FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

Doseamento de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em solos florestais

CORNÉLIA GARRIDO SOUSA CASTRO

Porto
2000

FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

Doseamento de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em solos florestais

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/09/98
Reg. 1523
Cota
FFM
CAS

CORNÉLIA GARRIDO SOUSA CASTRO

Porto
2000

MESTRADO EM CONTROLO DE QUALIDADE

ÁREA CIENTÍFICA: AMBIENTE

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo de Qualidade na área de especialização de Ambiente, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

DR n.º 162 de 16/7/97, II série, páginas 8485 e 8486

DR n.º 216 de 13/10/92

Trabalho realizado em:

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Serviço de Química Orgânica

Serviço de Hidrologia

Orientador:

Professor Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso

Ao Prof. Doutor Carlos Manuel Magalhães Afonso pelas sugestões e correcções efectuadas.

À Prof. Doutora Maria de Lourdes Bastos pelo incentivo.

Ao Dr. Carlos Gonçalves pela contribuição na realização da parte experimental e pela sua disponibilidade.

Ao Dr. Manuel Pinto e à Dra. Edite Cunha por toda a ajuda prestada.

Ao Sr. sub-chefe José Mendes da Corporação de Bombeiros Voluntários da freguesia de Melres, concelho de Gondomar pelas informações prestadas.

Aos meus alunos por terem sido o estímulo sempre presente.

Ao Adelino pelo apoio incondicional.

Aos meus pais que me ensinaram que "*o saber não ocupa lugar*".

Alguns dos resultados preliminares obtidos durante este estudo constam do poster "**PAH concentration and composition in soils**" apresentado no XVII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, que decorreu em Lisboa entre 1 e 3 de Março de 2000, subordinado ao tema "*A Química nas Interfaces*".

RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) formam-se durante a combustão incompleta de matéria orgânica e constituem um importante grupo de poluentes, quer devido à sua ubiquidade e persistência no ambiente, quer devido à sua comprovada carcinogenicidade.

Com o objectivo de determinar o teor de seis PAHs – fluoranteno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno – analisaram-se amostras de solos provenientes de locais sujeitos a incêndios florestais e de um outro envolvente dos anteriores mas não sujeito a fogo.

O estudo incidiu sobre solos provenientes da freguesia de Medas, concelho de Gondomar (Porto) onde se situam os locais sujeitos a fogos florestais em Junho e Julho de 1999.

Recorreu-se a dois métodos de extracção: fluido supercrítico (SFE) e Soxhlet. Os extractos obtidos por Soxhlet foram purificados por cromatografia em coluna. Todos os extractos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência.

Os resultado obtidos demonstram que a concentração dos seis PAHs em estudo nos solos provenientes do locais onde ocorreram incêndios é bastante superior à concentração dos mesmos compostos num solo proveniente da área envolvente não ardida.

Os resultados de estudo realizado demonstram que o uso de SFE para análise e quantificação de PAHs em amostras ambientais heterogéneas e complexas,

como os solos, pode apresentar várias vantagens sobre o método clássico que é o Soxhlet. O método desenvolvido e apresentado é preciso, exacto e apresenta uma linearidade de resposta e um limite de detecção que permitem a quantificação de níveis vestigiários.

Os níveis de concentração dos PAHs nos solos deverão ser monitorizados para identificar situações que possam ser potencialmente perigosas para a vida humana pelo que o estudo realizado poderá constituir referência e motivação para estudos ambientais futuros.

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are formed during the combustion of organic matter and are an important group of pollutants due to either their ubiquity and persistence in the environment or to their proved carcinogenicity.

With the aim of quantifying the amount of six PAHs – fluoranthene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*g,h,i*]perylene and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene – samples of forest soils showing fire action as well as soils from surrounding areas were analysed.

This study was carried out with forest soils from Medas, Gondomar (Oporto) where fires occurred between June and July of 1999.

In this study two extraction methodologies were compared: SFE and Soxhlet. The Soxhlet extracts were purified by column chromatography. The quantification of PAHs in every extract was established by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector.

Results show that the amount of the six PAHs in forest soils showing fire action was higher than the one from surrounding areas. Thus, the use of SFE for analysis and quantification of PAHs in heterogen and complex matrix like soils may have some advantages over the classical Soxhlet methodology.

The developed methodology is precise and accurate, shows linearity of response and a limit of detection that allows the quantification of traces.

PAHs should be monitored in soils in order to identifying eventually hazardous situations for human life in such a way that the study performed can be used as a reference and a motivation for further environmental studies.

ÍNDICE

Página

PARTE I – INTRODUÇÃO 1

1. Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos 1
2. Características gerais dos PAHs 7
3. Vias de degradação os PAHs no ambiente 15

PARTE II – IMPACTE DE PAHs NO AMBIENTE E NA SAÚDE 21

1. Fontes de PAHs 21
2. Ocorrência/Reciclagem no ambiente 23
3. Os PAHs e a Saúde Humana 33

PARTE III – ANÁLISE DE PAHs 46

1. Introdução 46
2. Métodos de extracção 49
   - 2.1. Extracção por Soxhlet 49
   - 2.2. Extracção por ultra-sons 51
   - 2.3. Extracção assistida por micro-ondas (MAE) 53
   - 2.4. Extracção em fase sólida (SPE) 55
   - 2.5. Microextracção em fase sólida (SPME) 57
   - 2.6. Extracção por solvente acelerada (ASE) 59
   - 2.7. Extracção por fluido supercrítico (SFE) 61
   - 2.8. Conclusões 66
3. Técnicas cromatográficas na análise de PAHs 68
   - 3.1. Introdução 68
   - 3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) 70
   - 3.3. Cromatografia de fase gasosa (CG) 81
   - 3.4. HPLC *versus* CG 87
   - 3.5. Outros métodos cromatográficos 89
     - 3.5.1. HPLC-CG 89
     - 3.5.2. Cromatografia de fluido supercrítico (SFC) 92

3.5.3. Cromatografia planar 95
3.5.4. Outros 97

PARTE IV – EXPERIMENTAL 99

1. Objectivos 99
2. Material 103
3. Reagentes e padrões 104
4. Instrumentação 105
5. Amostragem 107
5.1. Amostras 107
5.2. Colheita 109
5.3. Conservação, preparação e armazenamento das amostras 110
6. Procedimento analítico 111
6.1. Extracção 111
6.1.1. Extracção por Soxhlet 111
6.1.1.1. Purificação dos extractos 112
6.1.2. Extracção por fluido supercrítico 113
7. Análise cromatográfica 116
7.1. Condições cromatográficas 116
7.2. Identificação 118
7.3. Quantificação 119
8. Validação 122
8.1. Precisão 123
8.1.1. Repetibilidade da técnica analítica 123
8.1.2. Repetibilidade do procedimento experimental global 124
8.2. Exactidão 125
8.3. Linearidade 126
8.4. Limite de detecção (LD) 127
8.5. Limite de quantificação (LQ) 128

PARTE V – RESULTADOS E DISCUSSÃO 129

1. Introdução 129
2. Preparação das amostras 130
3. Extracção por Soxhlet 131

4. Extracção por fluido supercrítico 132
5. Soxhlet *versus* SFE 136
6. Análise cromatográfica 138
7. Validação 154
7.1. Precisão 157
7.1.1. Repetibilidade da técnica analítica 157
7.1.2. Repetibilidade do procedimento experimental global 159
7.2. Exactidão 160
7.3. Linearidade 164
7.4. Limite de detecção (LD) 166
7.5. Limite de quantificação (LQ) 167

PARTE VI – CONCLUSÕES 169

BIBLIOGRAFIA 173

ÍNDICE DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

É apresentada a designação anglo-saxónica nos casos em que a sigla usada não corresponde à tradução portuguesa.

λ - Comprimento de onda

ACN – acetonitrilo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ASE – Extracção por Solvente Acelerada (Accelerated Solvent Extraction)

ASTM – American Society for Testing and Materials

BPC – Cromatografia de Fase Ligada (Bonded Phase Chromatography)

BPDE – Benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido

C_{18} – Octadecilsilano

CEPA – Canada Environmental Protection Act (Acto de Protecção Ambiental do Canadá)

CG – Cromatografia de Fase Gasosa

DAD – Detector de Fotodíodos (Diode Array Detector)

DCM – Diclorometano

1,12-DMBA – 1,12-dimetilbenz[*a*]antraceno

7,12-DMBA – 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno

7,14-DMBa,jA – 7,14-dimetildibenz[*a,j*]antraceno

3,6-DMC – 3,6-dimetilcolantreno

EC – Electroforese Capilar

EM – Espectrometria de massa / Espectrómetro de massa

EPA – Agência de Protecção Ambiental (Environmental Protection Agency)

EU – Estados Unidos

FD – Detector de fluorescência (Fluorescence detector)

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FID – Detector de Ionização de Chama (Flame Ionization Detector)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Perfomance Liquid Chromatography)

HPTLC – Cromatografia em Camada Fina de Alta Eficiência (High Performance Thin Layer Chromatography)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (International Agency for Research on Cancer)

LD – Limite de detecção (Limit of Detection)

LEGC – Ligand Exchange Gas Chromatography (Cromatografia gasosa por troca de ligando)

LQ – Limite de Quantificação (Limit of Quantification)

MAE – Extracção assistida por micro-ondas (Microwave Assisted Extraction)

MEKC – Cromatografia Electrocinética Micelar (Micellar Electrokinetic Chromatography)

M_r – Massa Molecular Relativa

MSD – Detector de Massa (Mass Selective Detector)

NIST – National Institute of Standards and Technology

NP-BPC – Cromatografia de Fase Normal em Fase Ligada (Normal Phase – Bonded Phase Chromatography)

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (Organization for Economic Co-operation and Development)

ODS – Octadecilsilano

OSHA – Administração de Segurança e Saúde Ocupacional (Occupational Safety and Health Administration)

p.a. – pró-análise

PACs – Compostos Aromáticos Policíclicos (Polycyclic Aromatic Compounds)

PAHs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)

PC – Cromatografia em papel (Paper Chromatography)

RP-BPC – Cromatografia de Fase Reversa em Fase Ligada (Reverse Phase – Bonded Phase Chromatography)

RP-HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (Reverse Phase--High Performance Liquid Chromatography)

SFC – Cromatografia de Fluido Supercrítico (Supercritical Fluid Chromatography)

SFE – Extracção por Fluido Supercrítico (Supercritical Fluid Extraction)

SIM – Monitorização Selectiva de Iões (Single Ion Monitoring)

SPE – Extracção em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)

SPME – Microextracção em Fase Sólida (Solid Phase Microextraction)

TIC – Monitorização Total de Iões (Total Ion Monitoring)

TLC – Cromatografia em Camada Fina (Thin Layer Chromatography)

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta-visível

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Estrutura dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA 2

Figura 2 – Dibenzo[*a,h*]antraceno 5

Figura 3 – Benzo[*a*]pireno 5

Figura 4 – 3-metilcolantreno 5

Figura 5 – Alguns PAHs alternantes 8

Figura 6 – Alguns PAHs não alternantes 8

Figura 7 – PAHs obtidos por fusão "linear" e por fusão "ramificada" 8

Figura 8 – Benzo[*c*]fenantreno 9

Figura 9 – Estruturas planares do coranuleno e do [7]circuleno 9

Figura 10 – 7,12- DMBA e 1,12-DMBA 10

Figura 11 – 1-metilbenzo[*c*]fenantreno 10

Figura 12 – 7,14-DMBa,jA; 3,6-DMC; 11-metilbenzo[*a*]pireno 10

Figura 13 – Dibenzo[*def,p*]criseno (ou dibenzo[*a,l*]pireno) 11

Figura 14 – PAHs heterocíclicos comuns 12

Figura 15 – Azo-PAHs 12/13

Figura 16 – Tio-PAHs 14

Figura 17 – Oxo-PAHs 14

Figura 18 – Reacção de substituição electrofílica do antraceno 15

Figura 19 – Estruturas de nitro-PAHs comummente detectadas 16/17

Figura 20 – Produtos da reacção do pireno e do benzo[*a*]pireno com o ozono 18

Figura 21 – Aceno (antraceno) com região *meso* 19

Figura 22 – Epidióxidos do 7,12-DMBA e do 3,4-dihidrodiol-7,12-DMBA 19

Figura 23 – Algumas fontes de PAHs no ambiente 22

Figura 24 – Fontes e destino dos PAHs nos solos 25

Figura 25 – Degradação dos poluentes no solo por bactérias 28

Figura 26 – Destino químico, físico e biológico de PAHs nos meios aquático e terrestre 29

Figura 27 – Epoxidação do benzo[*a*]pireno 34

Figura 28 – Reacções de destoxicação do benzo[*a*]pireno-7,8-epóxido 34

Figura 29 – Biotransformação do 2-acetilaminofluoreno 36

Figura 30 – Mecanismos para o metabolismo dos PAHs pelas enzimas microssomais ... 37

Figura 31 – Formação de catiões radicais 38

Figura 32 – Activação metabólica do benzo[*a*]pireno-7,8-diol 39

Figura 33 – Formação de quinonas catalisada por enzimas dehidrogenases 40

Figura 34 – *Anti* BPDE e *syn*-BPDE 40

Figura 35 – Procedimentos usados num processo analítico 46

Figura 36 – Equipamento para extracção por Soxhlet 49

Figura 37 – Aparelho de ultra-sons 51

Figura 38 – Aparelho de micro-ondas 53

Figura 39 – Tubo SPE 55

Figura 40 – Seringa e fibra para SPME 57

Figura 41 – Sistema de extracção por solvente acelerada 59

Figura 42 – Sistema de extracção por fluido supercrítico 61

Figura 43 – Diagrama de fases do dióxido de carbono (CO_2) 62

Figura 44 – Diagrama esquemático de equipamento para HPLC 70

Figura 45 – Fase ligada 71

Figura 46 – Esquema de um detector de UV 74

Figura 47 – Sistema óptico de um detector DAD 74

Figura 48 – Espectro completo obtido com DAD 75

Figura 49 – Cromatograma tridimensional de PAHs 75

Figura 50 – Esquema do detector de fluorescência Waters® 474 76

Figura 51 – Representação esquemática de um sistema CG 81

Figura 52 – Detector FID 82

Figura 53 – Diagrama esquemático de CG-MSD 84

Figura 54 – Diagrama esquemático do sistema HPLC-CG 89

Figura 55 – Aparelho de HPLC-CG-EM 91

Figura 56 – Diagrama esquemático do sistema SFC 93

Figura 57 – Esquema do sistema HPTLC 96

Figura 58 – Seis PAHs em estudo 100

Figura 59 – Estratégia usada no procedimento analítico em estudo 102

Figura 60 – Localização da zona de colheita das amostras 107

Figura 61 – Envolvência dos locais de colheita das amostras 108

Figura 62 – Colheita das amostras 109

Figura 63 – Fase móvel e respectivo gradiente 116

Figura 64 – Procedimento analítico a que cada amostra de solo foi sujeita (Soxhlet) 120

Figura 65 – Procedimento analítico a que cada amostra de solo foi sujeita (SFE) 121

Figura 66 – Cromatograma obtido para a solução padrão 10,0 $\mu g.L^{-1}$ 138

Figura 67 – Cromatograma obtido para o solo 2 (Soxhlet) 139

Figura 68 – Cromatograma obtido para o solo 1 (SFE) 139

Figura 69 – Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 1 (Soxhlet) 141

Figura 70 – Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 2 (Soxhlet) 141

Figura 71 – Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 3 (Soxhlet) 142

Figura 72 – Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 4 (Soxhlet) 142

Figura 73 – Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 1 (SFE) 144

Figura 74 - Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no solo 3 (SFE) 144

Figura 75 – Comparação dos resultados obtidos no solo 1 com os do solo 4 146

Figura 76 – Comparação dos resultados obtidos no solo 2 com os do solo 4 146

Figura 77 – Comparação dos resultados obtidos no solo 3 com os do solo 4 147

Figura 78 – PAHs mais representados nos solos em estudo 151

Figura 79 – Comparação gráfica dos resultados SFE *versus* Soxhlet para o solo 1 163

Figura 80 - Comparação gráfica dos resultados SFE *versus* Soxhlet para o solo 3 163

Figura 81 – Curva de calibração 164

ÍNDICE DE QUADROS

Página

Quadro I – Extracção de PAHs de solos 54

Quadro II – Comparação de diversas técnicas de extracção de PAHs de um solo 60

Quadro III – Vantagens e limitações das metodologias utilizadas na extracção de PAHs em amostras ambientais 66

Quadro IV – Determinação de PAHs por HPLC em solos e peixe 78

Quadro V – Extracção de PAHs em alimentos 79

Quadro VI – Determinação de PAHs por HPLC em matéria particulada 80

Quadro VII – Determinação de PAHs por CG em solos 85

Quadro VIII – Determinação de PAHs por CG em matéria particulada 85

Quadro IX – Determinação de PAHs por CG em mexilhões 86

Quadro X – Massas de cada solo utilizadas em SFE 113

Quadro XI – Parâmetros e condições ensaiadas em SFE 114

Quadro XII – Condições de extracção SFE finais 114

Quadro XIII – Fase móvel e gradiente utilizados 116

Quadro XIV – Programação de comprimentos de onda utilizada 117

Quadro XV – Tempos de retenção dos padrões de PAHs utilizados 118

Quadro XVI – PAHs a que correspondem as duas concentrações mais elevadas 151

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Composição das amostras nos seis PAHs em estudo ($\mu g.Kg^{-1}$) após extracção por Soxhlet 140

Tabela 2 – Composição das amostras nos seis PAHs em estudo ($\mu g.Kg^{-1}$) após extracção por SFE 143

Tabela 3 – Teor total dos seis PAHs nas amostras em estudo 149

Tabela 4 – Repetibilidade da técnica analítica (mesmo dia) 157

Tabela 5 – Repetibilidade da técnica analítica (três dias) 158

Tabela 6 – Repetibilidade do procedimento experimental global 159

Tabela 7 – Comparação da eficiência da extracção por Soxhlet e por SFE para os seis PAHs em estudo nos solos 1 e 3 162

Tabela 8 – Equações das rectas de regressão da curva de calibração 165

Tabela 9 – Desvio padrão relativo (RSD %) das áreas para as determinações em triplicado de cada nível de concentração 165

Tabela 10 – Limite de detecção e limite de quantificação da técnica analítica 167

PARTE I – INTRODUÇÃO

PARTE I – INTRODUÇÃO

1. OS HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

A Humanidade inicia o século XXI com uma preocupação universal: o meio ambiente. Os meios de comunicação social, os programas escolares e os governos fazem com que, cada vez mais, todos estejamos conscientes de que a intervenção do Homem no Planeta pode também arrastar consigo a sua destruição. A melhoria dos padrões de vida, a tecnologia e a chegada do Homem a todos os recantos do mundo estão na origem da libertação no ambiente de milhares de novas moléculas que a Natureza não consegue neutralizar e que criam desequilíbrios difíceis de controlar.

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) ou poliarenos representam uma importante classe de tais compostos, resultando o interesse do seu estudo da ubiquidade [1] e da mutagenicidade e carcinogenicidade da maior parte deles [2]. Mais de 100 PAHs foram já caracterizados na natureza, 16 dos quais foram classificados como "poluentes prioritários" pela Agência de Protecção Ambiental (EPA) americana (Figura 1 – página 2) [3].

Destes 16 PAHs, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Cancro (IARC) considerou o benzo[*a*]pireno e o dibenzo[*a,h*]antraceno como os mais carcinogénicos [3].

Os PAHs, por definição, contêm apenas carbono e hidrogénio e são apenas uma das classes de um grupo mais genérico, os compostos aromáticos policíclicos (PACs). A designação PACs inclui também PAHs contendo grupos cloro, ciano, carboxi, hidroxilo, amino, nitro ou tio como substituintes nos anéis. Átomos de

azoto, de enxofre e de oxigénio podem, contudo, substituir átomos de carbono nos anéis e os compostos "heteroaromáticos" resultantes agrupam-se com os hidrocarbonetos com os quais se assemelham nas suas propriedades e no seu comportamento em análise. Como não existe ainda uma designação universal para descrever todos estes compostos aromáticos colectivamente, encontra-se muitas vezes referido na literatura compostos aromáticos policíclicos (PACs) para designar, não só os PAHs, mas também os seus análogos. Historicamente, nesta categoria de compostos policíclicos, os PAHs foram os primeiros a receber atenção e, consequentemente, "PAH" passou a ser a designação mais familiar [4,5].

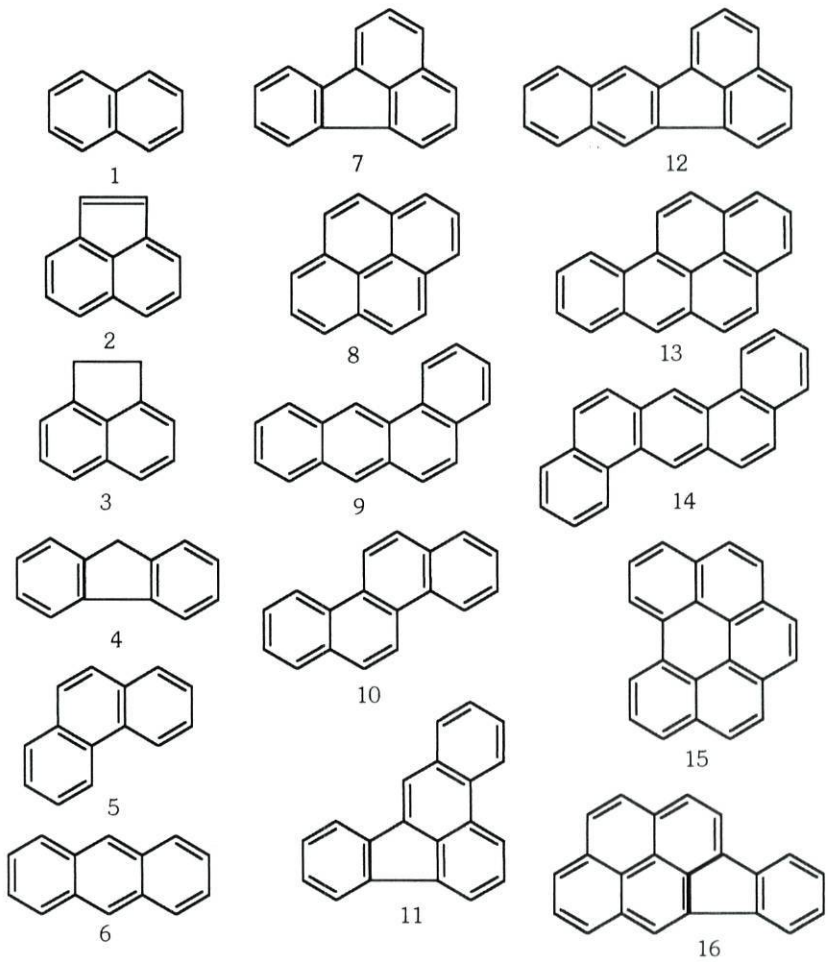


Figura 1. Estruturas dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA

1 – naftaleno **2** – acenaftileno **3** – acenafteno **4** – fluoreno **5** – fenantreno **6** – antraceno

7 – fluoranteno **8** – pireno **9** – benzo[*a*]antraceno **10** – criseno **11** – benzo[*b*]fluoranteno

12 – benzo[*k*]fluoranteno **13** – benzo[*a*]pireno **14** – dibenzo[*a,h*]antraceno

15 – benzo[*g,h,i*]perileno **16** – indeno[1,2,3-*c,d*]pireno

Os PACs encontram-se numa grande variedade no mundo natural sendo as possibilidades do arranjo espacial dos átomos de carbono em grupos, cadeias ou anéis quase ilimitadas. Constituem uma classe de substâncias em que a estrutura molecular central é mantida unida por ligações carbono-carbono estáveis.

Os PAHs são os principais produtos da combustão incompleta dos combustíveis fósseis e da matéria orgânica resultante, por exemplo, da queima de carvão, madeira e lixos, de máquinas de combustão interna e de geradores de calor e energia [6].

As estruturas aromáticas policíclicas formam-se sempre que substâncias orgânicas são expostas a temperaturas elevadas. Neste processo, designado por *pirólise,* liberta-se energia e os produtos aromáticos que se formam são mais estáveis que os seus precursores [4].

Alguns minerais orgânicos raros com uma bonita fluorescência foram encontrados na Califórnia nos Estados Unidos (EU) e na Europa Oriental. O químico francês Jean-Baptiste André Dumas estudou estes minerais na primeira metade do século XIX. Por volta de 1880, químicos alemães isolaram dois hidrocarbonetos aromáticos de quatro anéis em amostras de mercúrio em Idrija, na Jugoslávia. A idrialite desta região, a curtisite da Califórnia e os minerais afins de outros locais foram depois objecto de várias investigações. Embora a idrialite e a curtisite sejam quimicamente diferentes, contêm pelo menos centenas de PAHs juntamente com os seus análogos com enxofre e azoto, bem como derivados alquílicos em muitas combinações de substituição [4]. Em 1947, W. Kern identificou o PAH com quatro anéis aromáticos, criseno, num solo de jardim. No final dos anos 60 considerava-se

que se encontram presentes na maior parte dos solos, se não em todos, 10 a 15 hidrocarbonetos não substituídos [4].

Desde o primeiro estudo da idrialite efectuado por Dumas e da descoberta do criseno no solo por Kern, o conhecimento sobre PAHs no ambiente evoluiu ao passo da evolução da tecnologia analítica [4].

Em 1775, o médico e cirurgião inglês Percival Pott do hospital de S. Bartolomeu em Londres, referiu uma relação específica e causal entre a exposição a misturas ambientais e a indução de cancro. Na monografia "Surgical Observations" [7], Pott descreveu a ocorrência de cancro do escroto num número de pacientes com a profissão de limpa-chaminés e concluiu que a ocupação desses homens estava directamente relacionada com a sua doença maligna [4], tendo ainda sugerido que a fuligem à qual estiveram expostos era o agente causal da sua condição de saúde. Só mais de um século depois (1892), Butlin descreveu a relativa raridade do cancro do escroto entre os limpa-chaminés do continente europeu, comparada com a dos de Inglaterra (esta diferença foi atribuída aos relativamente baixos padrões de higiene no Reino Unido) [5].

Em 1915, os patologistas japoneses Yamagawa e Ischikawa descreveram, pela primeira vez, a produção de tumores na pele de animais, pela aplicação repetida de alcatrão nas orelhas de coelhos durante um certo número de meses. Estudos posteriores demonstraram que o mesmo acontecia em ratinhos. Durante os 15 anos seguintes foram feitas muitas tentativas para determinar a natureza do material responsável pela malignidade do alcatrão.

Em 1930, Kennaway e Cook [5] produzem o primeiro PAH sintético, o dibenzo[*a*,*h*]antraceno (Figura 2).

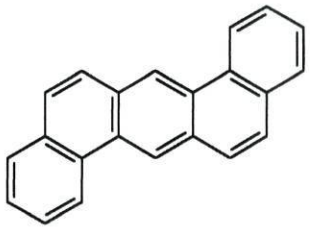


Figura 2. Dibenzo[*a*,*h*]antraceno

Foi demonstrado que este composto era um carcinogénio potente, depois de aplicações repetidas na pele de ratinhos. O isolamento do alcatrão e a síntese do benzo[*a*]pireno foi conseguida em 1932 por Kennaway e colaboradores através da pirólise de compostos orgânicos consistindo apenas em carbono e hidrogénio [5]. Em 1933, Cook e colaboradores conseguiram isolar uma pequena quantidade de substância activa a partir de duas toneladas de peixe. Essa substância demonstrou ser o benzo[*a*]pireno (Figura 3) cuja estrutura foi confirmada por síntese [5].

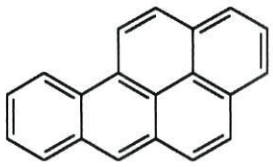


Figura 3. Benzo[*a*]pireno

Ainda em 1933, Wieland e Dane efectuaram a degradação do ácido desoxicólico, um dos componentes da bile humana e obtiveram o hidrocarboneto aromático 3-metilcolantreno (Figura 4) e, no ano seguinte, Cook demonstrou que o metilcolantreno era uma substância com elevado poder carcinogénico [8].

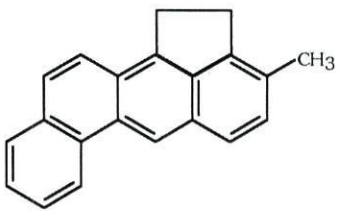


Figura 4. 3-metilcolantreno

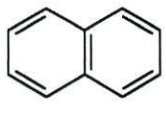
Assim, dado o conhecimento actual sobre a ubiquidade destes compostos no ambiente bem como a carcinogenicidade de muitos deles, o seu estudo revela-se assaz importante. Reveste-se, pois, de particular interesse a investigação de métodos de detecção de concentrações cada vez mais pequenas bem como de meios para remediar os efeitos no ambiente e os efeitos biológicos destes compostos.

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PAHs

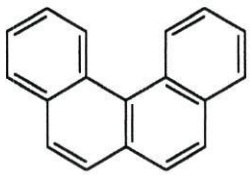
Os PAHs constituem uma classe de moléculas orgânicas extraordinariamente grande e diversificada. São sólidos cristalinos ou líquidos, incolores ou apresentando cores variadas [7].

Os tipos de poliarenos produzidos na combustão incompleta da matéria orgânica e dos combustíveis fósseis variam consideravelmente com a temperatura. A temperaturas elevadas, os produtos são misturas relativamente simples de PAHs de baixa massa molecular, sem substituintes alquílicos. A temperaturas moderadas, as misturas de produtos são mais complexas, contendo já quantidades apreciáveis de PAHs com substituintes alquílicos. A baixas temperaturas, a aromatização ocorre a uma velocidade marcadamente menor e a fragmentação dos grupos alquílicos está menos favorecida. Nestas condições, os poliarenos alquilsubstituídos tornam-se os produtos predominantes [4,6].

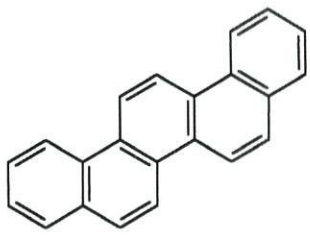
Podem considerar-se dois grandes grupos de PAHs: *alternantes* e *não-alternantes*. Os primeiros incluem PAHs que derivam do benzeno por fusão de anéis benzenóides adicionais (o mais simples é o naftaleno, com 10 átomos de carbono) (Figura 5 – páginas 7/8).



naftaleno



benzo[*c*]fenantreno



piceno

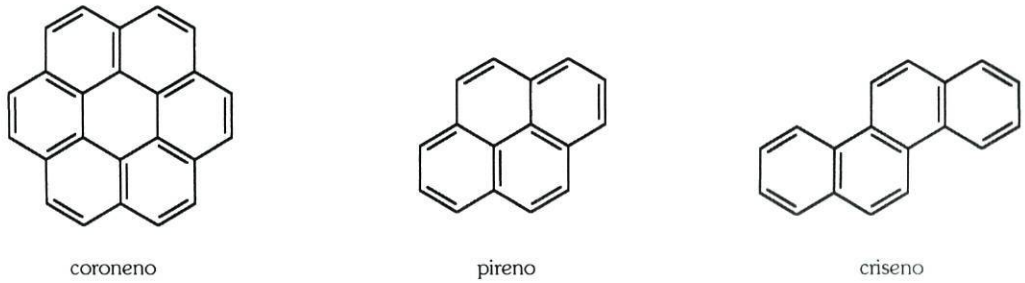


Figura 5. Alguns PAHs alternantes

Os PAHs não alternantes, para além dos anéis aromáticos, podem conter outros anéis com menos ou mais de seis átomos de carbono (Figura 6) [6].

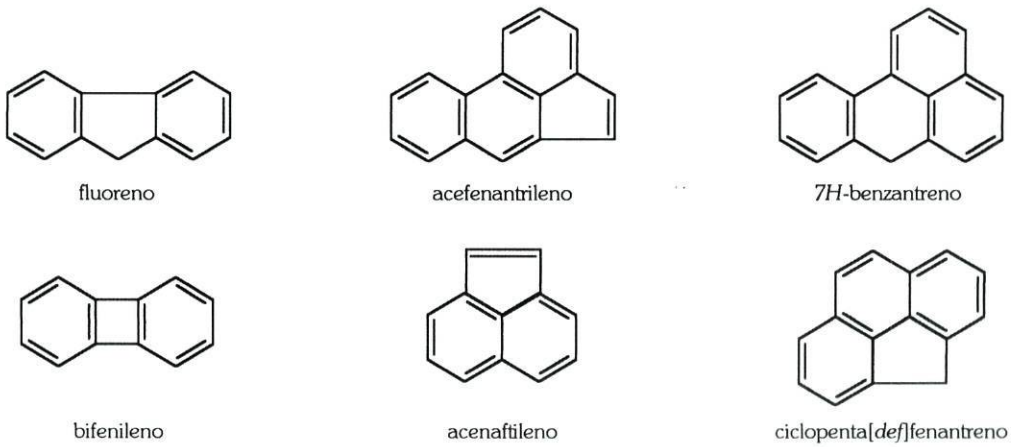


Figura 6. Alguns PAHs não alternantes

Os PAHs podem formar-se por fusão "linear" como no caso do antraceno ou por fusão "ramificada", como no caso do benzo[*a*]antraceno, podendo distinguir-se nestes as zonas K, L e em baía (Figura 7) [9].

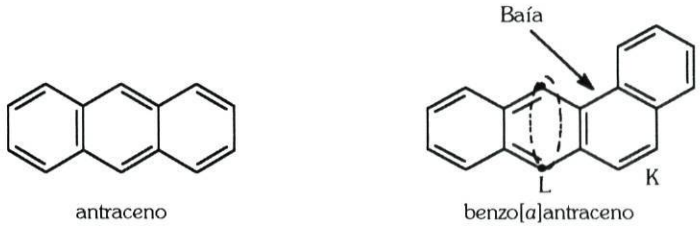


Figura 7. PAHs obtidos por fusão "linear" e por fusão "ramificada"

A maior parte dos poliarenos alternantes são planares mas a densidade espacial intramolecular pode, em alguns casos, resultar numa considerável deformação da geometria molecular. Por exemplo, o benzo[*c*]fenantreno sofre deformação em consequência de interacção estérica na região *fjord* da molécula (Figura 8).

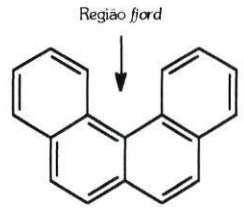
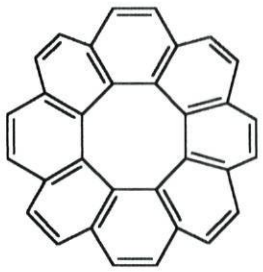


Figura 8. Benzo[*c*]fenantreno

O coranuleno e o [7]circuleno (que contêm anéis aromáticos fundidos num arranjo circular) apresentam um outro tipo de deformação molecular. Como consequência de tensão interna, as ligações exteriores periféricas são alongadas enquanto que as ligações internas centrais são comprimidas. Estes compostos adoptam então as estruturas planares representadas na Figura 9.

Coranuleno



[7]circuleno

Figura 9. Estruturas planares do coranuleno e do [7]circuleno

A deformação dos sistemas de anéis policíclicos pode também seguir-se à introdução de grupos metilo (ou outros mais volumosos) em regiões moleculares com impedimento estérico. Assim, o 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (7,12-DMBA), que contém um grupo metilo na região em baía, deforma-se geralmente em cerca de 22 ° e o isómero 1,12-DMBA, que contém dois grupos metilo opostos na região

em baía, apresenta um grau extremo de deformação – 36 ° – nessa região (Figura 10).

Figura 10.

Também o 1-metilbenzo[*c*]fenantreno que contém um grupo metilo na região *fjord*, apresenta um desvio significativo da planaridade (Figura 11) [6].

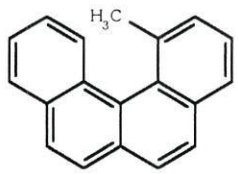


Figura 11. 1-metilbenzo[*c*]fenantreno

A deformação molecular parece ser um factor na carcinogenicidade. Por isso, o 7,12-DMBA (Figura 10), o 7,14-dimetildibenzo[*a,j*]antraceno (7,14--DMBa,j,A) o 3,6-dimetilcolantreno (3,6-DMC) e o 11-metilbenzo[*a*]pireno (Figura 12) são carcinogénios consideravelmente mais potentes do que os hidrocarbonetos de que derivam, os quais são mais planares.

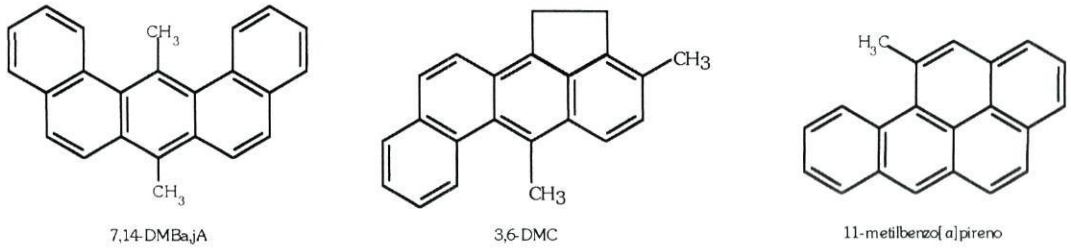


Figura 12.

O PAH carcinogénico mais potente estudado até hoje é o dibenzo[*def,p*]criseno (ou dibenzo[*a,l*]pireno), o qual contém uma região *fjord* responsável pela sua deformação na planaridade (Figura 13) [6].

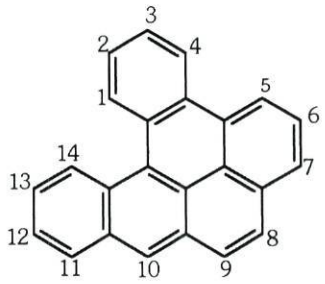


Figura 13. Dibenzo[*def,p*]criseno ou dibenzo[*a,l*]pireno

Os PAHs são moléculas relativamente neutras e estáveis. Em geral, têm baixa solubilidade em água (da ordem dos ppb) [10], pontos de fusão e de ebulição elevados (os dados sobre pontos de ebulição são muito limitados, sobretudo para os PAHs líquidos de massa molecular mais elevada) [11] e baixa pressão de vapor [12]. À medida que aumenta o volume molecular, diminui a solubilidade em água, aumentam os pontos de fusão ou de ebulição e diminui a pressão de vapor [13].

Devido à sua relativa insolubilidade em água, os PAHs e seus análogos têm uma forte tendência para se adsorver em solos e sedimentos e para bioacumular em tecidos gordos de organismos expostos [14]. A sua afinidade lipídica é elevada quando medida pelo coeficiente de partilha n-octanol/água. Os PAHs com dois e três anéis na sua estrutura são classificados como moléculas relativamente não polares. Como o sistema de electrões π nos PAHs com quatro, cinco e seis anéis é maior, estes PAHs são mais polares [15].

Os PAHs têm longas semi-vidas no meio ambiente. Num sedimento aeróbio, por exemplo, os tempos de semi-vida vão desde três semanas para o naftaleno a 300 semanas para o benzo[*a*]pireno [13]. Os PAHs são, portanto, poluentes or-

gânicos persistentes no ambiente. Esta persistência aumenta com o número de anéis e com o grau de condensação [13].

Os análogos heterocíclicos de PAHs (hetero-PAHs) nos quais um (ou mais) átomo de carbono é substituído por azoto (azo-PAHs), enxofre (tio-PAHs) ou oxigénio (oxo-PAHs) são também detectados como poluentes ambientais (Figura 14) [6]. Devido à presença do heteroátomo, os hetero-PAHs apresentam uma polaridade superior à dos PAHs correspondentes o que resulta numa melhor mobilidade hidrogeológica [16].

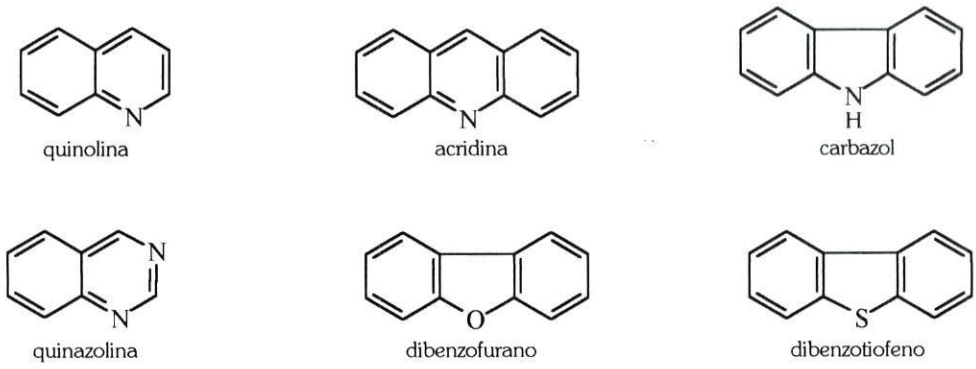
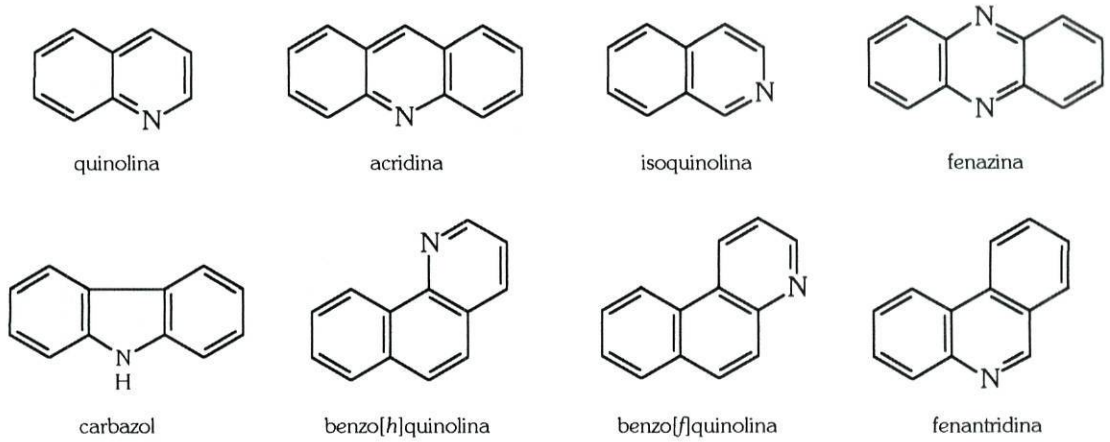
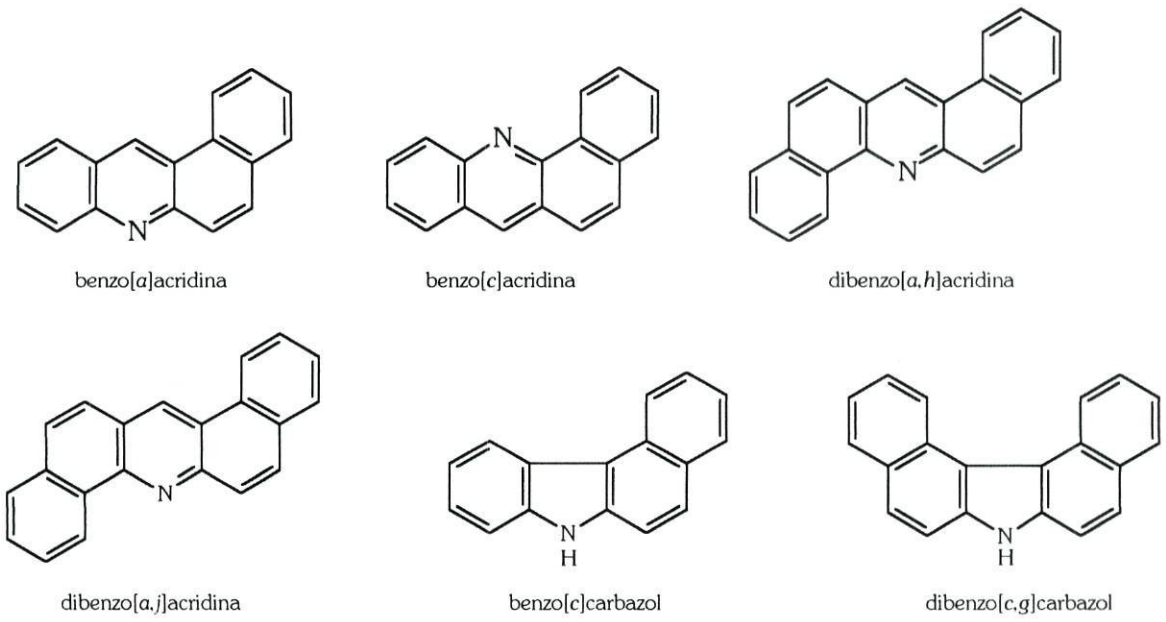


Figura 14. PAHs heterocíclicos comuns

Os predominantes são os azo-PAHs (Figura 15 – páginas 12/13).





benzo[*a*]acridina — benzo[*c*]acridina — dibenzo[*a,h*]acridina

dibenzo[*a,j*]acridina — benzo[*c*]carbazol — dibenzo[*c,g*]carbazol

Figura 15. Azo-PAHs

Os azo-PAHs formam-se na pirólise de materiais orgânicos que contêm azoto. Encontram-se níveis significativos destes compostos em atmosferas industriais e urbanas, fumo de tabaco, escapes de máquinas e alcatrão, sendo alguns suspeitos de ser carcinogénicos (benzo[*c*]acridina, dibenzo[*a,j*]acridina, dibenzo[*a,h*]acridina e 7*H*-dibenzo[*c,g*]carbazol). Embora os níveis de azo-PAHs presentes em amostras de diversas fontes varie consideravelmente, são normalmente mais baixos do que os dos PAHs relacionados [6]. A presença do heteroátomo implica naturalmente que os azo-PAHs apresentem uma basicidade superior à dos PAHs. Esta propriedade é útil para a separação de azo-PAHs de outros componentes presentes em amostras ambientais [6,16].

