

### 3

## Determinação de azaarenos básicos em querosene por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência

### 3.1.

#### Cromatografia líquida de alta eficiência

Cromatografia líquida (LC, do inglês “*liquid chromatography*”) é o nome genérico usado para descrever qualquer procedimento cromatográfico no qual a fase móvel é um líquido. Em LC convencional em coluna aberta, o eluente passa através da coluna, preenchida com material sólido composto por partículas de 150 a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sob a força da gravidade. Os componentes da mistura são arrastados através da coluna pelo eluente e a separação ocorre devido à distribuição diferencial dos componentes da amostra entre as fases móvel e estacionária. No entanto, a LC clássica em coluna aberta apresenta algumas desvantagens, dentre as quais podemos citar o fato de a eficiência da separação obtida ser relativamente baixa e a separação ser lenta mesmo para misturas razoavelmente simples [48].

O principal fator limitante para o desempenho da LC clássica é a queda da taxa de difusão das moléculas de soluto entre as fases devido ao uso de um eluente líquido. A chave para melhorar a eficiência das separações em LC implicou em aumentar a taxa de transferência de massa e promover o equilíbrio das moléculas do soluto entre as fases móvel e estacionária, o que pôde ser obtido com o uso de fases estacionárias compostas por partículas de menor tamanho (3 a 10  $\mu\text{m}$ ). Concomitantemente ao uso de partículas pequenas, a aplicação de alta pressão através das colunas foi necessária para promover a eluição da fase móvel e, conseqüentemente, equipamentos para cromatografia líquida de alta eficiência foram desenvolvidos para suportar tais pressões [48].

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês “*high performance liquid chromatography*”) é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa

sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais [49]. A técnica tem a capacidade de promover separações e determinações quantitativas de uma grande quantidade de substâncias presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução e sensibilidade.

A HPLC é uma técnica de separação hoje bem estabelecida, sendo um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos em análises de rotina e de pesquisa. Foi estimado que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método analítico baseado na HPLC em fase reversa (RP, do inglês “*reverse phase*”) [49]. Sistemas de HPLC em fase normal (NP, do inglês “*normal phase*”) consistem de uma fase estacionária de maior polaridade e uma fase móvel de menor polaridade, enquanto em HPLC-RP as polaridades das fases são invertidas. Além disso, a separação em RP com fases quimicamente ligadas apresenta várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo (metanol, etanol, água entre outros); fases estacionárias estáveis e de variados tipos; obtenção de rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutividade dos tempos de retenção. Por causa disso, a HPLC-RP é muito aplicada à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

A fluorescência tem sido extremamente útil como um processo de detecção e detectores baseados em medições de fluorescência compõem uma das alternativas mais sensíveis para a detecção de analitos separados por HPLC. Quando luz é emitida por moléculas que foram excitadas por radiação eletromagnética, o fenômeno é chamado fotoluminescência. As técnicas de detecção baseadas na fluorescência conferem ótima detectabilidade para analitos naturalmente fluorescentes ou para os analitos derivados quimicamente com o intuito de fluorescerem, porém, a fluorescência é também sensível à instabilidade das condições de operação do instrumento, como temperatura e pressão [50].

Uma das principais vantagens da detecção de fluorescência é a possibilidade de obter uma sensibilidade até três ordens de grandeza maior que a observada com detecção absorciométrica na região do UV-vis, a técnica mais comumente usada para detecção em HPLC. A detecção de fluorescência é também mais seletiva por conta da seleção da frequência de excitação e pela

habilidade em discriminar entre analitos e interferentes, quando estes últimos não fluorescem. Nos detectores baseados em fluorescência, a luz emitida pelo analito é medida contra um sinal de fundo muito baixo (baixo nível de ruído), devido à seleção do comprimento de onda de excitação, resultando no alcance de menores limites de detecção [51].

Moléculas cujas estruturas são formadas por anéis aromáticos ou ligações duplas conjugadas favorecem a detecção por fluorescência, permitindo alta sensibilidade e especificidade (quando aliados o poder de separação da cromatografia e a seletividade da detecção com par de comprimentos de excitação e de emissão característicos do analito de interesse) mesmo em amostras complexas. Em condições favoráveis, é possível detectar quantidades de analitos da ordem de picogramas, o que é um valor comparável aos detectores por captura de elétrons usados em cromatografia em fase gasosa.

## **3.2. Procedimentos experimentais para as separações por HPLC**

### **3.2.1. Avaliação do procedimento de extração**

A fim de verificar a adequação do procedimento de extração dos azaarenos básicos às amostras de QAV e de querosene comercial (descrito no item 2.1.2), amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos padrões dos analitos e amostras não-fortificadas foram analisadas sob as mesmas condições. Esperava-se com isso avaliar o procedimento de extração com relação a sua capacidade de recuperação dos analitos e a eliminação da presença dos interferentes e avaliar o efeito da matriz sobre o perfil dos cromatogramas. Uma amostra de QAV foi fortificada com  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito e uma amostra de querosene comercial foi fortificada com quantidades diferentes de cada analito, variando entre 30 e  $66 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os valores de recuperação foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração ( $\text{FPC} = \text{volume final do extrato} / \text{volume de amostra usado para a extração}$ ) e a diferença entre a concentração do analito na amostra fortificada e sua concentração na amostra antes da fortificação, de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Rec} = 100 \times \frac{\text{concentração após a fortificação} - \text{concentração antes da fortificação}}{\text{concentração adicionada do analito} \times \text{FPC}}$$

Equação 1

Além disso, para explicitar ainda mais a eficiência da extração com relação a sua capacidade de eliminar a interferência das substâncias neutras, o mesmo procedimento de extração foi aplicado a uma mistura sintética contendo os analitos, HPA e substâncias nitrogenadas neutras para simular a presença de interferentes. Um volume de 10,00 mL de uma solução em DCM contendo os seis azaarenos básicos, além de CBZ, Indol, 3MI, PIR, CRI e BaP foram utilizados no procedimento de extração. A concentração de cada uma dessas substâncias na solução foi de  $7,2 \mu\text{g L}^{-1}$ . O extrato resultante dessa solução, chamado de extrato controle, foi analisado por HPLC-FD na expectativa de encontrar apenas as substâncias básicas. Para comparação, uma solução padrão preparada em metanol:amônia 96:4 em volume (correspondendo ao solvente final do procedimento de extração), contendo essas mesmas substâncias, cada uma na concentração  $36 \mu\text{g L}^{-1}$ , foi também analisada por HPLC-FD. A concentração esperada de cada substância no extrato controle, levando em conta o FPC de cinco vezes e uma recuperação de 100%, correspondia a  $36 \mu\text{g L}^{-1}$ , o que possibilitou a comparação direta entre os cromatogramas da solução padrão e do extrato controle.

### 3.2.2.

#### A análise por HPLC-FD

As análises por HPLC-FD foram realizadas em fase reversa (coluna C18, 150 mm x 4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ) e as separações foram realizadas a 35 °C com uma vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Várias fases móveis compostas por acetonitrila (ACN) e água e ACN e tampão fosfato, incluindo diferentes gradientes de eluição, foram testados para separar os seis azaarenos básicos. Os espectros de excitação e de emissão das soluções das substâncias puras, preparadas em ACN:tampão fosfato pH 6,5 (1:1), foram utilizados para a determinação dos comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão. A detecção por fluorescência foi realizada aplicando-se uma programação com os comprimentos de onda máximos característicos dos analitos de modo a obter maior sensibilidade. As

condições de eluição e de detecção selecionadas para a determinação dos seis analitos investigados estão descritas, respectivamente, na Figura 2 e na Tabela 1.

