

**DETERMINAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
ELETROQUÍMICOS E ESPECTROFLUORIMÉTRICOS
PARA COMPOSTOS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO:
DETERMINAÇÃO DE AZAARENOS BÁSICOS EM
QUEROSENE DE AVIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DETECÇÃO POR
FLUORESCÊNCIA**

**Aluno: Thiago Fernando Mota Gonsalves
Orientador: Ricardo Queiroz Aucélio**

Introdução

Compostos nitrogenados em petróleo e derivados

Moléculas nitrogenadas estão frequentemente presentes em combustíveis fósseis, geralmente associadas à porção orgânica do material cru. Normalmente, o teor de nitrogênio no petróleo é baixo, variando entre 0,1 e 0,9% em massa, apesar de certos trabalhos indicarem que alguns óleos podem conter quantidades superiores a 2,0%. Os níveis de nitrogênio podem chegar a $15 \mu\text{g g}^{-1}$ em querosene usado como combustível de aviação, sendo a maior parte constituída de compostos nitrogenados básicos [1].

Nas refinarias, os compostos nitrogenados, principalmente os básicos, podem provocar o envenenamento de catalisadores nas unidades de craqueamento, contribuindo também para a formação de gomas em alguns produtos, tais como óleo combustível [2]. O nitrogênio ligado a compostos orgânicos causa sérios problemas durante a conversão do petróleo em derivados, especialmente quando os níveis excedem 0,5% em massa, como ocorre frequentemente no óleo pesado e betume. A titulação potenciométrica dessas amostras em meio não-aquoso mostra que o nitrogênio básico pode representar uma fração superior a 35% em massa do nitrogênio total contido no petróleo, óleo pesado e betume [2].

Os compostos nitrogenados são considerados como indesejáveis devido aos problemas que causam durante o refino do petróleo, além de afetar de forma adversa a estabilidade do produto. Esses compostos causam envenenamento do catalisador, facilitam as reações de oxidação, formando gomas e causando mau cheiro, além de contribuírem para as emissões gasosas, causando poluição atmosférica. Compostos nitrogenados, especialmente as moléculas contendo nitrogênio básico, foram relatados por terem um impacto negativo na estabilidade da oxidação dos combustíveis de aviação e óleos lubrificantes [1].

Os compostos nitrogenados podem ter caráter básico (piridinas, quinolinas, benzoquinolinas e acridinas), neutro (pirrois, indoís e carbazóis), e ácido (hidroxipiridinas e ácidos carboxílicos de indoís) [3]. Os azaarenos são classificados como substâncias com nitrogênio heterocíclico, onde um dos átomos de carbono na estrutura do hidrocarboneto policíclico aromático (HPA) é substituído pelo nitrogênio. As substâncias nitrogenadas básicas encontradas no petróleo são, predominantemente, compostas pelas famílias das alquilpiridinas,

alquilquinolinas, hidroxiquinolinas e acridinas. Várias das substâncias contendo nitrogênio heterocíclico e aminas primárias aromáticas são conhecidas ou suspeitas de serem carcinogênicas [4-7]. Um estudo detalhado do tipo e da concentração dos compostos nitrogenados presentes nos produtos do petróleo é claramente desejável para a otimização dos métodos para a sua remoção e para especificação de procedimentos de manipulação segura destes materiais. Os azaarenos têm sido difundidos no meio-ambiente através do uso extensivo de combustíveis fósseis e têm sido encontrados em um grande número de compartimentos ambientais, incluindo material particulado urbano [9-11], sedimentos marinhos e de rios [12, 13] petróleo cru e seus derivados e solos. Vários métodos têm sido relatados para a determinação de nitrogênio total em petróleo e derivados, mas os métodos voltados para grupos funcionais e compostos específicos têm sido pouco explorados.

Numerosos estudos têm sido feitos sobre a ocorrência de azaarenos em combustíveis e amostras ambientais. Vários esquemas de separação e identificação desses compostos têm sido relatados. Como a co-eluição pode ser um problema devido ao grande número de isômeros, tanto de carbazois quanto de acridinas, uma separação entre as frações básica e neutra é necessária para amostras complexas onde essas duas famílias de substâncias ocorrem juntas. Uma possibilidade para essa separação é a extração em fase sólida (SPE), pois é um método e de consumo de solvente baixo.

A determinação de azaarenos tem sido realizada, mais freqüentemente, por diferentes técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF) ou UV-Visível, cromatografia a gás (CG) acoplada à espectrometria de massas (EM), e cromatografia a gás bidimensional com detector seletivo de nitrogênio-fósforo usado para a detecção específica de moléculas contendo nitrogênio e detecção por EM.