Os PAHs contendo enxofre (tio-PAHs) e oxigénio (oxo-PAHs) encontram-se praticamente nas mesmas fontes ambientais dos PAHs e azo-PAHs, embora normalmente numa concentração menor. Entre os tio e oxo-PAHs detectados em amostras ambientais encontram-se o benzo[*b*]tiofeno, dibenzotiofeno, naftotiofe-

nos, benzo[*b*]naftotiofenos e fenantrotiofenos (Figura 16) e o benzofurano e dibenzofurano (Figura 17), respectivamente [6].

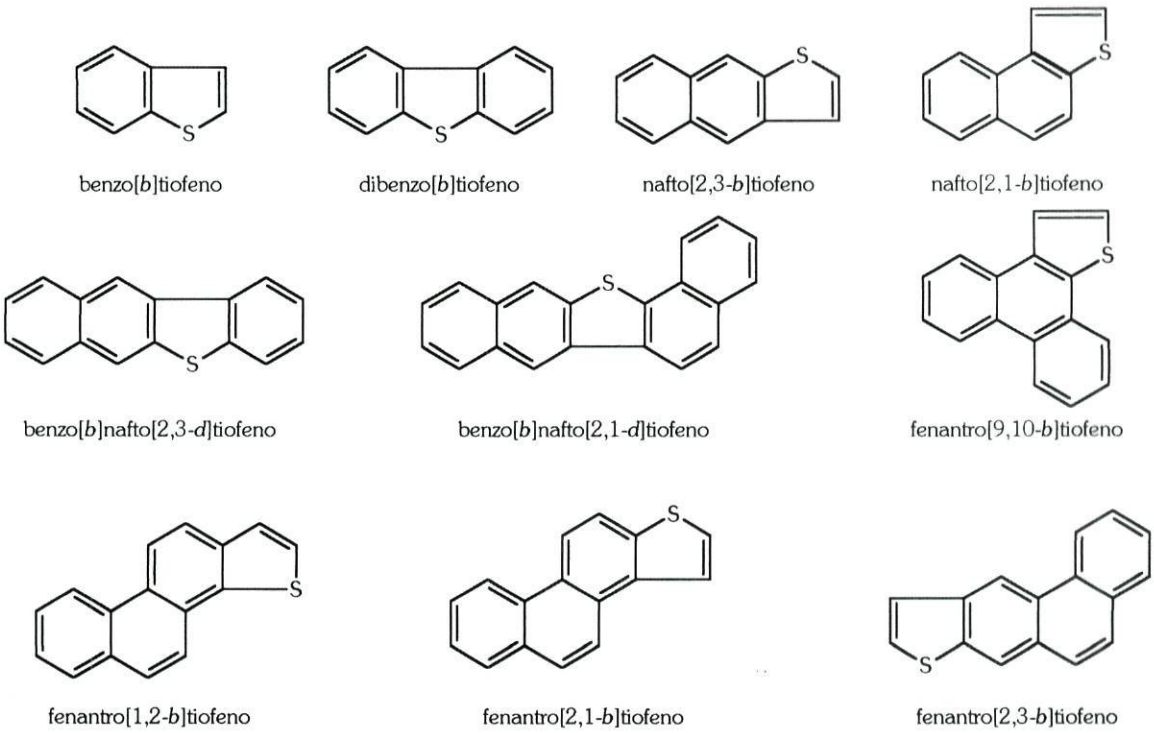


Figura 16. Tio-PAHs

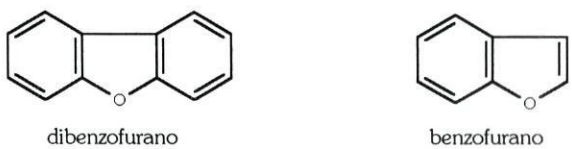


Figura 17. Oxo-PAHs

3. VIAS DE DEGRADAÇÃO DOS PAHs NO AMBIENTE

No ambiente, os PAHs estão sujeitos a vários processos químicos e fotoquímicos para originar produtos que apresentam, frequentemente, uma toxicidade aumentada em relação ao composto precursor. Entre as principais vias para a degradação dos PAHs no ambiente estão as reacções com os óxidos de azoto e de enxofre, reacções com poluentes do ar secundários produzidos por fotólise como o ozono e reacções fotoquímicas com oxigénio [6].

As reacções de substituição electrofílica são as reacções dos poliarenos melhor conhecidas. A substituição nos PAHs alternantes ocorre principalmente por um mecanismo de substituição electrofílica que envolve ataque inicial por um ião electrofílico carregado positivamente (E^+) a um poliareno para formar o ião arénio. Este intermediário converte-se num produto mais estável por perda de um protão para formar um derivado substituído (Figura 18) [6].

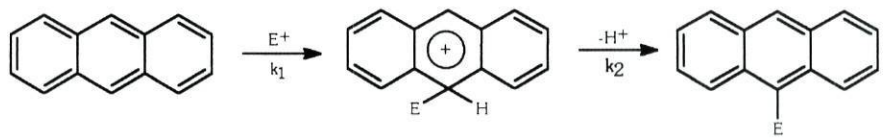


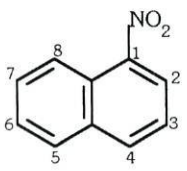
Figura 18. Reacção de substituição electrofílica do antraceno

De entre as reacções electrofílicas com interesse ambiental destaca-se a nitração, de que resultam nitro-PAHs.

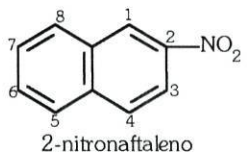
Estudos demonstraram que os nitro-PAHs são poluentes distribuídos pelo ambiente e que representam um perigo significativo para a saúde humana [17]. Os nitro-PAHs formam-se durante os processos de combustão que também originam os PAHs ou por reacções com óxidos de azoto na atmosfera [17]; no entanto, na

maior parte das amostras, os nitro-PAHs parecem estar presentes em muito menores quantidades do que os PAHs mais comuns [18]. As estruturas dos nitro-PAHs mais comummente detectadas encontram-se na Figura 19 (páginas – 16/17) [17].

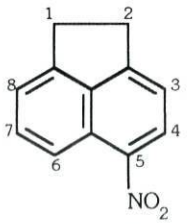
Desde que Pitts *et al.* e Jäger [19] descobriram, independentemente, que os PAHs podiam reagir com óxidos de azoto para produzir derivados *nitro* no ar poluído e em processos de combustão, surgiu um grande interesse pela elucidação do papel ambiental e biológico destes compostos [19]. Também a descoberta de que uma elevada proporção da mutagenicidade causada por extractos de matéria particulada do ar e de diesel (demonstrada pelo teste de Ames em *Salmonella thyphimurium)* era devida a nitro-PAHs [19,20] criou um grande interesse pelo estudo destes compostos. O 1-nitropireno tornou-se o composto de referência, quer para estudos analíticos quer para estudos de mutagenicidade, uma vez que se descobriu ser responsável por 3 a 23 % da mutagenicidade provocada pelos extractos atrás referidos. Além disso, os nitro-PAHs têm também importância resultante do facto de a nitração poder ser apenas um passo na formação de outros compostos muito mutagénicos durante os processos de combustão [19].



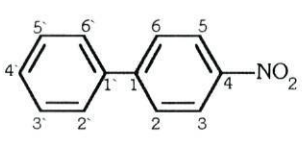
1-nitronaftaleno



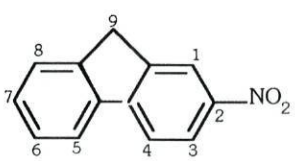
2-nitronaftaleno



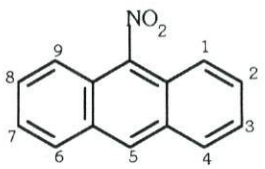
5-nitroacenafteno



4-nitrobifenil



2-nitrofluoreno



9-nitroantraceno

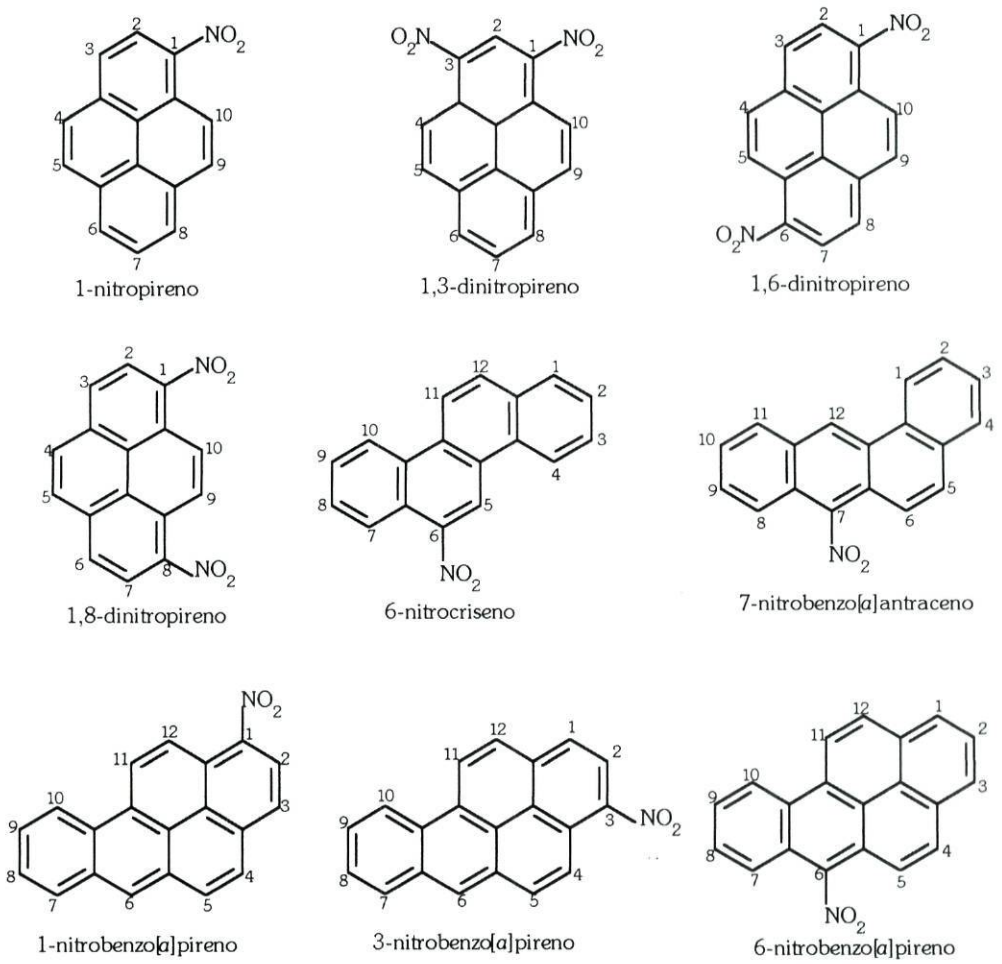


Figura 19. Estruturas de nitro-PAHs comummente detectadas [17]

A sulfonação, embora menos estudada que a nitração, apresenta também uma potencial importância ambiental devido à prevalência dos óxidos de enxofre como poluentes atmosféricos [6].

Também os processos oxidativos são importantes, quer na bioactivação de PAHs para formar espécies carcinogénicas, quer como processos de degradação de PAHs no ambiente. Assim, os poliarenos são susceptíveis a diversos modos de ataque oxidativo para produzir vários tipos de derivados oxidados incluindo óxidos de arenos, fenóis, quinonas, dihidrodióis, epidióxidos e produtos oxidados na cadeia lateral [21]. As quinonas são intermediários oxidados e têm interesse como potenciais metabolitos activos biológicos [22].

Num dos processos oxidativos mais estudado, o ozono, oxidante potente que está presente em certas condições no ambiente humano, ataca os PAHs um pouco indiscriminadamente para produzir, sobretudo, produtos de clivagem oxidativa dos anéis [6,23]. Dependendo da sua estrutura molecular e das condições reaccionais, os PAHs reagem com o ozono resultando produtos quinónicos e derivados formilados ou carboxilados. O pireno e o benzo[*a*]pireno, PAHs dificilmente biodegradáveis, apresentam estes dois tipos de mecanismo de reacção (Figura 20) [24].

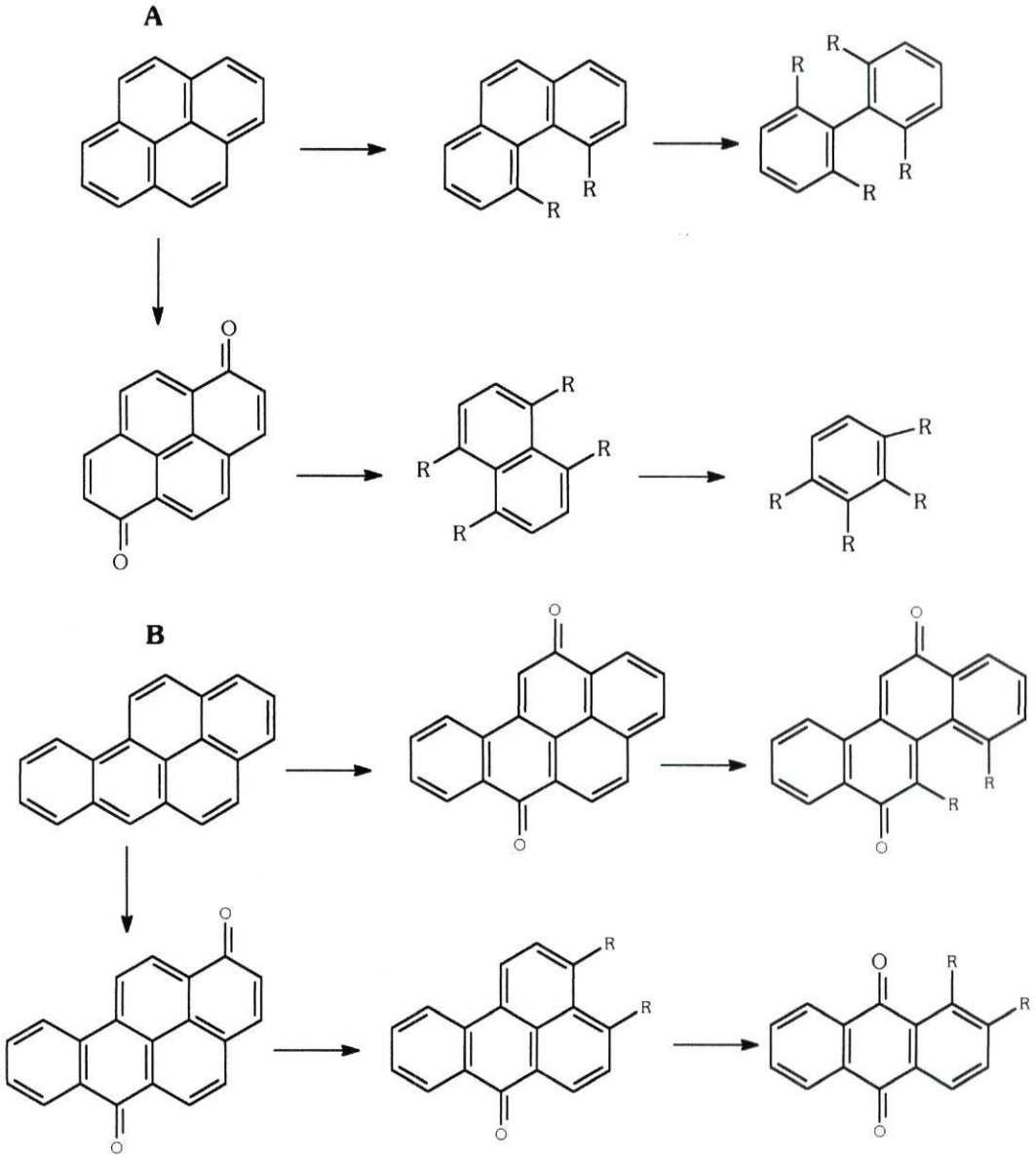
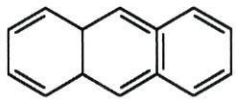


Figura 20. Produtos da reacção do pireno (**A**) e do benzo[*a*]pireno (**B**) com o ozono (R = COOH, $COOCH_3$, CHO)

Os PAHs intervêm ainda numa variedade de reacções fotoquímicas sendo a foto-oxidação a mais importante em química ambiental.

A foto-oxidação é uma importante via de degradação dos PAHs no ambiente. Os acenos e outros PAHs que contenham uma região *meso* (Figura 21), sofrem adição de oxigénio para formar epidióxidos. A reactividade é aumentada pela presença de grupos metilo naquela região e pela anelação linear.



região meso

Figura 21. Aceno (antraceno) com região *meso*

O potente carcinogénio 7,12-DMBA e o seu metabolito activo 3,4-dihidrodiol são muito sensíveis à foto-oxidação, originando os epidióxidos A e B (Figura 22) por exposição ao ar e à luz [6].

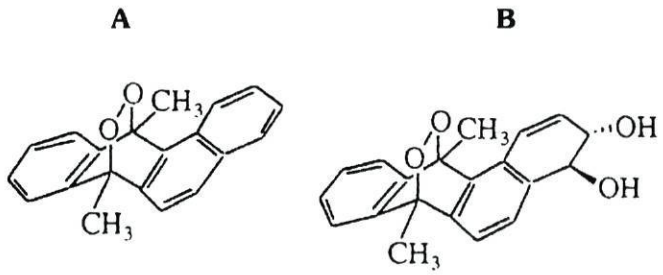


Figura 22. Epidióxidos do 7,12-DMBA e do 3,4-dihidrodiol-7,12-DMBA

Quanto às reacções de substituição nucleofílica e de formação de radicais dos poliarenos estão menos estudadas do que as reacções de substituição electrofílica.

Pese embora o facto de as reacções de radicais livres dos compostos benzenóides terem sido investigadas, conhece-se pouco para as reacções análogas dos PAHs superiores [6].

PARTE II – IMPACTE DE PAHs NO AMBIENTE E NA SAÚDE

PARTE II – IMPACTE DOS PAHs NO AMBIENTE E NA SAÚDE

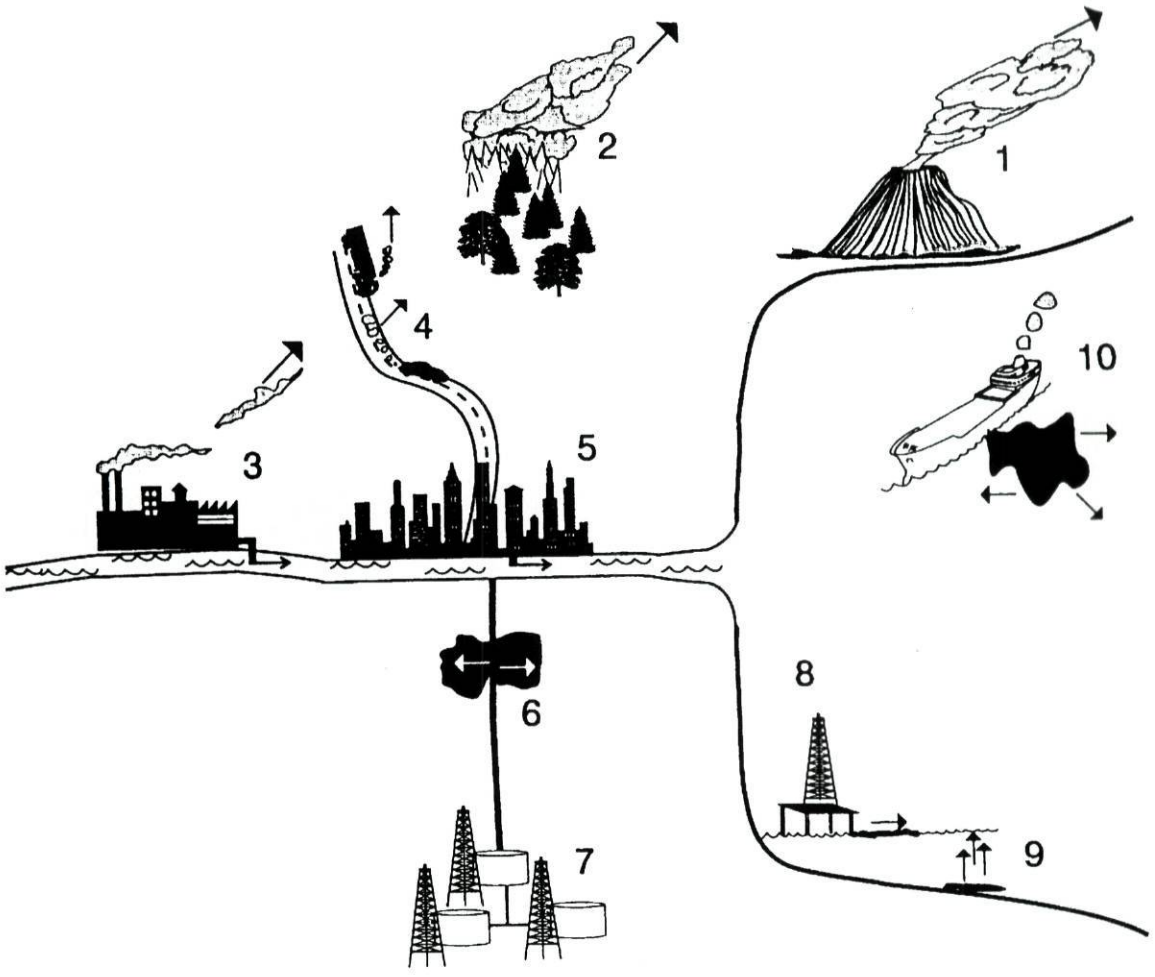
1. FONTES DE PAHs

As principais fontes de PAHs classificam-se em *naturais* e em *antropogénicas*. Como já referimos (página 3), os PAHs são formados durante a combustão de matéria orgânica e de combustíveis fósseis e são ubíquos no ambiente, sendo as fontes antropogénicas as que mais contribuem para isso [20]. Como os fogos naturais e a formação de petróleo sempre ocorreram, os PAHs circularam através dos ciclos biogeoquímicos durante milhões de anos [13] e, até ao início do século XX, um balanço natural entre a formação e a degradação dos PAHs assegurou uma concentração residual natural constante [25]. Todavia, o recurso cada vez maior a combustíveis fósseis e aos seus produtos de combustão pelos seres humanos, perturbou aquele balanço e a concentração de PAHs no ambiente aumentou cada vez mais o que levantou várias questões acerca dos perigos dos PAHs para os organismos vivos [13,25].

As principais fontes antropogénicas de PAHs incluem a produção de coque, carvão, alcatrão e asfalto, veículos a motor (máquinas de combustão interna), aquecimento doméstico, fogos a céu aberto como queima de lixos domésticos, fogos florestais, produção de energia eléctrica, derrames e descargas de petróleo e incineradoras [20,26,27]. A partir destas fontes, uma quantidade significativa das emissões de PAHs entra directamente na atmosfera, na hidrosfera e na litosfera (Figura 23 – página 22). Devido às suas propriedades biológicas (mutagenicidade, carcinogenicidade), os perigos colocados pela presença de PAHs no ambiente são

óbvios: a sua existência no ar, na água e nos solos tem um impacte directo na população humana [20].

As fontes naturais de PAHs incluem emissões de vulcões, fogos florestais, infiltrações naturais de petróleo e síntese *in situ*, a partir de material biológico por degradação (Figura 23) [28].



1 – Emissões de vulcões
2 – Fogos florestais
3 – Produção de energia pela indústria
4 – Máquinas de combustão interna
5 – Descargas municipais
6 – Derrames de oleodutos
7 – Extracção de petróleo (terra)
8 – Extracção de petróleo (mar)
9 – Infiltrações naturais de petróleo
10 – Acidentes com petroleiros

Figura 23. Algumas fontes de PAHs no ambiente (adaptado de [28])

2. OCORRÊNCIA/RECICLAGEM NO AMBIENTE

Desde a Revolução Industrial, a velocidade de deposição dos PAHs excedeu a sua velocidade de degradação e, consequentemente, os PAHs acumularam-se nos compartimentos ambientais [13]. Os PAHs assim depositados podem, no entanto, ser libertados para a atmosfera a partir de sedimentos e águas, constituindo assim os sistemas aquáticos uma importante fonte secundária destes compostos no ambiente [29]. Além disso, devido ao transporte dos PAHs na atmosfera, hidrosfera e litosfera estes compostos encontram-se, em consequência, por todo o ambiente, mesmo em áreas como os Pólos porque, ligados a partículas, são levados para longas distâncias pelo ar na troposfera [13].

Devido às propriedades biológicas dos PAHs há, pois, todo o interesse em compreender o movimento químico e o destino destes compostos nos ambientes atmosférico, aquático e terrestre [30].

A compreensão do movimento químico dos PAHs justifica-se pela exigência de caracterizar as suas concentrações no ambiente, contribuindo a avaliação da sua presença nos diferentes compartimentos ambientais (ar, água, solo, etc.) para a compreensão e interpretação da toxicidade destes poluentes. A compreensão do destino ambiental dos PAHs permite a avaliação do risco ecológico [14].

O primeiro processo de poluição *atmosférica* por PAHs é a combustão da matéria orgânica [28]. As principais vias de entrada dos PAHs na atmosfera ocorrem por evaporação e por emissões de chaminés [14].

A poluição *aquática* por PAHs é causada por derrames, descargas e infiltrações de petróleo, águas residuais industriais e municipais, varreduras das superfícies urbanas e deposição atmosférica [14].

A poluição *terrestre* por PAHs deve-se a emissões de vulcões, fogos naturais, actividades industriais, incineração de lixos, aquecimento doméstico, escapes de automóveis e a derrames de petróleo [28], por exemplo bem como às condições de armazenamento, distribuição e transporte de produtos derivados daquele [31]. O movimento químico dos PAHs nos solos, os quais apresentam porosidades variáveis, ocorre por difusão ou pelo movimento da água através dos espaços entre as partículas do solo [14].

Tendo em conta os objectivos deste trabalho de investigação (página 99), interessa analisar com particular destaque o compartimento *solo* pois a ligação dos PAHs a um solo pode ocorrer através de um certo número de mecanismos. Estes são, em larga medida, influenciados pela textura do solo assim como pelo seu conteúdo em matéria orgânica e em água. Assim, a extensão da ligação dos PAHs a um solo é difícil de prever devido à extrema variabilidade do solo [32].

Após a entrada no solo, os PAHs e os seus produtos de degradação ligam-se lentamente à matriz por forças mais ou menos fortes podendo ser armazenados, transformados e depois transferidos para a atmosfera, para as plantas e para águas subterrâneas e rios constituindo um reservatório de substâncias perigosas, o que representa um risco para todos os seres vivos (Figura 24 – página 25) [33].

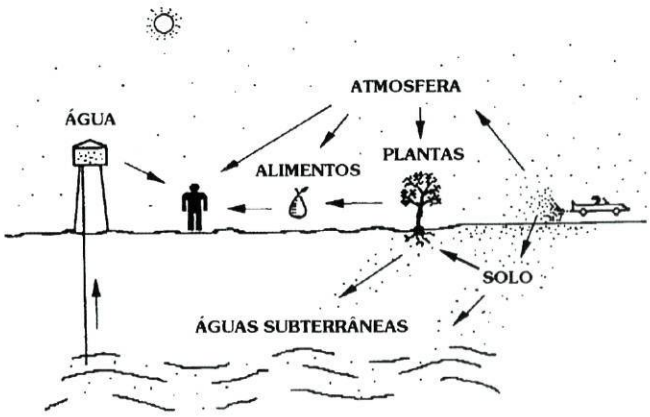


Figura 24. Fontes e destino dos PAHs no solo (adaptado de [33])

Apesar dos muitos estudos já levados a cabo, as vias de transferência do poluente para o solo, no solo e do solo para compartimentos como a atmosfera, plantas, rios e águas subterrâneas são ainda pouco compreendidas embora tenham já sido propostos alguns mecanismos [33,34]. Em particular, as condições físico-químicas que controlam a migração dos poluentes nas fases sólida, líquida, gasosa e coloidal são ainda um assunto controverso, especialmente para as moléculas de baixa solubilidade em água [33] como é o caso dos PAHs.

Logo que os poluentes orgânicos chegam ao solo, são sujeitos a processos responsáveis pela sua dissipação: fotodecomposição (foto-oxidação), volatilização, bioacumulação, degradação microbiana e lixiviação. Usualmente, esta cinética de dissipação depende muito das condições climáticas e do solo e, muitas vezes, não é possível identificar individualmente, quais os processos implicados no desaparecimento do poluente com o tempo. A *adsorção* é, no entanto, o primeiro processo a ocorrer quando os poluentes orgânicos chegam ao solo, constituindo um processo rápido e reversível que implica a acumulação do poluente nas interfases sólido-líquido. A adsorção é um fenómeno muito importante porque a retenção começa com a adsorção, ocorrendo posteriormente a estabilização [35,36].

A distribuição de poluentes na matéria orgânica do solo parece ser um mecanismo importante, particularmente para compostos apolares e hidrofóbicos como os PAHs [34] e a adsorção destes compostos ao solo pode prolongar grandemente o seu tempo de permanência no ambiente [34,37,38].

A matéria orgânica nos solos pode ser dividida em substâncias húmicas e substâncias não húmicas. As substâncias húmicas são "*substâncias orgânicas naturais, biogénicas e heterogéneas que podem ser caracterizadas, de um modo geral, com cor amarela a preta, de elevada massa molecular e refractárias*" [34]. São misturas extremamente complexas de macromoléculas que são formadas pela alteração química de substâncias não húmicas, por degradação microbiana, polimerização (de pequenas moléculas como fenóis, ácidos aminados e açúcares resultantes da decomposição dos organismos) e preservação de biopolímeros resistentes à biodegradação como a lenhina [34,39,40]. Estas macromoléculas desempenham um papel importante no destino e transporte dos poluentes no solo devido, em parte, à sua capacidade de complexação, às suas características de tampão e às propriedades de adsorção. As substâncias húmicas classificam-se em *ácido fúlvico* (fracção solúvel para qualquer valor de pH), *ácido húmico* (fracção solúvel para pH alcalino) e *humina* (fracção insolúvel, para qualquer valor de pH) [34,39] e apresentam uma capacidade de movimento menor que a dos resíduos orgânicos originais [35].

Esta primeira interacção do poluente com a matéria orgânica do solo – adsorção – é físico-química e estabelece não só a disponibilidade do poluente orgânico para ser transferido e disperso no ambiente, mas também para ser degradado pelos micro-organismos dos solos.

Estas interacções físico-químicas iniciais responsáveis pela adsorção são reversíveis mas, com o tempo, podem tornar-se menos reversíveis ou mesmo irreversíveis, levando à estabilização dos resíduos de poluentes orgânicos em formas menos disponíveis e menos biodegradáveis. Há várias hipóteses para explicar esta estabilização: união do poluente orgânico aos constituintes orgânicos do solo por ligações covalentes, difusão e aprisionamento em estruturas coloidais do solo e incorporação na biomassa microbiana do solo [35].

Os PAHs ligam-se com tenacidade à matéria orgânica do solo [34] tendo Kohl *et al.* [34] demonstrado que a ligação de determinados PAHs ao solo é rápida, ocorrendo entre o sétimo e o trigésimo dia após o contacto com o solo [34]; além disso, a adsorção fica essencialmente completa em 24 horas [41].

As substâncias húmicas absorvem fotões na região do UV e do visível do espectro solar até 500 nm. A energia absorvida desta forma, na gama de 58-98 $KJ.mol^{-1}$, torna possível uma série de processos fotoquímicos e podem ser produzidas espécies reactivas capazes de transformar uma grande variedade de compostos orgânicos. O interesse no comportamento fotoquímico das substâncias húmicas deve-se à capacidade daquelas em actuar como agentes despoluentes por fotoindução da degradação dos poluentes [42]. As substâncias húmicas são, portanto, capazes de transformar uma grande variedade de substratos orgânicos, através da luz solar, o que contribuirá, em certa medida, para a remediação, em termos ecológicos [42].

O destino e o transporte de poluentes orgânicos hidrofóbicos pode, pois, ser substancialmente influenciado por processos de adsorção. A questão de se a adsorção inibe a biodisponibilidade (considerada em termos de baixa libertação ou li-

mitação de transferência de massa) dos poluentes orgânicos é de grande importância para o sucesso da bioremediação de solos. Muitos investigadores determinaram que à medida que os poluentes orgânicos são adsorvidos a colóides naturais, tornam-se menos disponíveis para os micro-organismos. Pensa-se que os poluentes hidrofóbicos fortemente adsorvidos são bastante persistentes no ambiente e representam um dos desafios mais difíceis na remediação de locais contaminados, pois apresentam velocidades de libertação dos solos muito lentas [37].

Podem também ocorrer outros fenómenos como difusão, incorporação por micro-organismos ou degradação. De facto, os micro-organismos podem incorporar o poluente mais ou menos transformado na biomassa microbiana (Figura 25) ou transformar e contribuir para a humificação dos resíduos orgânicos introduzidos nos solos [35].

A biomassa microbiana do solo, além do papel na degradação de poluentes orgânicos não polares como os PAHs, representa ainda um potencial adsorvente orgânico para aqueles [35].

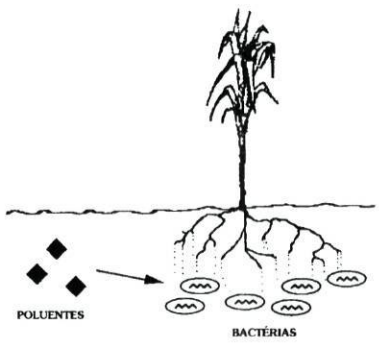


Figura 25. Degradação dos poluentes no solo por bactérias (adaptado de [33])

Todos os PAHs produzidos pelas fontes já referidas são, pois, dispersos no ar, dissolvidos na água ou espalhados pelo solo (Figura 26) tornando-se omnipresentes no ambiente [28].

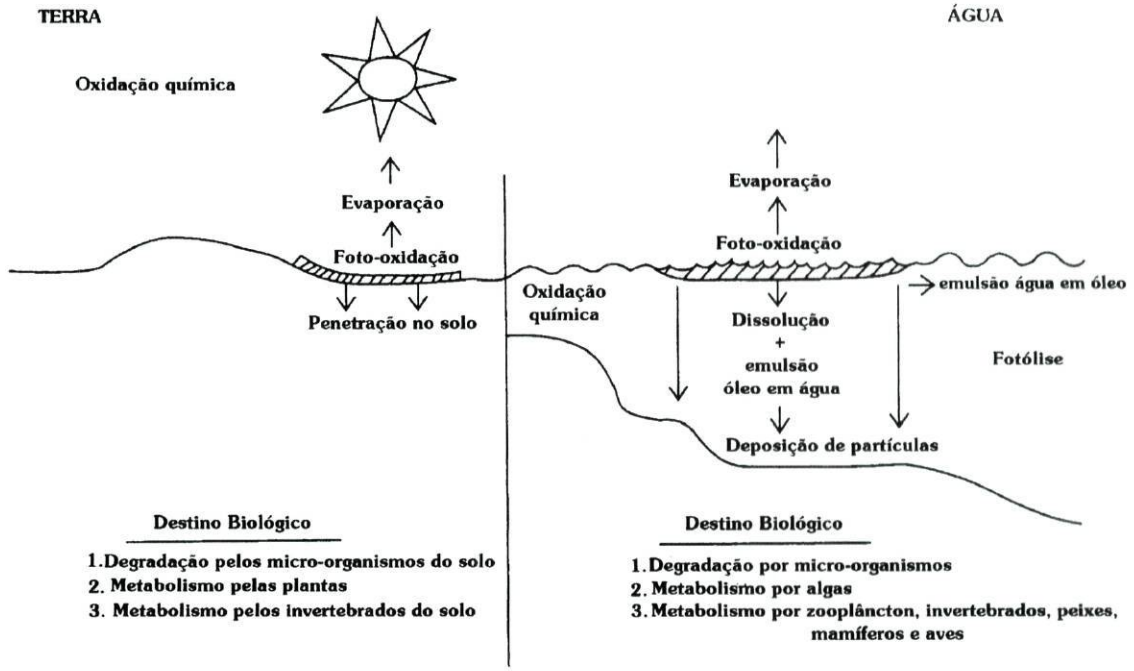


Figura 26. Destino químico, físico e biológico de PAHs nos meios aquático e terrestre [28]

No entanto, existem alguns mecanismos naturais que poderão contribuir para a reciclagem de PAHs no ambiente. Como os sistemas aquáticos e os seus sedimentos representam importantes reservatórios de PAHs, as trocas através das interfaces ar-água e sedimento-água desempenham uma acção essencial no balanço de massa e dinâmica destes compostos orgânicos. Todavia, nos dias de hoje, a extensão da reciclagem ambiental em sedimentos e águas e as condições mediante as quais pode ocorrer, não são ainda completamente conhecidas [29]. Pensa-se, contudo, que a reciclagem pode eventualmente ocorrer por mecanismos de biodegradação, fitoremediação ou ozonização.

A *biodegradação* de PAHs ocorre em condições aeróbias e anaeróbias. A biodegradação anaeróbia de PAHs é um processo lento e o seu mecanismo bioquímico não está ainda esclarecido. Pelo contrário, as vias degradativas aeróbias, sobretudo para os PAHs mais simples como o naftaleno e o fenantreno, foram bastante estudadas [43]. Embora os PAHs não sejam degradados em condições anaeróbias em amostras de solos e de sedimentos, são rápida e anaerobiamente degradados em sedimentos de zonas portuárias, que foram cronicamente poluídas com elevadas concentrações de PAHs. A capacidade dos micro-organismos em degradar os PAHs nestes locais e não nos solos e sedimentos é, provavelmente, o resultado de uma exposição prévia de longo prazo a PAHs [44].

Também o petróleo, no ambiente marinho, não acumula porque é metabolizado por micro-organismos os quais se desenvolveram para aproveitar as infiltrações naturais de petróleo como sua fonte alimentar. De facto, as bactérias metabolizadoras de hidrocarbonetos são ubíquas na natureza e podem quebrar as moléculas de petróleo mas se o processo demorar muito tempo, pode ocorrer dano considerável no ecossistema [45]. Os micro-organismos presentes na água metabolizam os hidrocarbonetos estruturalmente simples mas como os compostos mais complexos são mais resistentes à degradação microbiana, fixam-se nos sedimentos do fundo. No entanto, cerca de 40 a 80 % do petróleo bruto pode ser degradado por acção microbiana [28].

Em 1989, Mueller *et al.* [46] apresentaram, pela primeira vez, um estudo sobre uma comunidade bacteriana, isolada dum local de restos de creosote, que utilizou este material como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento. O creosote de alcatrão, usado como agente de preservação da madeira nos

cascos de navios durante mais de 150 anos, contém 85 % de PAHs [46,47]. A biodegradação dos PAHs resultou na remoção de um volume significativo dos poluentes do creosote e, portanto, na redução significativa dos potenciais perigos para a saúde associados a ambientes poluídos com este material [46].

Para além das bactérias, estão também identificados fungos e algas como micro-organismos específicos que podem degradar os PAHs [30].

A *fitoremediação* é uma tecnologia natural de custo moderado [33,48]. As plantas activam fortemente a biomassa microbiana por injecção de exsudatos ricos em nutrientes orgânicos como açúcares e aminoácidos na zona da raíz denominada rizosfera. Desta forma, os micro-organismos, bem alimentados pelas plantas, degradam os poluentes orgânicos [33].

Simonich *et al.* [49] desenvolveram um modelo de balanços de massa para PAHs, medindo as concentrações de dez PAHs em 147 amostras de vegetação e de solos num local suburbano em Bloomington, Indiana, EU, que permitiu concluir que a vegetação é uma via importante na remoção de PAHs da atmosfera [49]. Recentemente, Pradhan *et al.* [48] efectuaram um estudo laboratorial para determinar o potencial de fitoremediação para tratar solos poluídos com PAHs de uma instalação industrial de produção de gás e verificaram que, em seis meses, ocorreu uma diminuição na concentração total de PAHs de 57 %, com *Medicago sativa* e *Panicum virgatum* [48].

Eberius *et al.* [24] propuseram que a técnica de *ozonização* dos PAHs no solo pode ser usada para remediação do solo *in situ* ou em combinação com outras técnicas de bioremediação, uma vez que os produtos de ozonização (quinonas,

compostos formilados e carboxilados) são presumivelmente mais solúveis em água e biodegradáveis do que os PAHs precursores. Referem, no entanto, ser necessário maior conhecimento sobre a biodegradabilidade dos produtos da ozonização [24] para que este tipo de remediação possa ser usado.

Estes três mecanismos – biodegradação, fitoremediação e ozonização – não estão, contudo, ainda completamente estabelecidos e, por isso, continuam a ser realizadas pesquisas com o objectivo de melhorar quer a eficiência, quer os aspectos económicos destes processos, para que possam ser aplicados em caso de acidentes ambientais [43,44].

3. OS PAHs E A SAÚDE HUMANA

Nos anos 40 descobriu-se que a biotransformação no organismo de compostos exógenos (xenobióticos) como os PAHs, que até aí se pensava ser um mecanismo de destoxicação por facilitar a excreção dos compostos como metabolitos polares, estava também envolvida na toxicidade dos compostos. Como os PAHs requerem transformação metabólica a intermediários reactivos tóxicos (processo que se designa por activação metabólica ou bioactivação), a biotransformação destes xenobióticos desempenha, aparentemente, uma função dupla. Assim, em circunstâncias de ineficiente destoxicação, os PAHs podem induzir mudanças bioquímicas e fisiológicas que podem levar a efeitos tóxicos como dano celular, morte da célula, mutagénese ou tumorogénese. A ocorrência de efeitos tóxicos provocados por estes xenobióticos, pelos intermediários reactivos ou pelos metabolitos é, pois, geralmente dependente do balanço entre os processos de bioactivação e de destoxicação [50].

As reacções metabólicas podem dividir-se em três classes: as reacções de fase I (ou de funcionalização), as reacções de fase II (ou de conjugação) e as reacções de fase III (ou de simplificação) [50].

As reacções de fase I são reacções de biotransformação que convertem um substrato num composto mais polar e ocorrem, sobretudo, nos microssomas do retículo endoplasmático [6,51]. As reacções de fase II são reacções, geralmente, de destoxicação que envolvem conjugação e ocorrem essencialmente no citosol da célula [14]. As reacções de fase III são reacções de transformação ou de degrada-

ção em que os substratos são conjugados da glutationa ou da cisteína que originam derivados mercaptúricos [50].

Na Figura 27 encontra-se representada a reacção de epoxidação do benzo[*a*]pireno. Trata-se de uma reacção de Fase I em que o diol epóxido resultante poderá ser o metabolito envolvido na ligação ao ADN.

