



## **Desenvolvimento e otimização da detecção de fluorcarbonados para aplicação em tecnologias de biorremediação**

**Renato Nallin Montagnoli<sup>1</sup>, José Rubens Moraes Junior<sup>2</sup>, Ederio Dino Bidoia<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP (renatonm@rc.unesp.br)

<sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP

(jrubensmjr@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP (ederio@rc.unesp.br)

### **Resumo**

Espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) liberadas em grandes quantidades no ambiente quando utilizadas para extinguir incêndios de hidrocarbonetos. Em sua formulação existem grandes quantidades de compostos flúor-carbonados (PFCs) que contribuem com a capacidade extintora de incêndio, mas também são altamente resistentes à biodegradação e por isso têm prolongada persistência ambiental. Este trabalho utiliza diferentes metodologias para determinar compostos organo-halogenados possíveis em cenários de contaminação e biorremediação. O objetivo geral é determinar o potencial de diferentes técnicas na detecção de PFCs em AFFF para aplicações biotecnológicas, em que ocorre a co-contaminação por outras substâncias, por exemplo. Técnicas de cromatografia associada à espectrometria de massa (GC-MS) foram empregadas para quantificação dos subprodutos de biotransformação contendo flúor. As etapas envolvem a quantificação de PFCs e subprodutos voláteis por GC-MS. Além disso foram desenvolvidas metodologias para quantificar os subprodutos de biodegradação ainda não identificados a partir dos fluorcarbonados.

Palavras-chave: AFFF. Perfluorados. GC-MS.

Área Temática: Impactos Ambientais.

## **Development and optimization of fluorocarbon detection for application in bioremediation technologies**

### **Abstract**

*Aqueous film-forming foams (AFFFs) are released in substantial amounts into the environment when used to extinguish hydrocarbon fires. In their formulation there are perfluorinated compounds (PFCs) that contribute to the fire extinguishing capacity, but are also highly resistant to biodegradation and therefore have prolonged environmental persistence. This work uses different methodologies to determine biodegradation pathways of organohalogenates in bioremediation scenarios. The general objective is to determine the potential of different techniques in the detection of PFCs in AFFF for biotechnological applications, where co-contamination by other substances occurs, for example. Chromatography techniques associated with mass spectrometry (GC-MS) were employed for quantification of the fluorine-containing biotransformation by-products. The steps involve the quantification of PFCs and volatile by-products by GC-MS. Moreover, GC-MS methodologies were developed to quantify the yet unidentified biodegradation by-products from the fluorocarbons.*

*Key words: AFFF. Perfluorinated compounds. GC-MS.*

*Theme Area: Environmental Impacts.*



## 1 Introdução

A partir do final da década de 1990 e, particularmente, nos últimos anos, tem havido um aumento nas publicações e estudos de monitoramento que descrevem a presença de compostos fluorados no ambiente e em seres humanos. Assim como os clorados e bromados, os contaminantes organofluorados compreendem um grande número de compostos de diferentes classes. De interesse mais recente são os compostos perfluorados ou polifluorados (PFCs), uma vez que a substituição completa de ligações carbono-hidrogênio para as ligações de flúor-carbono são mais fortes e conferem propriedades físico-químicas únicas, incluindo uma alta resistência à degradação abiótica e biótica (MARTIN et al., 2004).

Toneladas de espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) contendo PFCs são liberadas no ambiente, pois sua aplicação é fundamental no controle de diversos incêndios em hidrocarbonetos. De fato, em situações de incêndio, o uso racionado visando menor liberação e consequente menor impacto ambiental de AFFF não é uma opção, pois situações de incêndio representam sério risco à vida e às propriedades locais. As AFFFs são imprescindíveis pela à sua efetividade na prevenção de danos colaterais e re-ignição de incêndios nesses locais.