Cromatografia líquida de alta eficiência

Nenhum registro das técnicas cromatográficas contemporâneas fica completo se não incluir a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de substâncias presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Somente a partir dos anos 70 conseguiu-se um avanço considerável da cromatografia líquida moderna que até então era essencialmente subdesenvolvida, apesar de um dos primeiros experimentos sobre cromatografia, no início do século, ter sido do tipo que é hoje chamado de cromatografia líquida clássica. O avanço foi gradual e atingiu o atual nível de sofisticação que a CLAE apresenta, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia. Desde 1968 tornou-se possível recheiar colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução e, também, adquirir equipamentos que funcionam sob as altas pressões necessárias para a obtenção de uma boa velocidade de eluição. Nos últimos anos ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimentos de onda variável até 190 nm, e houve um aumento na utilização dos detectores por fluorescência, eletroquímicos, e por fluorescência induzida por laser, bem como

acoplamento com o espectrômetro de massas. Com estes, tornou-se possível a detecção da maioria dos compostos e a análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc.

A CLAE é uma técnica de separação hoje bem estabelecida 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 [17].

Dentro da CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR) [17]. Sistemas de CLAE-FR consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; 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. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

A espectroscopia de fluorescência é um método de detecção dos mais sensíveis da atualidade, específico para compostos que fluorescem. Em boas condições é possível detectar quantidades da ordem de picogramas (10 a 12 g), o que é comparável aos detectores por captura de elétrons em cromatografia em fase gasosa. Moléculas cujas estruturas são formadas por anéis aromáticos ou ligações duplas conjugadas favorecem esse fenômeno e podem ser identificadas usando o detector por fluorescência.

Proposta do trabalho

A proposta do trabalho foi desenvolver um método analítico para a determinação seletiva de seis azaarenos básicos em querosene de aviação e querosene de uso doméstico. Os azaarenos em questão são: 7,8-Benzoquinolina (78BQ), 7,9-Dimetilbenzo[c]acridina (79DMBA), 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina (9ATHA), 9-Metilacridina (9MA), Acridina (A) e Dibenzo[a,j]acridina (DBA), e estão apresentados na Figura 1. Para tanto, um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF) foi avaliado. Como a concentração de cada azaareno individual nesse tipo de amostra pode ser muito baixa, ao invés de usar um único par de comprimentos de onda para a detecção dos analitos, um programa de detecção envolvendo os comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) e emissão (λ_{em}) máximas, selecionados para cada substância individualmente, foi utilizado para melhorar a sensibilidade da determinação dos azaarenos na matriz do querosene, reduzindo os valores dos limites de detecção.

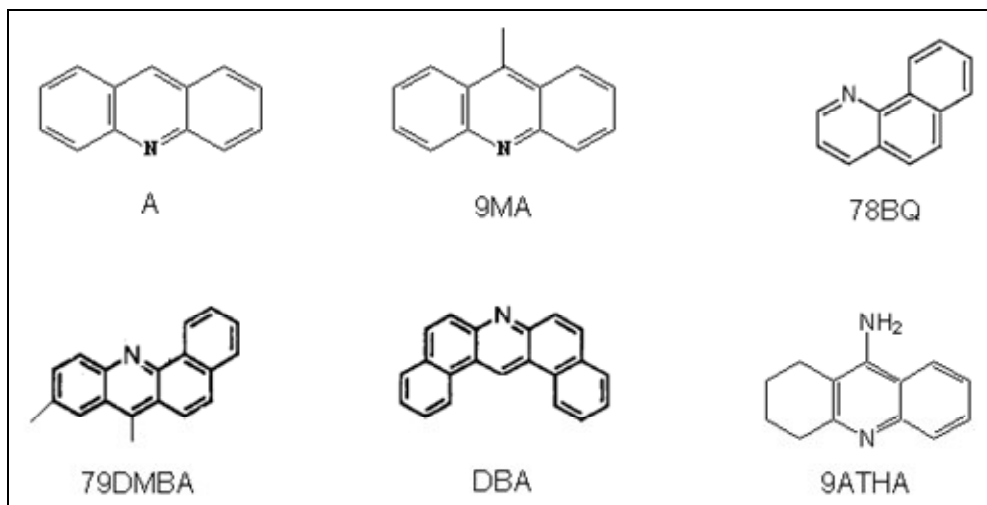


Figura 1 – Estruturas químicas dos azaarenos básicos em estudo.