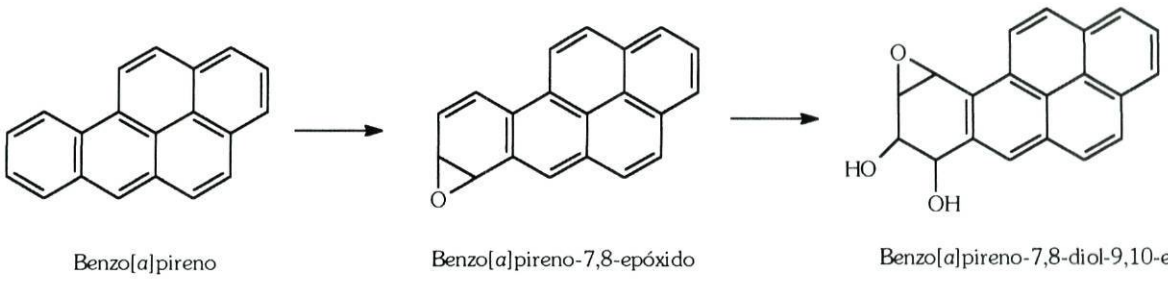


Figura 27. Epoxidação do benzo[*a*]pireno [14]

O benzo[*a*]pireno-7,8-epóxido pode, no entanto, sofrer destoxicação por reacções de Fase II, nomeadamente por conjugação com a glutationa ou por glucoronidação, conforme representado na Figura 28.

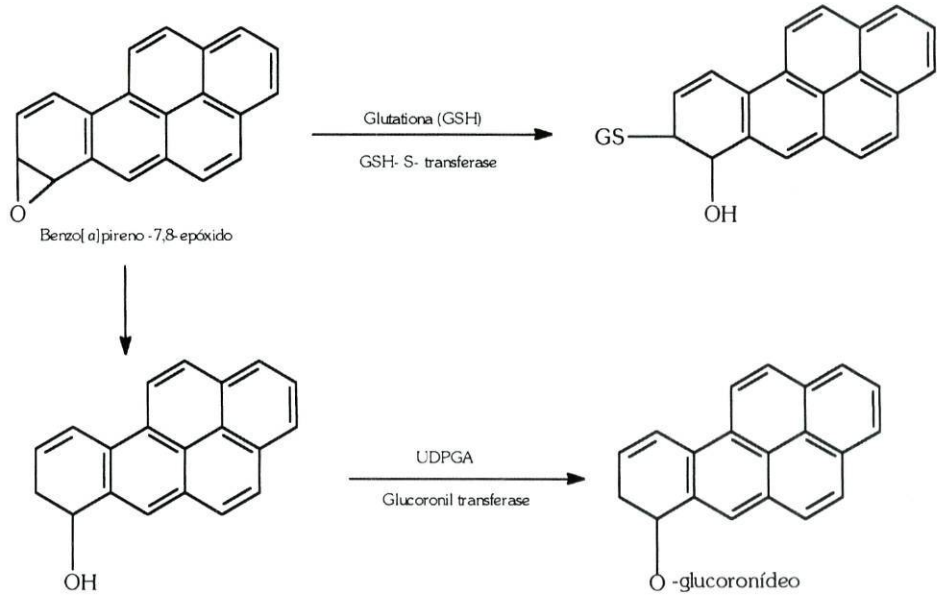


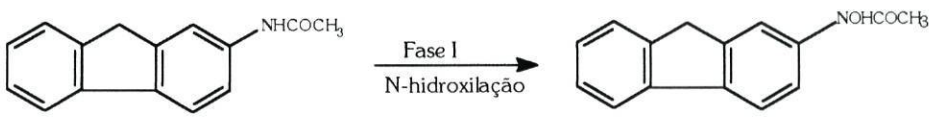
Figura 28. Reacções de destoxicação do benzo[*a*]pireno-7,8-epóxido (adaptado de [14])

Os compostos resultantes da conjugação com a glutationa podem ainda sofrer reacções de Fase III, originando derivados mercaptúricos (Figura 30 – página 37)

Como já tivemos oportunidade de referir, os PAHs são uma importante classe de carcinogénios ambientais. As suas propriedades carcinogénicas são devidas, em parte, a uma interacção de metabolitos específicos com o ADN. Embora se pense que os diol epóxidos sejam os metabolitos envolvidos na ligação ao ADN [21,52], podem ocorrer outras vias de activação metabólica e, consequentemente, é essencial que os metabolitos de PAHs sejam perfeitamente caracterizados (por isso, foram desenvolvidos métodos de síntese para a preparação desses metabolitos) [21].

Em 1951, Elizabeth Miller demonstrou a ligação covalente do benzo[*a*]pireno (ou de alguns dos seus metabolitos) às proteínas na pele de ratos tratados com este hidrocarboneto. Em 1962, Abell e Heidelberger descreveram o mesmo fenómeno para o 3-metilcolantreno. Foram estas descobertas que sugeriram que o passo mais importante na indução do cancro por estes xenobióticos é a interacção covalente de alguma forma do composto químico com macromoléculas [14].

A verificação da biotransformação do 2-acetilaminofluoreno a um composto mais reactivo (N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno) – reage com locais nucleófilos de macromoléculas – (Figura 29 – página 36), levou James e Elizabeth Miller a propor que os xenobióticos carcinogénicos são ou podem ser convertidos em espécies reactivas electrofílicas. Estas exercem os seus efeitos carcinogénicos por meio de interacção covalente com as macromoléculas celulares [14].



2-acetilaminofluoreno N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno

Figura 29. Biotransformação do 2-acetilaminofluoreno [14]

Em 1955, Pullman e Pullman propuseram que a região K dos PAHs (Figura 7 – página 8) era importante na previsão da sua carcinogenicidade. Em 1950, Boyland propusera a formação de intermediários epóxidos no metabolismo destes xenobióticos. Contudo, só em 1970 é que Jerina e colaboradores detectaram a formação de tais intermediários num sistema biológico e em 1974, Sims e colaboradores propuseram que o diol epóxido do benzo[*a*]pireno era a forma definitiva deste carcinogénio [14].

Os PAHs necessitam, portanto, de activação metabólica para expressar o seu potencial biológico como mutagénicos e como carcinogénicos [6].

Como evidenciamos com o benzo[*a*]pireno (Figura 27 – página 34), os metabolitos principais resultantes das reacções de fase I dos PAHs são os óxidos de arenos. Estes podem rearranjar-se espontaneamente a fenóis ou sofrer transformação metabólica posterior. A hidratação dos óxidos de arenos catalisada pela epóxido hidrase origina trans-dihidrodióis e a reacção dos óxidos de arenos com a glutationa, catalisada pela glutationa-S-transferase, origina conjugados que sofrem degradação a derivados do ácido mercaptúrico. Os fenóis e os dihidrodióis são excretados principalmente na forma de ésteres glucorónicos e ésteres de sulfato solúveis em água. Adicionalmente, o metabolismo oxidativo dos fenóis e dihidrodióis também ocorre para produzir quinonas e diol epóxidos (Figura 30 – página 37) [6].

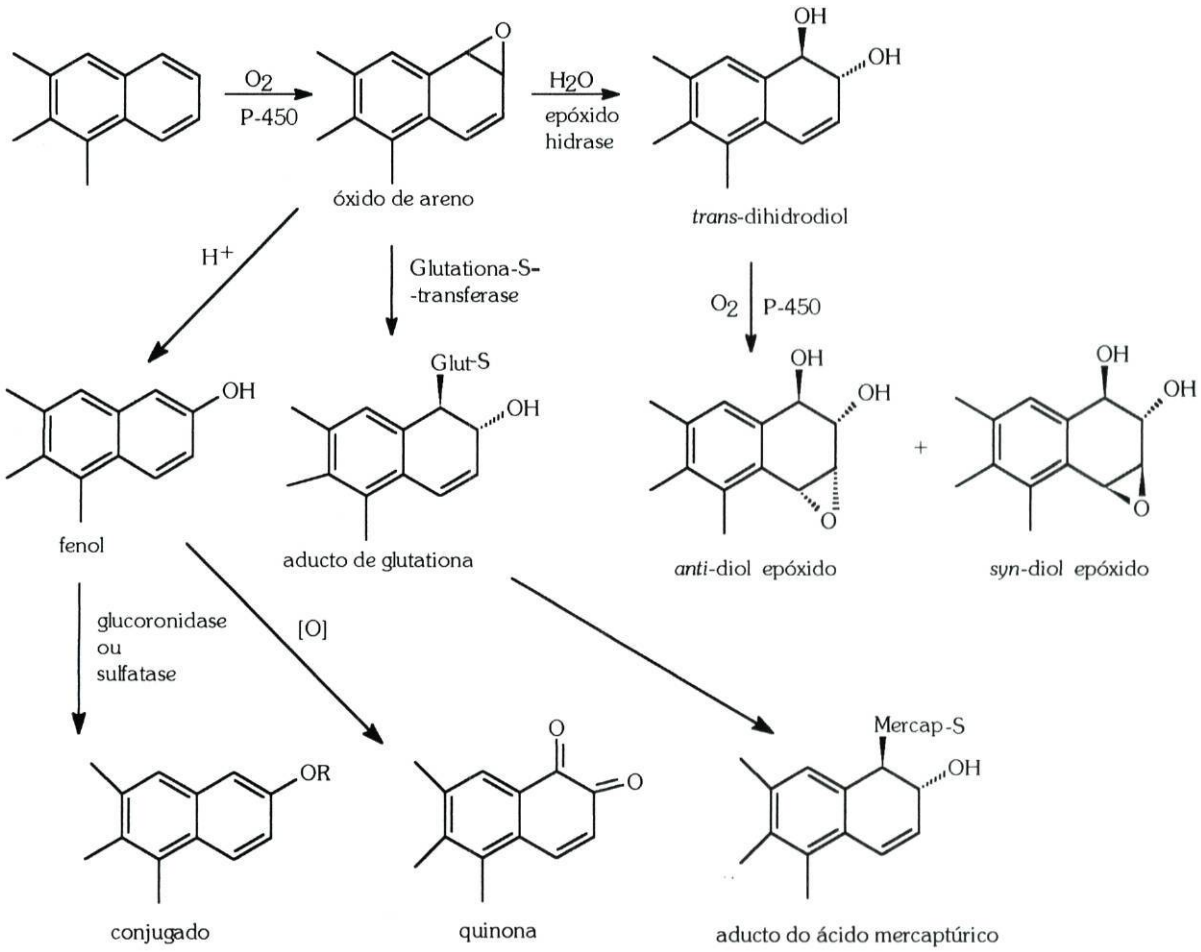


Figura 30. Mecanismos para o metabolismo dos PAHs pelas enzimas microssomais nas células de mamíferos [6]

A evidência fundamental para a importância dos metabolitos diol epóxido como formas activas dos PAHs carcinogénicos é a sua identificação como os principais aductos com o ADN formados *in vivo* e a sua potência como mutagénicos em bactérias e células de mamíferos [6].

A formação de aductos com o ADN é considerada ser o acontecimento inicial na carcinogénese química [193]. Como se pensa que certas mutações exercem uma acção importante no processo de carcinogénese, admitiu-se a hipótese de correlacionar a formação e a persistência de aductos com o ADN com a formação de tumores na carcinogénese química [53].

A indução de mutações é devida principalmente a alterações químicas ou físicas na estrutura do ADN que resultam numa replicação inadequada de uma região particular do genoma. A posição de um aducto com o ADN e as suas propriedades físicas e químicas determinam o tipo de mutações induzidas. Isto indica que diferentes aductos podem induzir um distinto espectro de mutações e que um dado aducto pode resultar num grande número de diferentes lesões no ADN. A extensão com que ocorrem os aductos com o ADN após a exposição a carcinogénios químicos, depende do metabolismo geral do xenobiótico e da reactividade química do metabolito definitivo. Uma vez o aducto formado, a sua presença permanente no ADN das células depende principalmente da capacidade da máquina celular em reparar a alteração estrutural no ADN [14].

Existe ainda a evidência do envolvimento de, pelo menos, outros dois mecanismos adicionais para a formação de aductos com o ADN. O primeiro implica oxidação dos PAHs para formar catiões radicais que podem combinar-se directamente com o ADN resultando na sua lesão (Figura 31) [6].

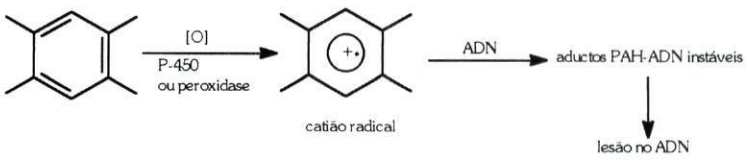
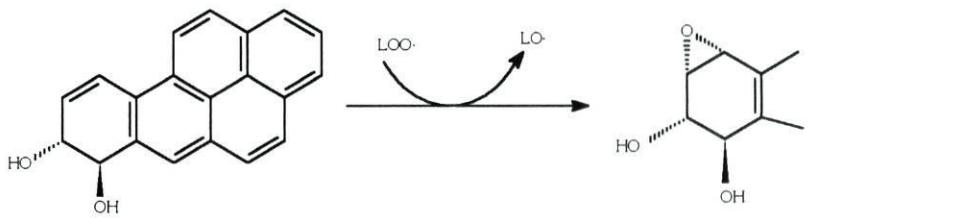


Figura 31. Formação de catiões radicais [6]

Cavalieri e Rogan [3] propuseram que os catiões radicais dos PAHs formados por oxidação do composto precursor por reacções de Fase I, são também importantes intermediários na formação dos metabolitos carcinogénicos definitivos destes xenobióticos [14]. Os radicais livres podem ligar-se covalentemente às macromoléculas celulares, abstrair átomos de hidrogénio daquelas ou doar o seu

electrão desemparelhado ao oxigénio molecular [50]. Assim, a perda de átomos de hidrogénio dos lípidos e as subsequentes reacções intramoleculares nestas moléculas ou as reacções entre os radicais lipídicos e o oxigénio molecular podem iniciar o processo de peroxidação lipídica o qual, por sua vez, tem fortes efeitos na fluidez, permeabilidade e integridade das membranas e, consequentemente, em vários processos associados às mesmas [50,51].

Em 1981, Marnett descreveu a co-oxigenação de ácidos gordos poliinsaturados (sobretudo do ácido araquidónico) e de PAHs com bioactivação destes. No caso do benzo[*a*]pireno-7,8-diol a transferência, catalisada pela peroxidase, do radical livre do hidroperóxido para o PAH, resulta na formação da forma carcinogénica definitiva do benzo[*a*]pireno, o benzo[*a*]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (Figura 32). Esta via de activação metabólica dos procarcinogénios embora não ubíqua, é importante em alguns tecidos extra-hepáticos como, por exemplo, no rim [14].



Benzo[*a*]pireno-7,8-diol — Benzo[*a*]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido

Figura 32. Activação metabólica do benzo[*a*]pireno-7,8-diol durante a peroxidação do ácido araquidónico [14]

O segundo mecanismo envolve a conversão de metabolitos dihidrodiol, por enzimas dehidrogenases, a *orto*quinonas que se podem ligar covalentemente ao ADN ou participar num ciclo redox com oxigénio para dar origem a espécies reactivas de oxigénio como os radicais hidroxilo e aniões superóxido, capazes de atacar o ADN. A formação de pequenas quantidades de quinonas por esta via pode re-

sultar na produção de grandes quantidades de espécies reactivas de oxigénio, levando a uma extensa lesão no ADN (Figura 33) [6].

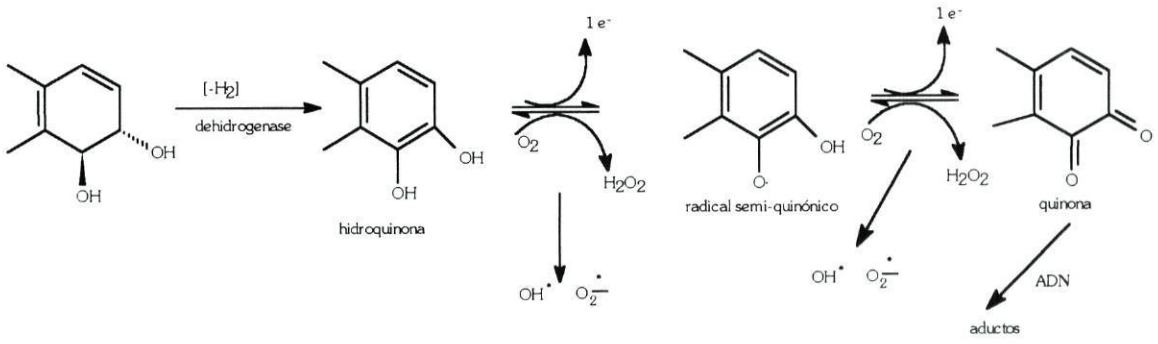


Figura 33. Formação de quinonas catalisada por enzimas dehidrogenases [6]

O benzo[*a*]pireno tem sido muito usado como composto modelo em estudos de PAHs carcinogénicos que demonstraram que o principal aducto com o ADN do benzo[*a*]pireno é o (+)*anti*-benzo[*a*]pireno-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido – - *anti*-BPDE [18,195] (Figura 34.A).

O *anti*-BPDE é o principal metabolito do benzo[*a*]pireno ligado ao ADN identificado em roedores, bovinos e células humanas.

A **B**

Figura 34. A – *anti*-BPDE **B** – *syn*-BPDE [6]

Também se formam pequenas quantidades de aductos resultantes do isómero *syn*-BPDE (Figura 34.B). O *anti*- e o *syn*-BPDE exibem ambos forte actividade mutagénica em sistemas celulares de mamíferos e em bactérias, embora o *anti*--BPDE demonstre uma actividade um pouco superior na indução de transforma-

ção maligna nos fibroblastos e na pele de ratinho e no pulmão do ratinho recém-nascido [6].

A maior parte das investigações sobre os mecanismos moleculares pelos quais os PAHs exercem as suas actividades biológicas como a activação metabólica, formação de aductos com o ADN e indução de mutações foram realizadas com PAHs tetra e pentacíclicos, em particular com o benzo[*a*]pireno [55].

O benzo[*a*]antraceno, o criseno, o 5-metilcolantreno e o dibenzo[*a,j*]antraceno sofrem activação metabólica com formação de diol epóxidos na região em baía e/ou na região *fjord* e reagem com o ADN para formar aductos. Contudo, as proporções de isómeros diol epóxidos assim formados, bem como a extensão da sua ligação covalente ao ADN, varia consideravelmente. Mais recentemente descobriu-se que os diol epóxidos da região *fjord* do benzo[*g*]criseno também se ligam extensivamente a locais específicos no ADN e são potentes carcinogénicos nas células bacterianas e de mamíferos [56].

Pelo contrário, muito pouco é conhecido sobre os efeitos biológicos de PAHs com seis anéis aromáticos, embora alguns membros deste grande grupo de PAHs como os dibenzopirenos, apresentem actividade carcinogénica significativa [55]. Prahalad *et al.* [55] e Ralstom *et al.* [56] efectuaram estudos com o dibenzo[*a,l*]pireno (Figura 13 – página 11) em roedores e verificaram que é um carcinogénio mais potente que o 7,12-DMBA (Figura 10 – página 10) e que o benzo[*a*]pireno (Figura 3 – página 5) na indução de tumores na glândula mamária de rato e que é também um carcinogénio pulmonar extremamente potente.

Assim, a extrema toxicidade expressa pelas características carcinogénicas do dibenzo[*a,l*]pireno, acompanhada da sua prevalência no ambiente, pode criar um potencial risco para a saúde humana. Devido à sua estrutura assimétrica, contendo quer a região em baía, quer a região *fjord* podem-se formar o 1,2-diol-3,4-epóxido e o 3,4-diol-1,2-epóxido e 11,12-diol-13,14-epóxido [55]. Ralston *et al.* [56] referiram ainda que tanto o dibenzo[*a,l*]pireno como o dibenzo[*a,l*]pireno-11,12--dihidrodiol são mutagénicos [56].

A importância biológica dos epóxidos da região em baía ou da região *fjord*, em relação a outros metabolitos óxidos de arenos, parece dever-se, não à excepcional reactividade destas regiões como foi inicialmente sugerido, mas ao facto de estas regiões originarem impedimento estérico em relação à acção das enzimas destoxificantes. Embora este conceito não tenha sido testado com todos os PAHs carcinogénicos conhecidos, parece ser aplicável, de um modo geral [6].

Segundo a IARC, está provado que 11 PAHs são carcinogénios em roedores [53]. Os PAHs de massa molecular superior estão ligados à formação de tumores e cancro em mamíferos de laboratório, peixes e humanos. Pelo contrário, a maior parte dos PAHs de baixa massa molecular evidenciam uma actividade indutora de tumores mínima [57]. Nos seres humanos, a exposição a PAHs foi correlacionada com vários tipos de cancro nomeadamente, pulmão, pele, estômago e esófago. Os efeitos não carcinogénicos dos PAHs incluem principalmente irritação da pele e dos olhos colocando, assim, a exposição a PAHs um problema de saúde para a população em geral e, em particular, em zonas industrializadas [53].

Na última década, a medição dos metabolitos do pireno em produtos de excreção de animais e do homem, especialmente do 1-hidroxipireno, ganhou parti-

cular importância como potencial biomarcador para a exposição a PAHs. Porque o pireno é um membro predominante na família dos PAHs, a detecção dos seus metabolitos fornece uma indicação sobre a exposição a PAHs de um determinado organismo. Além disso, como vimos, porque a oxidação metabólica dos PAHs é responsável pela formação de intermediários tóxicos, a determinação do nível de metabolismo por um organismo pode contribuir para o estabelecimento do risco a que uma espécie está sujeita num ambiente poluído com PAHs [58]. Stroomberg *et al.* [58] identificaram e quantificaram, recentemente, todos os metabolitos do pireno produzidos pelo isópode *Porcellio Scaber*. Porque o pireno predomina no ambiente, a análise dos seus metabolitos é um instrumento para o estabelecimento do risco ambiental dos ecossistemas no que respeita à exposição a PAHs, biodisponibilidade e biotransformação [58].

Para além dos efeitos biológicos já referidos, foi demonstrado recentemente que alguns PAHs inibem a actividade da acetilcolinaesterase de um modo competitivo. A acetilcolina é um dos neurotransmissores mais importantes, quer para o sistema nervoso central quer para o sistema nervoso periférico. Os compostos químicos que inibem a acetilcolinoesterase (designados agentes anticolinoesterase) fazem com que a acetilcolina livre se acumule nos locais colinérgicos do receptor, resultando uma sobre-estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, no sistema nervoso central e periférico. Por isso, a inibição da acetilcolinaesterase causada por PAHs foi mesmo proposta como um biomarcador para neurotoxicidade [8,51].

Também estudos recentes com linfócitos humanos do sangue periférico apoiam a hipótese de que o benzo[*a*]pireno e provavelmente outros PAHs são

metabolizados a certas espécies oxidantes reactivas que produzem uma diminuição momentânea de glutationa intracelular e atacam os grupos sulfidrilo das proteínas levando a um aumento do cálcio intracelular [5].

A avaliação dos efeitos dos poluentes no solo tem-se tornado uma prioridade para os países membros da OCDE. Os biomarcadores podem ser usados para detectar e estabelecer os efeitos da poluição, particularmente a provocada por baixas concentrações de misturas complexas de poluentes, na qualidade ambiental. M. Saint-Denis *et al.* [51] avaliaram, recentemente, as respostas bioquímicas da minhoca *Eisenia fetida andrei* ao benzo[*a*]pireno em diferentes concentrações e tempos de exposição. As minhocas encontram-se na maior parte dos solos e podem representar 60-80 % da biomassa total, o que torna estes organismos bioindicadores apropriados para avaliar os efeitos dos PAHs nos solos [51]. Além disso, as minhocas têm um certo número de características (tamanho, comportamento e elevada biomassa) que as torna um dos animais mais adequados para testar a toxicidade dos xenobióticos nos solos e, por isso, foram adoptadas pela OCDE como organismos padrão para avaliação ecotoxicológica [59].

Existem poucos estudos sobre os mecanismos da carcinogénese para PAHs heterocíclicos. Parece que os mecanismos de activação metabólica e de tumorogénese dos azo- e tio- PAHs são, provavelmente, semelhantes aos dos PAHs correspondentes. Os estudos de biotransformação apoiam, de um modo geral, a hipótese de que estes compostos são activados aos correspondentes diol epóxidos da região em baía. Contudo, foram observadas algumas diferenças nas actividades biológicas e padrões metabólicos. Por exemplo, o dibenzo[*c,g*]carbazol (Figura 15 – página 13) exibe actividade como carcinogénio hepático e da pele quando aplicado na

pele do ratinho. Isto contrasta com os PAHs carcinogénicos, os quais são activos apenas no local de administração [6].

A comparação das propriedades das moléculas isostéricas benzo[*a*]antraceno (Figura 7 – página 8), benzo[*a*]acridina e benzo[*c*]acridina (Figura 15 – página 13), permite avaliar os efeitos do heteroátomo na actividade biológica destes compostos. Em estudos de tumorogenicidade, a benzo[*c*]acridina é geralmente a mais activa e a benzo[*a*]acridina a menos activa. As tumorogéneses relativas explicam-se, em parte, como consequência do efeito de substituição do azoto nas estabilidades dos correspondentes metabolitos diol epóxido da região em baía. Em contraste com a reduzida expressão do efeito carcinogénico dos derivados da benzoacridina, a dibenzo[*a*,*h*]acridina (Figura 15 – página 13) é um carcinogénio potente. Este azo-PAH apresenta um interesse duplo porque possui duas regiões em baía assimétricas [6].

Embora não se tenha tido a pretensão de abordar de forma exaustiva a problemática do impacte dos PAHs na saúde humana, parece-nos que a breve abordagem que foi realizada relativamente às actividades biológicas dos PAHs justifica plenamente o enorme interesse e a grande importância do estudo analítico (e toxicológico) destes compostos ubíquos e persistentes no ambiente.

PARTE III – ANÁLISE DE PAHs

PARTE III – ANÁLISE DE PAHs

1. INTRODUÇÃO

Um processo analítico consiste em vários passos (Figura 35) contribuindo cada um para a obtenção de resultados o mais precisos, exactos e reprodutíveis [60,61,62].

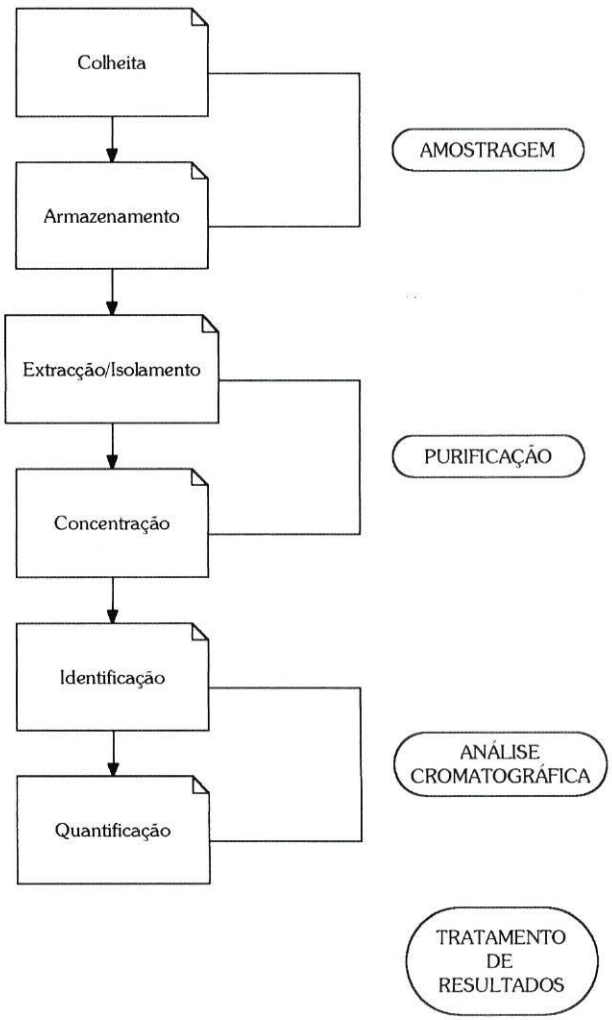


Figura 35. Procedimentos usados num processo analítico (adaptado de [63])

Com a amostragem o analista químico pretende obter uma amostra representativa da matriz em estudo. Para tal, passos como a colheita e o armazenamento devem obedecer a critérios estritos que garantam o objectivo pretendido. A amostragem é, pois, uma etapa delicada a que cada vez se presta mais atenção, já que pode pôr em causa todos os resultados subsequentes do processo analítico.

O objectivo da amostragem é obter uma boa informação a partir de uma amostra da população em estudo. As amostras deverão ser representativas e não deverão ser contaminadas pelos recipientes ou aparelhos de colheita [64].

Após o passo de amostragem, a amostra estará pronta para a extracção e isolamento dos analitos pretendidos. Segue-se, portanto, a purificação das amostras que, sendo ambientais, não podem habitualmente ser analisadas sem uma preparação preliminar devido à sua complexidade. O objectivo da purificação da amostra é proporcionar uma amostra enriquecida no/s analito/s de interesse, o que pode ser conseguido extraindo-os, concentrando-os e/ou removendo da matriz outros componentes que possam interferir na análise [65].

Não há uma estratégia única para a purificação de uma amostra. Depende sobretudo, da natureza dos compostos a serem determinados (volatilidade, polaridade, etc.), da natureza da matriz e do nível de concentração exigido. Apesar dos avanços nas técnicas de separação e quantificação, a purificação da amostra é ainda um passo débil e determinante em todo o processo analítico [65]. Trata-se de um passo exigente e, por vezes, longo no estudo das amostras ambientais [66]. Além disso, os métodos de purificação da amostra geralmente usados pelos químicos analíticos gastam quer solventes, quer tempo, constituindo também a principal fonte dos erros cometidos durante a realização de um processo analítico [67].

Uma consciência global cada vez mais alertada para a poluição do meio ambiente e para os perigos causados pelos poluentes orgânicos, resultou em iniciativas internacionais para tentar reduzir o uso de solventes orgânicos dos quais alguns métodos actuais continuam a depender [62]. Por isso, a procura de técnicas alternativas que abreviem o tempo de análise e limitem ao mínimo o recurso a grandes quantidades de solvente, tem constituído uma preocupação dos cientistas actuais. A imaginação e o desenvolvimento técnico têm permitido grandes avanços nesta área possibilitando, em muitos casos, o tratamento de amostras ambientais de forma eficiente, segura e reprodutível [66].

Após a etapa de purificação, recorre-se à análise cromatográfica que permitirá identificar e quantificar os analitos de interesse. Os actuais processos cromatográficos associados a modernos e potentes detectores, originam uma cada vez maior quantidade de resultados.

O tratamento dos resultados, última etapa de um procedimento analítico, tem de considerar, não só a quantidade mas também a complexidade dos resultados obtidos, sendo então os métodos a utilizar os mais modernos da análise matemática e estatística.

2. MÉTODOS DE EXTRACÇÃO

2.1. EXTRACÇÃO POR SOXHLET

A técnica de extracção por Soxhlet é um método clássico de extracção contínua de sólidos [63]. Nesta técnica, um solvente adequado (com elevada afinidade para o que se pretende extrair e, de preferência, com boa volatilidade e baixa viscosidade) volatiliza, condensa e percola através da amostra sólida. O líquido condensado é sifonado para o recipiente que contém o solvente, aumentando-se assim o tempo de contacto da amostra com o solvente [63,68] (Figura 36).

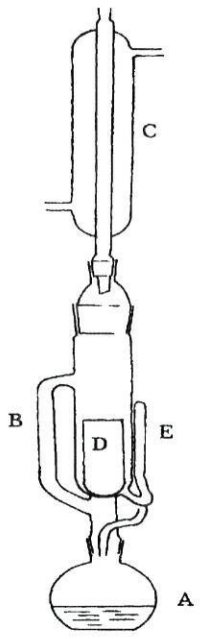


Figura 36. Equipamento para extracção por Soxhlet [69]
A – balão de aquecimento com o solvente B – Soxhlet C – condensador D – amostra E – sifão

Esta técnica constitui um método frequentemente eleito para a extracção de poluentes orgânicos não polares [70,71] e tem sido utilizada na extracção de PAHs de várias matrizes (solos – Quadros I e II – páginas 54 e 60 –, sedimentos marinhos,

cinzas produzidas durante a incineração de lixos municipais e poeiras atmosféricas, por exemplo).

A eficiência da extracção por Soxhlet tem sido comparada com outros métodos, o que tem permitido concluir que este método simples e clássico apresenta, por vezes, maior eficiência que outros mais complexos e modernos.

É, no entanto, uma técnica morosa, que exige que os compostos a extrair sejam estáveis à temperatura de ebulição do solvente extractor [63,70], que requer relativamente grandes volumes de solventes orgânicos, frequentemente tóxicos, caros e de eliminação problemática em termos ambientais [70,72,73,74,75,76].

2.2. EXTRACÇÃO POR ULTRA-SONS

O método que utiliza os ultra-sons para remover analitos, sobretudo de materiais sólidos, pode constituir uma alternativa à extracção por Soxhlet [77] (Figura 37). Trata-se de uma técnica que recorre à extracção por solventes complementada e melhorada pela utilização de ultra-sons.

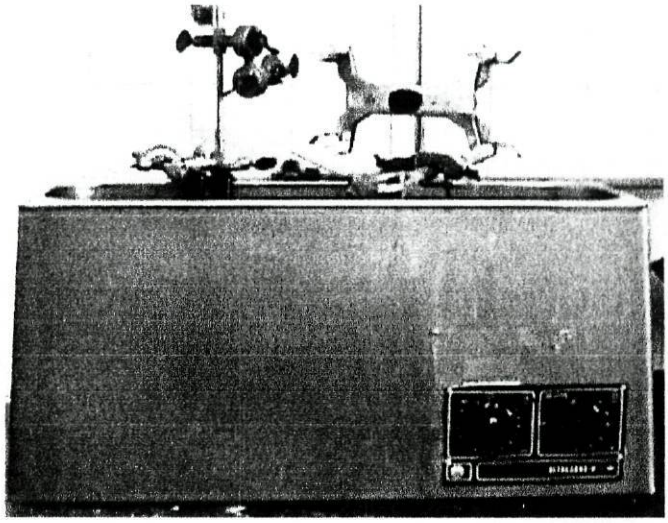


Figura 37. Aparelho de ultra-sons

As vibrações mecânicas produzidas pela transformação de energia eléctrica em energia ultra-sónica de alta frequência (20 KHz), são amplificadas provocando uma alternância de compressão no líquido e a formação de microbolhas que explodem violentamente. Este fenómeno, designado por cavitação, dissipa uma energia considerável permitindo assim uma intensa agitação das moléculas presentes no líquido [69].

A extracção por ultra-sons também envolve o uso de volumes de solventes relativamente grandes [78] mas a poupança conseguida nos tempos de extracção e na limpeza de material de vidro, tornam este método adequado para utilização em estudos de rotina [79].

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Esta técnica apresenta as vantagens da extracção por solvente – afinidade para os analitos pretendidos – permitindo, contudo, um contacto mais eficaz entre a amostra e o solvente sendo, por isso, os tempos de extracção reduzidos [63].

Tem sido utilizada na extracção de PAHs de solos (Quadro I – página 54), de sedimentos marinhos e de cinzas produzidas durante a incineração de lixos municipais.

2.3. EXTRACÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS (MAE)

A energia proveniente de micro-ondas causa movimento molecular por migração de iões e rotação de dipolos sem causar alterações na estrutura molecular [74,80]. Os comprimentos de onda (λ) de micro-ondas vão desde 0,30 a 30 cm (100 MHz a 3 GHz). As micro-ondas são geradas por um magnetrão e são mantidas numa cavidade – o forno de micro-ondas – cujas paredes interiores são superfícies metálicas que reflectem completamente as micro-ondas [80] (Figura 38).

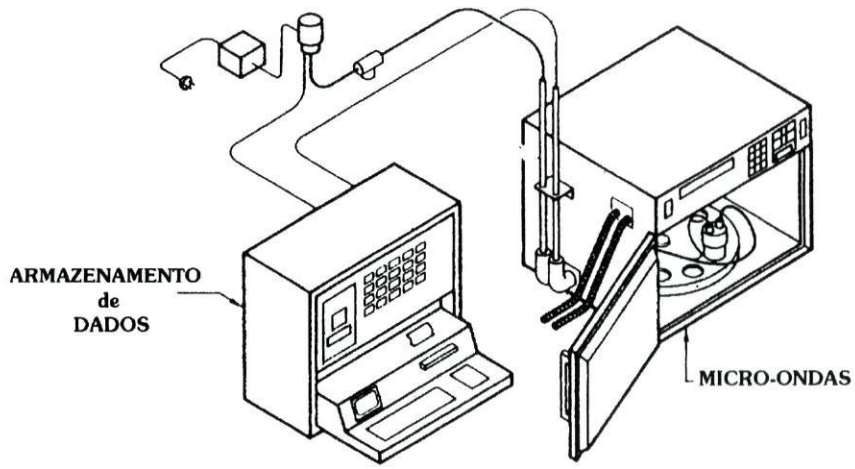


Figura 38. Aparelho de micro-ondas (adaptado de [60])

As extracções em recipiente fechado, por aquecimento em micro-ondas, podem ficar completas em aproximadamente 15 minutos devido ao aquecimento da amostra. As micro-ondas aquecem toda a amostra simultaneamente, sem aquecer o recipiente. Assim, com aquecimento por micro-ondas (a 2450 MHz que é a frequência mais comum [74,80]), a solução atinge o seu ponto de ebulição muito rapidamente. Além disso, porque o solvente se encontra num sistema fechado, é capaz de alcançar um ponto de ebulição bastante mais elevado do que aquele que atingiria à pressão atmosférica (por exemplo, a acetona e o diclorometano - DCM -

são aquecidos a cerca de 100 °C acima do seu ponto de ebulição normal). Temperaturas elevadas e o rápido aquecimento contribuem para o aumento da eficiência e redução do tempo de extracção [74].

É um método adequado para a extracção de componentes lábeis de matrizes complexas pois os efeitos de degradação devido ao uso de elevadas temperaturas durante tempos prolongados podem ser evitados [81]. As suas principais vantagens são a redução do tempo de extracção e do volume de solvente. O aparelho de micro-ondas é rápido e de utilização fácil e segura. As condições clássicas e padrão (30 W, 10 minutos e DCM) podem ser aplicadas para extrair PAHs com boas recuperações, seja qual for a matriz considerada [66].

A extracção de PAHs por micro-ondas pode ser uma possível alternativa à extracção por Soxhlet para solos (Quadro I) [74,82,83].

Quadro I – Extracção de PAHs de **SOLOS**

Condições Experimentais	**Técnicas de Extracção**		
	Soxhlet [74]	**Ultra-sons** [82]	**Micro-ondas** [74]
Amostragem	Solos armazenados em frascos bem fechados, previamente lavados com detergente Decon 90, água desionizada e acetona, secos a 105 °C, passados por hexano e secos. Após a colheita, os solos secaram em tabuleiros a uma temperatura não superior a 30 °C. Removeram-se todas as pedras grandes bem como outro material estranho e colocaram-se num tamisador electromagnético durante 5 minutos. Os solos obtidos, em pó fino, foram então armazenados em frascos herméticos.		
Quantidade de amostra	10 g	2,5-40 g	2 g
Solvente	DCM	Metanol/água (10:1)	DCM e acetona/hexano
Volume de solvente	100 mL	40-60 mL de *KOH* 2 $mol.dm^{-3}$ em metanol-água	40 mL
Tempo de extracção	6 horas	1 hora	20 minutos

Nota: em análise – os 16 PAHs considerados pela EPA como poluentes prioritários (Figura 1 – página 2)

2.4. EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A extracção em fase sólida (SPE) tem sido uma das técnicas mais utilizadas nos últimos anos na área da extracção/purificação de amostras, particularmente quando é necessário determinar pequenas concentrações de compostos semi--voláteis em matrizes complexas [62,84].

Nesta técnica, intervêm duas fases mutuamente imiscíveis, uma sólida e outra líquida denominadas, respectivamente, de enchimento e eluente [84] (Figura 39).

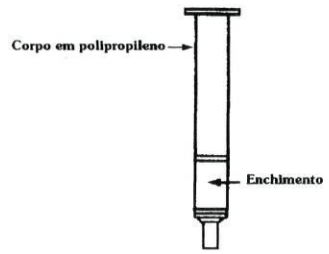


Figura 39. Tubo SPE (adaptado de [85])

Existem disponíveis muitos enchimentos para a extracção de diferentes grupos de compostos orgânicos com vários graus de selectividade [62]. Para a extracção de PAHs os mais utilizados têm sido a sílica, a sílica ligada quimicamente a C_8, C_{18}, *CN*, e NH_2 [85].

A SPE é uma técnica de extracção simples, eficiente, económica, selectiva, permite boas recuperações e a separação de componentes interferentes na matriz da amostra, o tempo de análise é diminuído, a exequibilidade é aumentada e apresenta reprodutibilidade de resultados e segurança para o operador e para o meio ambiente devido à grande redução de solventes tóxicos e inflamáveis [62,65,84,86,87,88,89].

Apresenta, no entanto, alguns problemas práticos como o risco de sobrecarga do enchimento por lixiviação de amostras desconhecidas com um elevado conteúdo de contaminantes [65], a possível perda de analito quando se utiliza em sistemas pouco conhecidos e o uso de solventes orgânicos tóxicos no passo de eluição [90].

2.5. MICROEXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

A microextracção em fase sólida (SPME) é uma técnica recente – introduzida em 1990 [91] – que permite a pré-concentração e extracção de poluentes em amostras ambientais aquosas e gasosas [92,93].

Utiliza uma fibra de sílica fundida revestida por um líquido orgânico não volátil ou por um polímero que adsorve os compostos orgânicos presentes na amostra (Figura 40) [91,94,95,96].

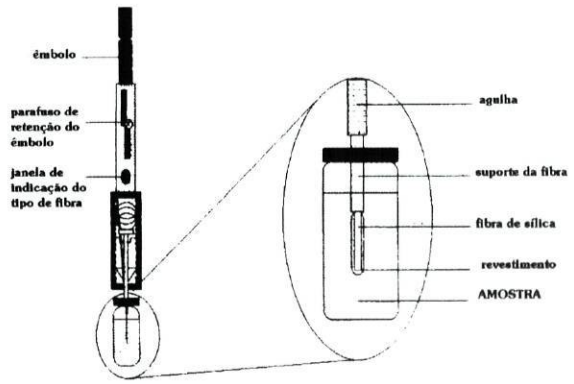


Figura 40. Seringa e fibra para SPME [93]

Estão disponíveis comercialmente uma variedade de fibras revestidas por películas quimicamente diferentes e com diferentes espessuras [95] (poliacrilato, polidimetilsiloxano, por exemplo) [85,93,94]. Os químicos da Supelco consideram que a fibra de polidimetilsiloxano de 100 μm é a indicada para conseguir os melhores resultados com a mistura dos 16 PAHs listados nos métodos 610 e 8310 da EPA [85]. A fibra pode ser usada repetidamente em muitos ciclos de extracção [90]. Porque quer a matriz quer a película, competem para os analitos, a selecção de fibras de elevada afinidade para os analitos de interesse é crucial em SPME

[96], sendo a quantidade de analitos extraídos independente do volume de amostra [95].

As inúmeras vantagens da SPME como a simplicidade, a menor manipulação da amostra [93], a utilização de um pequeno volume de amostra – 1-10 mL – [90,94], a rapidez [97] e a capacidade de amostragem em campo [94,98] bem como as poucas limitações (especificidade das fibras relativamente reduzida [93]; necessidade de películas poliméricas espessas [64], por exemplo), faz antever que a SPME venha a ser uma técnica líder na preparação de amostras [98].

2.6. EXTRACÇÃO POR SOLVENTE ACELERADA (ASE)

A extracção por solvente acelerada (ASE) é um processo de extracção que utiliza solventes orgânicos a altas pressões (500-3000 psi) e temperaturas elevadas (50-200 °C), durante curtos períodos de tempo (5-10 minutos) [99] (Figura 41).