A determinação quantitativa dos azaarenos básicos foi realizada através de uma curva analítica, na faixa de concentração de 0,500 a 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $2,50 \times 10^{-3}$  a 1,25 ng injetados), com cinco níveis de concentração em triplicata, utilizando as áreas dos picos como resposta analítica. A identificação dos analitos foi baseada na comparação entre os tempos de retenção obtidos para os padrões dos analitos e os obtidos para as mesmas substâncias identificadas nas amostras de QAV fortificado e não-fortificado, obtidos nas mesmas condições. Além disso, para aumentar o grau de certeza na identificação dos analitos, os cromatogramas da solução padrão e dos extratos das amostras foram também obtidos usando detecção de fluorescência com um par de comprimentos de onda de excitação/emissão ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ ) menos sensível (250/395 nm), mas com o qual todos os analitos eram detectados. A razão entre a área obtida com o programa de detecção apresentado na Tabela 1 e aquela obtida com o par 250/395 nm foi calculada para cada analito. A identidade do analito era confirmada quando as razões calculadas eram as mesmas para a solução padrão e para o extrato da amostra.

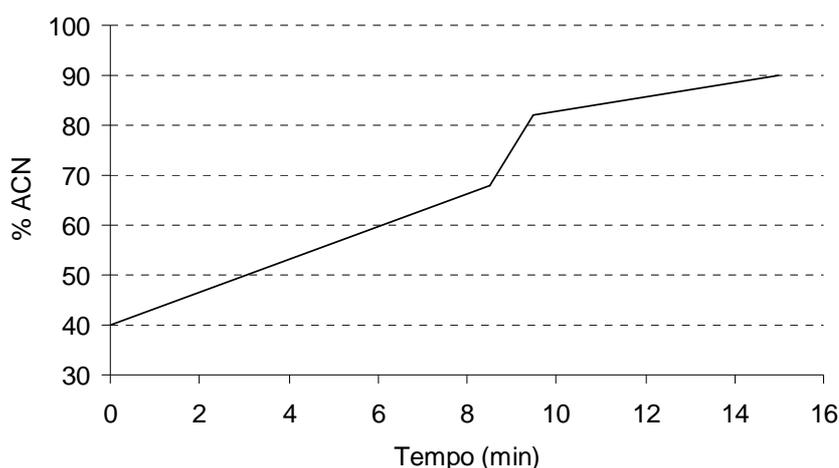


Figura 2 - Gradiente de eluição usado para a análise de amostras de querosene usando HPLC-FD. Gradiente composto por ACN e tampão fosfato 10  $\text{mmol L}^{-1}$  pH 6,5. Coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0  $\mu\text{m}$ ), 35°C, vazão de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Tabela 1 – Programa de detecção usado para as análises cromatográficas das amostras de querosene usando HPLC-FD.

Canal 1			Canal 2		
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	Substância		$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	Substância
0 - 5 min	240/361	9ATHA	0 - 9 min	247/422	A/9MA
5 - 15 min	263/367	78BQ	9 – 12,5 min	290/410	DBA
			12,5 - 15 min	285/412	79DMBA

### 3.3.

#### Resultados e discussão

##### 3.3.1.

##### Avaliação do procedimento de extração

Uma solução padrão em DCM contendo os seis azaarenos básicos, três azaarenos neutros (CBZ, Indol e 3MI) e três HPA (PIR, CRI e BaP), foi utilizada para examinar a eficiência do procedimento de extração em eliminar os interferentes neutros. A fração básica resultante dessa extração foi denominada extrato controle. Com o objetivo de avaliar qualquer perda de analito durante o procedimento, uma solução padrão contendo os seis azaarenos básicos, na mesma concentração esperada para 100% de recuperação no extrato controle, foi preparada e usada como referência para o cálculo dos valores de recuperação. Nesse caso, para possibilitar a comparação direta entre os cromatogramas da solução padrão e do extrato controle, foi necessário mudar o gradiente de eluição e o esquema de detecção para tornar possível a separação e a detecção de todas as substâncias presentes na mistura contendo, além dos analitos básicos, as substâncias neutras adicionadas para simular a presença de interferentes. As condições de eluição e de detecção selecionadas para a cromatografia dos seis analitos investigados mais os interferentes estão descritas, respectivamente, na Figura 3 e na Tabela 2. Os cromatogramas do extrato controle e da solução padrão estão apresentados na Figura 4. Como pode ser observado nessa figura, o procedimento de extração forneceu resultados satisfatórios para o isolamento dos azaarenos básicos, visto que o cromatograma do extrato controle não apresentou pico para nenhuma das substâncias neutras e a recuperação dos analitos ficou entre 94 e 104%, exceto para a 9ATHA que apresentou um valor de recuperação mais baixo (82%).

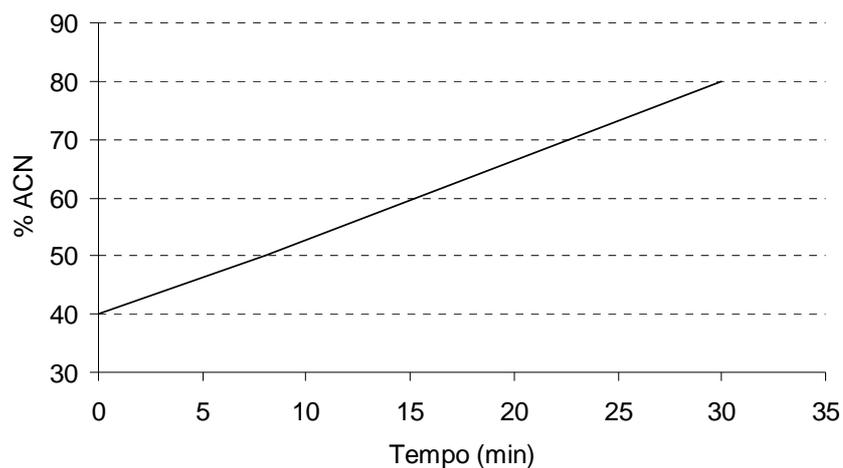


Figura 3 - Gradiente de eluição usado para a análise do extrato controle usando HPLC-FD. Gradiente composto por ACN e tampão fosfato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5. Coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 5,0 μm), 35°C, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Tabela 2 - Programa de detecção usado para a separação cromatográfica do extrato controle usando HPLC-FD.

Canal 1		Canal 2	
$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)		$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	
0 – 30 min	234/374	0 – 30 min	374/446
Substâncias	9ATHA, Indol, 3MI, 78BQ, CBZ, CRI, PIR	Substâncias	A, 9MA, DBA, 79DMBA, BaP