Os azaarenos são substâncias de caráter básico (com exceção dos derivados de carbazol e indol) e esta característica pode ser utilizada para a sua separação dos nitrogenados neutros e dos HPA, que estão presentes em muito maior quantidade nos combustíveis derivados de petróleo como o querosene de aviação. Com esse objetivo, um método de extração, adaptado de WILHELM et al (2000) [15] foi utilizado. Nesse procedimento, os azaarenos básicos foram isolados por extração em fase sólida (SPE) usando um adsorvente forte trocador de cátions (ácido propilsulfônico ou PRS) que é muito polar e não apresenta nenhum grau apreciável de interações apolares. Como o valor do pKa do PRS é baixo, compostos catiônicos podem ser eluídos tanto por neutralização de suas cargas através de um eluente fortemente alcalino (uma solução de metanol-amônia neste caso) ou por uma solução de alta força iônica. Esse procedimento é simples e rápido e a etapa de evaporação do solvente não é necessária, melhorando a recuperação das substâncias mais voláteis. Parâmetros analíticos de mérito foram determinados e a aplicabilidade do método foi avaliada.

Procedimento Experimental

Materiais e Reagentes

Indol, 3-Metilindol (3MI), 9-Metilacridina, 7,9-Dimetilbenzo[c]acridina, 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridina e Carbazol (CBZ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha); Acridina, 7,8-Benzoquinolina, Pireno (PIR), Criseno (CRI) e Benzo[a]pireno (BaP) foram adquiridos da Acros Organics (New Jersey, EUA); Dibenzo[a,j]acridina foi adquirida da Chem Service (West Chester, EUA). Soluções estoque 200 mg L^{-1} dessas substâncias, preparadas em Etanol, foram utilizadas no preparo das soluções de trabalho através de diluições posteriores.

Acetonitrila (ACN) grau HPLC, Metanol, Diclorometano (DCM), solução de amônia 25% e (grau analítico) foram provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha). O tampão fosfato, pH 6,5, foi uma solução 10 mmol L^{-1} preparada com KH_2PO_4 anidro (Sigma-Aldrich, Alemanha) e Na_2HPO_4 anidro (Merck, Alemanha), ambos de grau analítico, e água ultrapura, obtida de um sistema de

purificação de água da Millipore, modelo MilliQ A10 Gradiente (Massachusetts, EUA). Todas as soluções foram filtradas com um filtro Millipore de 0,45 µm antes da injeção no sistema CLAE. Cartuchos de ácido propilsulfônico (PRS, 500 mg) para extração em fase sólida foram obtidos da Varian (Austrália). As amostras de QAV foram fornecidas pela Petrobras e a amostra de querosene doméstico foi adquirida em comércio local. Gás nitrogênio 99,9% foi adquirido da AGA-Lynde (Rio de Janeiro, Brasil).

Instrumentação

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (CLAE-DF) foram realizadas em um cromatógrafo Waters (Massachusetts, USA) da série 1525 equipado com um “Multi Wavelength Fluorescence Detector” modelo 2475, um forno para a coluna e uma válvula de injeção de 5 µL. O sistema analítico incluiu uma coluna C18 XTerra (150 mm x 4,6 mm x 5,0 µm) e uma pré-coluna de mesma fase estacionária (10 mm x 4,6 mm x 5,0 µm), ambas fabricadas pela Waters. As separações foram realizadas a 35°C com um fluxo de 1 mL min⁻¹.

Procedimento de extração

Um volume de 25,00 mL de amostra foi aplicado ao cartucho PSR (500mg de ácido propilsulfônico), o qual foi previamente condicionado com 4 mL de diclorometano (DCM). Mais 4 mL de DCM foram passados pelo cartucho para eluir as substâncias neutras. Os azaarenos básicos, retidos no PSR, foram eluídos com 2 mL de Metanol:Amônia (9:1 em volume) em balão volumétrico de 5,00 mL depois de o cartucho ter sido seco com um fluxo suave de nitrogênio. O balão foi avolumado com Metanol e a solução final analisada por CLAE-DF. Esse procedimento de extração resultou em um fator de pré-concentração (FPC) de cinco vezes.

Procedimento experimental

Avaliação do procedimento de extração

A fim de verificar a conformidade do procedimento de extração para as amostras de QAV e querosene doméstico, para avaliar o efeito da matriz na posição dos picos no cromatograma, assim como para avaliar a recuperação dos azaarenos básicos, amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos padrões dos analitos e amostras não fortificadas foram analisadas sob as mesmas condições. Uma amostra de QAV foi fortificada com 6 µg L⁻¹ de cada analito e a amostra de querosene doméstico foi fortificada com quantidades diferentes de cada analito, variando entre 30 e 66 µg L⁻¹. Os valores de recuperação foram calculados levando em consideração o FPC e a diferença entre a concentração do analito na amostra fortificada e sua concentração na amostra antes da fortificação, de acordo com a seguinte fórmula:

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

Para avaliar a eficiência da extração, ou seja, a sua capacidade de recuperar as substâncias nitrogenadas básicas e eliminar a interferência das substâncias neutras, o mesmo procedimento de extração foi aplicado a 25,00 mL de uma solução em DCM contendo os seis azaarenos básicos, além de Carbazol (CBZ), Indol, 3-Metilindol (3MI), Pireno (PIR), Criseno (CRI) e Benzo[a]pireno (BaP). 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 CLAE-DF. 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 na concentração $36 \mu\text{g L}^{-1}$ cada, foi também analisada por CLAE-DF. O valor de $36 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde à concentração teórica de cada analito no extrato controle, levando em conta o FPC e uma recuperação igual a 100%, possibilitando a comparação direta entre os cromatogramas.