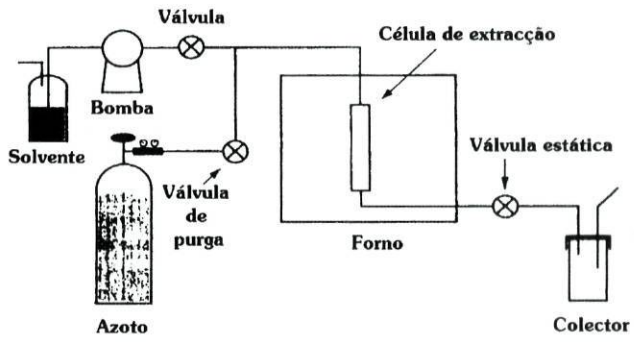


Figura 41. Sistema de extracção por solvente acelerada [100]

A utilização de pressões elevadas permite trabalhar a temperaturas elevadas sem que o líquido entre em ebulição. O uso de temperaturas acima do ponto de ebulição aumenta a capacidade dos solventes para solubilizar os analitos uma vez que as fortes interacções soluto-matriz e soluto-soluto (forças de van der Waals, ligações de hidrogénio, atracções dipolo-dipolo e outras) são quebradas mais facilmente. Por outro lado, o uso de temperaturas elevadas faz diminuir a viscosidade dos solventes permitindo assim uma melhor penetração das partículas da matriz e, consequentemente, aumentando a eficiência da extracção.

A ASE foi aplicada na extracção de PAHs de solos e os resultados comparados com outros métodos (Soxhlet, MAE e SFE) sendo de realçar que a maior vantagem da ASE é o reduzido tempo de extracção (Quadro II – página 60) [101].

Quadro II – Comparação de diversas técnicas de extracção de PAHs de um **SOLO** [101]

Condições Experimentais	**Técnicas de Extracção**			
	Soxhlet	**MAE**	**SFE**	**ASE**
Quantidade de amostra	2,0 g	2,0 g	2,0 g	2,0 g
Solvente	DCM	Acetona	CO_2 com metanol	Acetona + DCM
Volume de solvente	Não optimizado	40 mL	>60 mL CO_2 + 6 mL de metanol	25 mL (1:1 V/V)
Tempo de extracção	Não optimizado	20 minutos + 30 minutos de arrefecimento	60 minutos + 10-15 minutos para equilíbrio térmico	5 minutos equilíbrio + 4 minutos extracção estática

Nota: em análise – os 16 PAHs considerados pela EPA como poluentes prioritários (Figura 1 – página 2)

2.7. EXTRACÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

A capacidade de um fluido supercrítico solubilizar sólidos foi referida pela primeira vez por Hannay e Hogarth em 1879, quando verificaram que os halogenetos de metais se tornavam solúveis em etanol supercrítico, à medida que a pressão era aumentada. Os estudos de solubilidade em fluidos supercríticos continuaram durante as décadas seguintes de uma forma esporádica [102], pelo que a extracção por fluido supercrítico (SFE) se tornou um método de extracção alternativo apenas a partir dos anos 80 [102,103,104,105]. Nos últimos anos tornou-se um importante método de extracção para amostras ambientais e a sua aceitação pela EPA como método padrão, fez aumentar a sua utilização nos laboratórios analíticos [106] (Figura 42).

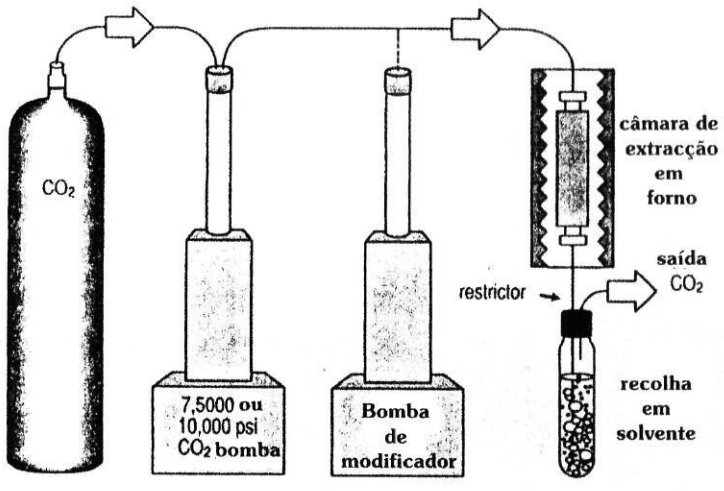


Figura 42. Sistema de extracção por fluido supercrítico (adaptado de [107])

Um fluido está no seu estado supercrítico quando as suas temperatura e pressão estão acima dos seus valores críticos, como exemplificado na Figura 43 (página 62) para o dióxido de carbono (CO_2) [108]. Um fluido supercrítico apresenta propriedades, simultaneamente, de um gás e de um líquido [109,110,111].

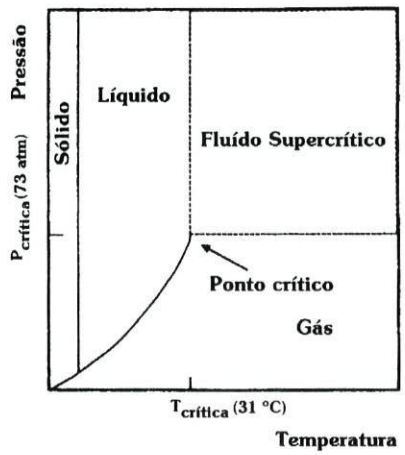


Figura 43. Diagrama de fases do CO_2 [85]

Os fluidos supercríticos possuem propriedades físico-químicas únicas que os tornam atractivos como solventes de extracção. No que respeita à cinética, a sua viscosidade é 5 a 20 vezes menor do que a dos líquidos vulgares; consequentemente, os coeficientes de difusão dos solutos são maiores [65]. Este facto permite extracções mais rápidas e mais eficientes, quando comparadas com as fases líquidas clássicas, devido a uma penetração mais rápida e mais completa das matrizes sólidas. No que respeita à termodinâmica, os fluidos supercríticos têm densidades 10 a 100 vezes superiores às dos gases, o que lhes dá um poder de solvatação próximo do dos líquidos [108].

A SFE apresenta vantagens sobre a extracção líquida sendo cada vez mais utilizada para extrair poluentes de baixa polaridade de amostras sólidas ambientais [110,112,113,114,115] devido, principalmente, à ausência de grandes volumes de solvente [113]. O fluido habitualmente usado é o CO_2 que apresenta baixa toxicidade, está disponível com alto grau de pureza a baixo custo, tem o poder de solvente do hexano, é não polar e as suas características de solvatação podem alterar-

se por variação da pressão ou da temperatura [32,70,78,103,108,109,113,115,116,117,118].

A eficiência da SFE é determinada pelas propriedades do soluto e do fluido supercrítico, assim como pelas condições experimentais de pressão e temperatura. As variações de temperatura originam alterações na pressão de vapor do soluto, na densidade do fluido supercrítico e nas propriedades físico-químicas, quer do soluto, quer do fluido supercrítico [119]. Para analitos com uma forte interacção com a matriz como, por exemplo, os PAHs, a temperatura pode ser muito importante para os libertar. Desde que exista uma pressão adequada para a solubilização do analito, a temperatura é uma variável mais importante do que a pressão [103,114].

A eficiência da extracção por SFE pode também ser controlada pela adição de pequenas quantidades de solventes orgânicos (especialmente os que possuem pares de electrões livres), denominados modificadores [70,110,120,121,122]. Como o CO_2 tem o poder de solvente do hexano, a adição de modificadores permite aumentar o seu poder de solvatação [70]. Foi demonstrado que a adição de modificadores orgânicos (como o metanol) ao CO_2 supercrítico, aumenta bastante a eficiência da extracção de alguns poluentes orgânicos em comparação com a utilização de CO_2 puro [114,116]. O metanol (CH_3OH) tem sido o modificador mais comummente usado em SFE [110,123]. A escolha do modificador depende do tipo de matriz da amostra e do analito a ser extraído, já que o seu papel é interagir com o complexo analito/matriz para aumentar a eficiência da extracção. Devido à capacidade do metanol para estabelecer ligações por pontes de hidrogénio, é o modificador mais adequado para interagir com a matéria orgânica da matriz solo nomeadamente com os ácidos húmicos e fúlvicos e com polissacarídeos [110].

Além disso, o modificador pode aumentar as propriedades de solubilização do CO_2 supercrítico, o que é especialmente importante para PAHs de elevada massa molecular quando a sua solubilidade é baixa e a sua tendência para readsorver à matriz é elevada [115,123,124,125].

Embora os PAHs sejam relativamente solúveis em CO_2 supercrítico, a sua eficiente recuperação depende muito da natureza da matriz [113,122,126]. Como referimos, muitas vezes são necessários modificadores orgânicos (metanol, acetonitrilo, tolueno, etc.) em conjunto com o CO_2 para remover efectivamente os PAHs. A este facto não será alheia a gama alargada de massas moleculares que os PAHs apresentam [113] bem como as forças de adsorção como interacções dipolo-dipolo, ligações de hidrogénio, complexação ou interacções π-π [126].

A SFE não requer a fase de pré-concentração e admite a possibilidade de ultrapassar a fase de eliminação de impurezas, muitas vezes necessária nos protocolos convencionais [75,127].

A extracção usando CO_2 supercrítico, a temperaturas elevadas e recorrendo ao auxílio de modificadores (bem como o modo de adição destes [128]), poderá assim ser o método de SFE mais eficiente para extrair PAHs de amostras ambientais [124] e constituir uma alternativa face a métodos como a extracção por Soxhlet ou por ultra-sons.

Como limitações deste método referem-se a necessidade de aparelhagem própria, que apresenta custo elevado; a exigência de experiência do operador de modo a encontrar com maior facilidade as melhores condições para obter a maior eficiência no processo e dominar os frequentes problemas da operação; a necessi-

dade de tomar em consideração inúmeros parâmetros – pressão, temperatura, qual e que quantidade de modificador, etc. – para optimizar o processo, possíveis resíduos dos solventes utilizados como modificadores [129] e o facto do poder de solvatação dos solventes diminuir quando em estado supercrítico (melhora em relação ao solvente no estado gasoso, mas piora quando em relação ao solvente no estado líquido). Além disso, um fluido supercrítico adequado, não só deve ser capaz de solvatar os analitos de interesse, como também deve possuir propriedades que lhe permitam interagir com o analito e a matriz para eficiente distribuição do analito no volume do fluido supercrítico [10,123].

2.8. CONCLUSÕES

Após a descrição dos métodos actualmente utilizados na extracção de PAHs em amostras ambientais, apresenta-se no Quadro III um resumo das vantagens e limitações de cada uma das metodologias referidas.

Quadro III – Vantagens e limitações das metodologias utilizadas na extracção de PAHs em amostras ambientais

Método de extracção	Vantagens	Limitações
SOXHLET	▪ Eficiência ▪ Equipamento de custo moderado	▪ Morosidade ▪ Requer volumes de solventes tóxicos relativamente grandes ▪ Os analitos a extrair deverão ser estáveis à temperatura de ebulição do solvente extractor
ULTRA-SONS	▪ Boas recuperações	▪ Requer volumes de solventes tóxicos relativamente grandes
MAE	▪ Rapidez ▪ Eficiência ▪ Adequado à extracção de compostos lábeis ▪ Reduzidos volumes de solvente	▪ Equipamento de custo relativamente elevado ▪ Pode não apresentar maior eficiência do que Soxhlet
SPE	▪ Simplicidade ▪ Rapidez ▪ Eficiência ▪ Permite amostragem em campo ▪ Selectividade ▪ Acoplamento com outras técnicas cromatográficas	▪ Sobrecarga do enchimento por lixiviação de amostras com elevado conteúdo de contaminantes ▪ Perda de analito por adsorção nos recipientes de amostragem e tubos de ligação ▪ Uso de solventes orgânicos tóxicos
SPME	▪ Simplicidade ▪ Utilização de pequenos volumes de amostra ▪ Capacidade de amostragem em campo ▪ Menor manipulação de amostra ▪ Não recorre a solventes orgânicos ▪ Capacidade de acoplamento a outras técnicas cromatográficas	▪ Reduzida especificidade das fibras ▪ Necessidade de películas poliméricas espessas ▪ Difícil reprodutibilidade
ASE	▪ Rapidez ▪ Eficiência ▪ Boas recuperações	▪ Utilização de solventes orgânicos
SFE	▪ Rapidez ▪ Eficiência ▪ Reduzido volume de solventes ▪ Baixa toxicidade e baixo custo do CO_2 ▪ Possibilidade de acoplamento com métodos cromatográficos	▪ Necessidade de adicionar modificadores orgânicos para remover efectivamente os PAHs ▪ Aparelhagem de custo elevado ▪ Controlo de muitos parâmetros ▪ Exigência de experiência do operador

Dependendo da matriz, do tipo de PAHs a estudar, dos objectivos analíticos pretendidos, da aparelhagem disponível e das informações bibliográficas existentes, o analista deve seleccionar, de entre todas estas ferramentas, a que considerar mais adequada para atingir os seus objectivos.

3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS NA ANÁLISE DE PAHs

3.1. INTRODUÇÃO

A poluição do ar, a poluição da água, a poluição do solo e a eliminação dos resíduos sólidos são, actualmente, os mais importantes problemas ambientais que a população humana enfrenta. As amostras ambientais são extremamente complexas e contêm, muitas vezes, classes diferentes de compostos, representados em várias quantidades. A apreensão, cada vez mais consciente, em relação a esta realidade fez com que as análises ambientais representem hoje um dos capítulos mais relevantes da química analítica [20].

As técnicas cromatográficas são, provavelmente, os processos mais extensamente usados na área ambiental. Assim, após o isolamento e concentração da amostra, recorre-se a um processo cromatográfico para separar, identificar e quantificar os compostos pretendidos [20].

A cromatografia designa um conjunto de métodos de separação em que os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases: uma estacionária (sólida ou líquida) com uma grande área superficial e outra móvel (líquida ou gasosa) a qual se move através da primeira. A separação baseia-se na diferente interacção das moléculas da amostra com as fases estacionária e móvel e moléculas com maior interacção com a fase estacionária são mais retidas e moléculas com maior interacção com a fase móvel são menos retidas [69].

As técnicas cromatográficas sofreram uma grande evolução desde o seu aparecimento em 1903, ano em que Tswett descreveu o primeiro processo cromatográfico de separação de pigmentos cloroplastos [69].

Técnicas cada vez mais evoluídas e eficientes foram surgindo, sendo de salientar dois marcos importantes: o aparecimento da cromatografia de fase gasosa (CG) em 1952 e a divulgação da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) nos anos 70. Estas duas técnicas tornaram-se rotineiras e constituem actualmente presença fundamental e indispensável em qualquer laboratório de química analítica [130].

Porque estas duas modernas técnicas cromatográficas – HPLC e CG – são quase que indispensáveis no estudo de PAHs, iremos referi-las com maior detalhe e adequação aos objectivos deste trabalho.

3.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de cromatografia líquida (a fase móvel é sempre um líquido) realizada sob pressão, utilizando colunas com enchimentos de partículas de reduzidas dimensões e com sistemas de detecção contínua do eluato, que apresenta em relação à cromatografia líquida convencional, a possibilidade de separações com elevada resolução e em tempos relativamente curtos [69].

Em 1941, Martin e Synge estabeleceram as condições essenciais da HPLC mas foi somente a partir de 1969 que a sua aplicação experimental se estabeleceu e difundiu [69].

Os componentes básicos do equipamento de HPLC são os apresentados na Figura 44:

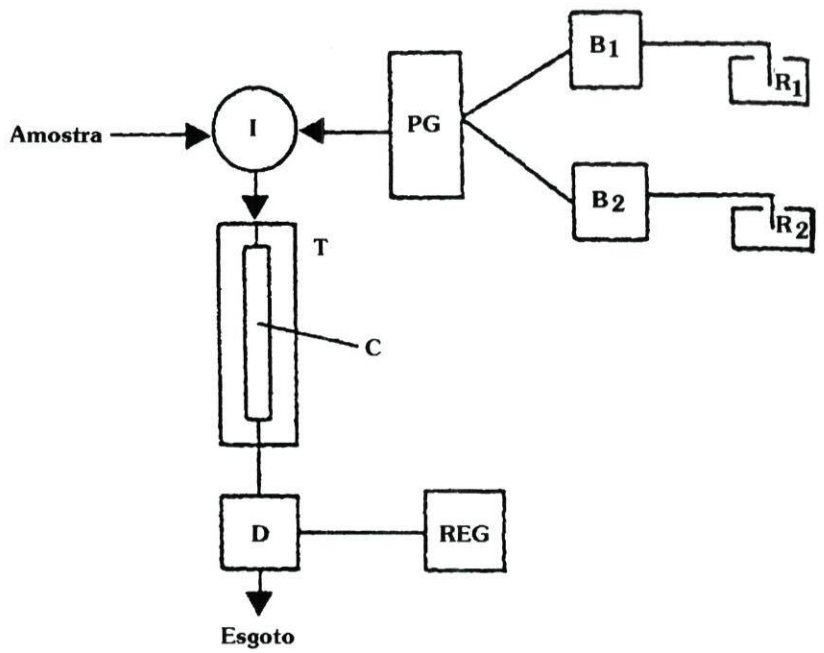


Figura 44. Diagrama esquemático de equipamento para HPLC (adaptado de [131])

I – injector PG – programador de eluição por gradiente B – bombas R – reservatórios da fase móvel T – termostato C – coluna D – detector REG – registador/integrador

O desenvolvimento de enchimentos de micropartículas quimicamente ligadas foi um marco importante para tornar a HPLC uma técnica valiosa nas ciências da vida (o desenvolvimento da HPLC foi estimulado pela descoberta do ácido desoxirribonucleico – ADN) e a introdução de enchimentos de fase reversa, transformou-a num instrumento mais universal tendo-se tornado, nos finais dos anos 70, uma técnica imprescindível e indispensável em qualquer laboratório onde fossem necessárias boas separações. Nos anos 80, o equipamento de HPLC foi aperfeiçoado, automatizado e computadorizado. As colunas tornaram-se mais pequenas [130], permitindo obter eficiências mais elevadas, diminuição das velocidades do fluxo e trabalhar com amostras mais reduzidas [132].

A cromatografia de distribuição ou de partilha é a mais frequentemente utilizada em análises ambientais. Neste caso, a fase móvel e a fase estacionária são líquidas. O líquido que constitui a fase estacionária está ligado a um suporte sólido que possa ser mantido na coluna e consiga suportar a passagem da fase móvel. Hoje em dia recorre-se habitualmente a fases estacionárias líquidas fixadas a um suporte sólido através de ligação química (BPC – cromatografia de fase ligada) (Figura 45).

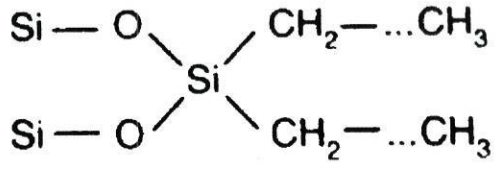


Figura 45. Fase ligada (adaptado de [88])

A fase estacionária não é, assim, arrastada pela fase móvel podendo, portanto, operar-se mais facilmente excluindo-se ainda o risco de os componentes da amostra aparecerem contaminados com esta fase [69].

A BPC apresenta outras vantagens como a facilidade de regeneração posterior da coluna e a possibilidade de utilização de fases móvel e estacionária com polaridade análoga e elevada selectividade [69].

Na cromatografia líquida de fase normal em fase ligada (NP-BPC), a fase estacionária é polar e a móvel não polar; deste modo, os solutos mais polares apresentam tempos de retenção superiores. A ordem de eluição surge invertida na BPC de fase reversa (RP-BPC), em que a fase estacionária é apolar e a móvel polar. Como fase estacionária em BPC de fase reversa utiliza-se sobretudo, o octadecilsilano (C_{18}, ODS, ou RP-18) [69] e é usual a utilização de uma fase móvel aquosa contendo um solvente orgânico miscível, como metanol ou acetonitrilo; o acetonitrilo apresenta a vantagem, em relação ao metanol, de ser um melhor solvente de solutos não polares e de apresentar menor viscosidade [69].

Em 1971, Schmit *et al.* [26] descreveram, pela primeira vez, a separação de PAHs usando uma fase estacionária de fase ligada de octadecilsilano [26]. Desde aí, a cromatografia líquida de fase reversa em fase ligada tornou-se o método de HPLC mais utilizado para a separação de PAHs [20,26,133]. A popularidade da HPLC de fase reversa na separação de PAHs é devida à excelente selectividade desta técnica para a separação dos PAHs e seus isómeros nas complexas misturas de PAHs encontradas nas amostras ambientais [26,134].

A percepção do fenómeno de separação ocorrido na coluna cromatográfica só é possível pela utilização de um detector. Este dispositivo deve detectar os compostos à saída da coluna e possibilitar uma avaliação qualitativa e quantitativa dos resultados. Isto pode conseguir-se pelo registo da resposta do detector em forma de

cromatograma (curva de resposta em função do tempo) e pela utilização de um equipamento de tratamento de dados [69].

Os requisitos básicos a que um detector deve obedecer podem resumir-se a três pontos: sensibilidade elevada na medição, linha base estável e baixo nível de ruído. O nível de ruído do detector e a sensibilidade determinam os limites de detecção do procedimento analítico. Como regra, só podem ser identificados sinais que excedam três a quatro vezes o ruído específico do aparelho detector. Para além da parte electrónica do detector, podem originar ruído e instabilidade da linha base: variações de temperatura, bolhas de gás no eluente ou alterações no pulsar da bomba [69].

Os detectores medem habitualmente uma propriedade física dos componentes à saída da coluna [135]. Os detectores de ultravioleta-visível (UV/VIS) e de fluorescência, são específicos e apenas detectam os compostos capazes de absorver radiações UV/VIS ou compostos com propriedades fluorescentes, respectivamente [135].

Os PAHs, sendo compostos aromáticos e, portanto, possuindo sistemas insaturados conjugados absorvem com facilidade radiações UV [136].

Os detectores de UV/VIS (Figura 46 – página 74), de comprimento de onda fixo e variável, são os mais populares na análise de compostos orgânicos [135]

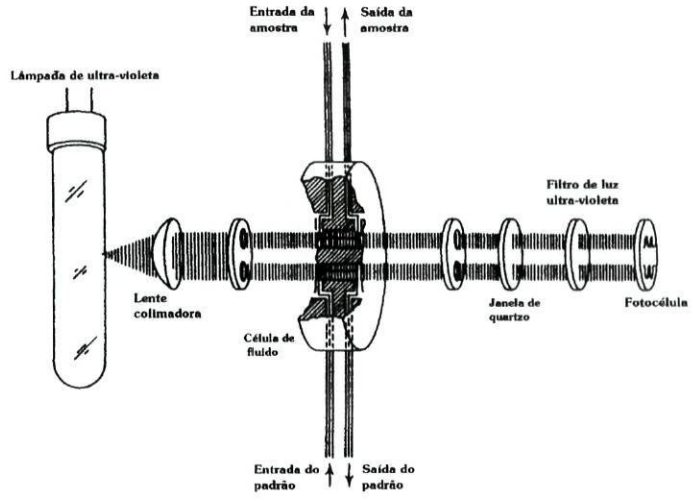


Figura 46. Esquema de um detector de UV [138]

A utilização da absorção de radiação ultravioleta originou o aparecimento de um novo tipo de detectores – DAD (detector de fotodíodos) – que, ao contrário dos detectores UV típicos, recorre a um elevado número de pequenos fotodíodos que permitem a medição concomitante da absorção em diversos valores de comprimentos de onda [137] (Figura 47).

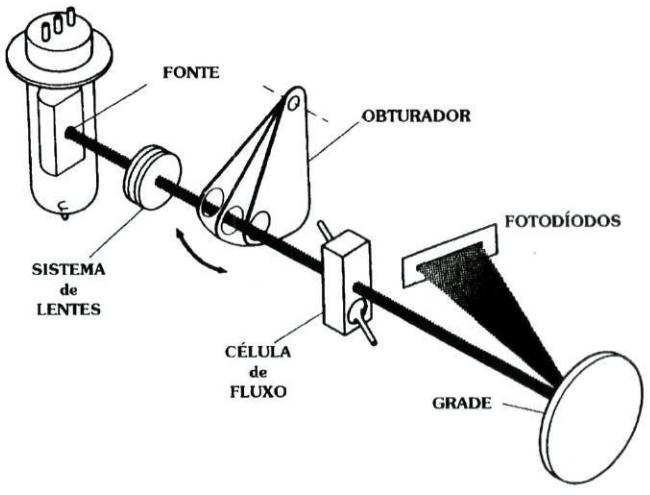


Figura 47. Sistema óptico de um detector DAD [138]

Desta forma é possível obter um espectro completo em qualquer ponto do cromatograma (Figura 48) e, com ajuda de uma sistema computadorizado, é mesmo possível obter cromatogramas a três dimensões [26] (Figura 49).

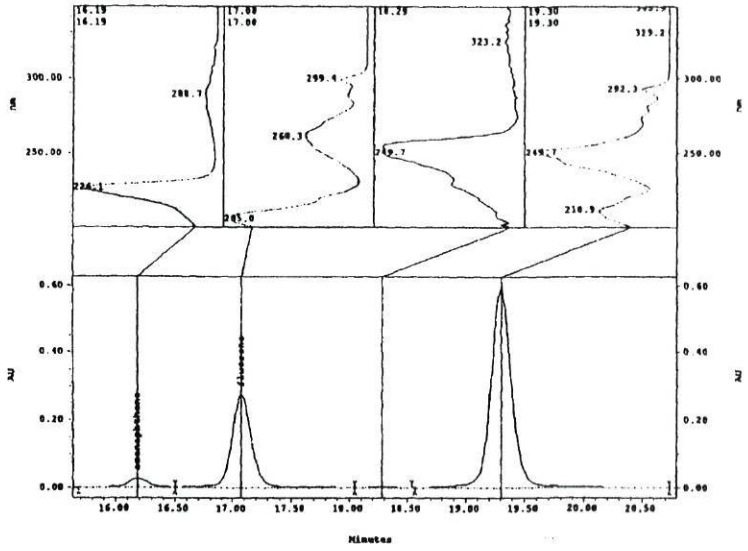


Figura 48. Espectro completo obtido com DAD [139]

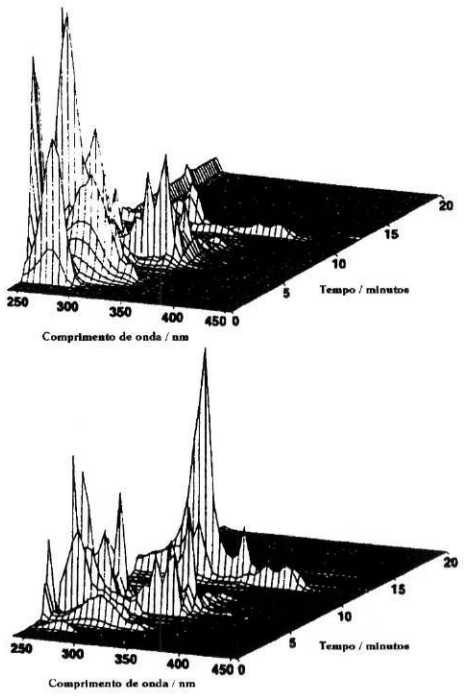


Figura 49. Cromatograma tridimensional de PAHs em produtos de petróleo refinado [135]

Os instrumentos disponíveis comercialmente têm a capacidade de fazer corresponder espectros desconhecidos aos de uma biblioteca [135].

Os PAHs correspondendo a moléculas com estruturas rígidas e um número elevado de ligações duplas conjugadas, apresentam também propriedades fluorescentes [136]. De facto, a espectroscopia de fluorescência é um dos métodos de detecção mais sensíveis e selectivos usados em cromatografia líquida, apresentando particular interesse para a determinação de substâncias com fluorescência intrínseca e com interesse em análise ambiental, como é o caso dos PAHs. Nos detectores de fluorescência, a intensidade de emissão, a um par fixo de λ de excitação e de emissão, é registada em função do tempo. Os detectores mais modernos podem, inclusivamente, ser programados para estabelecer os λ óptimos para cada composto, conseguindo-se assim aumentar a selectividade e a sensibilidade (Figura 50) [140].

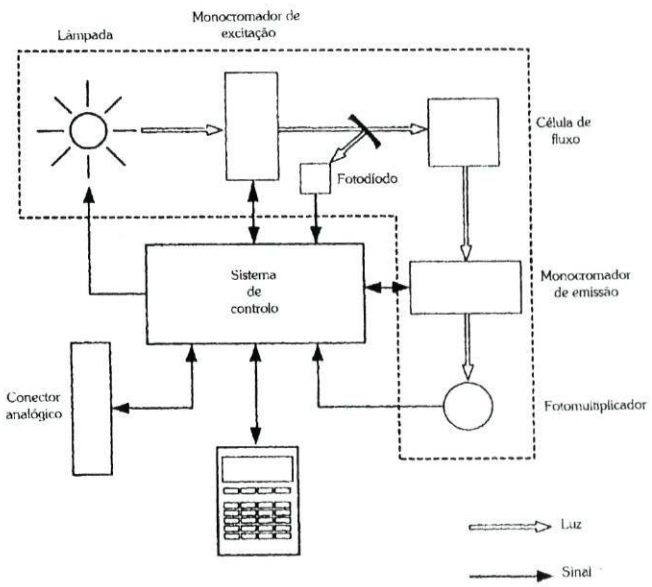


Figura 50. Esquema do detector de fluorescência Waters® 474 (adaptado de [141])

Por estes motivos, os detectores por absorção de radiações UV e de fluorescência são os mais usados em HPLC para a determinação e quantificação de PAHs

em amostras ambientais [26]. O detector de fluorescência oferece, contudo, uma maior sensibilidade e uma maior selectividade do que o detector UV, uma vez que apenas são detectadas e avaliadas espécies com propriedades fluorescentes [26,142]. O detector de fluorescência apresenta como limitação o facto de exigir que os líquidos que constituem a fase móvel sejam muito bem desgaseificados pois o oxigénio é um "captador" eficiente de fluorescência [136].

Os espectros de UV e de fluorescência de excitação e de emissão dos vários PAHs existentes na bibliografia podem ser muito úteis, quer para a identificação de alguns componentes quer na selecção de comprimentos de onda a utilizar durante a análise [135].

Existem ainda detectores mais elaborados, de grande utilidade em muitas circunstâncias mas cujo preço inibe a sua popularidade como sejam os detectores de espectrometria de massa e de infravermelho [137,140,143].

Depois da identificação dos componentes da amostra, a etapa seguinte é o doseamento dos componentes com interesse. Todos os detectores de HPLC produzem um sinal eléctrico que se utiliza para impulsionar o movimento de um dispositivo de medição. Tal como o tempo de retenção é o parâmetro a considerar na identificação, a área dos picos constitui o parâmetro a estudar para a quantificação. A medição das áreas dos picos baseia-se no facto de a concentração de um componente da amostra ser directamente proporcional à área. Pode efectuar-se a medição por métodos manuais (recortar e pesar o papel correspondente ao pico no cromatograma; recorrer a um planímetro; efectuar triangulação) mas os equipamentos mais modernos efectuam a integração da área dos picos. Em qualquer caso

é fundamental obter curvas de calibração recorrendo a soluções padrão de concentração conhecida [69].

Os dois métodos de doseamento mais frequentemente utilizados na análise de PAHs por HPLC são: (1) *método do padrão externo* e (2) *método do padrão interno.*

A imaginação e o engenho do químico possibilitam interligar processos, criar novas soluções e, desta forma, resolver problemas de análise ambiental de forma original, expedita e eficiente. Apresentamos nos Quadros seguintes (IV, V e VI) alguns casos que encontrámos na bibliografia consultada e que reclamaram a nossa atenção.

Quadro IV – Determinação de PAHs por HPLC em **SOLOS** e **PEIXE**

	Solos [144]	**Peixe fumado e grelhado** [145]
Amostra	8 g de solo seco e peneirado	As partes edíveis foram homogeneizadas e liofilizadas
Extracção	SFE: 60 mL CO_2 a 40 MPa, temperatura = 100 °C; extracto recolhido em $CHCl_2$; tempo de extracção = 60 minutos	SFE: 20 mL CO_2 a 350 atm; temperatura = 5-10 °C Extracto recolhido em 3 mL de hexano/DCM (3:1)
Eliminação de interferências	Separação em gele de sílica com ciclohexano com 15 % de água e coluna Sephadex LH 20; recolhem-se duas fracções	Os extractos foram evaporados à secura e diluídos em 1 mL de hexano
Quantificação	HPLC, por gradiente	RP-HPLC, por gradiente
Purificação	_____	SPE* - 1 g de alumina e 0,8 g de gele de sílica
Detecção	1ª fracção – UV, 254 nm 2ª fracção – fluorescência	UV, a 254 nm

* O uso de metanol como modificador resulta na co-eluição de compostos lipofílicos em grandes quantidades interferindo na análise por HPLC-UV. Impõe-se, assim, esta purificação.

Quadro V – Determinação de PAHs por HPLC em **ALIMENTOS**

	Alimentos marinhos [146]	**Alimentos** [147]	**Alimentos**** [148]
Amostra	MR de mexilhão (NIST) *	Peixes de água doce, do mar, crustáceos, moluscos, charcutaria, queijos	Alimentos fumados (charcutaria, queijos e peixes), grelhados, carnes e peixes de barbecue, pão, café, frutos secos
Extracção	TCTFE***	Ciclohexano	Soxhlet, com acetona, 5 horas
Eliminação de interferências	SPE, com coluna C_{18}	SPE	_____
Quantificação	RP-HPLC, por gradiente	RP-HPLC, por gradiente	RP-HPLC, por gradiente
Detecção	Fluorescência, com programação	Fluorescência, com programação	Fluorescência λ_{ex} = 381 nm λ_{em} = 405 nm

* e também castanholas, mexilhões, ostras, salmão e caranguejos
** quantificou-se apenas benzo[*a*]pireno
*** 1,1,2-triclorotrifluoretano

Nota – [146], [147]: 15 PAHs EPA (excepto acenaftileno); [148]: benzo[*a*]pireno

Quadro VI – Determinação de PAHs por HPLC em **MATÉRIA PARTICULADA**

	Referência Bibliográfica				
	May e Wise [149]	**Ares** [150]	**Gaston e Chang** [23]	**Götze *et al.*** [151]	**Núñez *et al.*** [136]
Amostra	MR 1649 do National Bureau of Standards	Ar de uma unidade industrial de produção de ânodos	1440 m^3 de ar da cidade de Taipei -Taiwan	Fuligem de diesel (locomotivas e veículos automóveis)	1000 m^3 de ar
Extracção	_____	Filtros extraídos por Soxhlet, com 25 mL de ciclohexano	Filtros extraídos por Soxhlet com DCM a 50 °C, 24 h	Soxtec,* com 200 mL de DCM, 2 h	Soxhlet com n-hexano, 5 h
Eliminação de interferências	_____	_____	Cromatografia de permeação em gel	Coluna SiO_2	_____
Separação	NP-HPLC com coluna C_{18} para separar os aromáticos; RP-HPLC de fase ligada C_{18} para separar isómeros e os derivados alquilados	_____	_____	A separação das diferentes classes de PAHs foi feita em coluna de alumina por mudança dos eluentes: heptano, benzeno, $CHCl_3$ e metanol	_____
Quantificação	RP-HPLC, com eluição por gradiente	_____	_____	RP-HPLC	RP-HPLC; eluição isocrática com acetonitrilo-água (80:20)
Detecção	Fluorescência, com programação de λ	Extracto analisado por UV-DAD, a 220-400 nm	UV a 254 nm e fluorescência programada	UV a 254 nm Fluorescência (λ_{ex} = 289 nm e λ_{em} >370 nm)	Fluorescência

*para taxas de recuperação da mesma ordem (≥95 %), um extractor Soxhlet demoraria 8 horas; trata-se de um método em três etapas: a amostra é imersa no solvente em ebulição onde permanece ≅ 60 min.; o recipiente contendo a amostra é elevado acima do solvente em ebulição e a amostra é extraída como se estivesse num aparelho de Soxhlet, durante ≅ 60 min.; na 3ª etapa, o solvente é evaporado directamente no aparelho de Soxtec, durante 15 minutos [84].

3.3. CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA (CG)

A exigência fundamental para que um composto seja analisado por CG é a sua volatilidade dentro dos limites de temperatura usados [20]. A CG é uma técnica cromatográfica de coluna e o eluente é um gás (inerte, relativamente à amostra e à fase estacionária) que atravessa, sob pressão, a coluna (a qual contém a fase estacionária, sólida ou líquida), arrastando consigo a amostra em estudo, pelo que se designa por gás vector [69]. As amostras em solução, são vaporizadas e depois arrastadas pelo gás vector através da coluna onde são separadas nos componentes de interesse os quais são, posteriormente, detectados [136] (Figura 51).

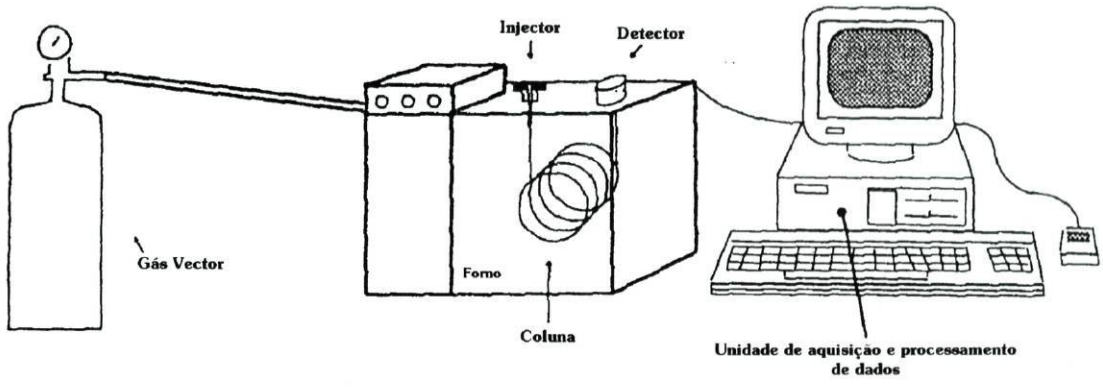


Figura 51. Representação esquemática de um sistema de cromatografia de fase gasosa (adaptado de [152] e de [153])

A CG constitui uma das técnicas separativas mais poderosas e mais usadas, dadas as características que apresenta: elevado poder de resolução, elevada eficiência, selectividade, reduzido tempo de análise, fácil quantificação, exigência de uma reduzida quantidade de amostra, capacidade de detectar baixas concentrações, facilidade de automatização e de acoplamento a outras técnicas analíticas (nomeadamente à espectrometria de massa e à espectrometria no infravermelho), [20,69]. Apresenta, no entanto, algumas limitações como: a exigência de amostras

voláteis e termicamente inertes e a dificuldade de aplicação à escala preparativa. A CG pode ser estendida, em alguns casos, à análise de amostras pouco voláteis após derivatização [69].

Ao contrário do que sucede em HPLC – em que as separações são conseguidas, essencialmente, fazendo variar a composição do eluente e em que existe uma relativa pequena variedade de tipos de coluna – em CG, o mercado disponibiliza uma infinidade de colunas diferentes. Embora muitas delas sejam tão similares a ponto de se poderem utilizar indiferenciadamente, é verdade que existe uma enorme variedade de fases estacionárias que exigem uma escolha adequada para que, em cada caso, se obtenham os melhores resultados analíticos [154].

O detector de ionização de chama (FID) é o detector mais popular utilizado em CG. É quase universalmente sensível a todos os compostos orgânicos e apresenta boa sensibilidade e excelente linearidade de resposta. O efluente da coluna é dirigido a uma chama de hidrogénio/ar onde sofre a acção de uma diferença de potencial de algumas centenas de vóltios [137] (Figura 52).

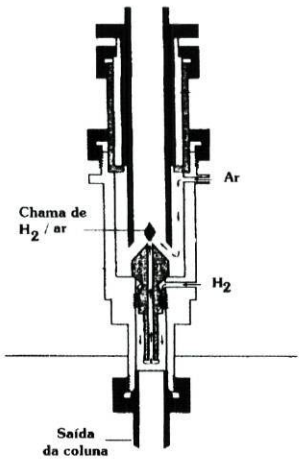


Figura 52. Detector FID (adaptado de [137])

Quando os componentes da amostra ardem produzem uma explosão de iões que, por sua vez, produzem uma corrente entre a chama e o colector. Esta corrente é amplificada e medida. A resposta deste detector pode dizer-se que é aproximadamente proporcional ao número de átomos de carbono presentes na chama num dado momento [137]. A maior desvantagem deste detector é que destrói a amostra, não permitindo a sua passagem a outro detector ou a recolha dos componentes após serem detectados [137].

O facto de todos os compostos orgânicos serem detectados faz com que os cromatogramas obtidos por CG-FID, a partir de amostras ambientais e com vista à análise de PAHs, sejam bastante complexos. De facto, é necessário um cuidado especial com a remoção de impurezas que interfiram ou coeluam com os PAHs (lípidos, hidrocarbonetos alifáticos, etc.). É, por isso, frequente e quase imprescindível recorrer à cromatografia líquida em coluna ou à SPME para purificar previamente as amostras antes de serem analisadas por CG-FID [137].

A cromatografia de fase gasosa associada com o detector de massas (MSD) constitui uma das técnicas mais poderosas a que um analista ambiental pode recorrer.

Este detector consiste, essencialmente, num espectrómetro de massas (EM) e permite trabalhar em gama total de iões (total ion monitoring – TIC), funcionando como detector universal, ou por escolha de alguns iões previamente seleccionados (single ion monitoring – SIM), o que o converte num detector altamente específico para determinado tipo de compostos (Figura 53 – página 84) [155].

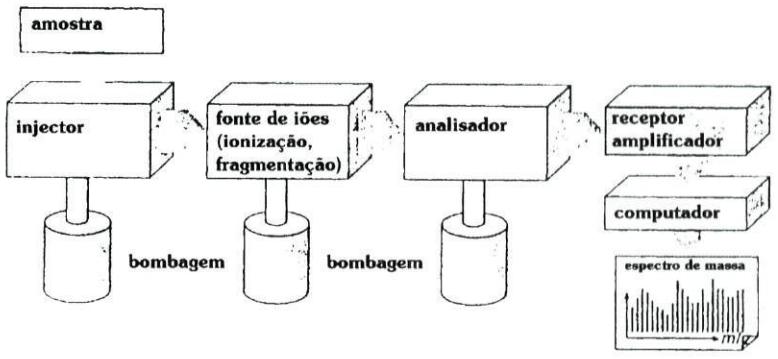


Figura 53. Diagrama esquemático de CG-MSD [155]

Em comparação com o detector FID, o MSD é mais preciso na quantificação de PAHs, uma vez que as interferências que coeluem são minimizadas por esta natureza selectiva do detector.

Os métodos de doseamento utilizados em CG são os já referidos a propósito de HPLC (ponto 3.2., página 78): método do padrão externo e método do padrão interno.

De todas as técnicas cromatográficas, a CG é a mais dinâmica e a que tem permitido uma melhor adaptação à resolução de problemas concretos de química ambiental. Tudo isto faz com que a CG seja das técnicas cromatográficas modernas, a mais antiga e que continua a manter a actualidade e a indispensabilidade de sempre num laboratório de química ambiental [20].

Indicamos a seguir (Quadros VII e VIII – página 85 e IX – página 86) algumas condições utilizadas por alguns autores para a separação de PAHs por CG em amostras de natureza diversa.