Sabe-se que dentre os PFCs, as AFFFs contêm em maior parte substâncias per e poli fluoralquiladas (PFAS) como principais agentes (MOODY & FIELD, 2000). Em refinarias de petróleo, postos de gasolina e em outros locais, como aeroportos municipais e campos de treinamento do corpo de bombeiros, onde AFFFs foram lançadas sob concentrações elevadas ( $>1.000.000 \text{ ng.L}^{-1}$ ) são detectados ácidos carboxílicos perfluorados (da sigla em inglês perfluorinated carboxylic acid, PFCA), ácidos sulfônicos perfluorados (da sigla em inglês perfluorinated sulfonic acids, PFSA) e fluorotelomeros sulfonados (da sigla em inglês fluotelomer sulfonate, FtS) em águas subterrâneas e superficiais (AHRENS, 2011). As águas subterrâneas em locais impactados pelo uso de AFFF têm as maiores concentrações registradas de PFAS entre qualquer ambiente (SCHULTZ et al., 2004).

Os PFCs são persistentes, bioacumuláveis, tóxicos e contaminantes. Por isso, a preocupação com a sua ocorrência no ambiente tem aumentado nos últimos anos. Eles foram detectados em muitas amostras ambientais (GIESY & KANNAN, 2002). Compostos orgânicos halogenados são caracterizados pela sua elevada estabilidade no ambiente. No entanto, tornou-se evidente durante as últimas duas décadas que muitos destes compostos são suscetíveis a degradação microbiana. Reconhece-se, portanto, que a degradação microbiana de tais compostos, apesar de ser relativamente lenta, pode contribuir de forma significativa para o seu destino ambiental em longo prazo (WHITACRE, 2008). Dados sobre o destino ambiental desses compostos são importantes, dada a toxicologia de PFCs, principalmente PFOA e PFOS. Estudos associam tais substâncias ao aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol no fígado, diminuição do colesterol no soro, hipolipidemia, e redução no consumo de alimentos em macacos-cinomolgo. Além disso, existe também a toxicidade de PFOS no desenvolvimento hepatotoxicidade, imunotoxicidade e neurotoxicidade em mamíferos, tais como ratos, e peixes como zebra-fish, carpa comum e vairão (HUANG et al., 2010).

Dada uma condição ambiental específica, é possível que os PFCs possam ser seletivamente remediados de modo mais eficiente enquanto outros compostos são mineralizados. Nesta pesquisa foram propostos ensaios no contexto da biorremediação de amostras contaminadas por AFFF de modo a fornecer dados sobre a composição de AFFF, que não apenas ajude a determinar os componentes da formulação comercial protegida por patente, como também influencie as interações ecológicas dentro das comunidades oxidantes com o objetivo de descrever a remoção dos poluentes que são liberados no ambiente. O objetivo nos experimentos apresentados aqui foi estudar os compostos flúor-carbonados das espumas formadoras de filmes aquosos (AFFF) utilizando cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa.



## 2 Metodologia

Para estudar as condições ambientais e biológicas que facilitam as reações de transformação de PFCs (PFAS e fluortelômeros), foram analisadas as formulações mais comuns de AFFF baseadas em fluortelômero tioamido sulfonados (FtTAoS) da Ansul e Sintex. Os experimentos foram conduzido por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS) em ensaios piloto para o desenvolvimento de um método novo para detecção rápida em cromatografia gasosa dos compostos perfluorados.

### 2.1 Amostras utilizadas

Foram coletadas amostras de solo da Refinaria de petróleo da Petrobrás em Paulínia, SP, Brasil. As amostras de solo foram coletadas em julho de 2015 em uma área próxima aos tanques de estoque de combustível da refinaria. O solo foi removido com instrumentos livres de PFAS na profundidade de até 0,2 m abaixo do solo.

A espuma do tipo AFFF foi aplicada em grande escala no incêndio ocorrido na Refinaria do Planalto Paulista (Replan), localizada em Paulínia / SP (22°43'24.2"S 47°08'00.3"W), em 8 de janeiro de 1993, sendo este o maior incêndio já ocorrido em refinarias de petróleo no Brasil. Bombeiros fizeram a extinção do fogo que atingia as bacias de contenção com aplicação de jatos de AFFF e o resfriamento do tanque atingido e dos adjacentes utilizando jatos de água. Foram consumidos 4.000.000 L de óleo diesel e gastos 37.000 L de AFFF liberados no solo (FIGUEREDO et al., 1999). Não existem registros sobre a marca de AFFF utilizada na época, contudo, sabe-se que a maior parte da AFFF produzido no mundo nessa época eram da marca Ansul e 3M, sendo estas as possíveis formulações de fluortelomerados aplicadas no local. Na época o Brasil não produzia suas próprias espumas de incêndio do tipo AFFF.