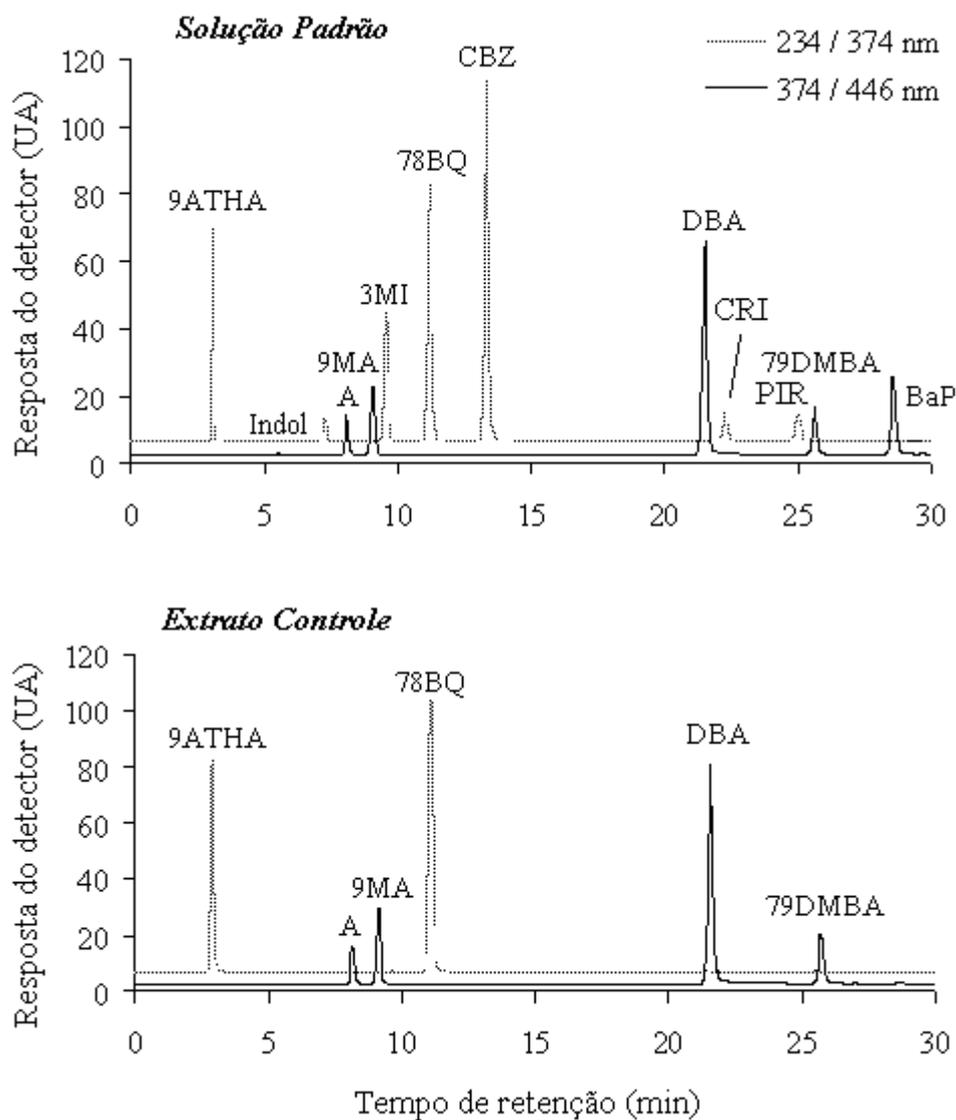


Figura 4 – Cromatogramas de uma solução padrão  $36 \mu\text{g L}^{-1}$  e do extrato controle. Coluna C18 XTerra, fase móvel: 0 – 8 min: ACN:tampão fosfato (40:60) para ACN:tampão fosfato (50:50), 8 – 30 min: ACN:tampão fosfato (50:50) para ACN:tampão fosfato (80:20). T =  $35^\circ\text{C}$ .

### 3.3.2. A análise cromatográfica

As condições cromatográficas foram otimizadas de modo a fornecerem uma separação rápida e com boa resolução para os azaarenos básicos. Diferentes gradientes de eluição compostos por ACN e água ou ACN e tampão fosfato ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 6,5) foram testados para separar os seis analitos. Foi observado que quando era utilizada uma fase móvel composta por ACN e água, a área do pico da 9ATHA era pequena e variava muito. Para aumentar o sinal fluorescente da 9ATHA, o pH do tampão na fase móvel deveria ser maior que 7 [35], mas, para evitar a hidrólise da fase estacionária, este valor foi fixado em 6,5.

Os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão, obtidos através dos espectros de excitação e de emissão das soluções das substâncias puras, preparadas em ACN:tampão fosfato pH 6,5 (1:1), coincidiram com os obtidos por WILHELM (2000) [35], que determinou uma série de substâncias nitrogenadas básicas em produto da degradação térmica de polímeros por HPLC-FD.

Sob as condições de separação e detecção apresentadas, respectivamente, na Figura 2 e na Tabela 1, selecionadas para a determinação dos seis analitos investigados, a separação completa dos azaarenos A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA, foi obtida com os tempos de retenção ( $t_R$ ) para todas as substâncias menores que 15 min. A repetitividade e a precisão intermediária entre dias para os valores de  $t_R$  foram calculadas a partir do resultado de sete determinações por dia realizadas em dois dias diferentes. A análise de variância desses resultados foi realizada através do programa Microsoft® Office Excel 2003 e os desvios-padrão relativos (DPR) para repetitividade e para precisão intermediária entre dias foram menores que 0,3% para todos os analitos.

Para a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito, curvas analíticas foram construídas na faixa de resposta linear, sendo que cada ponto das curvas foi o resultado de três análises cromatográficas. As curvas analíticas (Figura 5, Figura 7, Figura 9, Figura 11, Figura 13 e Figura 15) foram construídas a partir das áreas dos picos em função da massa de analito injetada e a melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada pelo método dos mínimos quadrados com a ajuda do programa Microsoft® Office Excel 2003. Apesar de os gráficos dos resíduos (Figura 6, Figura 8, Figura 10, Figura 12, Figura 14 e Figura 16)

indicarem uma leve tendência, ou seja, um comportamento heterocedástico dos dados, isso não chega a comprometer a quantificação através das curvas analíticas, já que o desvio da linearidade é pequeno. Um comportamento homocedástico foi assumido para aplicação de regressão linear simples. O comportamento linear na faixa de trabalho estudada foi indicado pelos valores dos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) superiores a 0,99, apresentados na Tabela 3.

A análise por HPLC-FD com a aplicação do programa de detecção, usando os pares  $\lambda_{em}/\lambda_{exc}$  ótimos para cada um dos seis analitos investigados, permitiu a determinação dos mesmos em níveis de concentração bastante baixos. Esses pares  $\lambda_{em}/\lambda_{exc}$  foram selecionados a partir de avaliação prévia dos espectros de fluorescência de cada analito em ACN:tampão fosfato (1:1). Os limites de detecção (LOD, do inglês “*limit of detection*”) e de quantificação (LOQ, do inglês “*limit of quantification*”) foram determinados como a concentração do analito que resultou em uma área do pico igual a 3 e 10 vezes o ruído da linha base do cromatograma, respectivamente, de acordo com a literatura [52]. Os valores de LOD para os azaarenos básicos ficaram entre 0,0013 e 0,021 ng injetados (0,26 e 4,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e os valores de LOQ entre 0,0044 e 0,072 ng injetados (0,88 e 14  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A Tabela 3 mostra os parâmetros de validação determinados para o método HPLC-FD.

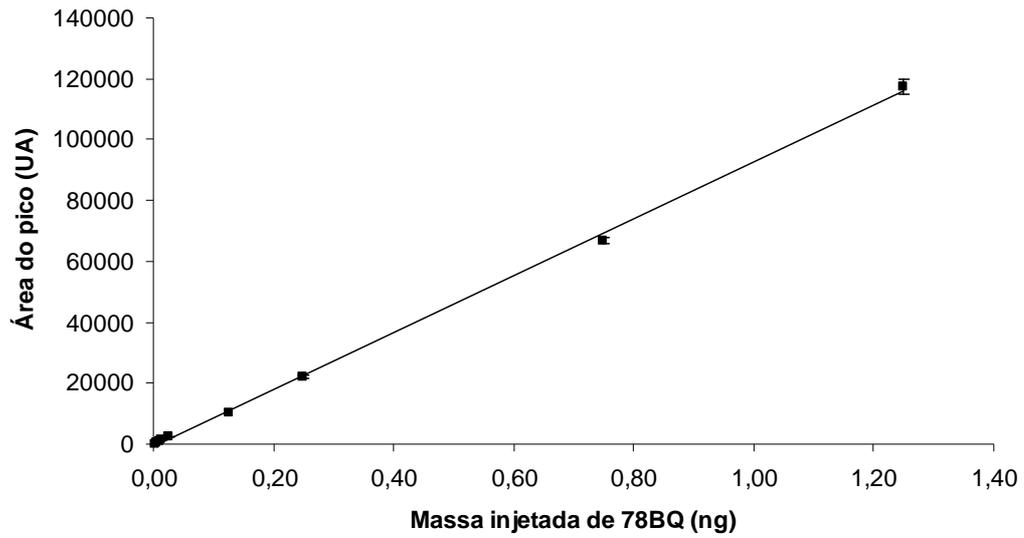


Figura 5 - Curva analítica da 7,8-benzoquinolina para determinações por HPLC.