Quadro VII – Determinação de PAHs por CG em **SOLOS**

	Referência Bibliográfica	
	Auer *et al.* [156]	**McClennen *et al.*** [157]
Amostra	30 porções individuais retiradas ao acaso de uma área de 10× 10 m, a uma profundidade de 5-8 cm	Solos argilosos
Extracção	Ultra-sons com 30 mL de 2-metoxi-etanol	Ultra-sons, com DCM
Eliminação de interferências	SPE, com cartuchos C_8 descartáveis	_____
Condições CG	Volume de injecção = 0,5 µL Temperatura do forno = 90-190 °C a 30 °C.min^{-1}, 190-260 °C a 4 °C.min^{-1}	Temperatura da coluna = 40--300 °C a 15 °C.min^{-1}
Detecção	FID	MSD

Nota: [156]: naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno; [157] – 16 PAHs EPA

Quadro VIII – Determinação de PAHs por CG em **MATÉRIA PARTICULADA**

	Referência Bibliográfica		
	Suzuki *et al.* [159]	**Rocha *et al.*** [158]	**Pointet *et al.*** [160]
Amostra	Ar	Ar	Escapes de veículos a diesel
Extracção	Soxhlet, benzeno, 24 horas	Ultra-sons, mistura tolueno-metanol, 50 °C, 1 hora	Soxhlet, 350 mL DCM, 24 horas
Eliminação de interferências	_____	_____	_____
Condições CG	20 mL.min^{-1} de N_2 25 ml.min^{-1} de H_2 850 ml.min^{-1} de ar volume de amostra = 1 µL 120 °C, durante 4 minutos subida de temperatura 7,5 °C.min^{-1} até 255 °C ; coluna de cristais líquidos	Coluna 0,25 µm, fenil-metilsilicone, 30 m × 0,32 mm, temperatura do forno = 60 °C, aumentada 6 °C.min^{-1}, até 282 °C	Temperatura da coluna: 100 °C (durante 2 minutos) até 240 °C, a 25 °C.min^{-1} e depois até 320 °C, a 5 °C.min^{-1}
Detecção	FID	MSD	MSD

Nota – [158] e [160]: 16 PAHs EPA; [159]: fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, trifenileno, benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno e perileno

Quadro IX – Determinação de PAHs por CG em **MEXILHÕES**

	Referência Bibliográfica				
	Butler *et al.* [161]	**Mason** [142]	**Hernández *et al.*** [162]	**Webster *et al.*** [163]	**Baumard *et al.*** [164]
Amostra	Mexilhões contaminados com petróleo	Mexilhões contaminados com hidrocarbonetos de petróleo	Mexilhões congelados (crus e pré-cozinhados)	Mexilhões da região costeira do sul da Escócia; após o derrame do petroleiro MV Breer, em Janeiro de 1993	Tecidos de mexilhões
Extracção	Saponificação, seguida de extracção com pentano	Hexano	3 × 50 mL de n-hexano	2 × 80 mL de isohexano	Pentano
Eliminação de interferências	Em coluna de gel de sílica	_____	_____	_____	_____
Separação	_____	Coluna de alumina-sílica: 1.ª fracção – alifáticos 2.ª fracção – aromáticos 3.ª fracção – polar	Cromatografia em coluna: Florisil-sílica	NP-HPLC, eluição isocrática	Coluna cromatográfica de alumina
Detecção	FID	Fluorescência	FID	MSD	MSD

Nota: [162] – em análise: fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[*a*]antraceno, criseno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*e*]pireno, benzo[*a*]pireno, coroneno; [163] – naftaleno, fenantreno, antraceno, dibenzotiofeno, fluoranteno, pireno; [164] – 12 PAHs EPA

3.4. HPLC *versus* CG

Como os PAHs representam um grande grupo de compostos e com um grande número de isómeros, são necessários métodos de separação eficientes para identificar e determinar todos estes compostos. Para a análise de PAHs contendo até seis anéis aromáticos, tem-se recorrido a CG. Para os PAHs de maior massa molecular tem-se recorrido, preferencialmente, a HPLC de fase reversa [165]. A principal razão para não se efectuar a análise destes PAHs por CG deve-se à baixa pressão de vapor daqueles compostos [166].

O método de CG capilar é eficaz para a separação de misturas complexas de PAHs devido ao seu elevado poder de resolução [69,166,167]. A selectividade apresentada pelas colunas capilares, a rapidez das análises e a eficiência na detecção fazem com que, na ausência de interferências, a CG constitua um método de eleição na análise de PAHs. Contudo, a CG apresenta limitações importantes: requer uma intensa eliminação de impurezas da amostra [168] e, para compostos de elevada massa molecular, a temperatura de eluição pode exceder o limite de temperatura da coluna [166].

Importa ainda referir que, um elevado número de amostras não podem ser analisadas por CG, quer devido ao teor de impurezas, quer devido à sua insuficiente volatilidade (a CG não é, em geral, utilizável com compostos cujo ponto de ebulição seja superior a 450 °C), quer também devido à sua instabilidade térmica [69].

As limitações de volatilidade e instabilidade térmica referidas para a CG não são, em geral, sentidas pela HPLC uma vez que aqui é habitual operar-se à temperatura ambiente. Uma outra vantagem de HPLC é que, enquanto que em CG o

gás é inerte e não apresenta afinidade pelo soluto, arrastando-o simplesmente através da coluna, na cromatografia líquida, o eluente compete com a fase estacionária pelas moléculas dos solutos. Assim, em HPLC existem duas fases com interacção selectiva sobre os solutos de onde resulta a possibilidade de jogar com um maior número de variáveis para se obter a separação pretendida [69].

Em resumo, pode dizer-se que a HPLC é um método de preparação e análise de amostras poderoso e que a CG é um método de separação e detecção rápido e eficaz para a análise de muitos PAHs.

3.5. OUTROS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.5.1. HPLC-CG

Conforme demonstram muitos dos exemplos encontrados na bibliografia, é frequente que as amostras analisadas por CG sejam precedidas de tratamento por cromatografia líquida. É assim lógico pensar que a utilização da cromatografia líquida ligada directamente à cromatografia gasosa constituirá um processo alternativo interessantíssimo na análise de PAHs em amostras ambientais.

A utilização sequencial de HPLC-CG foi descrita, pela primeira vez em 1980, por Majors [169]. A HPLC-CG mostrou ser eficaz na análise cromatográfica de vários compostos, nomeadamente de PAHs. Em HPLC-CG a amostra é injectada no cromatógrafo HPLC e, subsequentemente, uma ou mais fracções são analisadas por CG [169] (Figura 54).

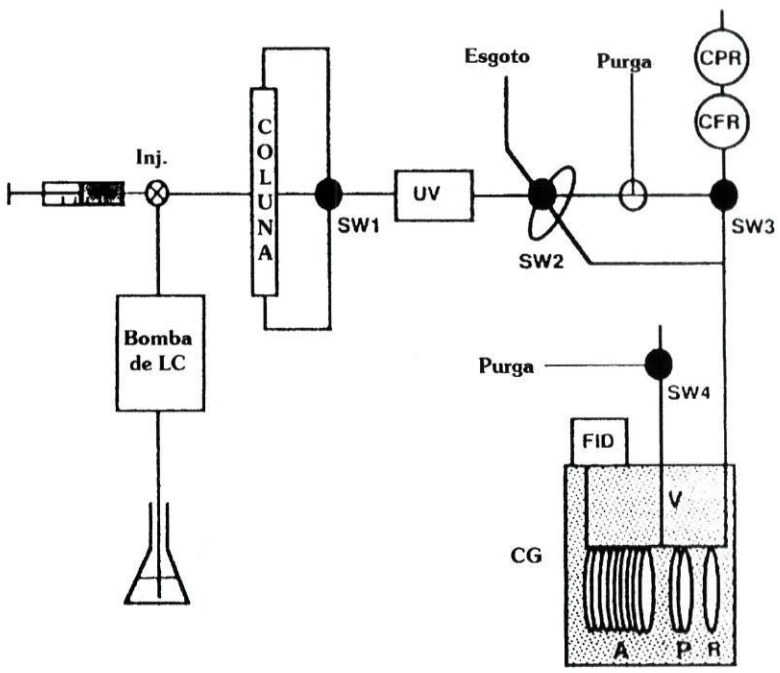


Figura 54. Diagrama esquemático do sistema HPLC-CG (adaptado de [169])

Inj. – injector UV – detector de UV SW 1-4 – válvulas CPR – regulador de pressão constante CFR – regulador de fluxo constante R – abertura de retenção P – pré-coluna A – coluna capilar V – saída de vapor CG – cromatógrafo de fase gasosa FID – detector de ionização de chama

Esta técnica "hifenada" oferece assim um processo automático e simultâneo de eliminação de impurezas (HPLC) e análise de amostras (CG) [169].

Como já referimos, na análise cromatográfica de muito baixas concentrações, uma grande parte do tempo é gasta na preparação da amostra. Com a HPLC pode-se efectuar uma grande parte do trabalho de pré-separação, eliminação de impurezas e pré-concentração da amostra. Assim, a preparação da amostra por HPLC é mais eficaz pois este método apresenta elevada eficiência de separação, uma larga gama de selectividades, elevada velocidade e, se acoplada, um elevado grau de automatização, eliminando todo ou, pelo menos, uma grande parte do trabalho de preparação da amostra [168].

A análise por CG associa-se muitas vezes a HPLC porque esta, por si só, não oferece detecção sensível para os componentes de interesse (por exemplo, por falta de um cromóforo adequado, caso se use um detector UV).

Assim, a técnica hifenada HPLC-CG reduz ou praticamente elimina o trabalho de preparação de amostra manual, permite detectar concentrações que não podiam ser analisadas antes e proporciona resultados com precisão e exactidão para toda a análise [168].

Lewis *et al.* [170] desenvolveram um sistema de NP-HPLC-CG-EM (Figura 55 – página 91) para efectuar análise quantitativa de amostras como óleos diesel e matéria particulada de áreas urbanas.

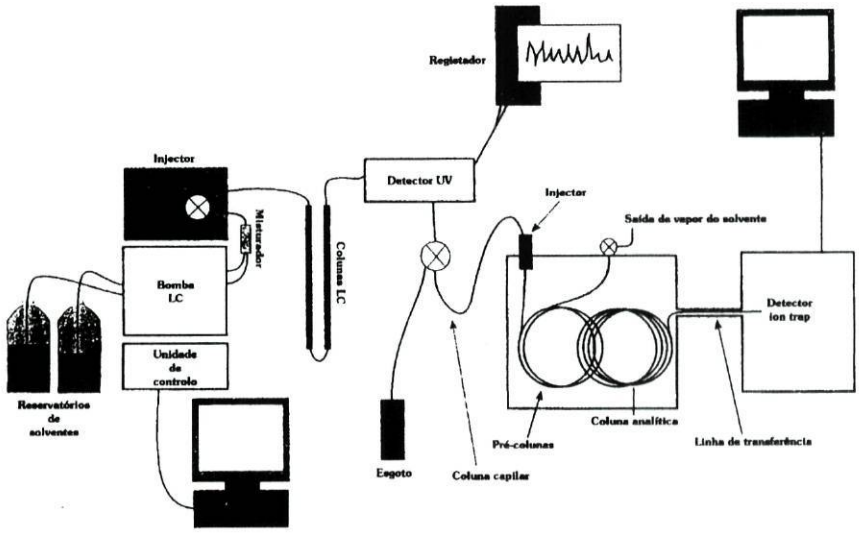


Figura 55. Aparelho de HPLC-CG-EM (adaptado de [170])

A HPLC, como passo de pré-preparação, permite separar espécies oxigenadas de PAHs, nitro-PACs, PAHs e hidrocarbonetos alifáticos. Estas fracções são transferidas para CG-EM, obtendo-se os espectros de massa. O uso de HPLC-CG acoplada a EM permite, pois, que a análise destas misturas complexas seja simplificada. O processo de fraccionamento aumenta a sensibilidade dos métodos de detecção subsequentes com a remoção dos compostos interferentes, permitindo o enriquecimento da amostra com o mínimo de perdas, contaminação e oxidação [170].

Contudo, estas técnicas altamente promissoras e de grande sucesso assegurado no futuro próximo, confrontam-se ainda com problemas técnicos que proporcionem aparelhos fiáveis e fáceis de utilizar.

3.5.2. CROMATOGRAFIA DE FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFC)

Mencionamos já a utilização de um fluido supercrítico na extracção de amostras ambientais (SFE – página 61). Tivemos aí oportunidade de referir que uma substância não pode existir no estado líquido acima da sua temperatura crítica. Indicamos também que, se um material se encontra acima da sua temperatura crítica e é sujeito a uma elevação suficiente de pressão, torna-se muito mais denso do que os gases vulgares e assume propriedades semelhantes às dos líquidos, passando então a denominar-se fluido supercrítico. Estes fluidos podem também ser utilizados como fases móveis em cromatografia, aproveitando a possibilidade de se poderem variar algumas das suas propriedades – fundamentais nas separações cromatográficas – como sejam a viscosidade e a solubilidade. O poder de solubilização destes fluidos é muito maior do que o dos gases, permitindo a separação de compostos pouco voláteis, impossíveis de separar por CG. Por outro lado, os coeficientes de difusão dos solutos são muito maiores nos fluidos supercríticos do que nos eluentes líquidos utilizados em HPLC. Isto significa que a velocidade da fase móvel, para o máximo de eficiência da coluna, pode ser cinco a dez vezes superior do que em HPLC, resultando separações mais eficientes em menor tempo. Finalmente, como a viscosidade é menor, é muito mais fácil bombear um fluido supercrítico e fazê-lo atravessar a coluna cromatográfica. Estes factos fazem com que esta técnica, relativamente recente, tenha começado a ser utilizada na análise de PAHs [137]. A Figura 56 (página 93) representa o diagrama esquemático de um aparelho para cromatografia de fluido supercrítico (SFC).

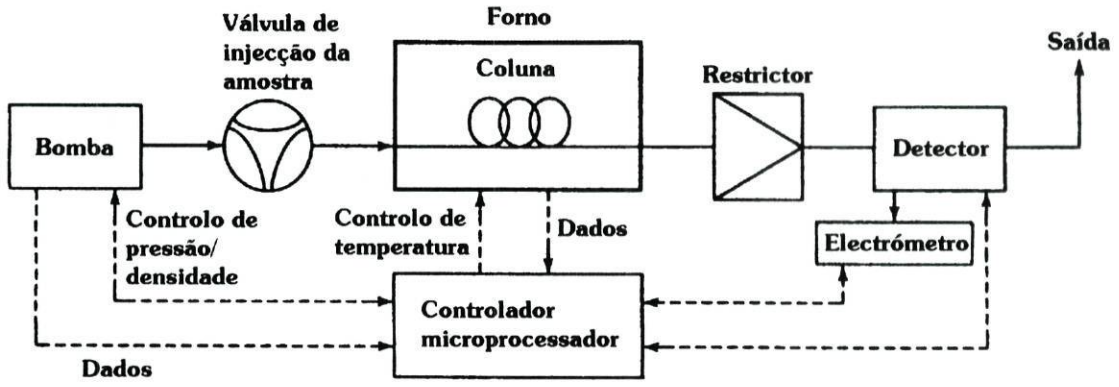


Figura 56. Diagrama esquemático do sistema SFC (adaptado de [137])

Dada a semelhança entre a SFC e a HPLC (são ambas técnicas cromatográficas de alta pressão), a instrumentação utilizada por estas técnicas é do mesmo tipo, embora apresente algumas diferenças decorrentes das particularidades de operação de cada uma das técnicas [137].

O sistema de injecção, particularmente em trabalho capilar, pode complicar a análise, surgindo dificuldades na quantificação em injecções com e sem divisão de fluxo devido a dificuldades de homogeneização da amostra com o eluente. As colunas utilizadas em SFC são normalmente semelhantes às utilizadas em HPLC. Colunas capilares de pequeno comprimento (1-10 m) podem também ser utilizadas [137]. No final da coluna é indispensável a presença de um restritor para manter o fluido na coluna às pressões necessárias [137].

Os detectores utilizados em HPLC e em CG podem ser usados em SFC [137].

O detector mais usado é o FID mas este não pode ser usado com a maioria dos modificadores. Como este detector fornece relativamente pouca informação acerca da natureza dos analitos detectados, pode recorrer-se a um detector de massa, o qual já permite obter essa informação [103].

No entanto, as dificuldades experimentais e a falta de equipamento disponível comercialmente constituem ainda limitações ao progresso de SFC.

3.5.3. CROMATOGRAFIA PLANAR

A cromatografia planar é um tipo de cromatografia líquida que abrange uma variedade de técnicas: cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia de alta eficiência em camada fina (HPTLC) e cromatografia em papel (PC).

A cromatografia planar tem sido especialmente usada na análise de PAHs e seus derivados como um passo de separação preliminar e como um método de subfraccionamento, particularmente antes do uso de outros métodos analíticos. É um método de custo reduzido, com consumo mínimo de solvente, em comparação com outras técnicas de separação líquidas como por exemplo HPLC [171].

A cromatografia em camada fina é uma técnica conhecida desde os primórdios da cromatografia e continua a prestar excelentes serviços aos químicos analíticos. Permanece um método usual e de custo reduzido para a separação de misturas, exigindo pouca instrumentação [171].

Acoplando HPLC a TLC, juntam-se dois princípios de separação – RP--HPLC e cromatografia de adsorção – num só processo analítico pelo que, de facto, estas técnicas se complementam.

O eluato da coluna de HPLC aplica-se numa placa de TLC através de um capilar. A interface consiste no fornecimento de um gás como o azoto e um sistema que move a placa de TLC (Figura 57 – página 96) [145].

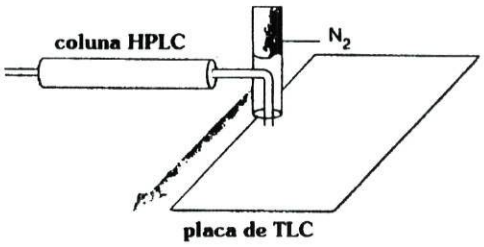


Figura 57. Esquema de HPTLC (adaptado de [155])

Está descrito um método de HPTLC como sendo de custo reduzido para "screening" de PAHs em amostras ambientais. Nesta aplicação, a separação dos PAHs é efectuada em placas de gele de sílica octadecilsilanizada e os compostos individuais são determinados por fluorescência [134].

Estão ainda descritos métodos de TLC e HPTLC para a separação e identificação de alguns derivados azotados de PAHs, em matéria particulada aérea e para a separação e quantificação de PAHs em água, com detecção por fluorescência [172].

3.5.4. OUTROS

Pelos muitos estudos encontrados na bibliografia, está demonstrado que a cromatografia é muito utilizada na análise de PAHs em amostras ambientais. Concomitantemente, os químicos analistas continuam a dedicar o seu esforço ao desenvolvimento de novos métodos analíticos que permitam quantificar PAHs em concentrações cada vez mais diminutas nas complexas matrizes ambientais.

Outros métodos cromatográficos são utilizados na quantificação de PAHs. Embora não tão utilizados como os anteriormente referidos, continuam a ser desenvolvidos devido, ou ao carácter promissor que apresentam, ou porque permitem resolver situações particulares na análise.

Apresenta-se, a seguir, a designação de alguns desses métodos aplicados a matrizes diversas (solos, matéria particulada aérea), à mistura dos 16 PAHs considerados poluentes prioritários pela EPA e outros, bem como as respectivas referências bibliográficas.

Método	**Referências bibliográficas**
Electroforese Capilar (EC)	[134], [173], [174], [175], [176], [177], [178]
Cromatografia Electrocinética Micelar (MEKC)	[179], [180], [181], [182], [183], [184]
SFE-CG	[23]
SFE-SFC	[23]
Cromatografia gasosa por troca de ligando (Ligand Exchange Gas Chromatography) – LEGC	[18]

Entendemos ainda que deveria ser aqui referenciado o método de quimioluminescência o qual, embora não sendo um método cromatográfico, surge também na literatura como um método de quantificação de PAHs em amostras ambientais [20].

PARTE IV – EXPERIMENTAL

PARTE IV - EXPERIMENTAL

1. OBJECTIVOS

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver uma metodologia para quantificação de seis PAHs (fluoranteno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno) em amostras de solos provenientes de zonas florestais sujeitas a incêndios. Como referimos (página 3), os PAHs são formados durante a combustão da matéria orgânica. Quando ocorre um fogo florestal, há combustão de matéria orgânica e, consequentemente, há formação de PAHs. Ocorrendo os fogos florestais com uma certa frequência durante o Verão, na zona objecto de estudo, considerámos de todo o interesse estudar o eventual contributo que esta ocorrência pode ter na problemática dos PAHs no ambiente.

O conjunto dos seis PAHs sobre que incidiu a análise (Figura 58 – página 100), apresenta um interesse particular por fazer parte da lista dos 16 PAHs considerados pela EPA americana como poluentes prioritários (constituindo o grupo recomendado para avaliação desta classe de compostos [185]) e da Lista de Substâncias Prioritárias do Acto de Protecção Ambiental do Canadá – CEPA – [76].

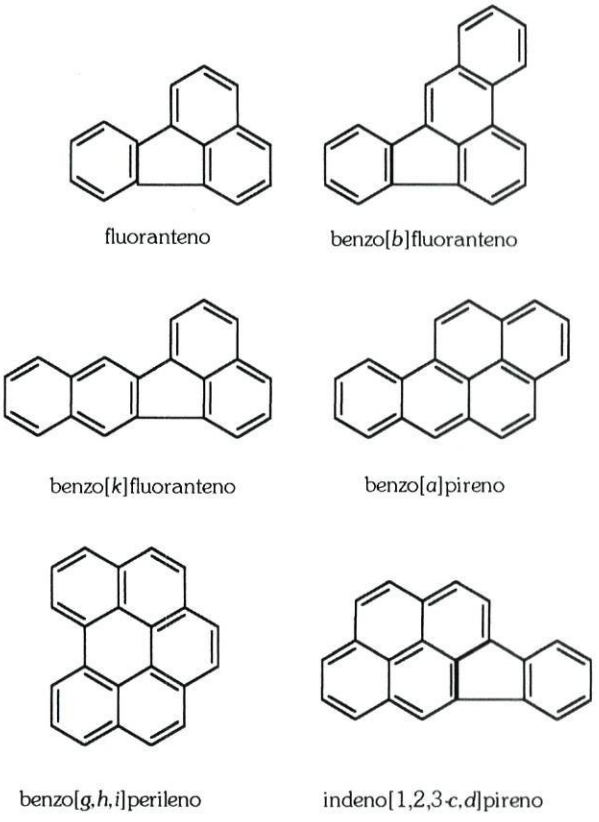


Figura 58. Seis PAHs em estudo

Além disso, os PAHs que nos propusemos estudar são objecto de legislação referente à contaminação de solos em países como o Canadá [186,187] e da legislação actualmente em vigor em Portugal, nomeadamente a Directiva 98/83/CE do Conselho de 3 de Novembro [188]. Esta Directiva, embora relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano, é de considerar devido ao facto da contaminação dos solos provocar, indirectamente, a contaminação das águas subterrâneas e dos lençóis freáticos.

Pretendemos comparar a eficiência de dois métodos de extracção de PAHs de solos – por Soxhlet e por fluido supercrítico – e efectuar a identificação e doseamento daqueles compostos recorrendo a HPLC com detecção por fluorescência. A escolha destes processos analíticos justifica-se pela sua adequação à análise de

PAHs, conforme demonstramos em capítulos anteriores (Parte III – ponto 3.2., página 70 e seguintes).

O estudo incidiu sobre solos provenientes do lugar do Corgo, freguesia de Medas, concelho de Gondomar, distrito do Porto onde se situam os locais que estiveram sujeitos a fogos florestais em Junho e Julho de 1999 (Figuras 60 e 61 – páginas 107 e 108, respectivamente).

Apresenta-se a seguir (Figura 59 – página 102) a estratégia usada no procedimento analítico em estudo.

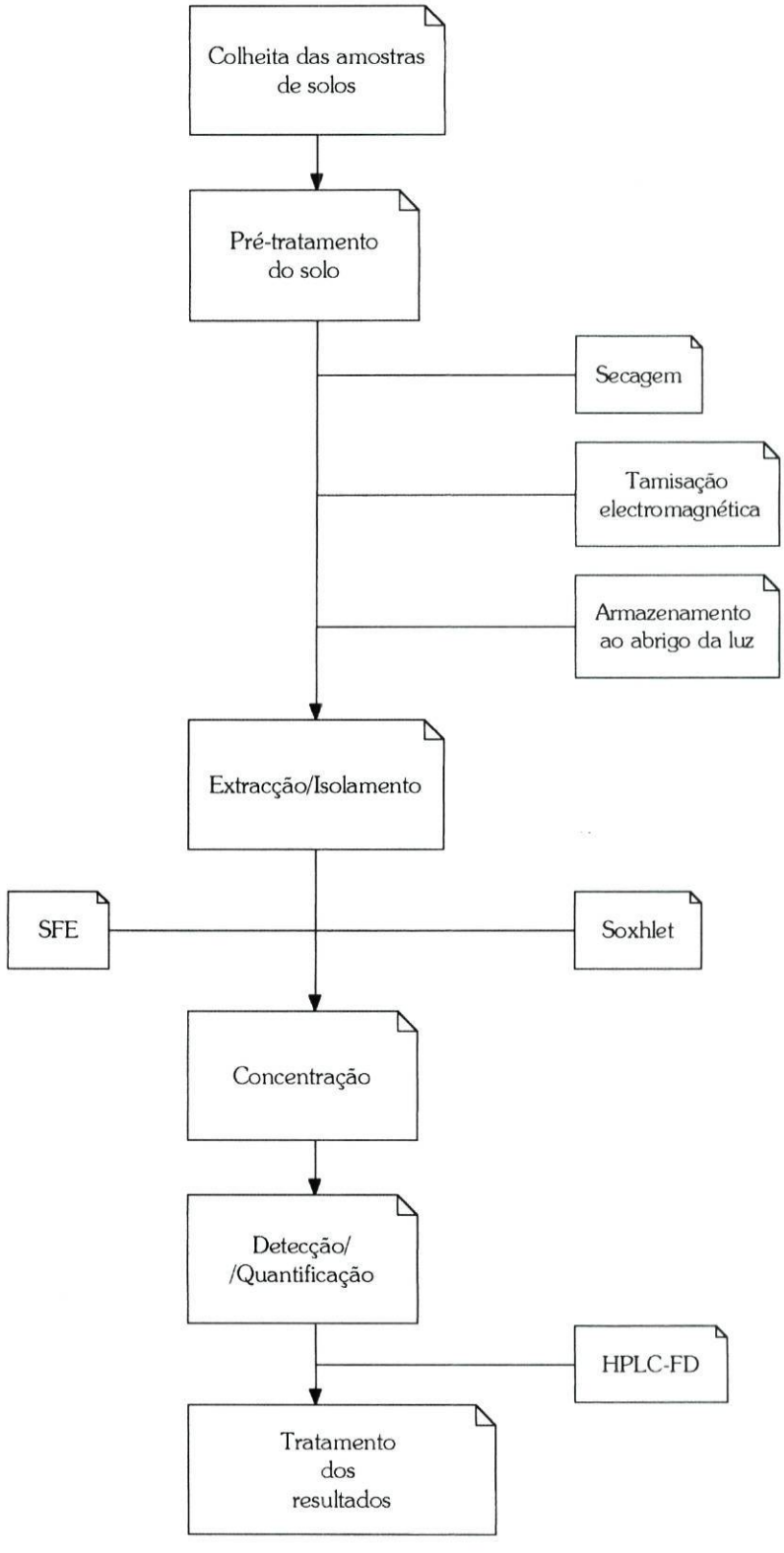


Figura 59. Estratégia usada no procedimento analítico em estudo

2. MATERIAL

O material de vidro utilizado em todos os procedimentos foi lavado com água da torneira e detergente Teepol®, tratado com mistura sulfocrómica durante 12 horas, passado por água com grau de pureza para HPLC e seco em estufa a 100 °C.

A manipulação dos padrões, dos solos e dos extractos foi efectuada na hotte usando luvas de latex.

3. REAGENTES E PADRÕES

- Metanol – Lichrosolv®, Merck®
- Acetonitrilo – E Chromasolv® para HPLC-UV, Riedel-de Haén
- Água (fase móvel) – G Chromasolv® para eluição em gradiente, Riedel-de Haén
- n-hexano e diclorometano – p. a., Merck®
- Padrões – Supelco®, à excepção de Fluoranteno e Benzo[*a*]pireno – Fluka®
- Óxido de alumínio 90 activo, neutro para cromatografia em coluna, Merck® (70-230 mesh ASTM)
- Gele de sílica 60, para cromatografia em coluna, Merck® (35-70 mesh ASTM)
- Sulfato de sódio anidro p. a., Merck®
- Dióxido de carbono industrial, Air Liquide
- As soluções padrão e problema foram conservadas a -20 °C e a 4 °C, respectivamente

4. INSTRUMENTAÇÃO

Para a tamisação das amostras de solos foi utilizado um tamisador electromagnético RP-03 da CISA.

Todas as determinações de massa foram realizadas em balança analítica Mettler® modelo AT201.

Para a extracção dos PAHs dos solos por fluido supercrítico foi utilizado um sistema de extracção SFX™ 220 constituído por um extractor SFX™ , um controlador SFX™ 200 e duas bombas 260D ISCO® (bombas de pistão, com capacidade de 260 mL), para a adição programada de modificador e fornecimento constante de fluido extractor. O sistema usado permite obter pressões máximas de 51,7 MPa e um fluxo de 90 $\mu L.min^{-1}$. O forno permite seleccionar temperaturas desde a ambiente até 150 °C e o restrictor desde 5 °C até 240 °C.

As câmaras de extracção usadas, em aço inoxidável e providas de filtros de 2 μm, foram as de capacidade de 2,5 mL. O fluxo foi controlado por um restrictor em aço inoxidável, aquecido e com 15 cm de comprimento.

Para a extracção dos PAHs dos solos por Soxhlet utilizou-se um conjunto de três extractores Soxhlet Quikfit® com a capacidade de 100 mL, munidos de refrigerantes em serpentina, e balões Schott® de 250 mL. Para o aquecimento foram utilizadas mantas de aquecimento Selecta® e, para evitar o fenómeno de sobreaquecimento, recorreu-se à utilização de pérolas de vidro com 4 mm de diâmetro.

A eliminação dos solventes foi efectuada em evaporador rotativo Büchi® modelo R-124.

As colunas cromatográficas de vidro Normax® usadas na purificação dos extractos tinham as dimensões 160 mm x 16 mm.

O desarejamento da fase móvel foi realizado em aparelho de ultra-sons Bandelin®, modelo Sonorex RK 100 H.

Para o doseamento do conjunto dos seis PAHs em estudo foi utilizado um cromatógrafo Waters® equipado com duas bombas modelo W 515, um injector manual de válvula rotatória hexagonal Rheodyne® modelo 7725i provido de "loop" de 20 μL e um detector de fluorescência Waters® 474 com uma lâmpada de xénon de 150 W. Para a injecção das amostras foi usada uma microsseringa Hamilton 702 NR de 25 μL.

Usou-se um pré-filtro Rheodyne® (0,5 μm x 3 mm), uma pré-coluna Supel-Guard™ LC-18 de 2 cm da Supelco® e uma coluna Supelcosil LC-PAH 5 μm (C_{18} de fase reversa) com 25 cm x 4,6 mm ID da Supelco®, termostatada a 30 °C em forno controlado por um módulo de controlo de temperatura Waters®. O tratamento de todos os dados foi efectuado pelo programa informático Waters Millenium[32], versão 3.05.01.

A secagem de todo o material de vidro foi efectuada em estufa Ehrex®, modelo TK 4067, a 100 °C.

5. AMOSTRAGEM

5.1. AMOSTRAS

As amostras de solos foram recolhidas no dia 28 de Julho de 1999 no lugar do Corgo, freguesia de Medas, concelho de Gondomar (Figura 60 e Figura 61 - -página 108), distrito do Porto entre as 18.00 e as 20.00 horas, a uma temperatura ambiente de cerca de 26 °C. Nesta zona ocorreram incêndios entre o dia 07 de Junho e 19 de Julho de 1999, num total de 31 ha de área ardida.

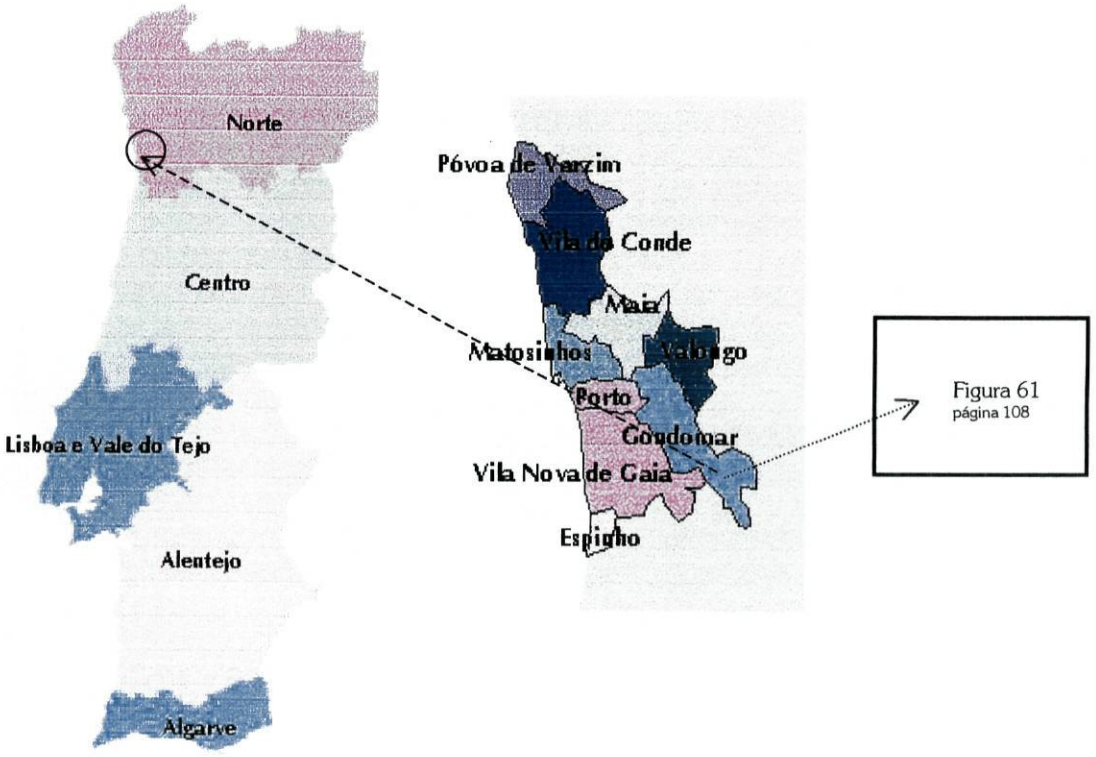


Figura 60. Localização da zona de colheita das amostras

Recolheram-se três amostras de solos (adiante designadas de solo 1, solo 2 e solo 3) em áreas onde ocorreram incêndios e uma amostra de um solo de uma zona não sujeita a incêndio florestal (solo 4), envolvente da anterior e situada a uma cota superior. As amostras dos solos 1 e 2 foram colhidas no centro da área queimada e a amostra de solo 3 na zona periférica.

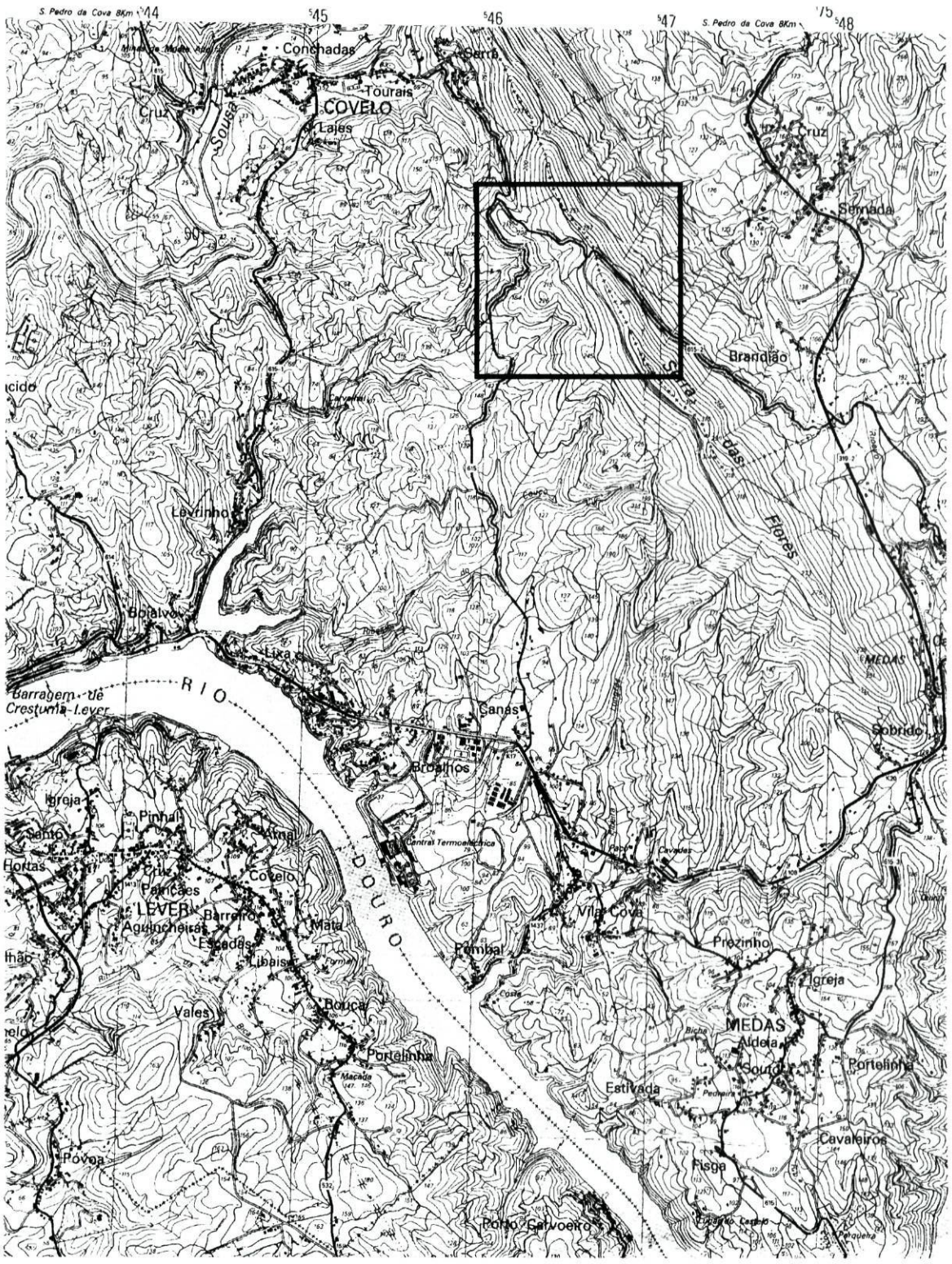


Figura 61. Planta de localização (escala 1: 25000) da freguesia de Medas na Área Metropolitana do Porto [189].

Envolvência dos locais de colheita das amostras.

5.2. COLHEITA

Recolheram-se amostras até 15-20 cm de profundidade com instrumentos não passíveis de as contaminar. As amostras foram recolhidas para folhas de alumínio (Figura 62) e transportadas em recipientes com acumuladores de frio (4 °C), para minimizar a possibilidade de volatilização e alterações físico-químicas como, por exemplo, a degradação dos compostos em estudo por exposição à luz ou ao calor [190].

Figura 62. Colheita das amostras para folhas de alumínio

5.3. CONSERVAÇÃO, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras foram conservadas a – 20 °C até ao momento da secagem.

Para a secagem, os solos foram colocados em estufa a uma temperatura entre 25 e 30 °C, até massa constante.

Removeram-se todas as pedras e outros materiais estranhos (agregados e vegetação) e dividiram-se finamente as amostras por tamisação electromagnética.

As amostras, em pó fino (diâmetro de partícula: 300 μm), foram colocadas em frascos de vidro âmbar borossilicatado, previamente tratados com mistura sulfocrómica, e hermeticamente fechados. As amostras assim preparadas foram, finalmente, armazenadas à temperatura ambiente, em local ao abrigo da luz.

Durante a colheita, transporte e preparação das amostras foram tomadas todas as medidas para reduzir ao mínimo a influência de contaminações que pudessem vir a interferir na detecção final.

6. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

6.1. EXTRACÇÃO

6.1.1. EXTRACÇÃO POR SOXHLET

Foram extraídas 15 g de cada amostra de solo durante 18 horas com 100 mL de uma mistura de DCM/n-hexano na proporção de 3:1, com ciclos de solvente de aproximadamente 15 minutos.

Foram ensaiadas outras proporções da mistura de solventes (n--hexano/DCM 3:1; n-hexano/DCM 1:1) e também cada solvente isoladamente mas conseguiram-se os melhores resultados com a mistura DCM/n-hexano 3:1.

Foram ainda ensaiados volumes da mistura de solventes extractores superiores e inferiores a 100 mL, mas verificámos ser este o melhor volume já que volumes inferiores (60 e 80 mL) não garantiam uma extracção completa e volumes superiores (130 mL) correspondiam a um gasto de solvente desnecessário, com os consequentes prejuízos económicos e ambientais.

Quanto ao tempo de extracção, verificámos que tempos inferiores a 18 horas (6, 12 e 16 horas) não garantiam extracções completas e tempos superiores (24 horas) eram desnecessários.

Cada amostra de solo foi extraída por quatro vezes.

6.1.1.1. PURIFICAÇÃO DOS EXTRACTOS

Os extractos brutos foram purificados numa coluna cromatográfica preparada com 1 g de gele de sílica, 1 g de alumina neutra e 1 cm de altura de sulfato de sódio anidro (este destinou-se a fixar a água eventualmente presente) [191,192,193,194]. Acondicionou-se a coluna com 3 x 1 mL da mistura DCM/n-hexano 3:1, aplicou-se o extracto a purificar e eluiu-se a fracção correspondente aos PAHs com 3 x 10 mL de DCM/n-hexano 3:1. Os extractos assim obtidos foram reduzidos, sob condições controladas, em evaporador rotativo quase até à secura e mantidos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até evaporação completa.

O resíduo assim obtido foi recuperado com 500 µL de acetonitrilo com agitação em "vortex" e guardado em pequenos frascos de vidro âmbar a 4 °C, em câmara frigorífica, até ao momento da injecção em HPLC.

6.1.2. EXTRACÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Foi utilizada uma câmara de extracção de 2,5 mL. Utilizaram-se, de cada solo, as massas necessárias para preencher totalmente a capacidade da câmara de extracção (Quadro X).

Quadro X – Massas de cada solo utilizadas em SFE

Solo	Massa
1	1,40 g
2	2,00 g
3	2,00 g
4	2,00 g

Procedeu-se deste modo para minimizar os efeitos do volume vazio do sistema, responsável por uma menor velocidade do fluido de extracção [195,196]; pela mesma razão, a câmara de extracção no modelo SFE utilizado, é colocada na posição vertical e o fluido supercrítico circula, ao longo da amostra, de cima para baixo [196].

Como fluido supercrítico foi utilizado o dióxido de carbono com 15 % de modificador [197]. Este, constituído por uma mistura de metanol/DCM na proporção 5:1 [197], foi continuamente misturado com o dióxido de carbono de tal modo que ao chegar à câmara de extracção já se encontrava no estado supercrítico [126]. Assim, como fluido extractor, foi utilizada uma fase ternária: CO_2/CH_3OH/DCM.

As extracções foram efectuadas em modo dinâmico bombeando volumes de CO_2 mantido à pressão de 45 000 KPa e à temperatura de 100 °C.

Os valores seleccionados para a pressão, fluido extractor e solvente colector foram os utilizados por Gonçalves e Alpendurada [197] num estudo aplicado a amostras de solo não contaminadas e fortificadas.

Foram ensaiadas diversas condições fazendo variar alguns dos parâmetros fundamentais para a extracção. Assim, ensaiaram-se tempos de extracção de 13, 15, 20, 30 e 40 minutos mantendo a temperatura do forno a 95 °C e 100 °C e utilizando temperaturas do restrictor de 90 °C, 95 °C, 120 °C, 135 °C e 150 °C.

O Quadro XI resume os diferentes parâmetros e condições ensaiadas.

Quadro XI – Parâmetros e condições ensaiadas em SFE

Tempos de extracção	13, 15, 20, 30 e 40 minutos
Temperatura do forno	95 e 100 °C
Temperatura do restrictor	90, 95, 120, 135 e 150 °C

Após este estudo, as condições seleccionadas para a extracção foram as indicadas no Quadro XII.