Para os ensaios realizados no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Rio Claro), os experimentos foram conduzidos utilizando essas amostras de solo, que foram preservadas em freezer (-4°C) como inóculo.

### 2.2 Montagem dos frascos

As análises foram feitas em frascos séricos (também conhecidos como frascos de penicilina) com volume de 80 mL com os seguintes componentes: 25 mL de meio salino mínimo BH (Bushnell Haas), composto por 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0,02 g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 0,05 g.L<sup>-1</sup> de FeCl<sub>3</sub>; 100 µL de AFFF da formulação Sintex. Assim como no AFFF fabricado pela Ansul. Diluições a partir da fórmula original foram feitas para se adequar aos limites de detecção das técnicas utilizadas; 2,5 g de amostra de solo, utilizando solo contaminado com AFFF.

### 2.3 Preparo das amostras e extração de AFFF

A extração dos PFCs ocorreu misturando 20 mL de amostra líquida sem solo a 20 mL de solvente em um funil de separação. Foram testados os seguintes solventes: diclorometano e acetato de etila. A adequação do solvente utilizado ao método visa aumentar a miscibilidade entre o solvente e a amostra durante a fase inicial da cromatografia. As etapas seguintes foram modificadas a partir de Gołebiowski et al (2011) e otimizadas para a extração dos fluorcarbonados encontrados na formulação Sintex de AFFF. A mistura 1:1 de solvente e amostra foi submetida à agitação manual por 5 minutos e sonicadas por 30 minutos. Todas as extrações piloto foram feitas em duplicata, entretanto os ensaios definitivos com solo serão conduzidos em triplicata. Além disso, os ensaios definitivos contendo solo as partículas serão separadas da fase líquida por centrifugação a 15000 g por 15 minutos antes dos procedimentos. Espera-se que os solventes orgânicos facilitem a detecção dos PFCs pela diminuição da pressão de vapor e o carregamento das moléculas à amostragem em seringa. As extrações têm como alvo o



estabelecimento de um método de alta performance em GC-MS, com tempo de corrida reduzido e alta intensidade de sinal dos compostos individuais.

## **2.4 Monitoramento da biotransformação de AFFF por GC-MS e determinação de produtos de biotransformação**

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa com o GC-MS Shimadzu QP2010 ULTRA. A concentração de fluorcarbonados foram monitoradas ao injetar 2,0  $\mu\text{L}$  de amostra líquida após extração por solvente. A abordagem definitiva sobre a amostragem é proposta para utilização em estudos futuras em ensaios de biotransformação de AFFF. A injeção foi feita com micro-seringas para amostragem líquida com o auxílio do AOC-20i *autoinjector*.

Foi utilizada a coluna Rtx-5ms e o gás carreador utilizado no sistema foi o hélio. Para uma análise confiável, mas que ainda assim não danifique a vida útil do equipamento e da coluna, as temperaturas do injetor e do detector foram de 290°C, embora a metodologia original por Langlois et al. (2007) recomende 310°C (Método 1). Os seguintes programas de temperatura foram aplicados: 60 a 130°C, com rampa de 2°C / min e depois 130-310°C, em uma taxa de 8°C / min. Os espectros de massa (70 eV) foram registrados na porção do espectrômetro de massa do mesmo equipamento. A fonte de íons foi mantida a 200°C.

As formulações estoque de AFFF fluortelomerizadas Síntex, produzida no Brasil, foram utilizadas como padrão único de detecção. Foi testado também o limite de resolução do equipamento para comparar com a capacidade de extração de fluorcarbonados das amostras ambientais. Apesar da ausência de padrões analíticos, o modo TIC-SCAN utilizado nas etapas atuais do trabalho permitem a utilização da biblioteca de massa / carga ( $m/z$ ) de acordo a biblioteca de espectros de espectrometria de massa disponível no software NIST11 Mass Spectral Library EPA/NIH e com os novos compostos.