A análise cromatográfica

As análises por CLAE-DF foram realizadas em fase reversa (coluna C18) e as separações foram realizadas a 35°C com um fluxo de 1 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. A detecção por fluorescência foi realizada aplicando-se uma programação dos comprimentos de onda de excitação e emissão. As condições de eluição e de detecção selecionadas para a determinação dos seis analitos investigados estão descritas na Tabela 1.

A determinação quantitativa dos azaarenos básicos foi realizada através de uma curva analítica de padronização externa, na faixa de concentração de 0,5 a $250 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,0025 a 1,25 ng injetados), utilizando as áreas dos picos. A análise qualitativa 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 um par de comprimentos de onda de excitação e emissão menos sensível (250/395 nm) 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 foi confirmada quando as razões calculadas foram às mesmas para a solução padrão e para o extrato da amostra.

Tabela 1 - Parâmetros usados para a análise de amostras de querosene usando CLAE-DF.

Gradiente de eluição					
0 – 8,5 min	ACN:Tampão (40:60) to ACN: Tampão (68:32)				
8,5 – 9,5 min	ACN: Tampão (68:32) to ACN: Tampão (82:18)				
9,5 – 1,5 min	ACN: Tampão (82:18) to ACN: Tampão (90:10)				

Programa de detecção					
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

Tampão = Tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, pH 6,5.

Resultados e discussão

Estudo 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. 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 o extrato controle, foi preparada e usada como referência para o cálculo dos valores de recuperação dos analitos. Para a análise cromatográfica foi necessário mudar o gradiente de eluição e o esquema de detecção para tornar possível a separação da mistura contendo as substâncias neutras e a sua detecção. Uma boa separação para todos os componentes foi obtida utilizando-se as condições descritas na legenda da Figura 2. 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 foi de 94 a 104%, exceto para a 9ATHA que apresentou um valor de recuperação mais baixo (82%).

A análise cromatográfica

As condições cromatográficas foram otimizadas de modo a fornecerem uma separação rápida e eficiente dos azaarenos básicos. Uma coluna C18 Xterra e um gradiente de eluição com ACN e tampão fosfato (10 mmol L⁻¹, pH 6,5), descrito na Tabela 1, foram utilizados. Sob essas condições, uma separação completa dos azaarenos na mistura, contendo A, 9MA, 78BQ, 9ATHA, 79DMBA e DBA, foi obtida com os tempos de retenção (t_R) para todas as substâncias menores que 15 minutos. Os desvios padrão relativos (DPR) para os valores de t_R foram menores que 1% (precisão intermediária entre dias, n = 7).