Quadro XII – Condições de extracção SFE finais

Fluido extractor	75 % CO_2 + 15 % CH_3OH/DCM (5:1)
Fluxo do fluido extractor	1,5-1,6 mL.min^{-1}
Pressão de extracção	45 000 KPa
Temperatura do forno	100 °C
Volume da câmara de extracção	2,5 mL
Fluxo do restrictor	1 mL.min^{-1}
Tempo de extracção	30 minutos
Solvente colector	CH_3OH (9 mL)
Temperatura do restrictor	120 °C (solos 1 e 3) 135 °C (solos 2 e 4)

Após a extracção, o fluido supercrítico passou por um restrictor em aço inoxidável aquecido e com 15 cm de comprimento onde foi despressurizado.

A temperatura do restrictor foi de 120 °C para os solos 1 e 3. Para os solos 2 e 4, foi necessário recorrer a uma temperatura mais elevada, 135 °C, para evitar a obstrução do restrictor.

Cada amostra de solo foi extraída por quatro vezes nas condições apresentadas no Quadro XII (página 114). Em cada extracção utilizou-se um volume de 9 mL de metanol. Combinaram-se os quatro extractos de 9 mL e evaporou-se o metanol em evaporador rotativo. Recuperou-se o resíduo assim obtido com 500 μL de acetonitrilo com agitação em "vortex", tendo-se de seguida procedido da forma já referida para a extracção por Soxhlet.

Tendo por base a bibliografia [71,76] e conforme pudemos verificar posteriormente, não foi necessária qualquer purificação adicional dos extractos obtidos, os quais foram injectados directamente em HPLC.

Todas as extracções foram realizadas em quadruplicado sempre nas condições apresentadas no Quadro XII (página 114).

7. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

7.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Vinte microlitros de extracto de cada uma das amostras foram injectados no sistema cromatográfico Waters®. A eluição foi realizada com um fluxo de 1,5 $ml.min^{-1}$, usando como fase móvel acetonitrilo e água com o gradiente representado no Quadro XIII e Figura 63 [198]:

Quadro XIII – Fase móvel e gradiente utilizados

Tempo (minutos)	% Acetonitrilo	% Água
0	90,0	10,0
5	90,0	10,0
10	100,0	0,0
15	100,0	0,0
16	90,0	10,0

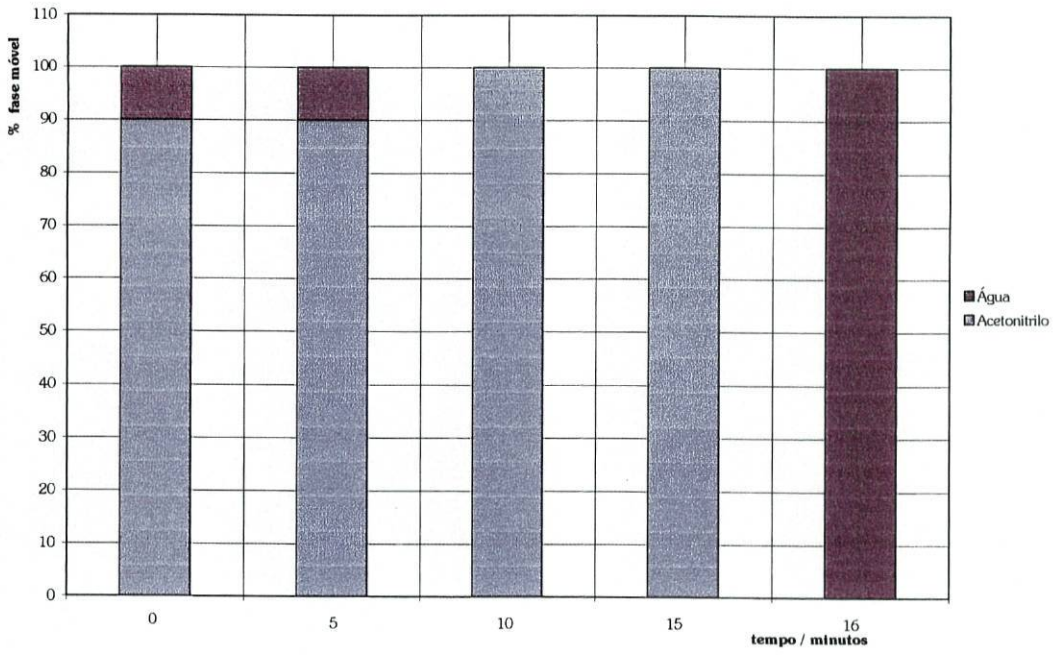


Figura 63. Fase móvel e respectivo gradiente

A detecção foi efectuada com um detector de fluorescência. As vantagens da detecção por fluorescência foram já descritas na Parte III (ponto 3.2. – páginas 76 e 77).

Os cromatogramas foram registados com a programação de comprimentos de onda que permitiu obter uma boa selectividade e o máximo de sensibilidade do detector (Quadro XIV) [198]:

Quadro XIV – Programação de comprimentos de onda utilizada

Tempo (minutos)	$\lambda_{exc.}$ **(nm)**	$\lambda_{em.}$ **(nm)**
0	288	462
6	302	450
9,3	308	428
10,4	365	428
13,0	300	460

7.2. IDENTIFICAÇÃO

Os seis PAHs foram identificados com recurso a padrões e com base nos dados de tempos de retenção apresentados no Quadro XV [198].

Quadro XV – Tempos de retenção dos padrões de PAHs utilizados

PAHs	Tempos de retenção (minutos)
Fluoranteno	3,9
Benzo[*b*]fluoranteno	8,4
Benzo[*k*]fluoranteno	9,8
Benzo[*a*]pireno	11,3
Benzo[*g,h,i*]perileno	14,4
Indeno[1,2,3-*cd*]pireno	15,1

7.3. QUANTIFICAÇÃO

A quantificação dos seis PAHs nas amostras em estudo foi efectuada pelo método do padrão externo, tendo-se utilizado as áreas dos picos correspondentes no cromatograma e a curva de calibração obtida previamente (Figura 81 – página 164).

Todos os seis PAHs foram quantificados nos extractos obtidos por Soxhlet e nos extractos obtidos por fluido supercrítico (injecções em duplicado para cada extracto) com o objectivo de determinar qual o método de extracção que apresenta maior eficiência para o conjunto dos seis compostos orgânicos.

As Figuras 64 (página 120) e 65 (página 121) resumem todos os procedimentos adoptados para cada solo desde a extração, por Soxhlet e por SFE, respectivamente, até à quantificação.

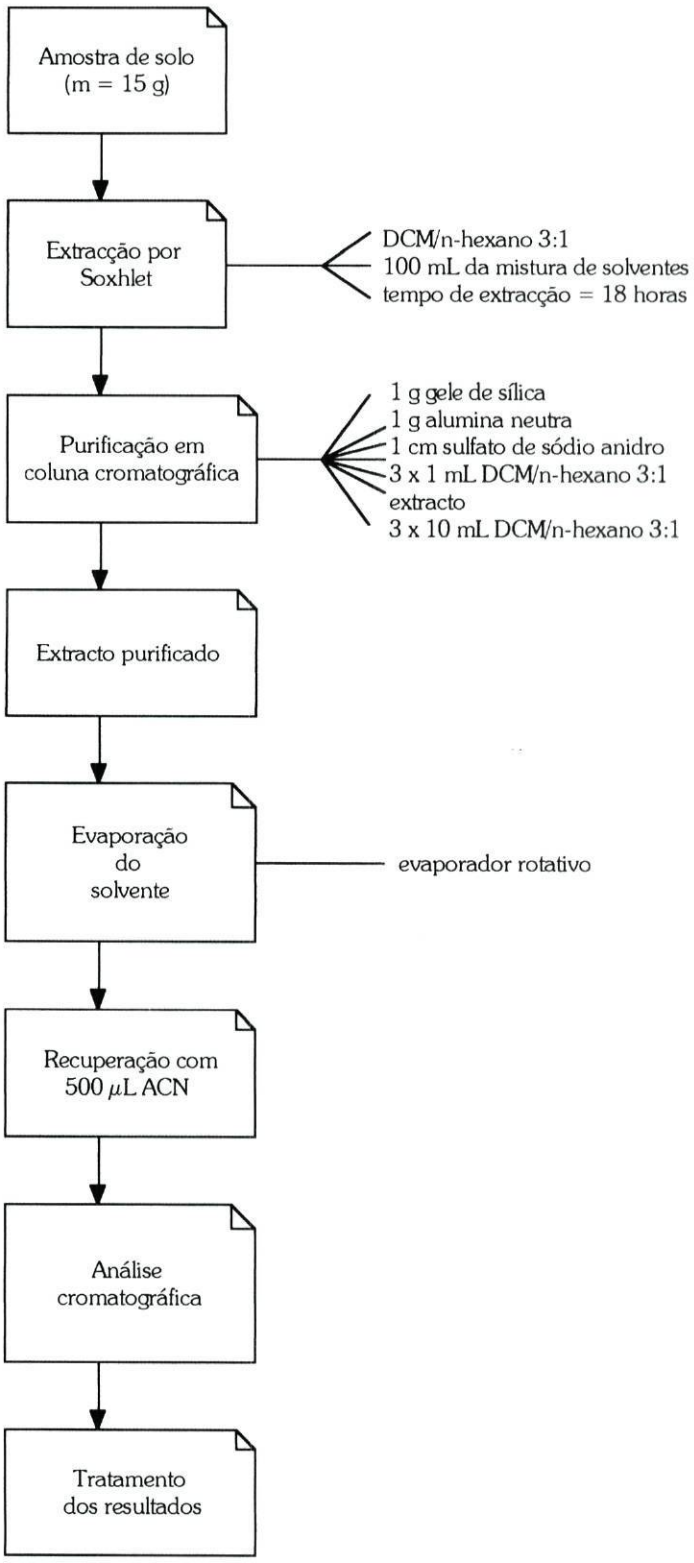


Figura 64. Procedimento analítico a que cada amostra de solo foi sujeita (extracção por Soxhlet)

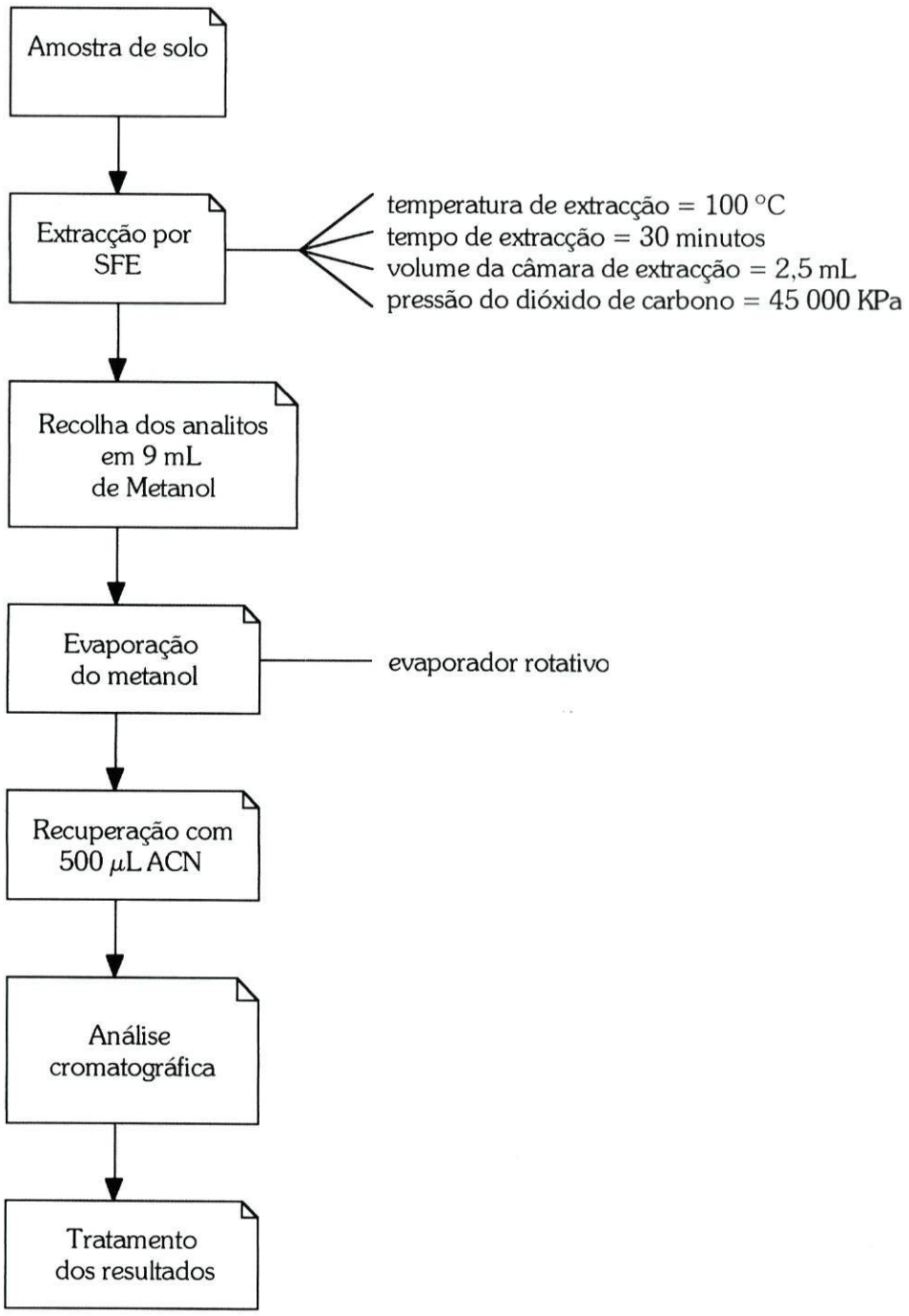


Figura 65. Procedimento analítico a que cada amostra de solo foi sujeita (extracção por SFE)

8. VALIDAÇÃO

Como não existem normas oficiais sobre a sequência dos passos/parâmetros de validação [199] e após revisão bibliográfica, optámos por determinar alguns dos parâmetros habitualmente utilizados para esse fim (parâmetros incluídos nas directrizes da Conferência Internacional de Harmonização (ICH)) [199]:

i) precisão

i.a) repetibilidade

ii) exactidão

iii) linearidade

iv) limite de detecção

v) limite de quantificação

8.1. PRECISÃO

8.1.1. REPETIBILIDADE DA TÉCNICA ANALÍTICA

O estudo da repetibilidade da técnica analítica em relação aos tempos de retenção e às áreas dos picos cromatográficos foi efectuado com base em sete ensaios com soluções padrão de cada PAH na concentração 10,0 $\mu g.L^{-1}$ e num mesmo dia, tendo-se calculado a média e o RSD % dos resultados (Tabela 4 – página 157).

O estudo da repetibilidade da técnica analítica, em relação aos tempos de retenção e às áreas dos picos cromatográficos foi também efectuado, com base em 21 ensaios (7 ensaios em cada um de 3 dias consecutivos) do padrão de concentração 10,0 $\mu g.L^{-1}$ de cada PAH, tendo-se calculado a média e o RSD % dos resultados (Tabela 5 – página 158).

8.1.2. REPETIBILIDADE DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GLOBAL

Para o estudo da repetibilidade do procedimento experimental global, recorreu-se ao solo 3. Este solo foi extraído por Soxhlet e por SFE por cinco vezes e efectuou-se a análise cromatográfica de três extracções seguidas de cada um dos extractos obtidos, tendo-se calculado a média e o RSD % dos resultados (Tabela 6- – página 159).

8.2. EXACTIDÃO

A exactidão foi determinada de acordo com:

$$\frac{[SFE]}{[Soxhlet]} \times 100$$

[SFE] e [Soxhlet] representam as concentrações de cada PAH na amostra usando a extracção SFE e Soxhlet, respectivamente [190].

8.3. LINEARIDADE

O estudo da linearidade foi realizado recorrendo ao método da curva de calibração. Para tal, prepararam-se soluções de cada PAH em acetonitrilo e, a partir destas, uma solução com a mistura dos seis PAHs [198]. A partir desta e por diluições apropriadas também com acetonitrilo, prepararam-se soluções padrão com as concentrações 0,10 $\mu g.L^{-1}$, 0,50 $\mu g.L^{-1}$, 1,0 $\mu g.L^{-1}$, 5,0 $\mu g.L^{-1}$, 10,0 $\mu g.L^{-1}$ e 50,0 $\mu g.L^{-1}$ dos seis PAHs.

A curva de calibração (Figura 81 – página 164) foi obtida a partir de determinações em triplicado de cada nível de concentração, tendo sido calculados os valores médios das áreas dos picos.

8.4. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

Foi efectuada a injecção sucessiva de dez brancos (acetonitrilo) e o limite de detecção da técnica para cada PAH foi determinado com base no valor do desvio padrão (SD) das áreas obtidas para cada PAH e no declive da curva de calibração (S) de acordo com:

LD = 3,3 (SD/S) [76,200].

8.5. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação foi calculado com base no desvio padrão (SD) das áreas obtidas com dez leituras de branco e no declive da curva de calibração (S), de acordo com:

$LQ = 10(SD/S)$ [76,201].

PARTE V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. INTRODUÇÃO

Todas as superfícies dos solos têm PAHs em quantidades quantificáveis pelas técnicas analíticas actuais. Os PAHs chegam aos solos através do transporte destes compostos na atmosfera e subsequentes processos de deposição. A determinação das concentrações de PAHs nos solos tem vindo a ser efectuada desde os anos 70. Em 1989, Jones *et al.* e em 1992, Menzie *et al.* [202] demonstraram que as concentrações de PAHs em solos florestais se situavam entre 5-100 $\mu g.Kg^{-1}$ e que resultavam quer de fontes naturais, quer de fontes antropogénicas [202]. O estudo dos PAHs nos solos pela complexidade e outros factores que já referimos (página 24 e seguintes), representa um desafio no que diz respeito à sua extracção e determinação quantitativa.

No trabalho efectuado pretendeu-se desenvolver uma metodologia para quantificação dos PAHs fluoranteno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*a*]pireno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno (Figura 58 – página 100) em amostras de solos provenientes de zonas florestais sujeitas a incêndios. Sendo os PAHs formados durante a combustão da matéria orgânica, quando ocorre um fogo florestal, há formação de PAHs. Ocorrendo os fogos florestais com uma certa frequência durante o Verão, na zona objecto de estudo, considerámos de todo o interesse estudar o eventual contributo que esta ocorrência pode ter na problemática dos PAHs no ambiente.

2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A água é encontrada em quase todos os solos devido à humidade natural [129] podendo atingir em alguns casos 50 %. A água pode actuar como um modificador tendo uma forte influência na extracção [203]. Por um lado, os solventes utilizados na extracção não se misturam facilmente com os solos que contêm uma quantidade apreciável de água [156] e, por outro, a água permite o desenvolvimento de bolores e outros fungos [204]. Consequentemente, para evitar estes efeitos nefastos na extracção, as amostras de solos foram secas tendo-se optado por uma temperatura de secagem que minimizasse as perdas dos analitos mais voláteis (25-30 °C).

A remoção de pedras e outros materiais estranhos proporcionou aos meios extractores uma grande superfície de contacto por unidade de massa, permitindo uma extracção mais rápida e eficiente [64,70]. Este procedimento garantiu ainda que as várias alíquotas utilizadas fossem representativas da amostra [190].

3. EXTRACÇÃO POR SOXHLET

Na extracção por Soxhlet, e depois de terem sido experimentadas várias outras misturas e proporções, foi utilizada uma mistura de DCM/n-hexano (3:1). O DCM tem a capacidade de penetrar nas partículas do solo e solubilizar os PAHs, mesmo os de maior massa molecular [75]. Para solos pouco poluídos em que os PAHs estão presentes na superfície das partículas ou para solos argilosos, a bibliografia refere a utilização de solventes mais polares como o DCM para provocar a ruptura dos agregados do solo e permitir um contacto intenso com as partículas. Para solos mais poluídos recorre-se, habitualmente, a solventes menos polares [71] como o n-hexano. Como no nosso estudo analisamos amostras reais sem termos uma ideia precisa sobre o teor de PAHs neste tipo de solos, entendemos utilizar uma mistura de um solvente polar e outro menos polar, tendo-se verificado que a mistura DCM/n-hexano (3:1) foi a que permitiu obter os melhores resultados, no que respeita aos compostos objecto deste estudo. Além disso, estes dois solventes revelaram-se bons extractores de PAHs em outros estudos [205].

O processo de extracção por Soxhlet de matrizes ambientais complexas origina a coextracção de uma grande quantidade de substâncias (lípidos, enxofre, pigmentos), tornando indispensável a purificação do extracto obtido antes da análise cromatográfica [76,190]. A metodologia adoptada para efectuar esta purificação vem referida inúmeras vezes na bibliografia para este mesmo objectivo [191,192,193,194].

4. EXTRACÇÃO POR FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Optou-se por uma temperatura de extracção relativamente elevada (100 °C) uma vez que esta permite uma melhor recuperação de todos os PAHs, sobretudo os de massa molecular mais elevada [71]. Temperaturas inferiores têm demonstrado ser insuficientes para competir com os locais activos da matriz e, na maioria dos estudos publicados, também não se usam temperaturas superiores a 100 °C porque, aumentando a temperatura, diminui a densidade do CO_2 (não variando a pressão), o que leva, consequentemente, a uma menor solubilidade dos compostos orgânicos [114].

Os PAHs de menor massa molecular podem ser extraídos com CO_2 puro [110]. Compostos com massas moleculares mais elevadas como o fluoranteno (M_r = 202), o benzo[*a*]pireno (M_r = 252) ou o benzo[*g,h,i*]perileno (M_r = 276), só podem ser extraídos eficientemente usando modificadores juntamente com o CO_2 [110]. No nosso caso, optámos por uma elevada concentração de metanol (15 %) para permitir a extracção dos compostos mais polares [110] (o metanol é compatível com os analitos de interesse e apresenta elevada solubilidade para os PAHs [125,203]).

Os restrictores são um elemento crítico em SFE porque a descompressão é aí que ocorre e o fluido extractor muda de supercrítico para gás [203]. Como o restrictor está mergulhado no solvente colector é aqui que o fluido descomprimido borbulha, havendo que considerar a violência deste borbulhar a qual pode levar à perda de PAHs [125].

A tarefa do restrictor é manter a pressão escolhida dentro da câmara de extracção e, se possível, permitir o ajuste do fluxo do fluido supercrítico [54]. Na zona do restrictor, a temperatura é, geralmente, aumentada de um modo significativo [206]. À medida que o fluido supercrítico sai do restrictor e as condições deixam de ser supercríticas, a pressão baixa num curto período de tempo e numa curta distância o que é acompanhado de uma rápida expansão e arrefecimento do fluido. Este facto, denominado de arrefecimento Joule-Thomson, traz como consequência a perda do poder de solvatação e obriga a que o arrefecimento tenha de ser compensado aquecendo a zona do restrictor para evitar a sua obstrução e a recolha demasiado rápida e incompleta dos analitos [125,203,206]. Contudo, temperaturas elevadas do restrictor podem originar evaporação do solvente colector dos analitos e perda dos compostos voláteis. Há também que ter em atenção a temperatura mínima que se deve aplicar ao restrictor para evitar a formação de gelo seco devido ao autoarrefecimento do CO_2 em expansão [203]. Assim, a temperatura do restrictor deve ser o mais elevada possível de modo a evitar a sua obstrução mas o mais baixa possível para minimizar a perda de analitos voláteis [203]. Neste trabalho, tal foi conseguido com 120 °C para as amostras dos solos 1 e 3 e 135 °C para as amostras dos solos 2 e 4.

As perdas que ocorrem com a recolha num solvente líquido devem-se às seguintes razões: i) as moléculas do analito não são retidas pelo solvente ou ii) as moléculas retidas são removidas do solvente colector pelo elevado fluxo gasoso do fluido extractor aquando da sua despressurização [195]. No entanto, estudos demonstram que a maior parte das perdas devem ser atribuídas a uma distribuição

ineficiente dos analitos no solvente colector em vez de às duas razões atrás referidas [195].

Uma boa eficiência na recolha dos analitos depende, portanto, de uma distribuição eficiente do analito no solvente colector. As propriedades do solvente – polaridade e temperatura – são mais importantes do que o volume de solvente para obter uma perda mínima de analito [103]. Mas a temperatura e o volume do solvente colector influenciam também a retenção dos analitos extraídos [103]. O DCM ou o acetonitrilo podiam ter sido escolhidos como solventes colectores em alternativa ao metanol devido às suas elevadas capacidades de solubilidade mas, as condições técnicas em que decorreu o estudo, o valor do ponto de ebulição do DCM (39,8 °C) e a perigosidade/toxicidade do acetonitrilo [75], fizeram com que a nossa opção recaísse sobre o metanol (ponto de ebulição de 64,7 °C). Este apresenta também uma grande capacidade de solubilização dos PAHs em estudo, não reage com aqueles e é relativamente menos tóxico que o acetonitrilo [125,203].

Por razões técnicas, não foi possível obter resultados por SFE, de confiança, para os solos 2 e 4. As condições de operação afinadas para a extracção dos PAHs em estudo, nomeadamente a temperatura do restrictor, não se adequaram à textura dos solos 2 e 4. Nas condições referidas no Quadro XII (página 114), o restrictor era obstruído pelos produtos extraídos na câmara de extracção. Este facto obrigou-nos a recorrer, sem qualquer sucesso, a várias estratégias para resolução do problema. A única forma de o extracto passar livremente no restrictor fazia recurso a uma temperatura demasiado elevada (135 °C), a qual não permitiu a recolha quantitativa dos PAHs à saída do restrictor.

Assim, os resultados obtidos não se devem a uma falta de eficiência de extracção do método SFE, mas antes à temperatura a que foi necessário colocar o restrictor, que poderá ter contribuído para perdas por volatilização, bem como ao "design" do recipiente colector. Uma forma de tentar minorar as perdas por volatilização seria termostatizar o solvente colector a 20 °C, facto que exigiria alterações na estrutura do equipamento para além do nosso alcance.

5. SOXHLET *versus* SFE

Embora se continue a dar preferência ao Soxhlet para a extracção dos PAHs de solos, este método apresenta alguns inconvenientes. De facto, apesar de eficiente, requer usualmente tempos de extracção longos, exige, na óptica actual, volumes consideráveis de solventes e requer, habitualmente, a purificação do extracto para análise [83,205]. De facto, com a crescente preocupação sobre as implicações na saúde associadas com o uso de solventes, a redução do seu uso é agora uma questão muito importante em análise ambiental, pois contribuirá para reduzir o custo envolvido no seu armazenamento com segurança e na sua eliminação [83].

Por estas e outras razões – necessidade de reduzir os gastos com solventes e executar a preparação da amostra de uma forma mais rápida, por exemplo –, o interesse em fluidos supercríticos, como substitutos dos solventes convencionais para a extracção de PAHs de amostras ambientais, tem aumentado [195].

O método de SFE desenvolvido permite a determinação de PAHs em matrizes extremamente complexas como as amostras de solos analisadas, sendo o tempo gasto no processo analítico adequado. No entanto, poderá ainda, eventualmente, realizar-se a optimização das condições de extracção estabelecidas, bem como desenvolver um sistema de recolha dos analitos mais eficiente. Estas e outras estratégias (desenvolvimento de câmaras de extracção de maior capacidade – 10 – - 500 g – e volume – 10-140 mL) parecem estar a ser seguidas pelos técnicos e cientistas que trabalham com esta técnica extractiva [205]. Estes desenvolvimentos técnicos permitem, por outro lado, extrair quantidades superiores de amostra, o

que reflecte uma preocupação em obter extractos cada vez mais representativos de amostras complexas e heterogéneas como são os solos [104].

6. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A análise foi desenvolvida por HPLC com detecção por fluorescência. Os seis PAHs presentes nas amostras em estudo foram identificados por comparação dos tempos de retenção com padrões. A quantificação, pelo método do padrão externo, foi efectuada tendo em conta as áreas dos picos cromatográficos e a curva de calibração obtida.

Apresentam-se a seguir:

- um cromatograma de uma solução padrão dos seis PAHs em estudo (Figura 66):

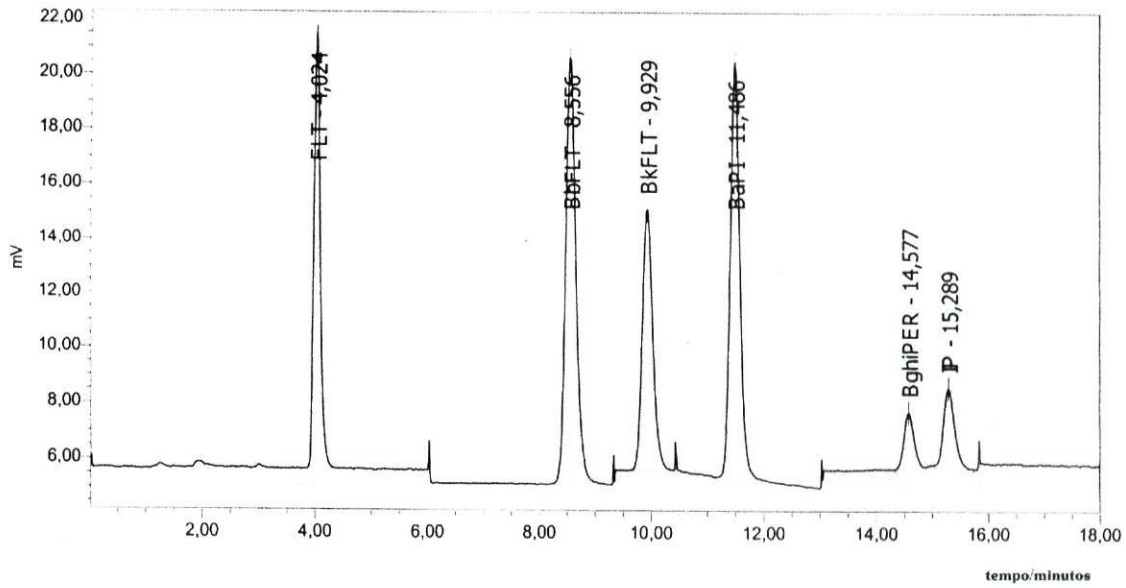


Figura 66. Cromatograma obtido para a solução padrão 10,0 $\mu g.L^{-1}$

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

- um cromatograma resultante da extracção por Soxhlet (solo 2) (Figura 67):

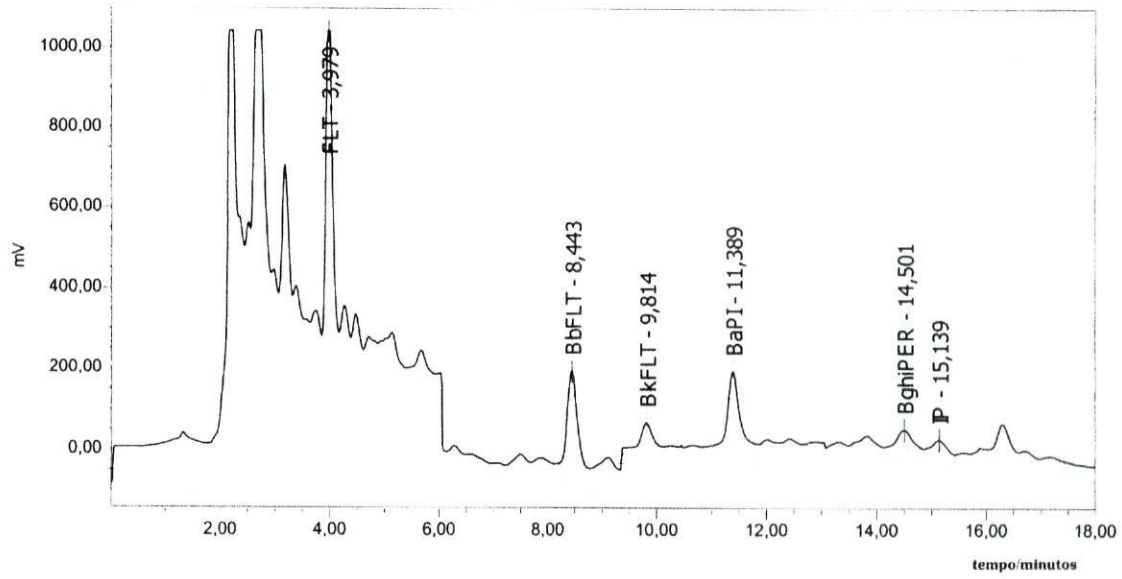


Figura 67. Cromatograma obtido para o solo 2 após extracção por Soxhlet (extracto purificado por cromatografia de adsorção em coluna)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

- um cromatograma resultante da extracção por SFE (solo 1) (Figura 68):

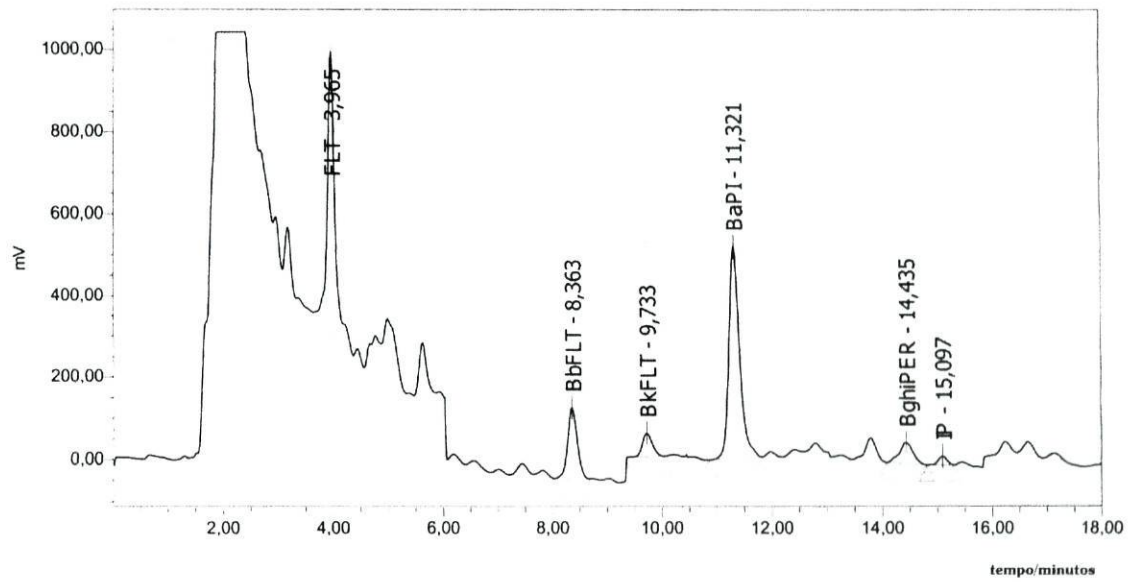


Figura 68. Cromatograma obtido para o solo 1 após extracção por SFE

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Os resultados da quantificação dos seis PAHs em estudo para os quatro solos em análise e resultantes da extracção por Soxhlet apresentam-se na Tabela 1 e nas Figuras 69 e 70 (página 141), 71 e 72 (página 142).

Tabela 1. Composição das amostras nos seis PAHs em estudo ($\mu g.Kg^{-1}$) após extracção por Soxhlet (n = 8)

	Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$)							
	Amostra de solo							
	1		2		3		4	
	Média	RSD %	Média	RSD %	Média	RSD %	Média	RSD %
FLT	15,540	18,4	14496	11,0	16,787	13,5	3,605	11,0
BbFLT	4,564	8,9	4,124	8,8	3,808	8,5	0,422	14,0
BkFLT	1,031	15,9	1,628	11,4	0,472	19,2	0,166	14,8
BaPI	2,256	13,3	4,348	2,0	2,796	13,4	0,251	16,2
BghiPER	6,733	16,3	9,536	10,1	12,660	9,5	0,974	14,5
IP	4,117	19,5	4,417	12,2	8,508	8,7	0,281	12,3
Σ	34,242	---	38,549	---	45,031	---	5,700	---

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno; Σ - teor total dos seis PAHs

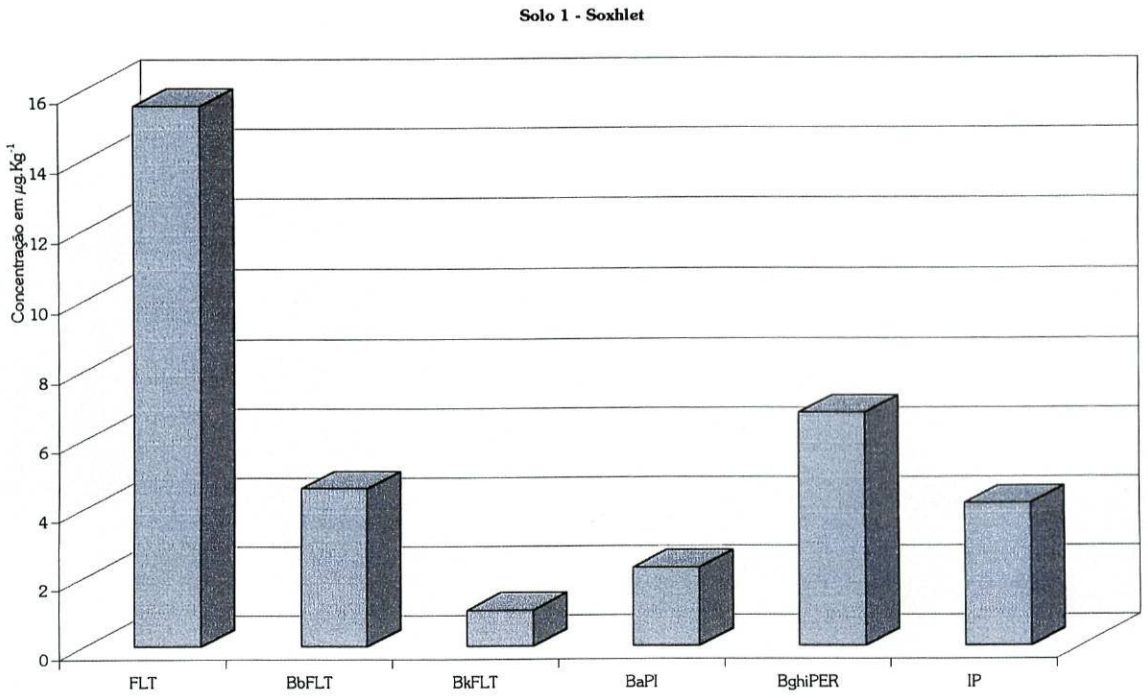


Figura 69. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 1** (extracção por Soxhlet)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPl – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

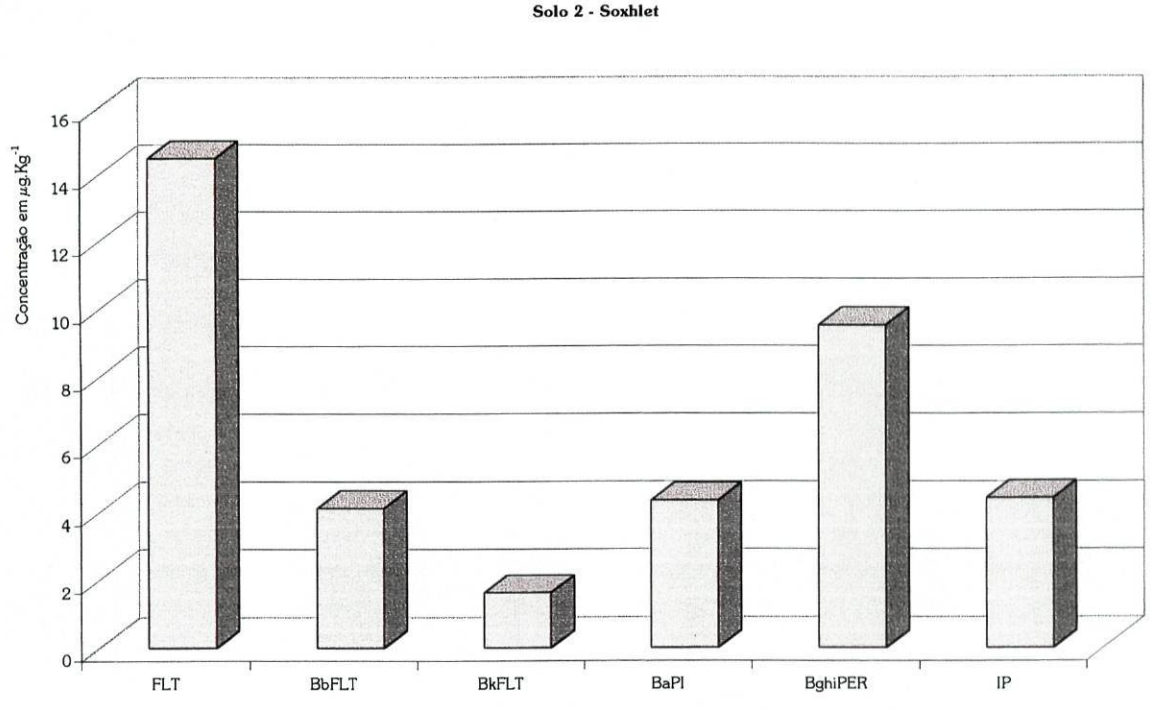


Figura 70. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 2** (extracção por Soxhlet)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPl – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

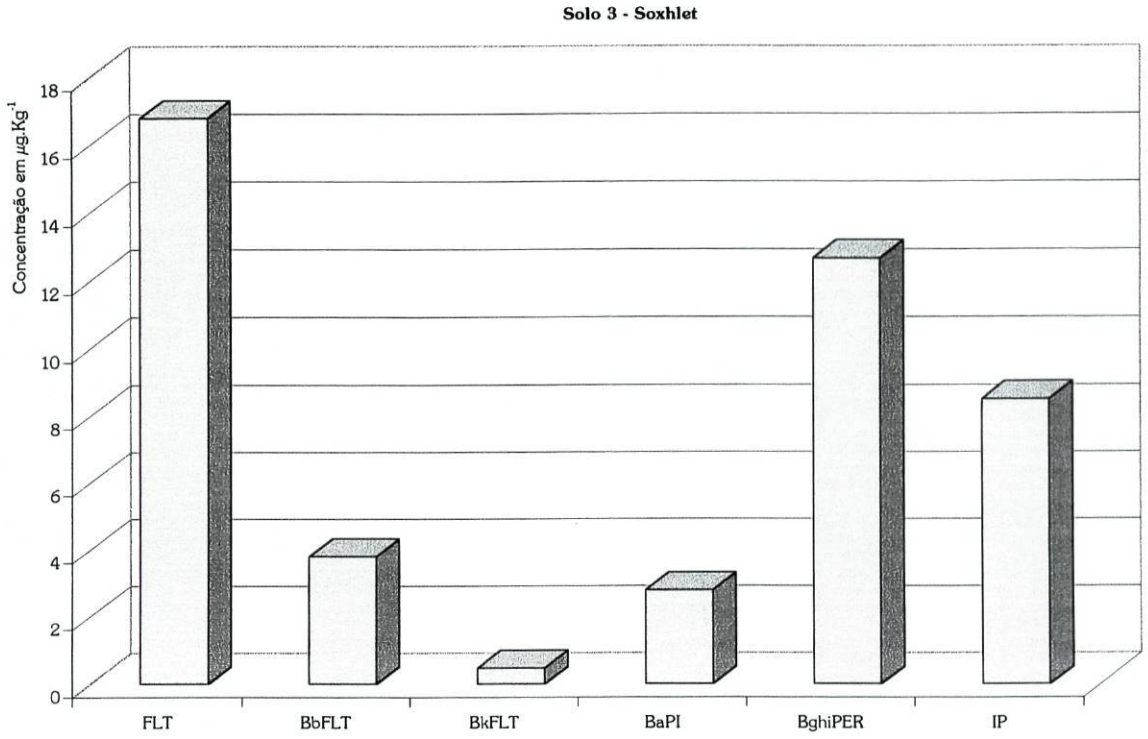


Figura 71. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 3** (extracção por Soxhlet)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

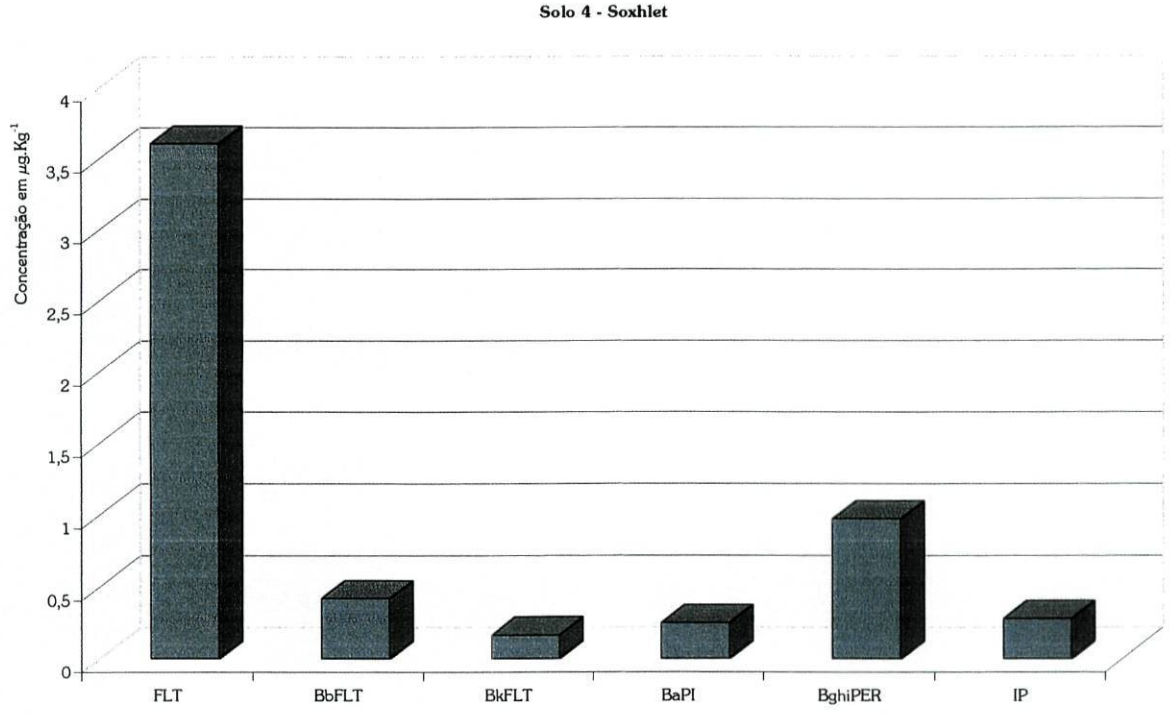


Figura 72. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 4** (extracção por Soxhlet)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Os resultados da quantificação dos seis PAHs em estudo para os dois solos em análise (solos 1 e 3) resultantes da extracção por SFE apresentam-se na Tabela 2 e nas Figuras 73 e 74 (página 144).