Outro método (Método 2) partiu dos parâmetros descritos por Shoeib et al. (2006) na determinação de PFCAs e PFOA por GC-MS. O cromatógrafo gasoso foi regulado para injeção com *split-ratio* 1:30. Foram utilizadas as Rxi-1ms, ao invés da Rtx-5ms. Hélio foi usado como gás de carreador. Para uma análise confiável, as temperaturas injetor e do detector foram de 310°C. Os seguintes programas de temperatura foram aplicados: 60-130°C, taxa de 2°C.min<sup>-1</sup> e, em seguida, 130-310°C, a taxa de 8°C.min<sup>-1</sup>. Os espectros de massa (70 eV) também foram registrados no espectrômetro de massa acoplado ao GC. A fonte de íons foi mantida a 220°C.

## **3 Resultados**

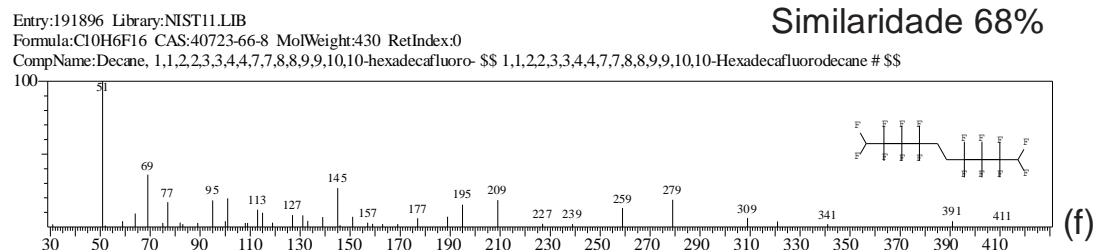
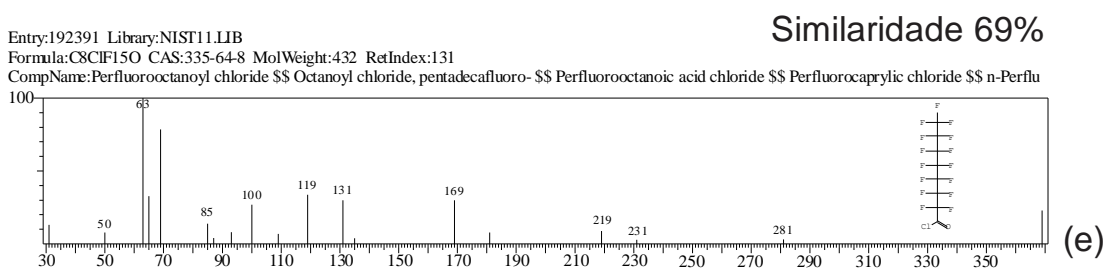
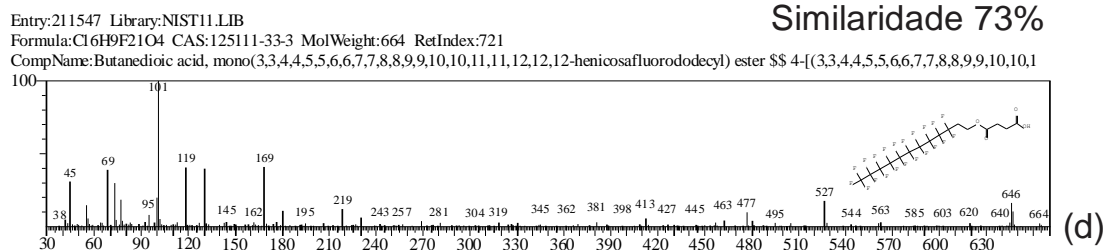
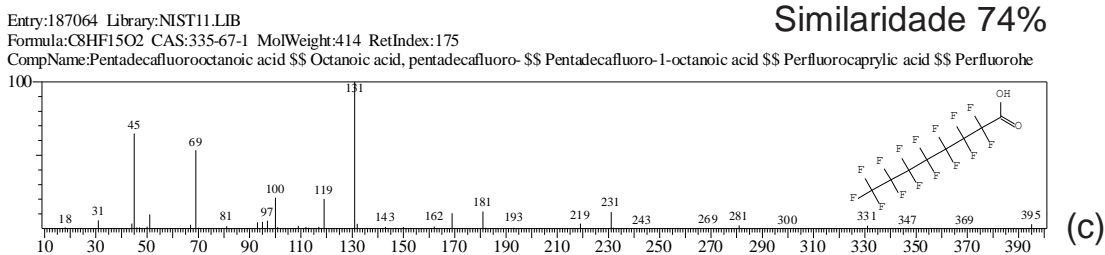
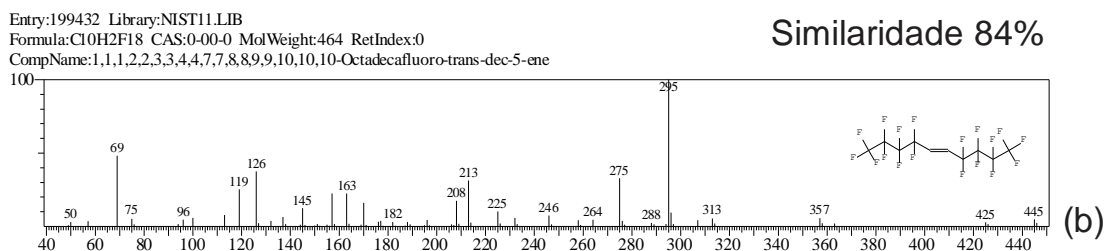
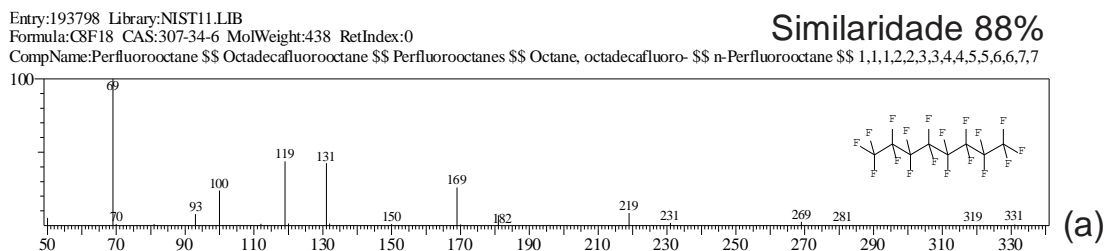
Os resultados obtidos correspondem ao aperfeiçoamento dos protocolos experimentais estabelecidos em Montagnolli et al. (2017). Os novos resultados apresentados nesse artigo confirmação e obtenção de dados sobre os componentes encontrados em AFFF.

### **3.1 Detecção de PFCs por GC-MS**

Os procedimentos de extração com solventes permitiram a detecção de alguns picos pela cromatografia. Embora as metodologias iniciais não tenham sido otimizadas para a detecção dos PFCs, alguns compostos foram detectados em um intervalo de 55,2 a 88,8% de similaridade no padrão de fragmentação  $m/z$  presentes na biblioteca NIST. Na Figura 14, são mostrados os compostos detectados após o procedimento de extração em acetato de etila ou diclorometano, conforme a similaridade ao espectro de massa da biblioteca.



Figura 1. Similaridade do espectro de massa dos compostos encontrados nos ensaios piloto contendo AFFF, sendo eles perfluorooctano (a), octadecafluoro-trans-deceno (b), ácido pentadecafluorooctanoico (c), um fluortelômero de ácido butanodioico (d), um perfluorooctano clorado (e).







Os dados de similaridade parciais na Figura 1 indicam a necessidade de otimização do método, afinal a similaridade encontrada é insuficiente para a confirmação dos compostos. A baixa similaridade, no entanto, pode ser decorrente de uma incompatibilidade do método utilizado (extração e cromatografia) e os parâmetros teóricos da biblioteca NIST. Essas análises foram independentes do uso de padrões analíticos que poderiam confirmar a presença desses compostos. Curiosamente foram encontrados compostos desconexos, como um perfluorooctano clorado (Figura 1e), contudo a baixa similaridade justifica um erro na combinação do espectro teórico com o encontrado experimentalmente. Sendo assim, a etapa atual desse estudo para otimização desse método tem sido desenvolvida para eliminar os problemas associados ao padrão de fragmentação dos compostos e do espectro de massa.

### **3.2 Desenvolvimento de método cromatográfico de PFCs**

Embora presentes em pequenas concentrações (ppb, ng.mL<sup>-1</sup>), os PFCs foram detectáveis, mas seus picos cromatográficos ainda estão pouco resolvidos. Esse trabalho encoraja os ajustes necessários nos métodos em estudos futuros, para a obtenção de resultados cada vez mais sensíveis para a determinação dos PFCs. Uma das propostas desta pesquisa foi a otimização da detecção desses compostos os quais pouco se conhece. Esta fase da pesquisa encontrou diferentes perfis e separação de acordo com o solvente e metodologia utilizados (Figura 2) modificar os parâmetros disponíveis para PFCAs.

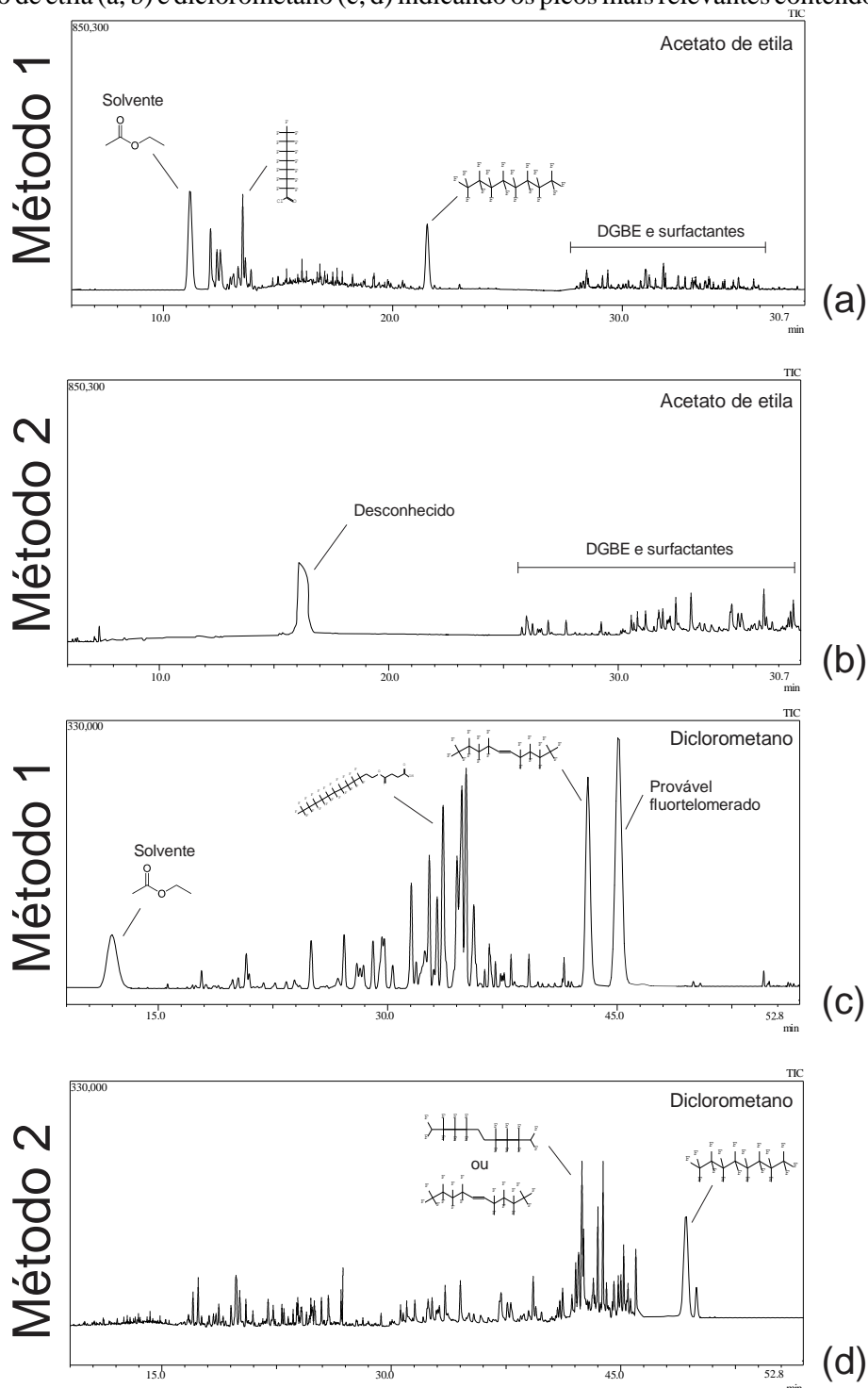
É importante citar que o método de separação cromatográfica atingido nesse estudo obteve resultados satisfatórios para análises ambientais, tanto em duração quanto em resolução dos picos. Os resultados atuais só foram obtidos após extensivos testes e adaptações das metodologias propostas por Shoeib et al. (2006) e Langlois et al. (2007). Contudo, a intensidade dos sinais e a geração inconsistente de cromatogramas entre as amostras são alguns dos problemas argumentáveis sobre essa pesquisa. Somado a isso, foi indicado na Figura 2(a) a presença de um fluorcarbonado contendo cloro em sua cadeia, o que não corresponde ao esperado. O pico desconhecido na Figura 2(b), cuja hipótese inicial era de se tratar do solvente, também não foi um resultado esperado, pois sua assinatura de fragmentação não é identificada pelo espectrômetro de massa.