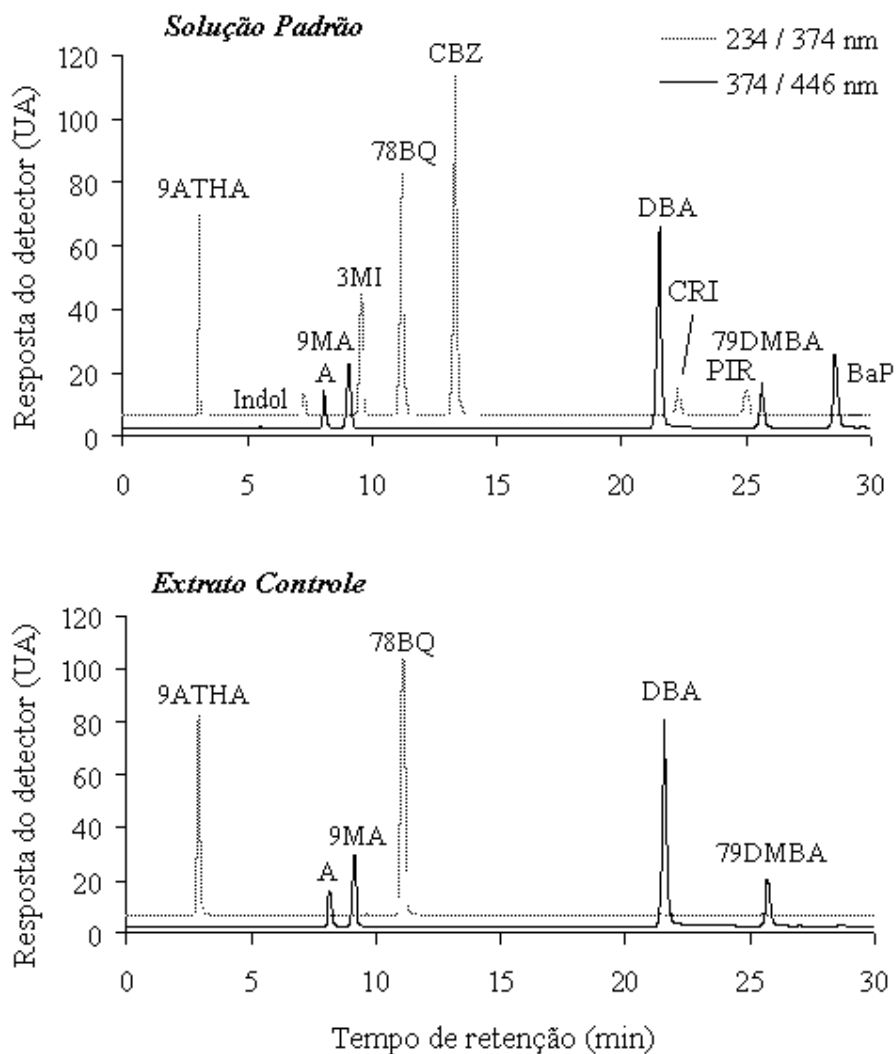


Figura 2 – Cromatogramas de uma solução padrão $36 \mu\text{g L}^{-1}$ e do extrato controle. Coluna C18 XTerra, fase móvel: 0 – 8 min: ACN:tampão fosfato (40:60) para ACN:tampão fosfato (50:50), 8 – 30 min: ACN:tampão fosfato (50:50) para ACN:tampão fosfato (80:20). T = 35 °C.

A análise por CLAE-DF com a aplicação do programa de detecção, usando os pares $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{exc}}$ ótimos para cada um dos seis analitos investigados, permitiu a determinação dos mesmos em níveis de concentração bastante baixos. Esses pares $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{exc}}$ foram obtidos através dos espectros de fluorescência de cada analito em ACN:tampão fosfato (1:1). Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) 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 [18]. Os LOD para os azaarenes básicos estão entre 0,0013 e 0,021 ng injetados e os LOQ entre 0,0044 e 0,072 ng injetados. As curvas de calibração foram lineares ($r^2 > 0,99$) na faixa de trabalho

estudada. A Tabela 2 mostra os parâmetros de validação determinados para o método CLAE-DF.

Tabela 2 - Resultados de validação para o método CLAE-DF.

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

^a y = área do pico do analito; x = quantidade de analito, ng.

^b 5 μ L injetados.

Análise das amostras de QAV e querosene doméstico

O método foi aplicado para a determinação dos seis azaarenos básicos em três amostras de QAV, denominadas como Amostra I, Amostra II e Amostra III, e uma amostra de querosene doméstico. 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 foi fortificada com diferentes quantidades de cada analito (30 a $66 \mu\text{g L}^{-1}$). As amostras passaram pelo procedimento de extração e os extratos foram analisados pelo método CLAE-DF. As amostras não fortificadas foram utilizadas como branco para o cálculo da recuperação.

Parte da amostra de QAV a ser fortificada com os analitos foi previamente percolada em bauxita. O processo de percolação consistiu em passar, lentamente, 25 L de QAV através de uma coluna de 180 cm^3 cheia com o adsorvente bauxita (30 – 60 mesh). O objetivo do uso desse tratamento foi remover os compostos nitrogenados do querosene [8]. A Figura 3A e a Figura 3B mostram os cromatogramas da amostra de QAV tratado com e sem fortificação, respectivamente, e a Figura 4 mostra os cromatogramas da amostra de querosene comercial fortificado e não fortificado. Essa amostra de querosene não foi percolada em bauxita. Os analitos foram quantificados pelo método de padronização externa e as recuperações ficaram entre 92 e 107% para o QAV (Tabela 3) e entre 83 e 104% para o querosene doméstico (Tabela 4). A única exceção foi a recuperação da 9ATHA, que foi 68 e 48%, respectivamente, provavelmente devido ao seu alto valor de pK_a , o que causa uma forte retenção deste analito no adsorvente PSR e, em consequência, dificuldade na eluição.