Tabela 2. Composição das amostras nos seis PAHs em estudo ($\mu g.Kg^{-1}$) após extracção por SFE (n = 8)

	Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$)							
	Amostra de solo							
	1		2		3		4	
	Média	RSD %	Média	RSD %	Média	RSD %	Média	RSD %
FLT	12,590	7,8	---	---	14,719	15,4	---	---
BbFLT	4,407	2,3	---	---	3,030	17,1	---	---
BkFLT	0,692	17,6	---	---	0,573	6,5	---	---
BaPI	1,689	15,1	---	---	2,452	15,3	---	---
BghiPER	3,487	16,5	---	---	14,142	17,8	---	---
IP	5,724	6,4	---	---	13,020	12,8	---	---
Σ	28,590	---	---	---	47,935	---	---	---

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno; Σ - teor total dos seis PAHs

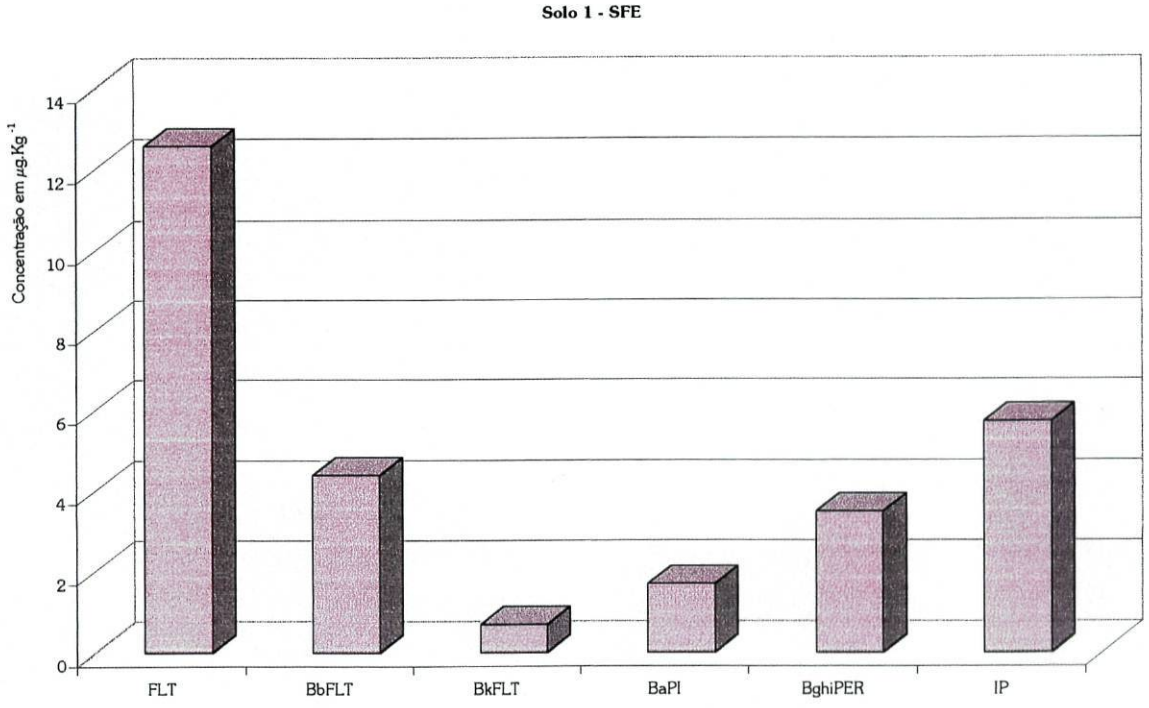


Figura 73. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 1** (extracção por SFE)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

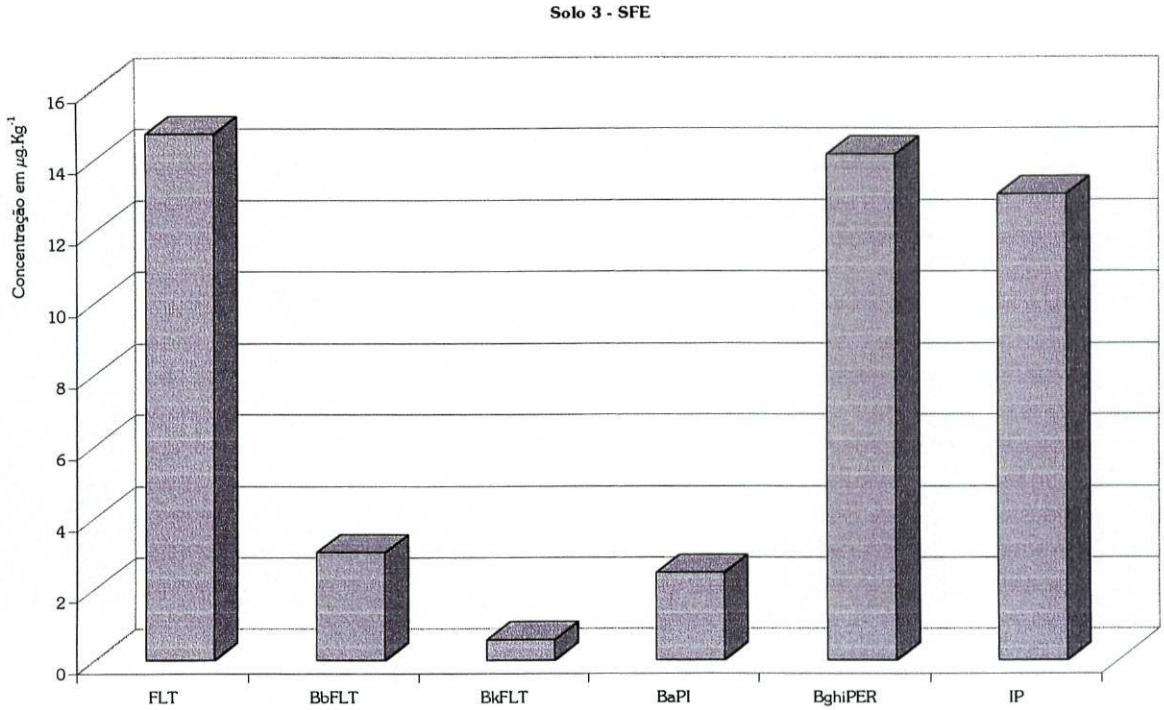


Figura 74. Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$) dos seis PAHs em estudo no **solo 3** (extracção por SFE)

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Como pretendemos determinar as concentrações de seis PAHs nos solos em análise, considerámos importante conhecer a concentração "normal" neste tipo de matriz. Por isso, introduzimos no nosso estudo a amostra de solo 4, retirada de uma área florestal não sujeita a incêndios nos últimos anos e situada a uma cota superior, relativamente aos locais das restantes amostras em análise. De facto, a não ocorrência recente de incêndios e a situação geográfica relativamente às áreas ardidas objecto de estudo, foram factores que nos levaram a admitir que o teor de PAHs a encontrar no solo 4 deveria corresponder ao teor habitual nos solos florestais estudados. A influência do incêndio no aumento da concentração de PAHs nos solos pôde, assim, ser medida por comparação do solo 4 com os solos 1, 2 e 3.

Os resultados encontrados demonstram que a concentração dos seis PAHs em estudo nos solos provenientes de locais onde ocorreram incêndios (solos 1, 2 e 3) são bastante superiores à concentração dos mesmos compostos no solo proveniente de uma área próxima dos locais anteriores mas a uma cota superior e onde não ocorreram incêndios (solo 4) (Figuras 75 e 76 – página 146; Figura 77 – página 147).

Pode-se assim concluir que a ocorrência de incêndios nos locais referidos contribui para um aumento da concentração em PAHs nos solos das áreas em estudo.

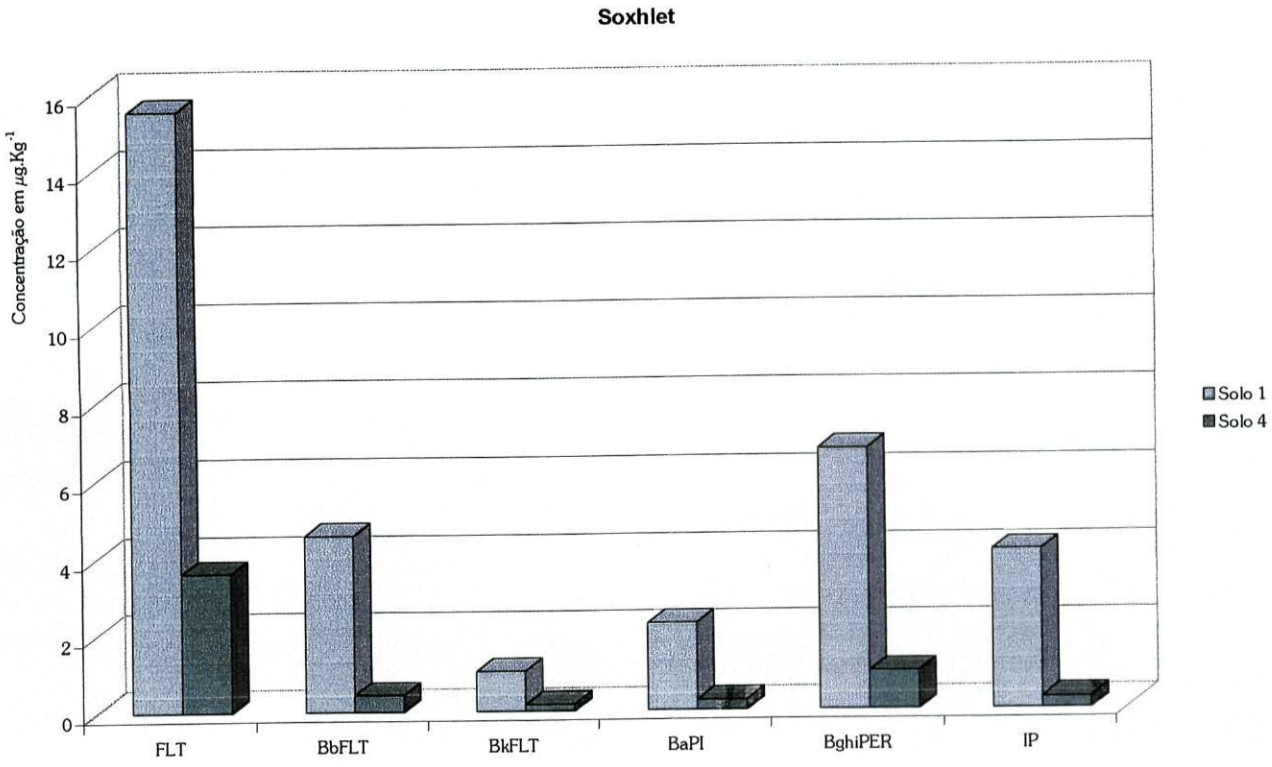


Figura 75. Comparação dos resultados obtidos no **solo 1** com os do solo 4

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

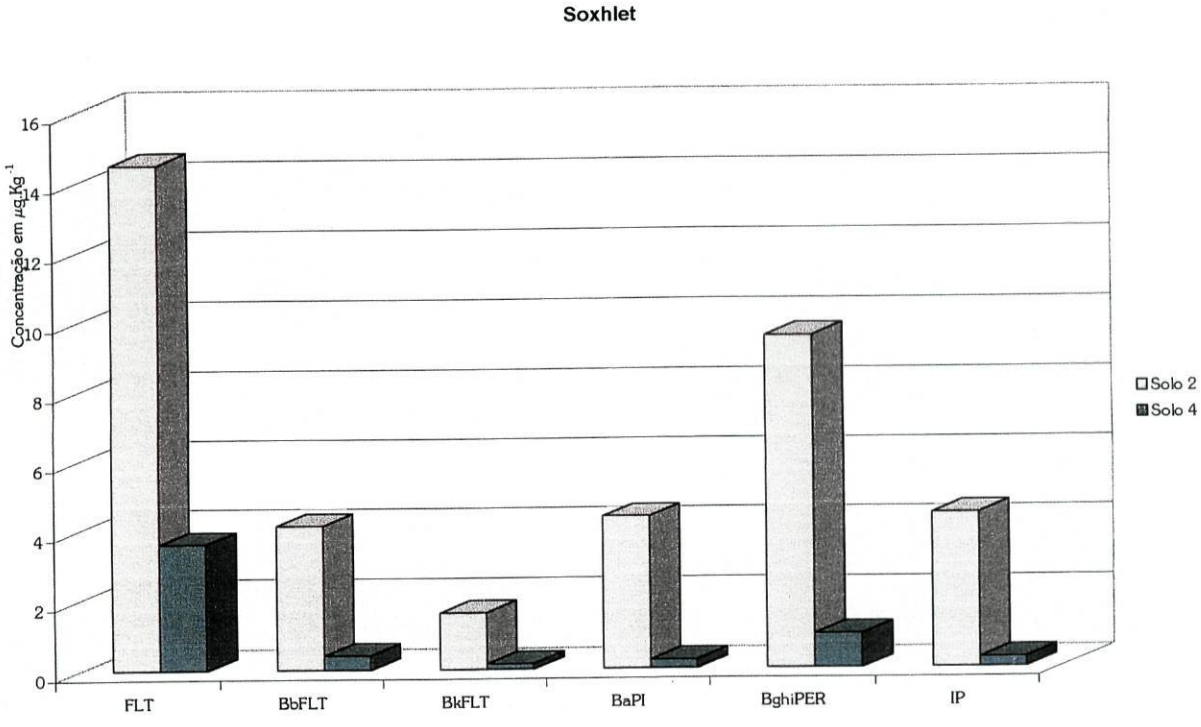


Figura 76. Comparação dos resultados obtidos no **solo 2** com os do solo 4

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

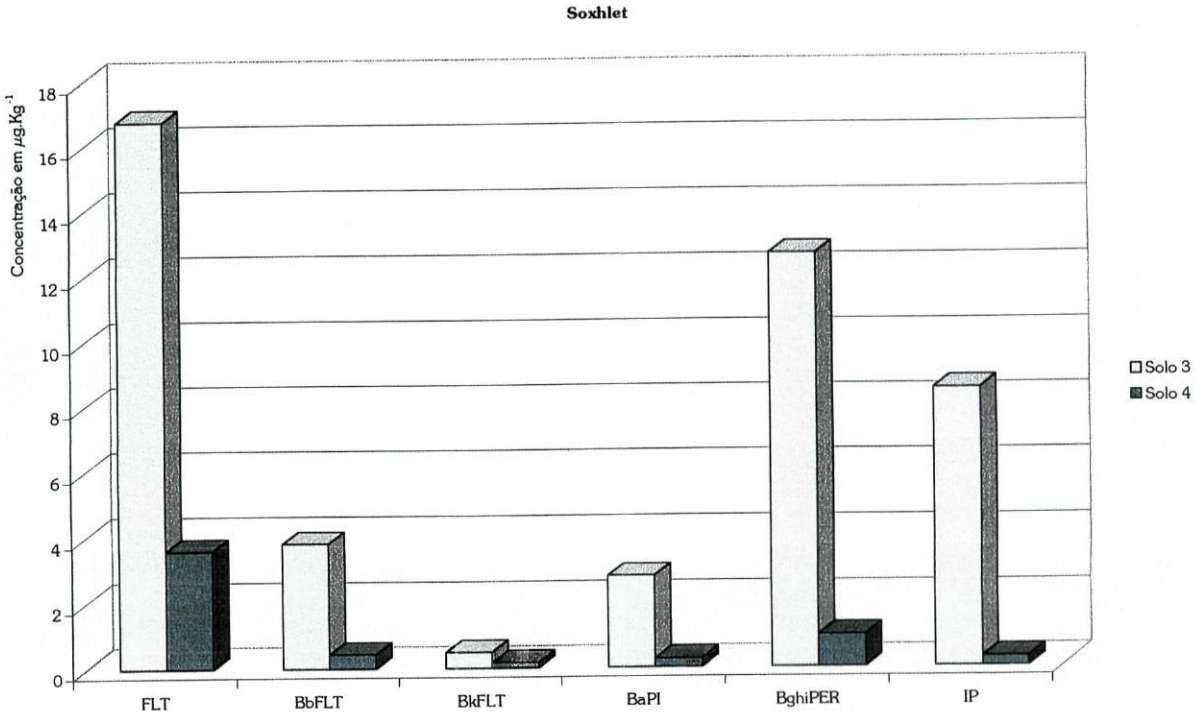


Figura 77. Comparação dos resultados obtidos no **solo 3** com os do solo 4

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

A bibliografia consultada não refere qualquer estudo sobre PAHs em solos que sofreram incêndios. A maior parte dos estudos publicados referem solos poluídos por fontes que fazem prever, à partida, quantidades elevadas de PAHs. Os valores encontrados para as amostras objecto do nosso estudo, são substancialmente menores do que os encontrados em solos que sofreram introdução directa e mais massiva de PAHs. Este facto permite considerar que, durante os incêndios e devido à formação de temperaturas muito elevadas que contribuem para a volatilização dos PAHs, sobretudo dos de menor massa molecular, a maior parte dos PAHs não se depositará exclusivamente nesse local. Como os solos em análise foram recolhidos após a ocorrência dos incêndios e na estação quente que é o Verão, o relativamente curto tempo para deposição/acumulação nos solos e condições climáticas

favoráveis à volatilização, poderão ter contribuído para as concentrações encontradas.

No caso presente não há que considerar o efeito da lixiviação para as águas subterrâneas uma vez que não se verificaram períodos de chuva entre os incêndios e a colheita das amostras. Tendo ocorrido precipitação e, portanto, lixiviação, esse facto poderia ter contribuído para explicar as concentrações encontradas (apesar dos PAHs terem uma baixa solubilidade em água, a matéria orgânica dissolvida actua como transportadora dos PAHs).

O estudo efectuado permite, no entanto, concluir que ao ocorrerem incêndios florestais, parte dos PAHs que é libertada na atmosfera, se deposita de imediato no solo, contribuindo para a poluição desses locais.

Os estudos de solos referidos na bibliografia indicam que se deve proceder à eliminação de todos os detritos de maior dimensão antes de se proceder à homogeneização das amostras. Neste estudo seguimos o mesmo procedimento (página 110). Contudo, parece-nos que teria sido útil ter incluído na amostra todos os detritos maiores, particularmente porque a colheita foi efectuada pouco tempo após se ter verificado o incêndio. De facto, estamos agora convictos que, uma parte dos PAHs presente nos solos após o incêndio, resulta da deposição por gravidade e permanecerá adsorvida à superfície, podendo ser significativa a que se acumula nos detritos orgânicos de maior dimensão.

Todavia, as quantidades de PAHs encontradas foram superiores ao mínimo considerado como habitual (página 129) pelo que será sempre de ponderar o risco ambiental provocado pelos incêndios, pois os PAHs que assim se formam e se li-

bertam para a atmosfera, para além de se depositarem no solo onde ocorreu o incêndio, serão também transportados e posteriormente depositados noutros solos mais distantes por efeito da gravidade ou pelo arrastamento pela água das chuvas.

A tabela 3 apresenta o teor total dos seis PAHs encontrados nas amostras em estudo resultantes da extracção por Soxhlet e por SFE.

Tabela 3. Teor total dos seis PAHs nas amostras em estudo

	Teor total (Σ) dos seis PAHs em estudo ($\mu g.Kg^{-1}$)	
	Soxhlet	**SFE**
Solo 1	34,242	28,590
Solo 2	38,549	---
Solo 3	45,031	47,935
Solo 4	5,700	---

Como a extracção por Soxhlet constitui um método aceite que permite determinar as concentrações reais [190], foi possível comparar os resultados obtidos por SFE com os resultantes de Soxhlet (página 163).

Os resultados obtidos na extracção por Soxhlet e por SFE mostram que as duas técnicas de extracção são similares em termos de eficiência para todos os PAHs (páginas 140/142 e 143/144).

Assim, para todos os solos e por ambas as técnicas de extracção, o PAH para que se obteve o valor de concentração mais elevado foi o fluoranteno. Também para todos os solos e por ambas as técnicas o PAH, para que se obteve o segundo valor de concentração mais elevado foi o benzo[*g,h,i*]perileno (excepção para o solo 1, para a extracção por SFE, em que foi o indeno[1,2,3-*cd*]pireno) (Quadro XVI e Figura 78 – página 151).

Para o solo 1, a SFE apresenta apenas maior eficiência que o Soxhlet para o indeno[1,2,3-*cd*]pireno, ou seja, obtiveram-se valores de concentração mais elevados com a extracção por Soxhlet para todos os restantes PAHs (Tabelas 1 – página 140 – e 2 – página 143; Figura 78 – página 151). Para o solo 3 obtiveram-se, com a extracção por SFE, valores de concentração mais elevados para três dos PAHs em estudo (benzo[*k*]fluoranteno, benzo[*g,h,i*]perileno e indeno[1,2,3-*cd*]pireno) (Tabelas 1 – página 140 e 2 – página 143; Figura 78 – página 151).

No solo 3, o benzo[*g,h,i*]perileno é o PAH com o segundo valor de concentração mais elevado (quer por Soxhlet, quer por SFE) e, dos solos analisados, é neste que o PAH referido apresenta a mais elevada concentração (Tabelas 1 – página 140 e 2 – página 143; Figuras 71 – página 142, 74 – página 144 e 78 – página 151). Aquele PAH é considerado como um marcador dos escapes de veículos motorizados [38]. De facto, dos quatro solos analisados, o solo 3 é o que se situa junto a uma estrada com algum tráfego automóvel o que, em parte, pode contribuir para explicar os valores de concentração encontrados para este PAH, relativamente aos outros três solos analisados.

Para a extracção por Soxhlet, verifica-se que as duas concentrações mais elevadas detectadas nas amostras em estudo foram, para o fluoranteno (16,787 $\mu g.Kg^{-1}$) e para o benzo[*g,h,i*]perileno (12,660 $\mu g.Kg^{-1}$) no solo 3, como ilustrado no Quadro XVI e na Figura 78 – página 151.

Para a extracção por SFE as duas concentrações mais elevadas correspondem ao fluoranteno (14,719 $\mu g.Kg^{-1}$) e ao benzo[*g,h,i*]perileno (14,142 $\mu g.Kg^{-1}$) no solo 3, como ilustrado no Quadro XVI e Figura 78 – página 151.

Quadro XVI – PAHs a que correspondem as duas concentrações mais elevadas encontradas

	Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$)					
	Soxhlet				**SFE**	
	Solo 1	Solo 2	Solo 3	Solo 4	Solo1	Solo 3
FLT	15,540	14,496	16,787	3,605	12,590	14,719
BghiPER	6,733	9,536	12,660	0,974	5,724	14,142

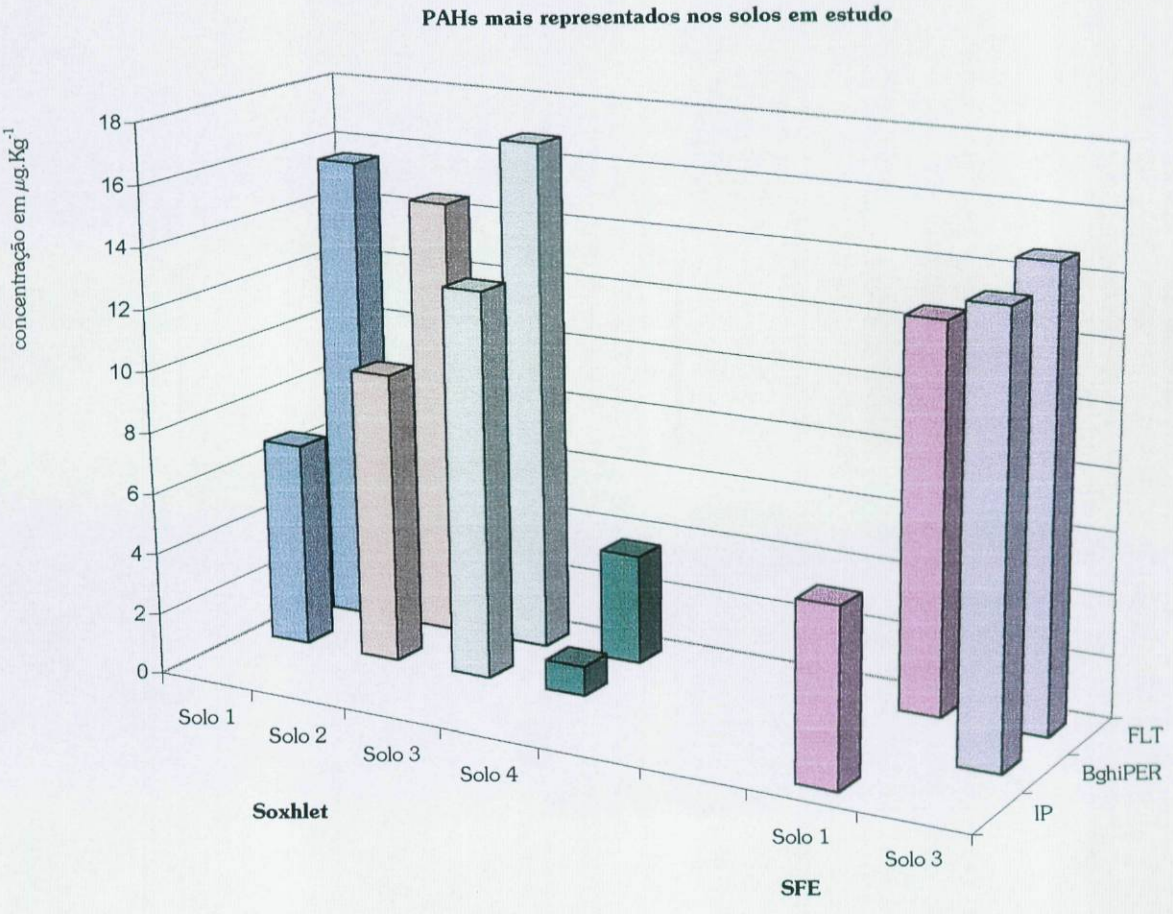


Figura 78. PAHs mais representados nos solos em estudo

FLT – fluoranteno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Estes resultados indiciam também que os PAHs de menor massa molecular (por exemplo, para o fluoranteno M_r = 202), mais voláteis, são, geralmente, mais facilmente extraídos, independentemente das condições de extracção [116].

A SFE mostrou maior selectividade para a extracção dos PAHs indeno[1,2,3-*cd*]pireno (no solo 1) e benzo[*g,h,i*]perileno (no solo 3) (Tabela 2 – página 143; Figura 78 – página 151).

Estes resultados demonstram que a SFE de uma mistura de compostos pode, algumas vezes, levar a uma extracção preferencial de um componente relativamente a outro/s. Esta extracção selectiva pode ser atribuída a diferenças de solubilidade dos compostos no fluido supercrítico. Há também que ter em atenção que a solubilidade de cada componente varia de um modo ligeiramente diferente com as variações de temperatura e de pressão. As diferenças nas forças de interacção entre os PAHs e o solo podem também contribuir para a selectividade da extracção [32].

As concentrações encontradas para as diferentes espécies de PAHs podem dever-se ainda a proporções diferentes formadas durante os processos de combustão devido, por exemplo, à temperatura de combustão [202].

Os resultados obtidos permitem confirmar estudos levados a efeito por outros autores [196] que referem que a extracção de PAHs em solos pouco contaminados depende, sobretudo, do passo de desadsorção/cinética (página 25). Os resultados encontrados poderão indicar que existem interacções diferentes entre cada PAH e os locais activos no solo [114], já que se verificaram concentrações diversas

nos diferentes solos, apesar de macroscópica e geograficamente não diferirem muito uns dos outros.

7. VALIDAÇÃO

A análise ambiental depara-se com algumas dificuldades pois os seus objectivos são muito específicos e os analitos de interesse têm de ser medidos em concentrações muito reduzidas e em matrizes complexas [207].

Por isso, é necessário implementar um programa de garantia de qualidade o qual deverá estar descrito no manual de qualidade do organismo responsável pela análise ambiental [208,209]. O objectivo de um programa de garantia de qualidade é reduzir os erros e assegurar que os resultados apresentem uma elevada probabilidade de serem fidedignos e válidos. Tal programa engloba o *controlo de qualidade* – o mecanismo estabelecido para controlar os erros – e a *avaliação da qualidade* – o sistema usado para verificar que o processo analítico opera dentro de limites aceitáveis [210,211]. Assim, fica assegurado que a análise, uma vez completa, fornece resultados que satisfazem os objectivos de qualidade estabelecidos [208].

Em termos de controlo de qualidade, há dois parâmetros que, pela sua importância, devem ser sempre considerados: a exactidão e a precisão associadas ao método. Ambos garantem a fiabilidade dos resultados. A precisão (diferença entre os dados obtidos em medições repetidas da mesma grandeza) é afectada pelos erros aleatórios [207]. A exactidão (diferença entre o valor medido e o valor verdadeiro) é afectada pelos erros sistemáticos [212].

O desenvolvimento actual da instrumentação analítica permite atingir limites de quantificação suficientes mesmo ao nível dos traços. Neste domínio, a automatização também facilita o controlo dos processos e dos resultados fazendo diminuir

drasticamente certos erros instrumentais e humanos, em particular os que estão ligados ao sistema de medida. Os erros que se devem essencialmente à origem e à natureza da amostra (falta de homogeneidade, impurezas da matriz) e às etapas de extracção e de pré-tratamento são mais difíceis de eliminar [213].

Este desenvolvimento da instrumentação analítica produziu particular impacto nos métodos cromatográficos. De facto, os modernos métodos cromatográficos permitem obter uma grande quantidade de resultados com o aumento consequente da complexidade do seu tratamento, de forma a obter toda e a melhor informação. Assim, para conseguir a melhor precisão e a melhor exactidão em análise cromatográfica, é necessário o controlo dos vários parâmetros que, em conjunto, determinam a qualidade dos resultados. Tal exige um bom conhecimento e domínio da totalidade do processo analítico, desde a amostragem até ao tratamento dos resultados [154]. Métodos de análise estatística multivariada como a regressão linear múltipla e a análise factorial são frequentemente úteis no estudo dos resultados obtidos [214].

Os métodos estatísticos são o meio mais objectivo para tratar e explorar a informação disponível e são decisivos na avaliação da qualidade das análises. Fornecem as ferramentas necessárias a uma optimização lógica e racional das condições de operação permitindo a identificação e quantificação das causas de erro e, portanto, uma diminuição do seu efeito, uma vez que a existência de erro em qualquer procedimento analítico é inevitável [215].

A validação de um método é então o meio que permite demonstrar, com um grau de confiança elevado, que o processo analítico usado é adequado para o fim a que se destina [199,201,213].

Como referimos, a precisão avalia a concordância de uma série de medidas da mesma grandeza numa amostra homogénea [199,201]. É a medida do grau de repetibilidade de um método analítico e expressa-se, normalmente, através do desvio padrão relativo (RSD %), para um número estatisticamente significativo de amostras [216].

A repetibilidade traduz-se pelos resultados da técnica obtidos durante um pequeno intervalo de tempo, nas mesmas condições, por um operador [70,199,215]. A repetibilidade caracteriza a dispersão intralaboratorial no decurso de uma mesma série de ensaios, isto é, entre análises repetidas pelo mesmo operador, utilizando a mesma aparelhagem durante um curto intervalo de tempo. A repetição de determinações da concentração de um analito numa dada amostra apresenta duas vantagens: i) os resultados afectados por erros grosseiros podem ser detectados e eliminados se um teste estatístico os permitir considerar como valores aberrantes e ii) a incidência de erros acidentais que traduzem o efeito de todos os factores não controlados encontra-se também minimizada [215].

Em amostras ambientais, a precisão depende muito da matriz da amostra, da concentração do analito de interesse e da técnica de análise e pode variar entre 2 % e valores superiores a 20 % [199].

7.1. PRECISÃO

7.1.1. REPETIBILIDADE DA TÉCNICA ANALÍTICA

Nas tabelas 4 e 5 encontram-se representados os resultados encontrados para a repetibilidade da técnica analítica num mesmo dia e em três dias, respectivamente.

Tabela 4. Repetibilidade da técnica analítica (n= 7) – mesmo dia

	Repetibilidade da técnica analítica			
	Tempos de retenção		Áreas	
	Média	RSD (%)	Média	RSD (%)
FLT	3,988	0,430	137389	2,617
BbFLT	8,446	0,506	222423	3,064
BkFLT	9,819	0,430	132250	2,448
BaPI	11,394	0,315	213436	9,455
BghiPER	14,483	0,193	33142	9,479
IP	15,179	0,188	39187	3,268

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Tabela 5. Repetibilidade da técnica analítica (n= 21; 7 injecções em cada um de 3 dias)

	Repetibilidade da técnica analítica			
	Tempos de retenção		Áreas	
	Média	RSD (%)	Média	RSD (%)
FLT	3,985	0,457	141670	4,042
BbFLT	8,432	0,524	228558	3,886
BkFLT	9,804	0,433	133795	2,350
BaPI	11,382	0,297	233342	10,291
BghiPER	14,469	0,186	34922	10,617
IP	15,161	0,184	40033	6,137

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaIP – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

7.1.2. REPETIBILIDADE DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL GLOBAL

Na tabela 6 encontram-se representados os resultados encontrados para a repetibilidade do procedimento experimental global.

Tabela 6. Repetibilidade do procedimento experimental global (n= 15)

	Repetibilidade do procedimento experimental global			
	Soxhlet		**SFE**	
	Média (concentração em $\mu g.Kg^{-1}$)	RSD (%)	Média (concentração em $\mu g.Kg^{-1}$)	RSD (%)
FLT	17,249	11,785	15,934	19,853
BbFLT	2,736	15,923	3,729	20,227
BkFLT	0,393	20,308	0,527	18,914
BaP	2,314	18,672	2,738	19,368
BghIiPER	10,323	18,611	15,831	20,288
IP	7,111	19,063	12,662	18,808

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

7.2. EXACTIDÃO

Como já referimos (página 154), a exactidão avalia a proximidade entre os valores encontrados e o valor verdadeiro [76,199,201].

O desenvolvimento de um processo de extracção para amostras ambientais reais está limitado pelo facto de que é simplesmente impossível saber a concentração exacta de um qualquer poluente em qualquer amostra. Por isso, o desenvolvimento e a validação de um método de extracção quantitativo baseia-se geralmente numa das seguintes abordagens: i) determinação da recuperação de concentrações conhecidas adicionadas à matriz da amostra ou a uma similar; ii) comparação das recuperações dos analitos com as conseguidas com métodos de extracção convencionalmente aceites e bem caracterizados; iii) realização de múltiplas extracções sequenciais da mesma amostra [195,200].

A bibliografia consultada refere que o uso de materiais de referência certificados, embora muito mais válido do que os estudos de recuperação baseados em fortificação de amostras, está limitado por dois factores. O primeiro é que a eficiência da extracção deve ser baseada em algum método admitido como correcto (usualmente a extracção por Soxhlet) [114] e o segundo é que as diferenças quer na extracção, quer na análise entre laboratórios diferentes podem contribuir para diferenças nas recuperações [114]. Quando não estão disponíveis materiais de referência, a comparação dos resultados de SFE com métodos padrão como Soxhlet fornece, de certo modo, um método consistente para avaliar os resultados de SFE [144,195]. Mas, de facto, o único modo de conseguir demonstrar recuperações

totais é usando compostos marcados [190], processo dispendioso e nem sempre acessível à generalidade dos laboratórios.

Trabalhos publicados [217] demonstraram que se a amostra de solo é homogénea (e todos os locais activos estão facilmente acessíveis) o método de fortificação é, provavelmente, um bom modelo para desenvolver as condições de extracção. Pelo contrário, em amostras heterogéneas, os analitos nas amostras fortificadas não têm a oportunidade de se associar com locais de ligação mais fortes como acontece com os analitos originais pelo que, as recuperações por fortificação não são um método válido para desenvolver condições de extracção quantitativas [217]. Tempos de equilíbrio de dias ou meses permitem aos compostos fortificados migrar para locais mais remotos ou de forte ligação na matriz, de tal modo que se tornam cada vez mais resistentes à extracção. Contudo, de um ponto de vista prático, períodos de equilíbrio de dias ou de meses são impraticáveis. Além disso, é experimentalmente impossível reproduzir as condições ambientais que ocorrem durante a deposição dos poluentes nas amostras reais [217]. Nestas circunstâncias e em conclusão, em matrizes heterogéneas, o recurso à comparação de diferentes métodos de extracção é mais válido do que o estudo de recuperação com amostras fortificadas [217].

Assim, neste estudo, a exactidão foi avaliada comparando os resultados obtidos pela extracção por fluido supercrítico com os resultados obtidos pela extracção por Soxhlet, método que é bem caracterizado e convencionalmente aceite como correcto. De facto, se os resultados obtidos para a mesma amostra por ambos os métodos forem semelhantes, pode considerar-se que os valores encontrados correspondem, provavelmente, ao valor verdadeiro [190].

Apresenta-se a seguir (Tabela 7) a comparação dos resultados obtidos para os solos 1 e 3 por Soxhlet e por SFE. Considerando que a extracção por Soxhlet corresponde a 100 %, apresentam-se as taxas de extracção por SFE para cada um dos solos.

Tabela 7. Comparação da eficiência da extracção por **Soxhlet** e **SFE** para os seis PAHs em estudo nos **solos 1** e **3**

	Concentração ($\mu g.Kg^{-1}$)					
	Amostra de solo					
	Solo 1			**Solo 3**		
	Soxhlet	SFE	**SFE/Soxhlet (%)**	SFE	Soxhlet	**SFE/Soxhlet (%)**
FLT	15,540	12,590	**81,0**	16,787	14,719	**87,7**
BbFLT	4,564	4,409	**96,6**	3,808	3,030	**79,5**
BkFLT	1,031	0,692	**67,1**	0,472	0,573	**121,4**
BaPI	2,256	1,689	**74,9**	2,796	2,452	**87,7**
BghiPER	6,733	3,487	**51,8**	12,660	14,142	**111,8**
IP	4,117	5,724	**139,0**	8,508	13,020	**153,0**
Σ	34,242	28,590	**83,5**	45,031	47,935	**106,4**

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno; Σ - teor total dos seis PAHs

Nas Figuras 79 e 80 (página 163) comparam-se graficamente os resultados obtidos por Soxhlet e SFE para os solos em estudo.

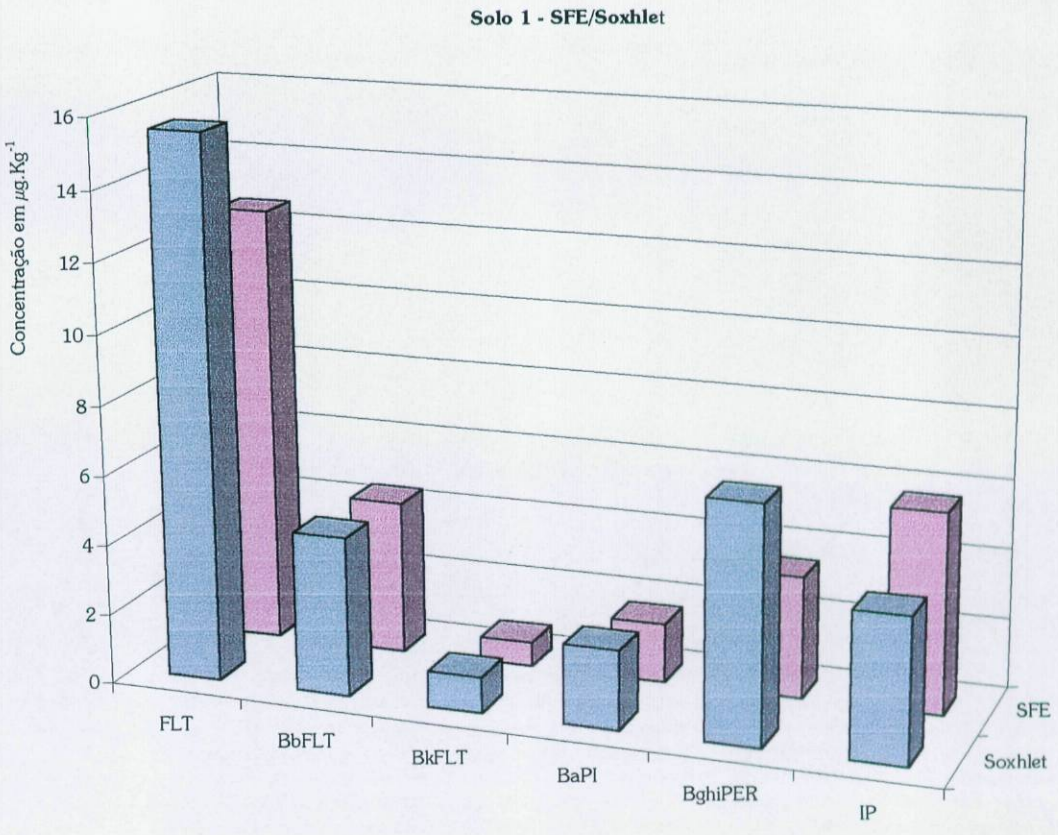


Figura 79. Comparação gráfica dos resultados SFE *versus* Soxhlet para o **solo 1**

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPl – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

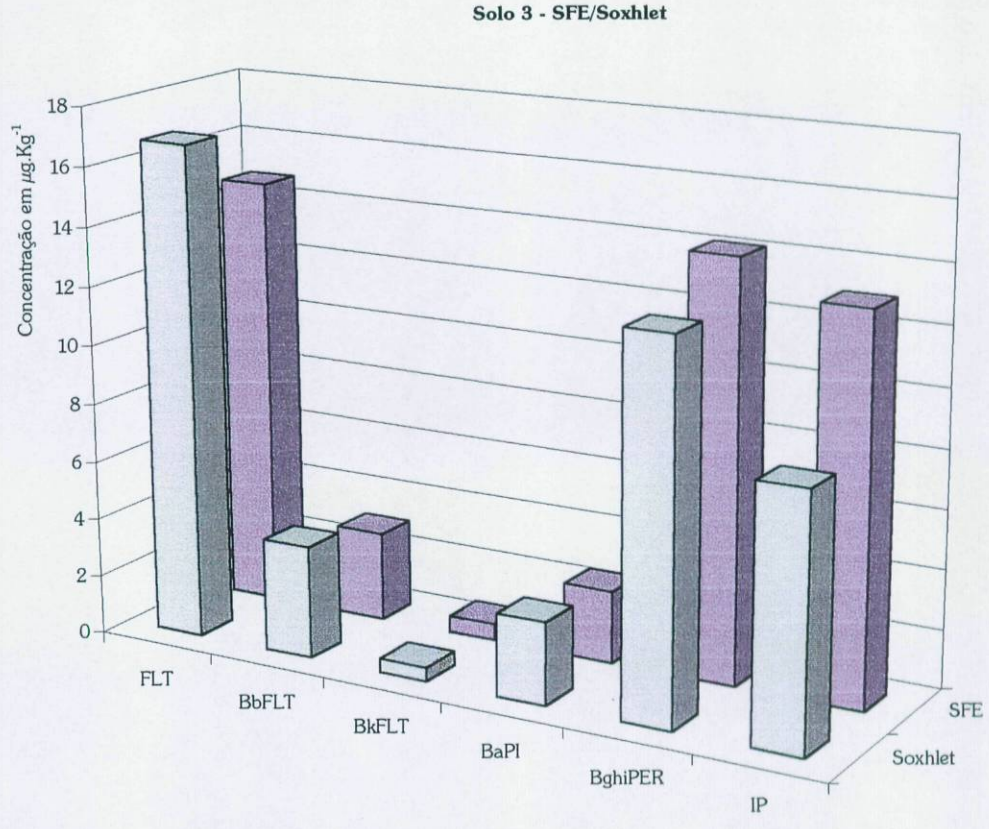


Figura 80. Comparação gráfica dos resultados SFE *versus* Soxhlet para o **solo 3**

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPl – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

7.3. LINEARIDADE

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade em originar resultados que são directamente proporcionais à concentração dos analitos de interesse na amostra [201]. A resposta deve ser, pois, directamente proporcional à concentração dos analitos e uma equação de regressão linear aplicada aos resultados deve dar uma intersecção não significativamente diferente de zero [199].