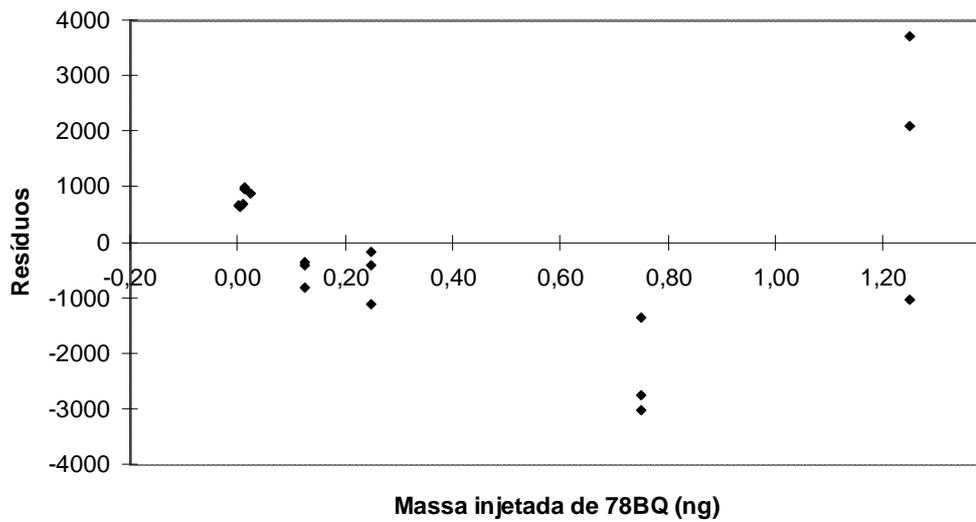


Figura 6 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de 7,8-benzoquinolina (78BQ).

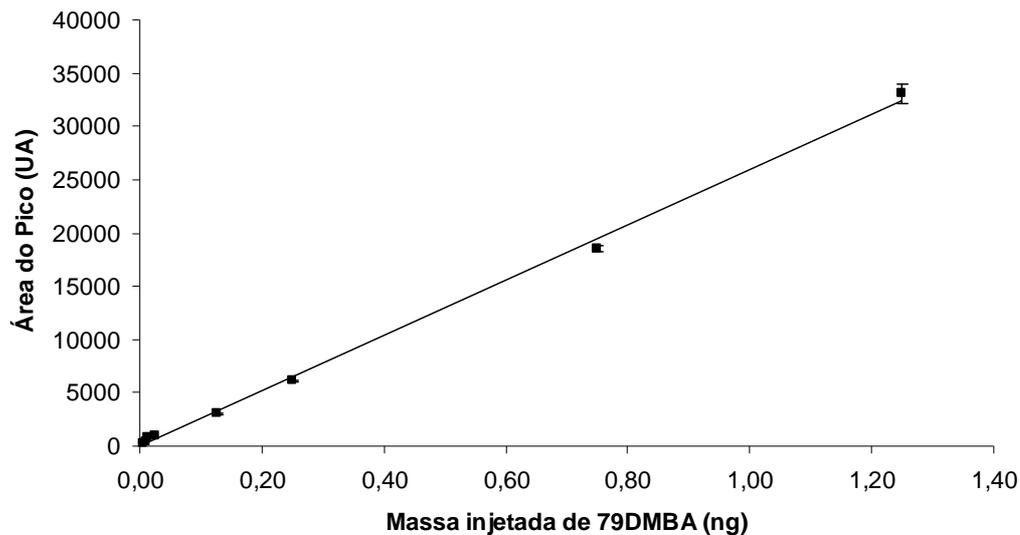


Figura 7 - Curva analítica para a 7,9-dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA) para determinações por HPLC.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0510427/CA

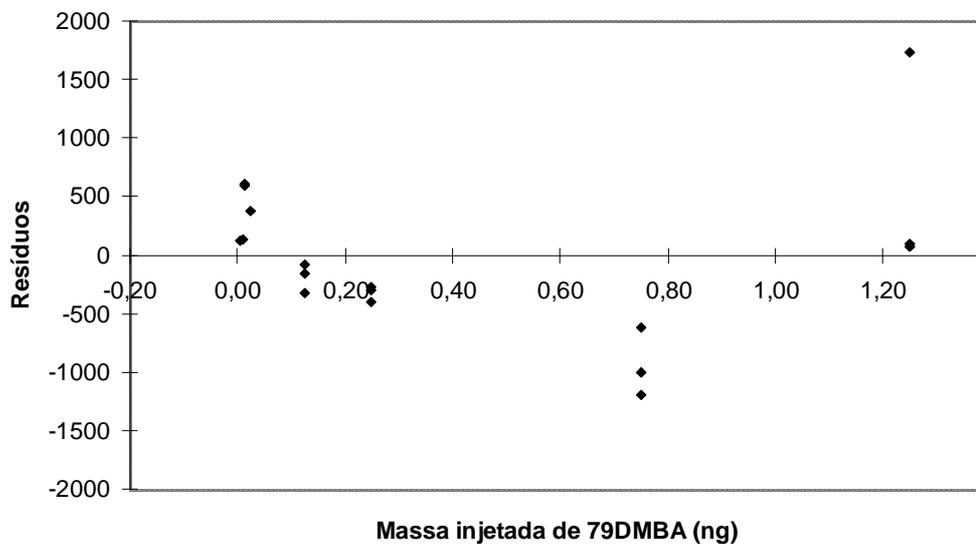


Figura 8 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de 7,9-dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA).

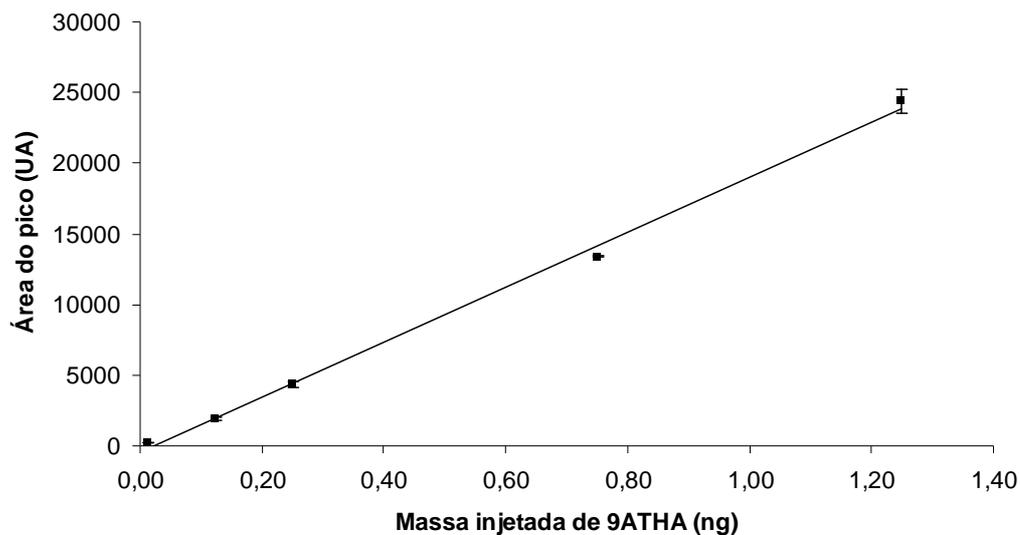


Figura 9 - Curva analítica para a 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA) para determinações por HPLC.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0510427/CA

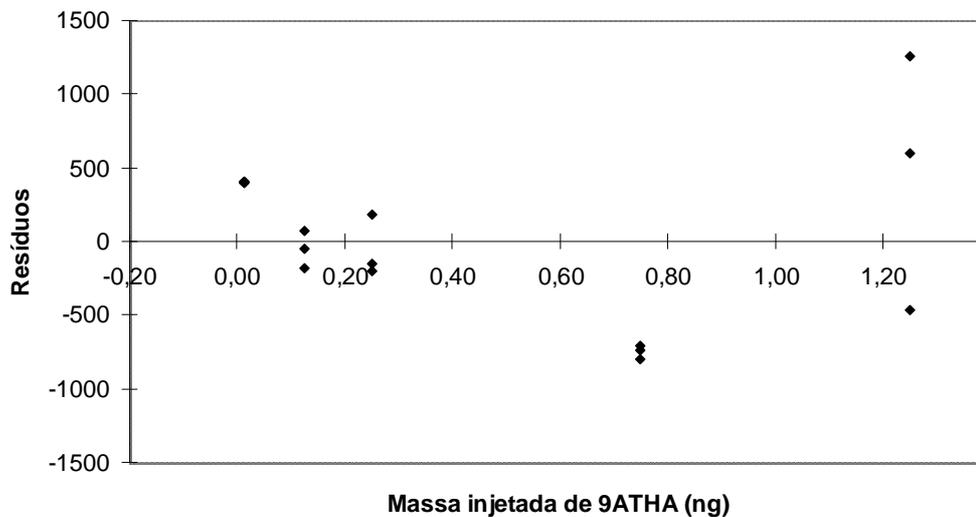


Figura 10 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA).

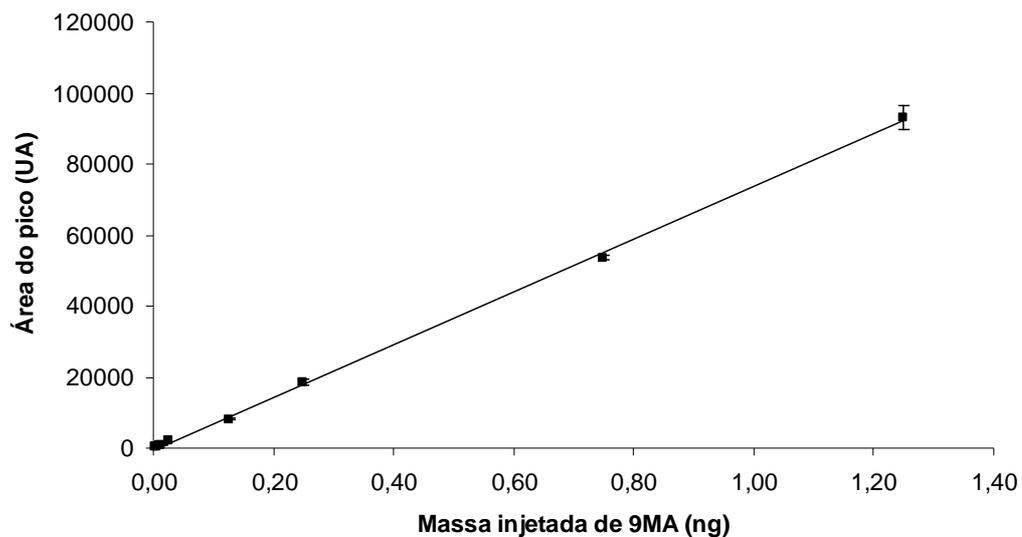


Figura 11 – Curva analítica para a 9-metilacridina (9MA) para determinações por HPLC.

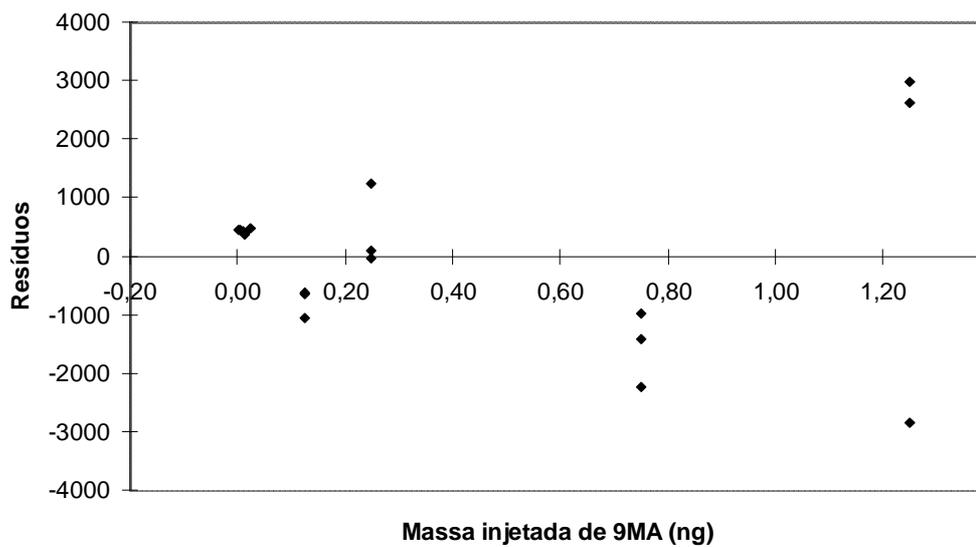


Figura 12 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de 9-metilacridina (9MA).

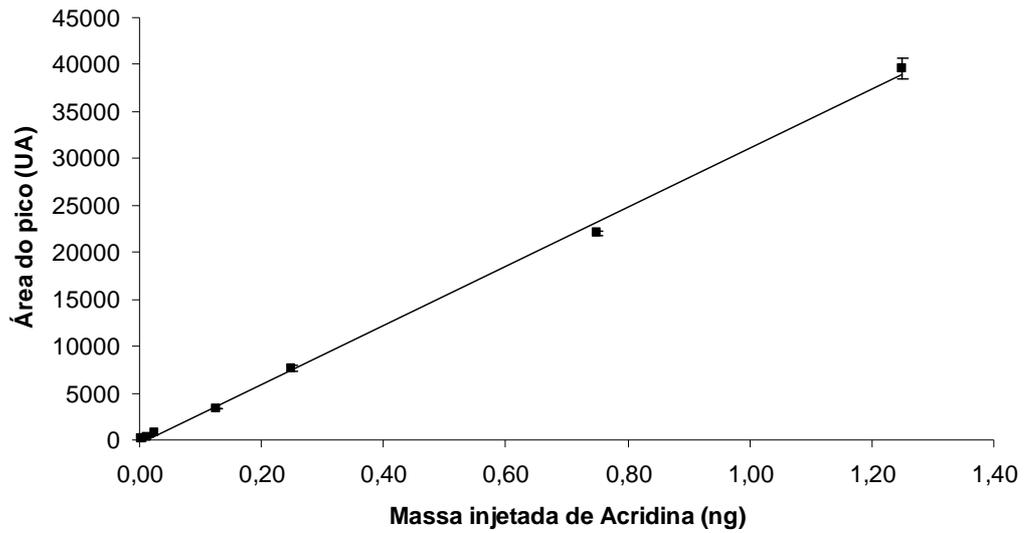


Figura 13 - Curva analítica para a acridina (A) para determinações por HPLC.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0510427/CA

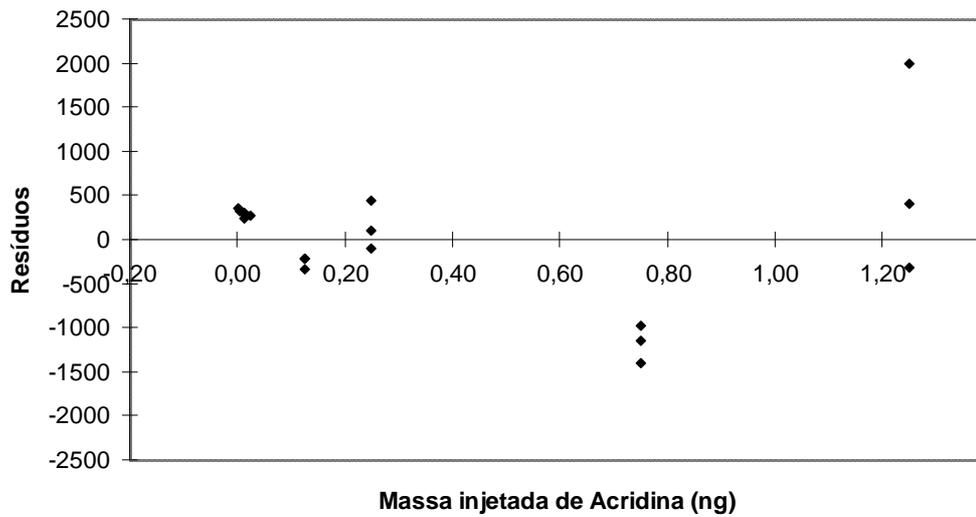


Figura 14 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de acridina.

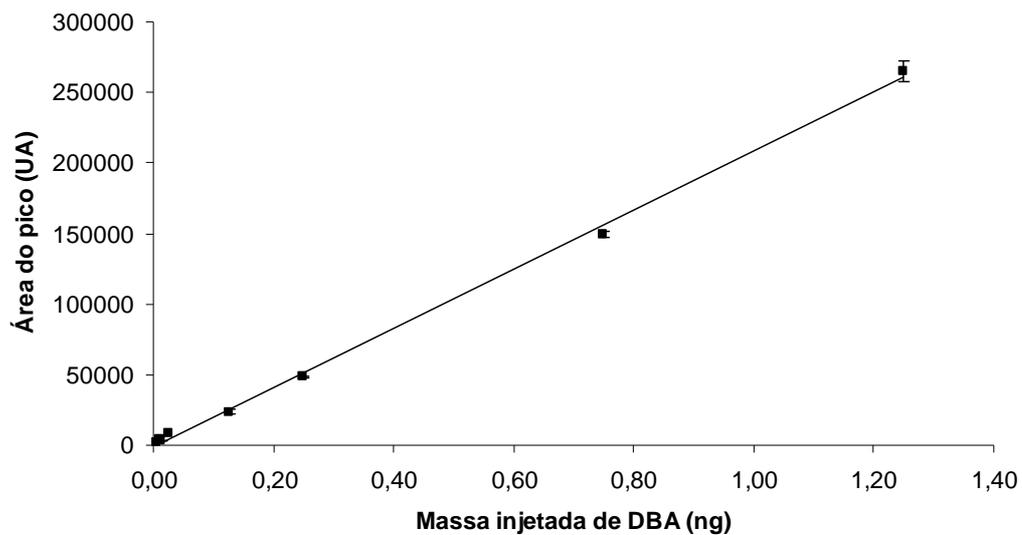


Figura 15 - Curva analítica para a dibenzo[a,]acridina (DBA) para determinações por HPLC.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0510427/CA

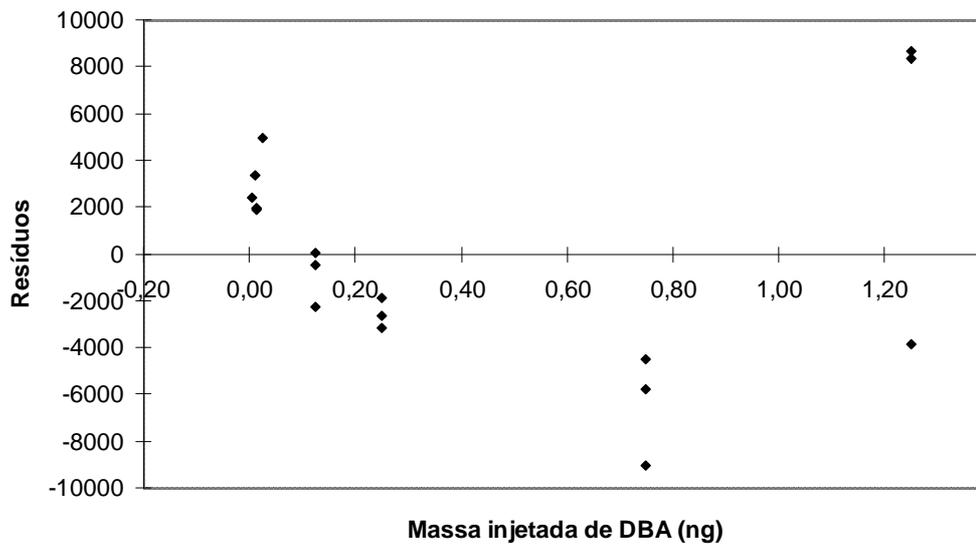


Figura 16 - Gráfico de resíduos para a análise cromatográfica de dibenzo[a,]acridina (DBA).

Tabela 3 - Resultados de validação para o método HPLC-FD.

	Faixa linear (ng)	Equação da curva analítica, $y = ax + b$ <sup>a</sup>		$r^2$	LOD ng injetados <sup>b</sup>	LOQ ng injetados <sup>b</sup>
		a	b			
9ATHA	0,017 - 1,25	$1,95 \times 10^4 \pm 329$	$-468 \pm 218$	0,9963	0,0050	0,017
78BQ	0,0044 - 1,25	$9,37 \times 10^4 \pm 1005$	$-1053 \pm 667$	0,9985	0,0013	0,0044
A	0,0083 - 1,25	$3,15 \times 10^4 \pm 467$	$-467 \pm 310$	0,9972	0,0025	0,0083
9MA	0,020 - 1,25	$7,43 \times 10^4 \pm 923$	$-680 \pm 613$	0,9980	0,0061	0,020
DBA	0,014 - 1,25	$2,11 \times 10^5 \pm 2765$	$-3026 \pm 1835$	0,9978	0,0043	0,014
79DMBA	0,072 - 1,25	$2,61 \times 10^4 \pm 420$	$-111 \pm 279$	0,9966	0,021	0,072

<sup>a</sup>  $y$  = área do pico do analito;  $x$  = quantidade injetada de analito, ng.

<sup>b</sup> 5  $\mu$ L injetados.

### 3.3.3.

#### Análise das amostras de QAV e querosene comercial

O método HPLC-FD em estudo foi aplicado para a determinação dos seis azaarenos básicos em três amostras de QAV, denominadas como Amostra I, Amostra II e Amostra III, além de uma amostra de querosene comercial. Para avaliar a exatidão, uma das amostras de QAV foi fortificada com  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito e a amostra de querosene comercial foi fortificada com diferentes quantidades de cada analito ( $30$  a  $66 \mu\text{g L}^{-1}$ ). As amostras passaram pelo procedimento de extração antes da análise pelo método HPLC-FD. As amostras não-fortificadas foram utilizadas como branco para o cálculo da recuperação.

Uma parte de uma das amostras de QAV (Amostra III), antes de ser fortificada com os analitos, foi previamente percolada em bauxita. O processo de percolação consistiu em passar, lentamente,  $25 \text{ L}$  de QAV através de uma coluna de  $180 \text{ cm}^3$  cheia com o adsorvente bauxita ( $30 - 60 \text{ mesh}$ ). O objetivo do uso desse tratamento, neste caso, foi o de remover as substâncias nitrogenadas do querosene [11] e avaliar a aplicabilidade do método através da análise da amostra antes e após a percolação. Na Figura 17 são mostrados os cromatogramas da amostra de querosene comercial fortificado e não-fortificado, amostra esta que não foi percolada em bauxita. Na Figura 18A e na Figura 18B são mostrados os cromatogramas da amostra de QAV percolado em bauxita com e sem fortificação, respectivamente. Os analitos foram quantificados pelo método de interpolação na curva analítica e as recuperações ficaram entre  $92$  e  $107\%$  para o QAV (

Tabela 4) e entre 83 e 104% para o querosene comercial (Tabela 5), cada valor sendo a média de sete ou três ensaios independentes, respectivamente. A única exceção foi a recuperação da 9ATHA, que foi 68% para o QAV e 48% para o querosene comercial, provavelmente devido ao seu alto valor de pKa, o que causa uma forte retenção deste analito no adsorvente PRS e, em consequência, dificuldade na eluição.