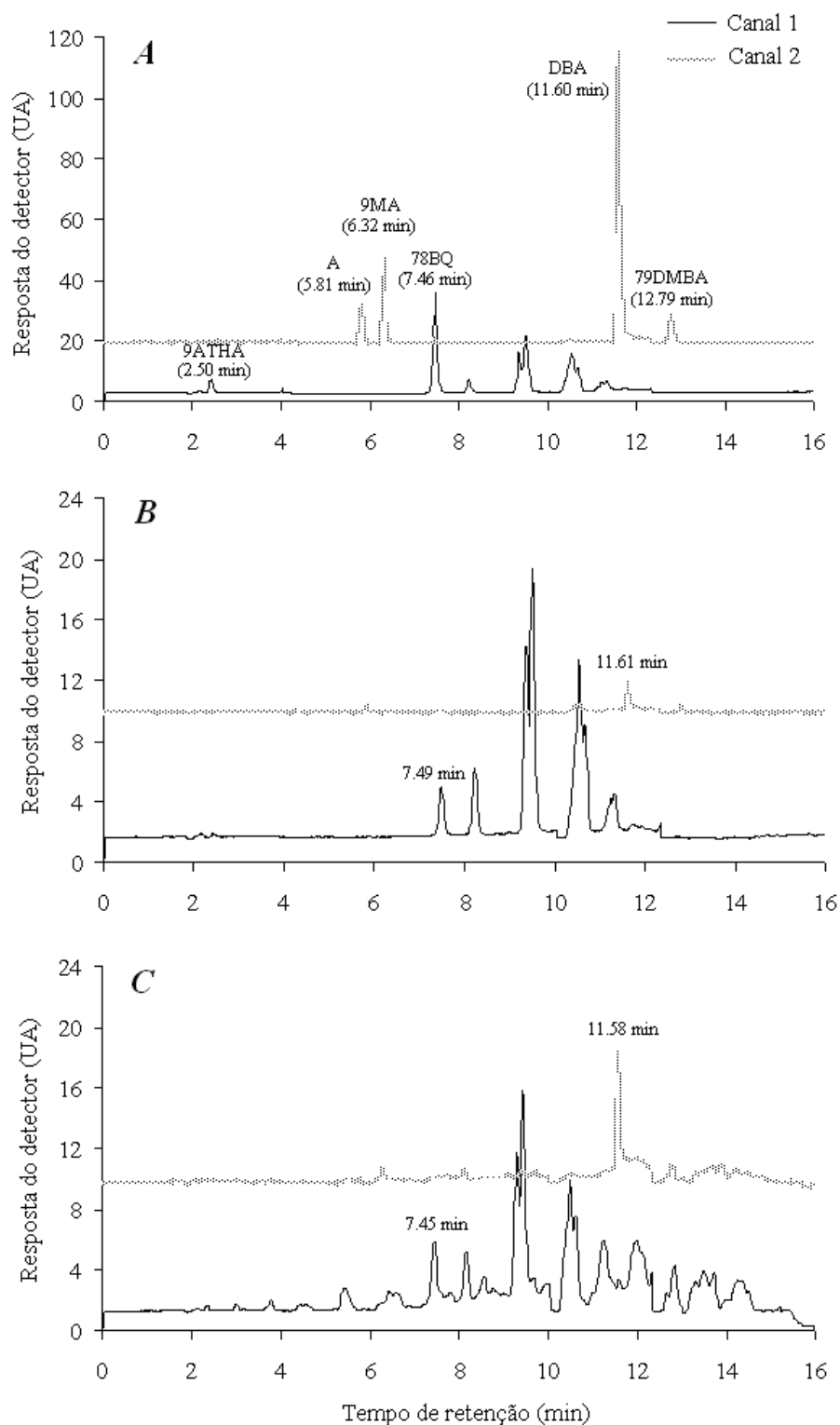


Figura 3 – Cromatogramas de: amostra de QAV tratado (percolado em coluna de bauxita) e fortificado com $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito (A); amostra de QAV tratado sem fortificação (B); amostra de QAV não tratado sem fortificação (C). Coluna C18 XTerra, condições de análise descritas na Tabela 1.