A relação de linearidade entre as concentrações e as absorvências foi verificada para o intervalo de concentrações entre 0,10 e 50,0 $\mu g.L^{-1}$ (Figura 81).

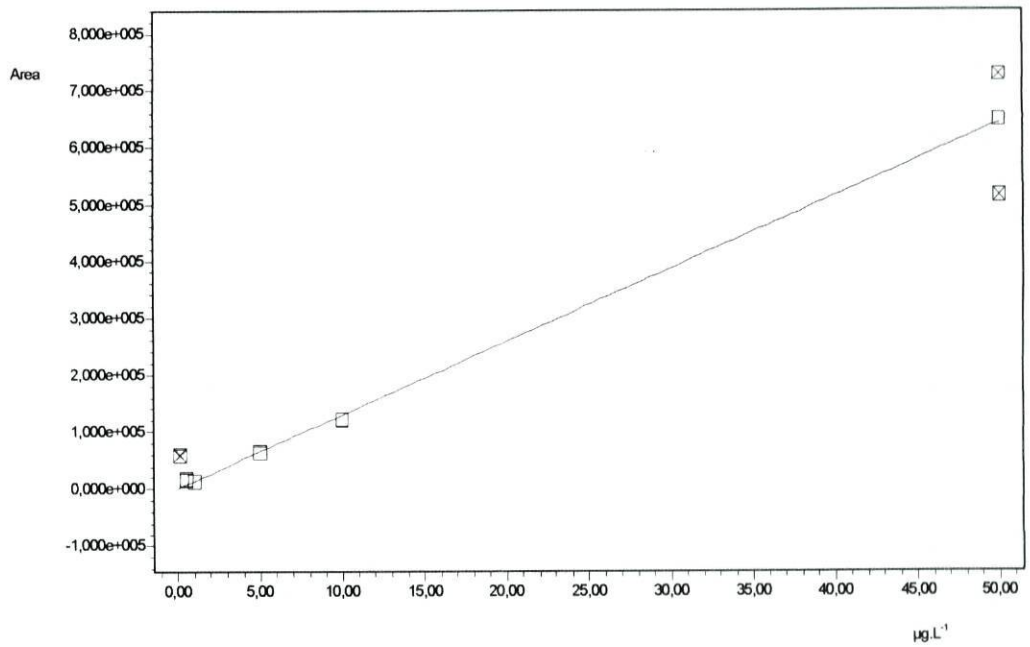


Figura 81. Curva de calibração

As equações das rectas de regressão da curva de calibração (área do pico *versus* concentração) para os seis PAHs em estudo assim como o respectivo coeficiente de correlação (R) encontram-se representados na Tabela 8 (página 165).

O RSD (%) das áreas para as determinações de cada nível de concentração dos padrões, efectuadas em triplicado, encontra-se representado na Tabela 9 (página 165).

Tabela 8. Equações das rectas de regressão da curva de calibração

	Equação da recta de regressão	R
FLT	Y = 1,28e+0,04x+1,27e+0,03	0,999317
BbFLT	Y = 2,06e+0,04x-2,86e+0,03	0,999782
BkFLT	Y = 1,28e+0,04x-1,76e+0,03	0,999777
BaPI	Y = 1,85e+0,04x-2,06e+0,02	0,999835
BghiPER	Y = 2,47e+0,03x-2,45e+0,02	0,999788
IP	Y = 3,80e+0,03x-1,51e+0,02	0,999897

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

Tabela 9. Desvio padrão relativo (RSD %) das áreas para as determinações em triplicado de cada nível de concentração

	Padrões ($\mu g.L^{-1}$)					
	0,10	0,50	1,0	5,0	10,0	50,0
	RSD (%)					
FLT	0,127	7,603	2,558	0,213	0,109	12,117
BbFLT	25,763	6,156	0,717	0,658	0,498	10,407
BkFLT	2,390	5,648	2,569	0,638	0,344	12,566
BaPI	11,975	3,807	2,193	0,479	0,565	7,425
BghiPER	---	18,245	5,775	1,092	0,982	5,109
IP	---	3,161	2,476	1,440	0,403	15,865

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

7.4. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

O limite de detecção de um processo analítico corresponde à medição cujo valor é maior do que a incerteza a ele associada. É a mais baixa concentração de analito numa amostra que pode ser detectada (mas não necessariamente quantificada) [201]. No limite de detecção o sinal gerado pelo instrumento aproxima-se do sinal gerado por um branco [207].

7.5. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

É a mínima quantidade injectada que origina resultados precisos, ou seja, a mais baixa concentração de analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exactidão adequadas nas condições do método [76,199,201].

Os limites de detecção e de quantificação da técnica analítica encontram-se representados na Tabela 10.

Tabela 10. Limite de detecção e limite de quantificação da técnica analítica

	LD ($\mu g.mL^{-1}$)	**LQ** ($\mu g.mL^{-1}$)
FLT	$3{,}79 \times 10^{-5}$	$1{,}15 \times 10^{-5}$
BbFLT	$8{,}81 \times 10^{-6}$	$2{,}67 \times 10^{-5}$
BkFLT	$1{,}13 \times 10^{-5}$	$3{,}44 \times 10^{-5}$
BaP	$1{,}05 \times 10^{-5}$	$3{,}18 \times 10^{-5}$
BghiPER	$4{,}94 \times 10^{-5}$	$1{,}50 \times 10^{-4}$
IP	$4{,}08 \times 10^{-5}$	$1{,}24 \times 10^{-4}$

FLT – fluoranteno; BbFLT – benzo[*b*]fluoranteno; BkFLT – benzo[*k*]fluoranteno; BaPI – benzo[*a*]pireno; BghiPER – benzo[*g,h,i*]perileno; IP – indeno[1,2,3-*cd*]pireno

O estudo da validação do método implementado neste trabalho apresenta resultados, a nível dos parâmetros analíticos ensaiados, que são comparáveis com a generalidade dos resultados encontrados na revisão bibliográfica efectuada. Assim, os resultados determinados para a precisão (traduzida no desvio padrão relativo – RSD % – para a repetibilidade da técnica analítica e para a repetibilidade do

procedimento experimental global) e para a exactidão demonstram a eficiência da extracção e que o método é preciso e exacto.

A resposta dos PAHs – quer com a extracção por Soxhlet, quer com a extracção por SFE – ao detector de fluorescência usado na análise por HPLC, revelou-se linear para o conjunto dos seis PAHs em estudo entre as concentrações 0,10 $\mu g.Kg^{-1}$ e 50,0 $\mu g.L^{-1}$. Esta gama de concentrações cobre todos os valores encontrados para os extractos dos PAHs em estudo.

Os limites de detecção da técnica de HPLC variaram entre $8,81x10^{-6}$ $\mu g.L^{-1}$ para o benzo[*b*]fluoranteno e $4,94x10^{-5}$ $\mu g.L^{-1}$ para o benzo[*g,h,i*]perileno (Tabela 10 – página 167) o que permite detectar e dosear os seis PAHs presentes nos solos.

O método desenvolvido apresenta-se, pois, como um método preciso e exacto, com uma linearidade de resposta e um limite de detecção que permitem a quantificação de níveis vestigiários. Além disso, adequa-se aos requisitos desejáveis em análise ambiental: a extracção é simples, completa, rápida, quantitativa e com um uso mínimo de solvente [75,101,218].

PARTE VI – CONCLUSÕES

PARTE VI – CONCLUSÕES

A formação de PAHs pode ter origens muito diversas que vão desde causas naturais, como a actividade vulcânica ou fogos florestais até à actividade antropogénica, como a actividade industrial e a incineração [20,26,27,28]. De um modo geral, sempre que há combustão orgânica são produzidos PAHs [6].

A maior parte dos PAHs libertados na atmosfera acaba por atingir o solo, constituindo este o principal compartimento de destino dos PAHs no ambiente terrestre. Uma vez chegados ao solo, nem todos os PAHs apresentam o mesmo comportamento. Os compostos mais leves estão mais sujeitos à volatilização e à degradação, enquanto que os de maior massa molecular, sendo mais lipofílicos, tendem a acumular-se mais. O processo de fixação, permanência e degradação dos PAHs nos solos é bastante complexo por estarem envolvidas inúmeras variáveis que tornam o estudo do comportamento destes compostos nessas matrizes bastante difícil. Os solos apresentam texturas muito diversas, matéria orgânica (fundamental porque é aí que os PAHs se fixam) em concentração e disponibilidade muito desiguais e quantidades de água muito variáveis. Assim, o teor de PAHs presente nas camadas orgânicas de húmus traduzirá um compromisso de vários factores: a quantidade que chega ao solo vinda da atmosfera, a quantidade e tipo de matéria orgânica presente, o teor em humidade e a textura desse solo.

A consciencialização da importância dos PAHs na saúde humana (página 33 e seguintes) levou a que se oficializassem métodos de análise de PAHs em águas. Começa actualmente a dar-se igual importância à presença destes poluentes no solo, atribuindo-se-lhes o mesmo interesse dado aos PAHs em águas.

A análise de PAHs em solos é frequentemente complexa e arrasta consigo algumas dificuldades particulares. Solos que macroscopicamente parecem homogéneos, quando estudados a nível microscópico, apresentam-se quase sempre como sistemas muito heterogéneos [40]. Os PAHs ligam-se fortemente, mas de forma desigual, à complexa mistura que constitui a matéria orgânica dos solos. Os processos de adsorção envolvidos e que permitem a fixação de compostos deste tipo, são também muito complexos [40]. Estes factos justificam a dificuldade que surge em garantir a extracção completa e sem alterações dos PAHs dos solos. Para além dos problemas relacionados com a eficiência da extracção, surgem frequentemente obstáculos causados pela coextracção de compostos interferentes e pela intrincada e diferente composição das amostras. Por outro lado, o facto de os PAHs considerados prioritários pelas organizações internacionais (EPA e UE) possuírem uma gama larga de propriedades físico-químicas, pode também criar dificuldades analíticas sérias. Volatilidades diferentes e a hidrofobia, que aumenta à medida que aumenta o grau de condensação dos PAHs, fazem com que a extracção ou a purificação dos extractos não surja frequentemente optimizada para cada um dos PAHs em análise [144,193].

Os seis PAHs em estudo foram quantificados por HPLC com detecção por fluorescência após extracção por Soxhlet (solo 1, 2, 3 e 4) e extracção por SFE (solo 1 e 3).

O estudo efectuado permitiu considerar que, ao verificar-se um incêndio com concomitante formação de PAHs, uma parte será arrastada para locais mais distantes e outra é depositada no próprio local, contribuindo para um aumento destes poluentes nesse lugar.

Os valores encontrados e aqui apresentados são superiores aos descritos na literatura como valores "normais" para solos [202]. De facto, encontraram-se concentrações mais elevadas de PAHs em qualquer dos solos que sofreram incêndios (solos 1, 2 e 3), quando comparados com um solo da mesma zona, não poluído (solo 4).

A presença de benzo[*g,h,i*]perileno em teor mais elevado no único solo próximo de uma estrada (solo 3), permite pôr em evidência a utilização deste PAH como marcador da poluição por veículos motorizados.

A obtenção de resultados similares para as duas técnicas de extracção utilizadas, mostra a sua validade. As diferenças obtidas nos dois tipos de extracção, evidenciando selectividade extractiva preferencial de alguns PAHs, indicam a vantagem de utilização das duas técnicas em conjunto. Porém, a SFE, sendo uma técnica relativamente recente, ainda bastante dependente do "design" do equipamento, é uma metodologia bastante promissora e poderá, quando se tornar mais comum, ser adaptada, com vantagem, para a extracção preferencial de PAHs. Para além disso, a necessidade de menores quantidades de solvente, a rapidez e a pureza dos extractos obtidos poderá, no futuro vir a transformar a SFE na técnica de eleição para a extracção de PAHs de solos.

Na separação cromatográfica dos diferentes PAHs, a técnica de HPLC confirmou as suas potencialidades: rapidez e eficiência. O detector de fluorescência, pela elevada sensibilidade e especificidade que demonstrou neste estudo, justifica também a sua escolha preferencial para a análise de PAHs por HPLC.

Os PAHs existem no planeta partilhados entre três fases: o ar, a água e o solo. O solo, através da matéria orgânica que o compõe (humina, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e lípidos), constitui o principal recipiente de PAHs. De acordo com as propriedades físico-químicas do PAH, do conteúdo em carbono orgânico do solo e da forma como o PAH é lançado para o ambiente, a afinidade para o solo pode chegar a ser 300 milhões de vezes maior do que para o ar [219]. Se pensarmos no transporte dos PAHs dos solos para outros locais (por lixiviação e/ou volatilização), na possibilidade de transferência directa para produtos alimentares e na sua degradação em produtos ainda mais tóxicos, facilmente nos apercebemos da importância do estudo destes poluentes nesta matriz. Contudo, e a avaliar pelo número de publicações que vão surgindo, os solos agrícolas e florestais continuam a ser muito menos estudados do que a água e o ar.

Terminamos manifestando um desejo: que o modesto trabalho aqui apresentado tenha a capacidade de sensibilizar e motivar a prossecução do estudo de PAHs nos solos em todas as suas implicações.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

[1] CHEN, B., H., LIN, Y., S., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, **45**, 1394-1403

[2] FERNANDEZ, M., J., GARCIA, C., VILLANOVA, R., J., G., GOMEZ, J., A., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1996, **44**, 1785-1789

[3] CHEN, B., H., *Journal of Food and Drug Analysis*, 1997, **5**, 25-42

[4] BLUMER, M., *Scientific American*, 1988, **50**, 35-48

[5] ROMERO, D., L., MOUNHO, B., J., LAUER, F., T., BORN, J., L., BURCHIEL, S., W., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, **144**, 62-69

[6] HARVEY, R., G., *The Handbook of Environmental Chemistry of PAHs and Related Compounds, Vol. 3 – Part I,* A., H., Neilson Editor, Springer Verlag, 1998, capítulo 1

[7] CLAR, E., *Polycyclic Hydrocarbons*, vol. 1, Academic Press, 1964

[8] KANG, J., J., FANG, H., W., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, **238**, 367-369

[9] DIPPLE, A., *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, Ronald G. Harvey Editor, American Chemical Society, Washington, D. C., 1985, capítulo 1

[10] HAWTHORNE, S., B., YANG, Y., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 2912-2920

[11] BEMGÅRD, A., COLMSJÖ, WRANGSKOG, K., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 4288-4294

[12] NIEDERFELLNER, J., LENOIR, D., MATUSCHEK, G., REHFELDT, F., UTSCHICK, H., BRÜGGEMANN, R., *Quantitative Structure-Activity Relationships,*1997, **16**, 38-48

[13] HENNER, P., SCHIAVON, M., MOREL, J., L., LICHTFOUSE, É., *Analusis Magazine*, 1997, **25**, M56-M59

[14] KLAASEN, D., *Casarett and Doull`s Toxicology – The Science of Poisons*, 5 th Edition, McGrawhill, 1996, capítulos 8, 28 e 29

[15] NOTAR, M., LESKOVŠEK, H., *Fresenius`Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **358**, 623-629

[16] MEYER, S., CARTELLIERI, S., STEINHART, H., *Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 4023-4029

[17] BELAND, F., A., HEFLICH, R., H., HOWARD, P., C., FU, P., P., *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, Ronald G. Harvey Editor, American Chemical Society, Washington D. C. , 1985

[18] LIU, C., Y., HU, C., C., YANG, C., L., *Journal of Chromatography A*, 1997, **773**, 199-208

[19] MACCREHAN, W., A., MAY, W., E., YANG, S., D., BENNER, Jr, B., A., *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 194-199

[20] LEE, H., K., *Journal of Chromatography A*, 1995, **710**, 79-82

[21] BALANIKAS, G., HUSSAIN, N., AMIN, S., HECHT, S., S., *Journal of Organic Chemistry*, 1988, **53**, 1007-1010

[22] HARVEY, R., G., GOH, S., H., CORTEZ, C., *Journal of the American Chemical Society*, 1975, **12**, 3468-3479

[23] GASTON, J., C., CHANG, M., G., *Journal Environ. Sci. Health*, 1997, **32**, 1525--1556

[24] EBERIUS, M., BERNS, A., SCUPHAN, I., *Fresenius`Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **359**, 274-279

[25] FURUTA, N., OTSUKI, A., *Analytical Chemistry*, 1983, **55**, 2407-2413

[26] WISE, S., A., SANDER, L., C., MAY, W., E., *Journal of Chromatography*, 1993, **642**, 329-349

[27] WISE, S., A., HILPERT, L., A., REBBERT, R.. E., SANDER, L., C., SCHANTZ, M., M., CHESLER, S., N., MAY, W., E., *Fresenius Z Anal Chem*, 1988, **332**, 573-582

[28] HOFFMAN, D., J., RATTNER, B., A., BURTON, Jr., G., A., CAIRNS, Jr., J., *Handbook of Ecotoxicology*, Lewis Publishers, 1995, capítulo 15

[29] SANDERS, G., TAYLOR, J., H., JONES, K., C., *Environmental Science and Technology*, 1996, **30**, 2958-2966

[30] MIHELCIC, J., R., LUTHY, R., G., *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, **5**, 1182-1187

[31] SUGIMOTO, I., SEYAMA, M., NAKAMURA, M., *Journal of Environmental Monitoring*, 1999, **1**, 135-142

[32] LOW, G., K., C., DUFFY, G., J., *Trends in Analytical Chemistry*, 1995, **14**, 218-225

[33] LICHTFOUSE, E., *Analusis Magazine*, 1997, **25**, M16-M23

[34] KOHL, S., D., RICE., J., A., *Chemosphere*, 1998, **36**, 251-261

[35] HOUOT, S., BENOIT, P., CHARNAY, M., P., BARRIUSO, E., *Analusis Magazine*, 1997, **25**, M41-M45

[36]AISLABIE, J., BALKS, M., ASTORI, N., STEVENSON, G., SYMONS, R., *Chemosphere*, 1999, **39**, 2201-2207

[37] LAOR, Y., STROM, P., F., FARMER, W., J., *Water Research*, 1999, **33**, 1719-1729

[38] WILCKE, W., MÜLLER, S., KANCHANAKOOL, N., NIAMSKUL, C., ZECH, W., *Geoderma*, 1999, **91**, 297-309

[39] LICHTFOUSE, É., LÉVÊQUE, J., *Analusis Magazine*, 1999, **1**, 10-12

[40] KOHL, S., D., RICE, J., A., *Organic Geochemistry*, 1999, **30**, 929-936

[41] KOHL, S., D., TOSCANO, P., J., HOU, W., RICE, J., A., *Environmental Science Technology*, 2000, **34**, 204-210

[42] AGUER, J., P., RICHARD, C., ANDREUX, F., *Analusis*, 1999, **27**, 387-390

[43] HARAYAMA, S., *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, **8**, 267-273

[44] COATES, J., D., WOODWARD, J., ALLEN, J., PHILIP, P., LOVLEY, D., R., *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **9**, 3589-3593

[45] SPIRO, T., G., SRIGLIANI, W., M., *Chemistry of the Environment*, Prentice-Hall Inc., NJ, 1996, Parte 1

[46] MUELLER, J., G., CHAPMAN, P., J., PRITCHARD, P., H., *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, **12**, 3085-3090

[47] STRAUBE, W., L., MEEHAN, J., J., PRITCHARD, P., H., JONES, W., R., *Resources Conservation and Recycling*, 1999, **27**, 27-37

[48] PRADHAN, S., P., CONRAD, J., R., PATEREK, J., R., SRIVASTAVA, V., J., *Journal of Soil Contamination*, 1998, **7**, 467-480

[49] SIMONICH, S., L., HITES, R., A., *Nature*, 1994, **370**, 49-51

[50] VERMEULEN, N., P., E., KELDER, G., D., O., COMMANDEUR, J., N., M., *Perspectives in Medicinal Chemistry*, VCH Publishers, 1993, capítulo 37

[51] DENIS, M., S., NARBONNE, J., F., ARNAUD, C., THYBAUD, E., RIBERA, D., *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, **31**, 1837-1846

[52] DIPPLE, A., PIGOTT, M., A., AGARWAL, S., K., YAGI, H., SAYER, J., M., JERINA, D., M., *Nature*, 1987, **327**, 535-536

[53] BAAN, R., A., STEENWINKEL, M., J., S., T., Van der BERG, P., T., M., ROGGEBAND, R., Van DELFT, J., H., M., *Human and Experimental Toxicology*, 1994, **13**, 880--887

[54] VEJROSTA, J., KARÁSEK, P., PLANETA, J., *Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 905--909

[55] PRAHALAD, A., K., ROSS, J., A., NELSON, G., B., ROOP, B., C., KING, L., C., NESNOV, S., MASS, M., J., *Carcinogenesis*, 1997, **10**, 1955-1963

[56] RALSTON, S., L., COFFING, S., L., SEIDEL, A., LUCH, A., PLATT, K., L., BAIRD, W., M., *Chemical Research in Toxicology*, 1997, **10**, 687-693

[57] WILLETT, K., L., RANDERATH, K., ZHOU, G., D., SAFE, S., H., *Biochemical Pharmacology*, 1998, **55**, 931-839

[58] STROOMBERG, G., J., KNECHT, J., A., ARIESE, F., GESTEL, C. A., M., VELTHORST, N., H., *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, **18**, 2217-2224

[59] ARNAUD, C., DENIS, M., S., NARBONNE, J., F., SOLER, P., RIBERA, D., *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, **32**, 67-73

[60] KINGSTON, H., M., JASSIE, L., B., *Analytical Chemistry*, 1986, **58**, 2534-2541

[61] HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry*, 1987, **59**, 1705-1708

[62] ZHANG, Z., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 844A-853A

[63] POOLE, S., K., DEAN, T., A., OUDSEMA, J., W., POOLE, C., F., *Analytica Chimica Acta*, 1990, **236**, 3-42

[64] ALPENDURADA, M., F., *Amostragem e Análise Ambiental – Curso de Curta Duração*, IAREN, 1996, capítulo 1

[65] BARCELÓ, D., *Preparação e análise de amostras – Curso de Curta Duração*, IAREN 1996, capítulo 4

[66] LETELLIER, M., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P., WISE, S., *Spetroscopy*, 1996/1997, **13**, 71-80

[67] CAMEL, V., TAMBUTÉ, A., CAUDE, M., *Journal of Chromatography*, 1993, **642**, 263-281

[68] PRISTA, L., A., ALVES, A., C., MORGADO, R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, I volume, 2.ª edição, FCG, 1975

[69] POMBEIRO, A., J., L., *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*, FCG, Lisboa, 1983, capítulos 17 e 18

[70] MAJORS, R., E., *LC-GC International*, 1996, October, 641-647

[71] BERSET, J., D., EJEM, M., HOLZER, R., LISCHER, P., *Analytica Chimica Acta*, 1999, **383**, 263-275

[72] HEEMKEN, O., P., THEOBALD, N., WENCLAWIAK, W., *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 2171-2180

[73] NADKARNI, R., A., *Analytical Chemistry*, 1984, **56**, 2233-2237

[74] BARNABAS, I., J., DEAN, J., R., FOWLIS, I., A., OWEN, S., P., *Analyst*, 1995, **120**, 1897-1904

[75] DANKERS, J., GROENENBOOM, M., SCHOLTIS, L. H., A., HEIDEN, C., *Journal of Cromatography*, 1993, **641**, 357-362

[76] LEE, H., B., PEART, T., E., YOU, R., L., H., GERE, D., R., *Journal of Chromatography A*, 1993, **653**, 83-91

[77] BARTLE, K., D., LEE, M., L., WISE, S., A., *Chemical Society Reviews*, 1981, **10**, 113-158

[78] OOSTDYK, T., S., GROB, R., L., SNYDER, J., L., MCNALLY, M., E., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 596-600

[79] EICEMAN, G., A., VIAU, A., C., KARASEK, F., W., *Analytical Chemistry*, 1980, **52**, 1492-1496

[80] ONUSKA, F., I., TERRY, K., A., *Journal of High Resolution Chromatography*, 1995, **18**, 417-421

[81] GANZLER, K., SALGÓ, A., VALKÓ, K., *Journal of Chromatography*, 1986, **371**, 299-306

[82] CHATOT, G., CASTEGNARO, M., ROCHE, J., L., FONTANGES, R., *Analytica Chimica Acta*, 1971, **53**, 259-265

[83] CRESSWELL, S., L., HASWELL, S., J., *Analyst*, 1999, **124**, 1361-1366

[84] CASTILHO, M., C., RAMOS, F., SILVEIRA, M., I., N., *Química*, 1995, **59**, 38-45

[85] SUPELCO, *Chromatography Products*, TEKNOKROMA S., Coop S. Lda., Barcelona, 1996

[86] GREEN, D., R., LE PAPE, D., *Analytical Chemistry*, 1987, **59**, 699-703

[87] JUNK, G., A., RICHARD, J., J., *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 451-454

[88] MACFARLANE, J., D., *Journal of Automatic Chemistry*, 1997, **19**, 175-180

[89] LINTELMANN, J., WAADT, K., SAUERBREY, R., KETTRUP, A., *Fresenius` Journal of Analytical Chemistry*, 1995, **352**, 735-742

[90] EISERT, R., LEVSEN, K., *Journal of Chromatography A*, 1996, **733**, 143-157

[91] GÓRECKI, T., PAWLISZYN, J., *Analyst*, 1997, **120**, 1079-1086

[92] YANG, X., PEPPARD, T., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, **42**, 1925-1930

[93] SIMPLÍCIO, A., L., BOAS, L.,V., *Química*, 1997, **67**, 21-24

[94] LOUCH, D., MOTLAGH, S., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1992, **64**, 1187--1199

[95] MOTLAGH, S., PAWLISZYN, J., *Analytica Chimica Acta*, 1993, **284**, 265-273

[96] ARTHUR, C., L., KILLAM, L., M., BUCHHOLZ, K., D., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1992, **64**, 1960-1966

[97] CHAI, M., ARTHUR, C., L., PAWLISZYN, J., BELARDI, R., P., PRATT, K., F., *Analyst*, 1993, **118**, 1501-1505

[98] ZHANG, Z., YANG, M., J., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 844A--853A

[99] HEEMKEN, O., P., THEOBALD, N., WENCLAWIAK, B., W., *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 2171-2180

[100] RICHTER, B., E., JONES, B., A., EZZELL, J., L., PORTER, N., L., AVDALOVIC, N., POHL, C., *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 1033-1039

[101] DEAN, J., R., *Analytical Communications*, 1996, **33**, 191-192

[102] VANNOORT, R., W., CHERVET, J., P., LINGEMAN, H., DE JONJ, G., J., BRINKMAN, U., A., Th., *Journal of Chromatography*, 1990, **505**, 45-77

[103] CHESTER, T., L., PINKSTON, J., D., RAYNIE, D., E., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 106R–130R

[104] KING, J., W., *Trends in Analytical Chemistry*, 1995, **14**, 474-481

[105] KING, J., W., HOPPER, M., L., *Journal of AOAC International*, 1992, **75**, 375-377

[106] HOLLENDER, J., SHNEINE, J., DOTT, W., HEINZEL, M., HAGEMANN, H., W., GÖTZ, G., K., E., *Journal of Chromatography A*, 1997, **776**, 233-243

[107] ISCO, SFX, *Supercritical Fluid Extraction*, Brochure 9401, Isco, Inc., 1994

[108] CAMEL, V., TAMBUTÉ, A., CAUDE, M., *Journal of Chromatography*, 1993, **642**, 263-281

[109] NOBLE, D., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 693A-695A

[110] BAYONA, J., *LRA*, 1993, **5**, 283-292

[111] WRIGHT, B., W., WRIGHT, C., W., GALE, R., W., SMITH, R., D., *Analytical Chemistry*, 1987, **59**, 38-44

[112] CHESTER, T., L., PINKSTON, J., D., RAYNIE, D., E., *Analytical Chemistry*, 1992, **64**, 153R–170R

[113] BARNABAS, I., J., DEAN, J., R., TOMLINSON, W., R., OWEN, S., P., *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 2064-2069

[114] HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 4005-4012

[115] TENA, M., T., CASTRO, M., D., L., VALCÁRCEL, M., *Chromatographia*, 1994, **38**, 431-435

[116] LANGENFELD, J., J., HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 338-344

[117] JANDA, V., BARTLE, K., D., CLIFFORD, A., A., *Journal of Chromatogaphy*, 1993, **642**, 283-299

[118] SCHANTZ, M., M., CHESLER, S., N., *Journal of Chromatography*, 1986, **363**, 397--401

[119] LOU, X., JANSSEN, H., G., CRAMERS, C., A., *Journal of Chromatography A*, 1997, **785**, 57-64

[120] POOLE, S., K., DEAN, T., A., OUDSEMA, J., W., POOLE, C., F., *Analytica Chimica Acta*, 1990, **236**, 3-42

[121] WENCLAWIAK, B., W., PASCHKE, T., KRAPPE, M., *Fresenius` Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **357**, 1128-1132

[122] FAHMY, T., M., PAULAITIS, M., E., JOHNON D., M., McNALLY. M., E., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 1462-1469

[123] LANGENFELD, J., J., HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., PAWLISZYN, J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 909-916

[124] YANG, Y. GHARAIBEH, A., HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry,* 1995, **67**, 641-646

[125] VEJROSTA, J., ANSORGOVÁ, A., MIKEŠOVÁ M., BARTLE. K., D., *Journal of Chromatography A*, 1994, **659**, 209-212

[126] FRIEDICH, C., CAMMANN, K., KLEIBÖHMER, W., *Fresenius` Journal of Analytical Chemistry*, 1995, **352**, 730-734

[127] BARNABAS, I., J., DEAN, J., R., OWEN, S., P., *Analyst,* 1994, **119**, 2381-2393

[128] DEUSTER, R., LUBAHN N., FRIEDICH, C., KLEIBÖHMER, W., *Journal of Chromatography A*, 1997, **785**, 227-238

[129] SCHLEUSSINGER, A., OHLMEIER, B., REISS, I., SHULZ, S., *Environmental Science and Technology*, 1996, **30**, 3199-3204

[130] BROWN, P., R., *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 995A-1007A

[131] MATISSEK, R., WITTKOWSKI, R., *Food Control and Research*, 1993, capítulo I.1

[132] NOVOTNY, M., *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 500A-509A

[133] EIROA, A., A., BLANCO, E., V., MAHÍA, P., L., LORENZO, S., M., RODRÍGUEZ, D., P., *Analyst*, 1998, **123**, 2113-2117

[134] PELTONEN, K., KULJUKKA, T., *Journal of Chromatography A*, 1995, **710**, 93-108

[135] FETZER, J., C., BIGGS, W., R., *Journal of Chromatography*, 1993, **642**, 319-327

[136] GONÇALVES, M., L., S., S., *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções*, FCG, Lisboa, 1983, capítulo 11

[137] SKOOG, D., A., LEARY, J., L., *Análise Instrumental*, Cuarta Édicion, McGrawHill Interamericana, 1994, capítulos 25, 26 e 27

[138] CHRISTIAN, G., D., O`REILLY, J., E., *Instrumental Analysis*, 1986, capítulo 21

[139] KEBBEKUS, B., B., BAPEDO, S., M., *Environmental Chemical Analysis*, 1998, capítulo 4

[140] FERRER, R., GUITERAS, J., BELTRÁN, J., L., *Journal of Chromatography A*, 1997, **779**, 123-130

[141] Operator`s Guide, *Waters 474 Scanning Fluorescence Detector*, Waters, Division of MILLIPORE, Milford, 1994

[142] MASON, R., P., *Marine Pollution Bulletin*, 1987, **18**, 528-533

[143] BELTRÁN, J., L., GUITERAS, J., FERRER, R., *Analytical Chemistry*, 1998, **70**, 1949-1955

[144] WENCLAWIAK, B., W., RATHMANN, C., TEUBER, A., *Fresenius`Journal of Analytical Chemistry*, 1992, **344**, 497-500

[145] JÄRVENPÄÄ, E., HUOPALAHTI, R., TAPANAINEN, P., *Journal of Chromatography and Related Technology*, 1996, **19**, 1473-1482

[146] PERFETTI, G., A., NYMAN, P., J., FISHER, S., JOE, F., L., Jr., DIACHENKO, G., W., *Journal of AOAC International*, 1992, **75**, 872-877

[147] DAFFLON, O., GOBET, H., KOCH, H., *Trav. Chim. Alim. Hyg*, 1995, **86**, 534-555

[148] SALAGOITY, M., H., GAYE, J., TRICARD, Ch., DESORMEAUX, M., N., SUDRAUD, P., *Science des Aliments*, 1990, **10**, 785-796

[149] MAY, W., E., WISE, S., A., *Analytical Chemistry*, 1984, **56**, 225-232

[150] ARES, J., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1993, **51**, 203--210

[151] GÖTZE, H., J., SCHNEIDER, J., HERZOG, H., G., *Fresenius` Journal of Analytical Chemistry*, 1991, **340**, 27-30

[152] NEVES, H., J., C., FREITAS, A., M., C., *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*, Dias de Sousa Lda., Póvoa de Santa Iria, 1996

[153] FERNANDES, J., O., *Cromatografia gasosa/Espectrometria de massa – Aplicação da técnica na análise de vinhos*, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, FFUP, Porto, 1993

[154] GUIOCHON, G., GUILLEMIN, C., L., *Journal of Chromatography Library – volume 42, Quantitative Gas Chromatography*, Elsevier Science Publishers, New YorK, 1988, capítulos 10, 11 e 15

[155] SCHWEDT, G., *The Essential Guide to Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, 1997, páginas 123 e 147

[156] AUER, W., MALISSA, H., Jr., *Analytica Chimica Acta*, 1990, **237**, 451-457

[157] MCCLENNEN, W., H., ARNOLD, N., S., ROBERTS, K., A., MEUZELAAR, H., L., C., LIGHTY, J., S., LINDGREN, E., R., *Combustion Science and Technology*, 1990, **74**, 297-309

[158] ROCHA, T., A., P., DUARTE, A., C., *Analyst*, 1997, **122**, 1509-1515

[159] SUZUKI, Y., IMAI, S., *Analyst*, 1985, **110**, 907-912

[160] POINTET, K., GONNORD, M., F., R., MILLIET, A., JAUDON, P., *Bulletin de la Societé Chimique de France*, 1997, **134**, 133-140

[161] BUTLER, A., C., SIBBALD, R., R., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1986, **37**, 570-578

[162] HERNÁNDEZ, J., E., MACHADO, L., T., CORBELLA, R., RODRÍGUEZ, M., A., MONTELONGO, F., G., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1995, **55**, 461-468

[163] WEBSTER, L., ANGUS, L., TOPPING, G., DALGARNO, E., J., MOFFAT, C., F., *Analyst*, 1997, **122**, 1491-1495

[164] BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., GARRIGUES, P., *Fresenius` Journal of Analytical Chemistry*, 1997, **359**, 502-509

[165] BEMGÅRD, A., COMLSJÖ, A., LUNDMARK, B., O., *Journal of Chromatography*, 1993, **630**, 287-295

[166] BEMGÅRD, A., COMLSJÖ, A., LUNDMARK, B., O., *Journal of Chromatography*, 1992, **595**, 247-258

[167] HIRATA, Y., NOVOTNY., M., PEADEN, P., A., LEE, M., L., *Analytica Chimica Acta*, 1981, **127**, 55-61

[168] GROB, K., *Chimia*, 1991, **45**, 109-113

[169] ÖSTMAN, C., BEMGÅRD, A., COLMSJÖ, A., *Journal of High Resolution Chromatography*, 1992, **15**, 437-443

[170] LEWIS, A., C., ASKEY, S., A., HOLDEN, K., M., BARTLE, K., D., PILLING, M., J., *Journal of High Resolution Chromatography*, 1997, **20**, 109-114

[171] TYRPIEN, K., JANOSZKA, B., BODZEK, D., *Journal of Chromatography A*, 1997, **774**, 111-120

[172] SHERMA, J., *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 1R-19R

[173] NIE, S., DADOO, R., ZARE, R., N., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 3571-3575

[174] WALBROEHL, Y., JORGENSON, J., W., *Analytical Chemistry*, 1986, **58**, 479-481

[175] SZOLAR, O., H., J., BROWN, R., S., LUONG, J., H., T., *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 3004-3010

[176] BROWN, R., S., LUONG, J., H., T., SZOLAR, O., H., J., HALASZ, A., HAWARI, J., *Analytical Chemistry*, 1996, **68**, 287-292

[177] NGUYEN, A., L., LUONG, J., H., T., *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 1726-1731

[178] DING, J., VOUROS, P., *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 379-384

[179] TERABE, S., MIYASHITA, Y., SHIBATA, O., BARNHART, E., R., ALEXANDER, L., R., PATTERSON, D., G., KARGER, B., L., HOSOYA, K., TANAKA, N., *Journal of Chromatography*, 1990, **516**, 23-31

[180] YIK, Y., F., ONG, C., P., KHOO, S., B., LEE, H., K., LI, S., B., Y., *Journal of Chromatography*, 1992, **589**, 333-338

[181] COPPER, C., L., SEPANIAK, M., J., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 147-154

[182] KANETA, T., YAMASHITA, T., IMASAKA, T., *Analytica Chimica Acta*, 1995, **299**, 371-375

[183] BRÜGGEMANN, O., FREITAG, R., *Journal of Chromatography A*, 1995, **717**, 309--324

[184] KRISMANN, U., KLEIBÖHMER, W., *Journal of Chromatography A*, 1997, **774**, 193-201

[185] NÚÑEZ, M., D., CENTRICH, F., *Analytica Chimica Acta*, 1990, **234**, 269-273

[186] Gouvernment du Québec, Ministére de l`Environnment, Direction des Substances Dangereuses, *Criteria for Ascertaining the Contamination of Soil and Ground Water*

[187] Environment WCD, *Interim Canadian Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites*, 1994

[188] Jornal Oficial das Comunidades Europeias, 5.12.98, *Directiva 98/83/CE do Conselho* de 3 de Novembro de 1998 relativa à qualidade da água destinada a consumo humano

[189] INSTITUTO GEOGRÁFICO DO EXÉRCITO, *Carta Militar de Portugal*, Foz do Sousa (Gondomar), Folha 134, Escala 1:25000, IGE, Lisboa, 1998

[190] QUEVAUVILLER, P., DONARD, O., F., X., *Journal of Environmental Monitoring*, 1999, **1**, 503-513

[191] ROSEN, A., A., MIDLLETON, F., M., *Analytical Chemistry*, 1955, **27**, 790-794

[192] REIMER, G., SUAREZ, A., *Journal of Chromatography A*, 1995, **699**, 253-263

[193] HARTMANN, R., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 1996, **62**, 161-173

[194] FARIA, M., A., R., P., *Optimization of an HPLC technique and sample pretreatment for PAH analysis*, Department of Analytical Chemistry, University of Siegen, Germany, June, 1996

[195] HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., BURFORD, M., D., LANGENFELD, J., J., TILOTTA, S., E., LOVIE, P., K., *Journal of Cromatography*, 1993, **642**, 301-317

[196] HAWTHORNE, S., B., GALY, A., B., SCHMITT, V., O., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry*, 1995, **67**, 2723-2732

[197] GONÇALVES, C., ALPENDURADA., M., F., *Handling of Environmental Samples: SFE as a tool for the extraction of PAHs in soil samples*, Laboratory of Hidrology, Pharmacy Faculty, Oporto University and IAREN – Water Institute of the Northern Region, Oporto; submitted for publication and presented at the 9 th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Oporto, 1999

[198] PINTO, M., R., ALPENDURADA, M. F., *PAH in drinking water by Solid Phase Microextraction and High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection*, Laboratory of Hidrology, Pharmacy Faculty, Oporto University and IAREN – Water Institute of the Northern Region, Oporto; submitted for publication and presented at the 9 th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Oporto, 1999

[199] HUBER, L., *LC-GC Internacional*, 1998, **96**-105

[200] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, *Text on Validation of Analytical Procedures*, ICH, Steering Comittee, October, 1996

[201] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, *Text on Validation of Analytical Procedures*, ICH, Steering Comittee, October, 1994

[202] MAZZERA, D., HAYES, T., LOWENTHAL, D., ZIELINSKA, B., *The Science of the Total Environment*, 1999, **229**, 65-71

[203] RELNDL, S., HÖFLER, F., *Analytical Chemistry*, 1994, **66**, 1808-1816

[204] MIGASZEWSKI, Z., *Water, Air and Soil Pollution*, 1999, **111**, 123-138

[205] AFONSO, M., M., PORTELA, C., PINTO, M., CUNHA, A., ALPENDURADA, F., FERNANDES, J., O., PINTO, M., *Análise de PAH: pré-purificação por TLC-$AgNO_3$*, XII Encontro Luso-Galego de Química, Porto, 1998

[206] GERE, D., R., DERRICO, E., M., 1994, *LC-GC International*, **7**, 325-331

[207] ACS COMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT, *Analytical Chemistry*, 1983, **55**, 2210-2218

[208] PRASAD, S., S., *Trends in Analytical Chemistry*, 1994, **13**, 157-163

[209] ANTÓNIO, N., S., *Qualidade – Teoria e Prática*, Edições Sílabo Lda., Lisboa, 1991, capítulo 6

[210] ACS COMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT, *Analytical Chemistry*, 1980, **52**, 2242-2249

[211] VALCÁRCEL, M., RÍOS, A., *Journal of AOAC International*, 1994, **77**, 785-789

[212] QUEVAUVILER, Ph., *Trends in Analytical Chemistry*, 1994, **13**, 404-409

[213] VIALLE J., LINET, P., MAIER, E., A., *Analusis*, 1999, **27**, 479-490

[214] POE, R., B., RUTAN, S., C., *Analytica Chimica Acta*, 1993, **283**, 845-853

[215] JARDY, A., VIAL, J., *Analusis*, 1999, **27**, 511-519

[216] http:\\ www.waters.com/Waters_Website/Applications/validate/term_def.htm, Maio, 1999

[217] BURFORD, M., D., HAWTHORNE, S., B., MILLER, D., J., *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 1497-1505

[218] SAIM, N., DEAN, J., R., ABDULLAH, M., P., ZAKARIA, Z., *Journal of Chromatography A*, 1997, **791**, 361-366

[219] MACKAY, D., SHIU, W., Y., MA, K., C., *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Inorganic Chemicals*, vol. 2, CRC Press, 1991

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA