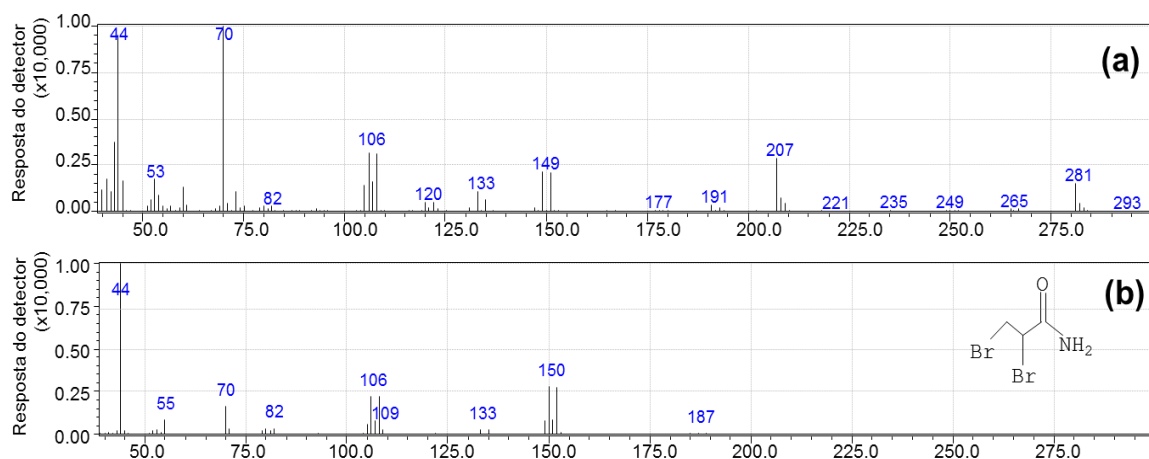


Figura 02 - Espectros de massas de 2,3 – dibromopropionamida: (a) espectro de massas obtido via CG-EM; (b) espectro de massas disponibilidade pela biblioteca NIST/EPA/NIH 2008.

Foi realizada derivatização de solução aquosa a 1 mg L^{-1} de acrilamida, que demonstrou bons resultados (figura 3), mesmo com a utilização de reagentes comerciais, com grau de pureza indesejável para análises cromatográficas. Assim, espera-se que a qualidade do processo de derivatização, extração e separação seja ampliada a partir da utilização de reagentes de qualidade adequada.

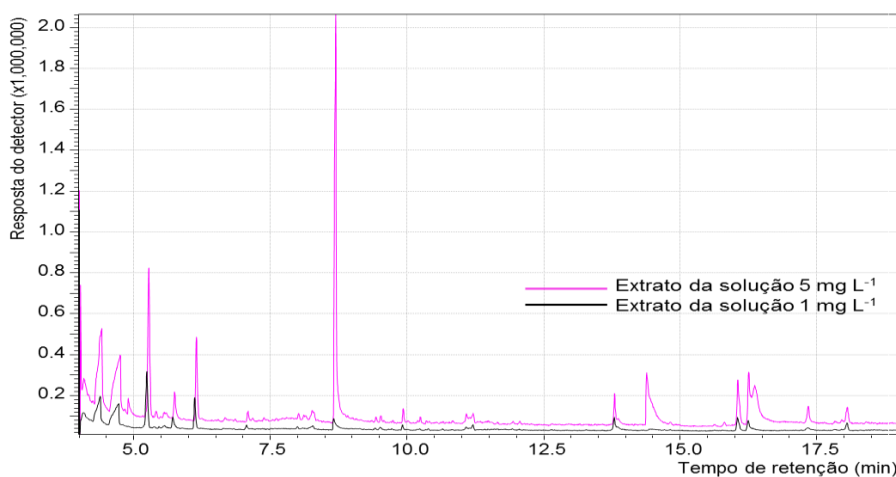


Figura 03 - Cromatogramas de 2,3 - dibromopropionamida correspondentes às concentrações iniciais de acrilamida em solução aquosa de 5 e 1 mg L^{-1} .

4 Conclusão

O processo de bromação da acrilamida via metodologia adaptada de Papousek et al (2014) demonstrou-se um método adequado à análise de amostras de água tratada. A reação de brominação ocorre de forma rápida (30 min) e, embora

exista o risco da liberação de bromo, esse pode ser facilmente controlado seguindo-se recomendações básicas de segurança laboratorial.

Análise via CG-EM utiliza condições amplamente utilizadas e difundidas em laboratórios de cromatografia, facilitando a aplicabilidade do método. De acordo com os resultados preliminares, parece um método muito sensível, mesmo na presença de interferentes. A utilização futura de reagentes de grau de pureza adequados, deve tornar o método ainda mais sensível e permitir a conclusão e validação do mesmo.

Referência

PAPOUSEK, R.; PATAJ, Z.; NOVÁKOVÁ, P.; LEMR, K.; BARTÁK, P. Determination of acrylamide and acrolein in smoke from tobacco and e-cigarettes. *Chromatographia*, 77:1145-1151, 2014.