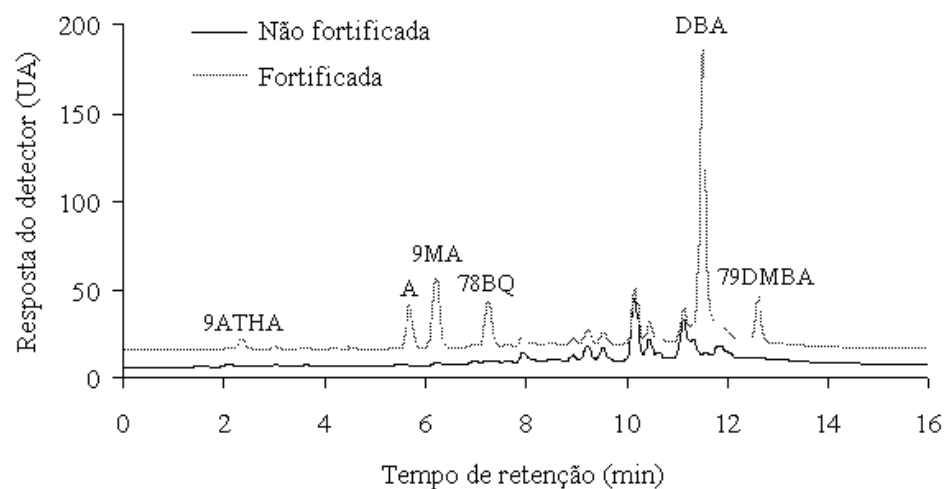


Figura 4 - Cromatogramas da amostra de querosene doméstico não fortificado e fortificado com diferentes concentrações de cada analito. Coluna C18 XTerra, condições de análise descritas na Tabela 1.

Tabela 3 - Precisão e recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada.

	Concentração fortificada		Recuperação ^a %	Repetitividade ^a %DPR	Precisão Intermediária ^a	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados ^b			entre dias (%DPR)	entre analistas (%DPR)
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

^a 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.

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

Tabela 4 – Repetitividade e recuperação dos azaarenos básicos em amostra fortificada de querosene doméstico.

	Concentração fortificada		Recuperação ^a	Repetitividade ^a
	$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados ^b	%	%DPR
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

^a 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.

^b 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) [19, 20]. O valor de repetitividade foi expresso através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), 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. Os resultados, que variaram entre 2,7 e 13%, são mostrados na Tabela 3.

Além disso, a precisão intermediária também foi avaliada. Uma boa precisão foi obtida pelo método, medida em termos de desvio padrão relativo (%DPR), com valores variando entre 3,5 e 14% para quase todos os analitos (considerando precisão intermediária entre dias e entre analistas, $n = 7$). Mais uma vez, o único resultado não satisfatório foi o da 9ATHA, que apresentou precisão intermediária por volta de 40% (Tabela 3). 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 5, foram de 91 a 118%, com exceção da 9ATHA que variou entre 49 e 64%.

Tabela 5 – Recuperação dos azaarenos básicos em amostra de QAV fortificada com diferentes níveis de concentração dos analitos.

Concentração fortificada		Recuperação ^a					
$\mu\text{g L}^{-1}$	ng injetados ^b	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

^a A recuperação foi calculada a partir da área do pico do analito na amostra de QAV fortificada.

^b 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, antes e

depois da percolação em coluna de bauxita. Os extratos provenientes da amostra percolada e não percolada foram analisados usando o método CLAE-DF apresentado. A presença dos analitos nas amostras foi confirmada por comparação entre os tempos de retenção obtidos para as amostras e uma solução padrão, e também comparando as razões entre as áreas obtidas com diferentes esquemas de detecção para a mesma solução (Teste t de Student, com $n = 3$ e nível de confiança de 95%). A Tabela 6 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 analisadas (Amostras I, II e III) e nenhuma das substâncias estudadas teve sua presença confirmada na amostra de querosene doméstico. A Figura 3B e a Figura 3C mostram, 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 6 e comparando essas figuras, o conteúdo dos compostos básicos na Amostra III foi reduzido com a sua percolação na coluna de bauxita, incluindo 78BQ e DBA, as quais foram quantificadas na amostra não tratada.

Tabela 6 – Determinação dos azaarenos básicos em amostras de QAV.

	Concentração ^{a, b}	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		$0,0066 \pm 0,0004$				

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

^b $n = 3$.

nd = não detectado ou abaixo do limite de quantificação.

A tabela 7 compara algumas figuras de mérito geradas pelo método proposto e por outros métodos descritos na literatura para a determinação de azaarenos básicos em combustíveis e amostras relacionadas. Embora o método CLAE-DF proposto apresente valores de LOD maiores que o método CG-CG-DNF proposto por VON MÜHLEN (2007) [14], ele é capaz de gerar resultados confiáveis para os azaarenos básicos de maneira mais simples e barata

Tabela 7 - Comparação das figuras 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 (ng injetados)	Recuperação (%)	Referência
CLAE-DF	Querosene	SPE	0,0013 - 0,021	49-118	Método proposto
CG-EM	Aerosol urbano	Extração ácido-base	0,1 - 22	46,1 - 95,5	6
CLAE-DF	Óleos de creosoto	Extração ácido-base - CL	2	82,3 - 93,6	18
CG-DNF	Solvente refinado de carvão	CL - CLAE	nd	79 - 98	20
CG-EM	Querosene de aviação e diesel	Extração líquido-líquido - CLAE	nd	59,4 - 131	22
CG-DNF	gasóleo pesado	SPE	0,00016 - 0,0012	nd	24
CG-EM	Destilados de petróleo	SPE	nd	35,9 - 75,3	35

nd = não determinado.