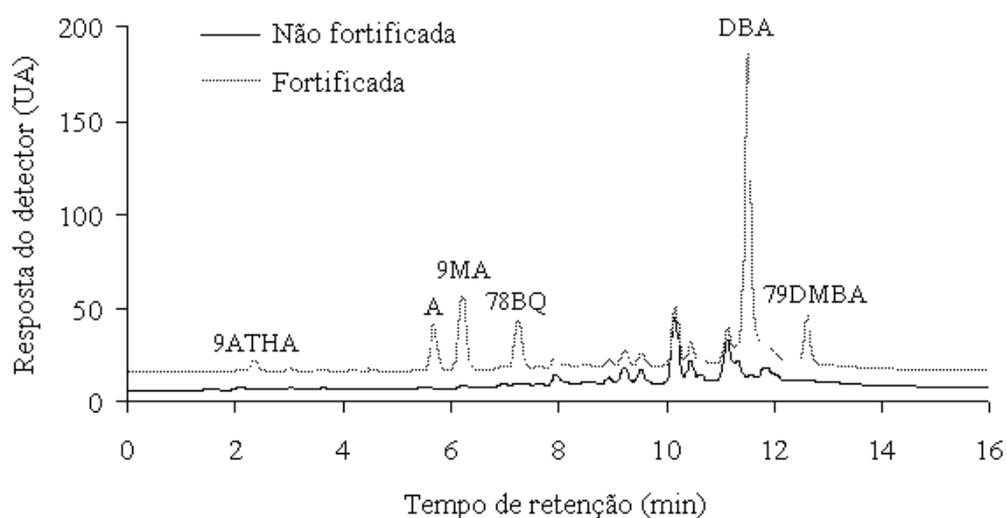


Figura 17 - Cromatogramas da amostra de querosene comercial não fortificado e fortificado com diferentes concentrações de cada analito. Coluna C18 XTerra, condições de separação e detecção descritas, respectivamente, na Figura 2 e na Tabela 1.

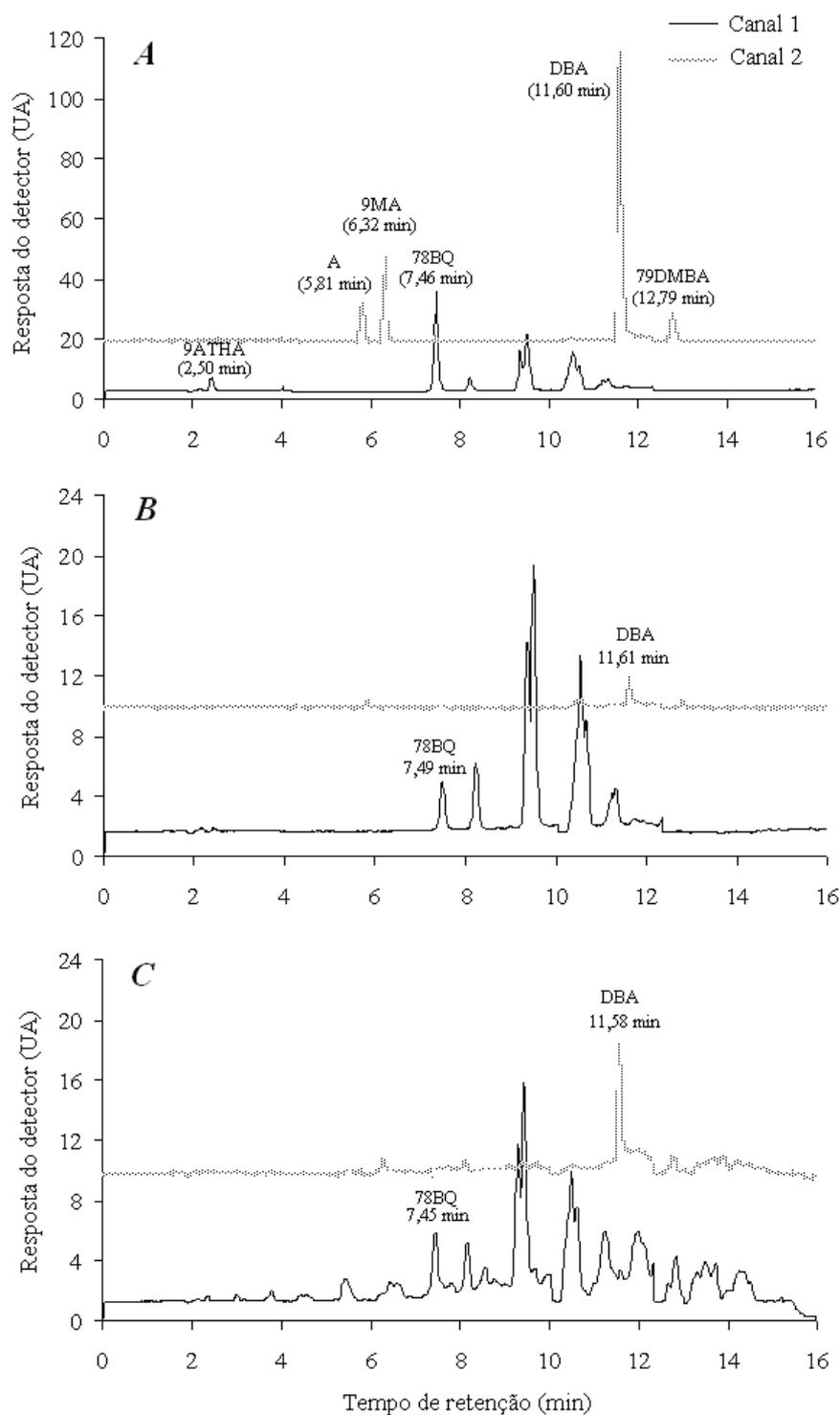


Figura 18 - Cromatogramas de: amostra de QAV tratado (percolado em coluna de bauxita) e fortificado com  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito (A); amostra de QAV tratado sem fortificação (B); amostra de QAV não tratado sem fortificação (C). Coluna C18 XTerra, condições de separação e detecção descritas, respectivamente, na Figura 2 e na Tabela 1.

Tabela 4 - Precisão e recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada.

	Concentração fortificada		Recuperação <sup>a</sup>	Repetitividade <sup>a</sup>	Precisão Intermediária <sup>a</sup>	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados <sup>b</sup>	%	%DPR	entre dias (%RSD)	entre analistas (%RSD)
9ATHA	6,0	0,15	68	13	40	39
78BQ	6,0	0,15	97	4,8	5,6	3,5
A	6,0	0,15	107	4,4	11	11
9MA	6,0	0,15	92	6,5	14	12
DBA	6,0	0,15	96	2,7	5,5	7,9
79DMBA	6,0	0,15	105	4,7	6,0	14

<sup>a</sup> Cada valor é a média de sete ensaios independentes. A recuperação foi calculada a partir da área do pico do analito na amostra de QAV fortificada.

<sup>b</sup> Esses valores foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração do procedimento de extração (cinco vezes).

Tabela 5 – Repetitividade e recuperação dos azaarenos básicos em amostra fortificada de querosene doméstico.

	Concentração fortificada		Recuperação <sup>a</sup>	Repetitividade <sup>a</sup>
	$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados <sup>b</sup>	%	%RSD
9ATHA	48	1,2	54	6,6
78BQ	38	0,96	104	2,7
A	58	1,4	90	7,1
9MA	66	1,7	83	2,6
DBA	60	1,5	84	6,7
79DMBA	30	0,74	94	1,5

<sup>a</sup> Cada valor é a média de três ensaios independentes. A recuperação foi calculada a partir da área do pico do analito na amostra de querosene fortificada.

<sup>b</sup> Esses valores foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração do procedimento de extração (cinco vezes).

A precisão das medições foi avaliada pelo ensaio de repetitividade, que avalia o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas em uma mesma amostra sob as mesmas condições (mesmo instrumento, mesmo operador) [53, 54]. O valor de repetitividade foi expresso através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD, do inglês “*relative standard deviation*”), para o qual foi usada uma amostra de QAV fortificada com  $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito e a análise, incluindo o procedimento de extração, foi realizada por sete vezes consecutivas num único dia. Os resultados, que variaram entre 2,7 e 13%, são mostrados na Tabela 4. Além disso, a precisão intermediária também foi avaliada para o QAV. Sete ensaios foram realizados em cada um de dois dias consecutivos (entre dias) e sete ensaios foram realizados por cada um

de dois analistas num único dia (entre analistas). Uma boa precisão foi obtida pelo método, medida em termos de RSD, com valores variando entre 3,5 e 14% para quase todos os analitos (considerando as precisões intermediárias entre dias e entre analistas). Mais uma vez, o único resultado não satisfatório foi o da 9ATHA, que apresentou precisão intermediária por volta de 40% (Tabela 4). Outros níveis de fortificação (4,0, 10 e 16  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram testados para a amostra de QAV e os resultados de recuperação, apresentados na Tabela 6, foram de 91 a 118%, com exceção da 9ATHA que variou entre 49 e 64%.

Tabela 6 – Recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada com diferentes níveis de concentração dos analitos.

Concentração fortificada		Recuperação <sup>a</sup>					
$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados <sup>b</sup>	9ATHA	78BQ	A	9MA	DBA	79DMBA
4,0	0,10	49	99	96	98	118	108
6,0	0,15	68	97	107	92	96	105
10	0,26	60	93	93	91	99	96
16	0,40	64	96	96	92	98	97

<sup>a</sup> A recuperação foi calculada a partir da área do pico do analito na amostra de QAV fortificada.

<sup>b</sup> Esses valores foram calculados levando em consideração o fator de pré-concentração do procedimento de extração (cinco vezes).

Para testar ainda mais a aplicabilidade do método, foi feita uma comparação entre os resultados de uma amostra de QAV não-fortificada (Amostra III), antes e depois da percolação em coluna de bauxita. Três extratos provenientes dessa amostra percolada e três da não-percolada foram analisados usando o método HPLC-FD, assim como três soluções-padrão de mesma concentração contendo os seis analitos. A presença dos analitos nas amostras foi confirmada por comparação entre os tempos de retenção obtidos para as amostras e as soluções-padrão, e também comparando as razões entre as áreas obtidas com diferentes esquemas de detecção para as mesmas soluções, conforme descrito na seção 3.2.2. O teste t de *Student*, com nível de confiança de 95%, foi realizado com os tempos de retenção obtidos através dos três cromatogramas de cada amostra e dos três cromatogramas das soluções-padrão (n = 3). A Tabela 7 apresenta os conteúdos dos azaarenos básicos determinados nas amostras de QAV analisadas, expressos em  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Somente 78BQ e DBA foram detectadas nas três amostras de QAV não-percolado (Amostra I, Amostra II e Amostra III) e suas concentrações foram determinadas

através das respectivas curvas analíticas. Nenhuma das substâncias estudadas teve sua presença confirmada na amostra de querosene comercial. Na Figura 18B e na Figura 18C são mostrados, respectivamente, o cromatograma da amostra de QAV percolada em coluna de bauxita e o cromatograma da mesma amostra sem tratamento (Amostra III). Como pode ser visto na Tabela 7 e comparando essas figuras, o conteúdo das substâncias básicas na Amostra III foi reduzido com a sua percolação na coluna de bauxita, incluindo 78BQ e DBA, que foram quantificadas na amostra não-tratada.

Tabela 7 – Determinação dos azaarenos básicos em amostras de QAV.

	Concentração <sup>a, b</sup>	9ATHA	78BQ	A	9MA	DBA	79DMBA
Amostra I	$\mu\text{g L}^{-1}$	nd	$3,2 \pm 1,0$	nd	nd	$6,3 \pm 1,0$	nd
	ng injetados		$0,016 \pm 0,005$			$0,031 \pm 0,005$	
Amostra II	$\mu\text{g L}^{-1}$	nd	$2,4 \pm 0,3$	nd	nd	$1,0 \pm 0,1$	nd
	ng injetados		$0,012 \pm 0,002$			$0,0048 \pm 0,0005$	
Amostra III Não tratada	$\mu\text{g L}^{-1}$	nd	$1,6 \pm 0,3$	nd	nd	$1,5 \pm 0,1$	nd
	ng injetados		$0,0082 \pm 0,0014$			$0,0077 \pm 0,0006$	
Amostra III Tratada	$\mu\text{g L}^{-1}$	nd	$1,3 \pm 0,1$	nd	nd	nd	nd
	ng injetados		$0,0066 \pm 0,0004$				

<sup>a</sup> Este resultado foi obtido levando em consideração o fator de pré-concentração do procedimento de extração (cinco vezes).

<sup>b</sup> n = 3.

nd = não detectado ou abaixo do limite de quantificação.

Na Tabela 8 são comparados alguns parâmetros de mérito gerados pelo método proposto e por outros métodos descritos na literatura, baseados em técnicas cromatográficas, para a determinação de azaarenos em combustíveis e amostras relacionadas. Embora o método HPLC-FD aqui proposto apresente valores de LOD maiores que o método GC-GC-NPD proposto por VON MÜHLEN (2007) [30], ele é capaz de gerar resultados confiáveis para os azaarenos de maneira mais simples, além de este último não ter reportado valores de recuperação.

Além disso, se levarmos em consideração apenas os métodos que determinaram os valores de recuperação, além dos limites de detecção, o método aqui proposto é o que apresenta os melhores resultados. Vale lembrar que, se não forem considerados os valores de recuperação obtidos para a 9ATHA, a faixa de valores de recuperação é estreitada para 91 a 118%,

incluindo todos os níveis de fortificação testados (4,0 a 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou 0,10 a 0,40 ng injetados).

Tabela 8 - Comparação das figures de mérito do método proposto com as de outros métodos descritos na literatura, aplicados a determinação de azaarenos básicos em combustíveis e amostras relacionadas.

Método	Amostra	Preparação da amostra	LOD		Recuperação (%)	Referência
			(ng injetados)	(ng injetados)		
HPLC-FD	Querosene	SPE	0,0013 - 0,021	49-118	Método proposto	19
GC-MS	Aerosol urbano	Extração ácido-base	0,1 - 22	46,1 - 95,5		24
HPLC-FD	Óleos de creosoto	Extração ácido-base - LC	2	82,3 - 93,6		26
GC-NPD	Líquidos derivados de carvão	LC - HPLC	nd	79 - 98		27
GC-MS	Querosene de aviação e diesel	Extração líquido-líquido - HPLC	nd	59,4 - 131		29
GC-GC-NPD	Gasóleo pesado	SPE	0,00016 - 0,0012	nd		38
GC-MS	Destilados de petróleo	SPE	nd	35,9 - 75,3		

na = não apresentado.

CL = cromatografia líquida clássica (em coluna aberta).