CL = cromatografia líquida clássica (em coluna aberta)

Conclusões

Neste trabalho, a metodologia SPE-HPLC-FD é proposta para a determinação seletiva dos azaarenos básicos em querosene (comercial e em combustível de aviação). O procedimento de extração em fase sólida (SPE) usando uma coluna trocadora de cátions que permite a isolamento seletivo da fração dos azaarenos básicos dessas matrizes complexas. O programa de detenção de HPLC-fluorescência permite determinação individual dos indivíduos que compõem a amostra ao nível 0.88 – 14.4 µg L⁻¹ (0.0044 – 0.072 ng injetado), com valores de recuperação entre 49 e 118%. Este método é conveniente para controlar a presença de azaarenos básicos e os seus conteúdos em amostras de querosene. Os conteúdos totais dos compostos básicos investigados foram de 3.1 a 9.5 µg L⁻¹ nas amostras de querosene de aviação analisadas. Além disso, a aplicação do método em uma amostra de querosene de aviação que foi percolada na bauxita serviu para mostrar que este tipo de tratamento reduz a quantidade dos compostos básicos nesta amostra.

Referências

1. PILLON, L. Z., Effect of clays and adsorbents on the nitrogen content and the stability of jet fuels. *Petroleum Science and Technology*, 19, 7-8, p. 961-970, 2001.
2. SPEIGHT, J. G. and *Handbook of Petroleum Analysis*. New York: John Wiley and Sons, 2001.
3. MOREIRA, E. M., PEREIRA, C. G., BORGES, M. B., Craqueamento catalítico fluido de GOP Cabiúnas desnitrificado: o impacto da redução de nitrogenados na carga no desempenho do FCC. *Boletim Técnico da Petrobras*, 45, 3/4, p. 274-283, 2006.
4. SOCHOVA, I., HOFMAN, J., and HOLOUBEK, I., Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environment International*, 33, 6, p. 798-804, 2007. 8. BLEEKER, E. A. J., et al., Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 41, 1-2, p. 51-62, 1998.
5. BLEEKER, E. A. J., et al., Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 41, 1-2, p. 51-62, 1998.
6. BLEEKER, E. A. J., et al., *Toxicity of azaarenes*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 173. 2002. p. 39-83.
7. KOBETICOVA, K., et al., Toxicity of four nitrogen-heterocyclic polyaromatic hydrocarbons (NPAHs) to soil organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 3, p. 650-660, 2008.
8. PASSOS, C. N., KAZUSHI, J., KLEIN, S. L., CARVALHO, R. L., S. BOZZO, Processamento de querosene Basrah no tratamento Bender da Reduc. 46, 3/4, p. 334-350, 2003.
9. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Measurement of semi-volatile azaarenes in airborne particulate and vapor phases. *Analytica Chimica Acta*, 501, 1, p. 71-78, 2004.

10. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Dissolution of azaarenes from urban aerosols. *Atmospheric Environment*, 38, 7, p. 1023-1028, 2004.
11. CHEN, H. Y. and PRESTON, M. R., Azaarenes in the aerosol of an urban atmosphere. *Environmental Science & Technology*, 32, 5, p. 577-583, 1998.
12. OSBORNE, P. J., PRESTON, M. R., and CHEN, H. Y., Azaarenes in sediments, suspended particles and aerosol associated with the River Mersey estuary. *Marine Chemistry*, 58, 1-2, p. 73-83, 1997.
13. KOZIN, I. S., et al., Isomer-specific detection of azaarenes in environmental samples by Shpol'skii luminescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 354, 1-3, p. 181-187, 1997.
14. VON MUHLEN, C., et al., Qualitative and quantitative study of nitrogen-containing compounds in heavy gas oil using comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Journal of Separation Science*, 30, 18, p. 3223-3232, 2007.
15. WILHELM, M., MATUSCHEK, G., and KETTRUP, A., Determination of basic nitrogen-containing polynuclear aromatic hydrocarbons formed during thermal degradation of polymers by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 878, 2, p. 171-181, 2000.
16. NAVAS, M. J. and JIMENEZ, A. M., Chemiluminescent methods in petroleum products analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 30, 2-3, p. 153-162, 2000.
17. TONHI, E., et al., Stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) based on functionalized inorganic oxide surfaces. *Quimica Nova*, 25, 4, p. 616-623, 2002.
18. GONZALEZ, A. G. and HERRADOR, M. A., A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 26, 3, p. 227-238, 2007.
19. ELLISON, S. L. R., ROSSLEIN, M., WILLIAMS, A., ed. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. EURACHEM/CITAC Guide. 2000.
20. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, Revisão 02 – JUNHO/2007.