Ainda assim, a mistura de compostos presente na formulação total do AFFF é bastante complexa, sendo os compostos perfluorados muito diversos. Observou-se nesses ensaios piloto que a formulação do AFFF brasileiro produzido pela Sintex amostrado nessa pesquisa difere significativamente do AFFF utilizado nos EUA, embora ambos sejam formulados pela mesma empresa (Ansul). Acredita-se que as frações menores não resolvidas na Figura 2(a) e 2(b) indique alguns surfactantes não fluorados, incluindo o dietilenoglicol butil éter (DGBE), como parte da composição total do AFFF Sintex.

Logo, os ensaios apresentados demonstraram que os métodos de GC-MS são suficientemente sensíveis e adequados para a determinação de concentrações muito baixas de fluorcarbonados em amostras reais e, portanto, pode ser potencialmente aplicada no lugar de os procedimentos de HPLC-MS/MS comumente usados.

Compostos intermediários de PFCs, incluindo PFCA e PFAS são os contaminantes esperados (BUCK et al., 2011) e são normalmente determinadas pelos métodos HPLC-MS/MS. Contudo, a instrumentação necessária é bastante cara e, portanto, é muitas vezes indisponível. Seria conveniente ter à disposição um processo com menor custo e prontamente disponível com o GC-MS para determinações de PFCs e BTEX. Logo, a adaptação da metodologia na detecção desses compostos propostas nessa pesquisa por GC-MS mostra-se promissora na detecção desses poluentes. Além disso, a retirada de amostras líquidas para HPLC interfere mais no ambiente de biodegradação dos frascos quando comparados à amostragem do espaço gasoso.

**Figura 2.** Cromatograma dos PFCs de acordo com o Método 1, modificado de Langlois et al. 2007 (a, c) e com o Método 2, modificado de Shoeib et al. 2006 (b, d) após processo de extração com os solventes acetato de etila (a, b) e diclorometano (c, d) indicando os picos mais relevantes contendo PFCs.



## 4 Conclusões

Ao longo dos experimentos piloto realizados ao longo das atividades de pesquisa nesse pós-doutorado, observou-se que diferentes vias de transformação FtTAoS podem ser monitoradas, dada a detecção em potencial de diversos PFCs. Isso é especialmente importante dada a seleção para determinadas populações microbianas que crescem em áreas contaminadas



por AFFF que poderão posteriormente alterar as vias metabólicas e produzir diferenças nas taxas de transformação dos PFCs e dos produtos finais quantificados. No entanto, não se sabe como essa confluência de fatores pode afetar as condições que facilitam ideais das vias de biotransformação de FtTAoS. Várias alterações de crescimento conhecidos podem afetar a defluoração em FtTAoS. Esse estudo encoraja, a partir das metodologias apresentadas aqui, estudos sobre substratos alternativos e co-metabólitos que podem provar ser mais benéficos na reposição de NAD(P)H consumida pela transformação de FtTAoS e aliviar o impacto dos PFCs no ambiente e por novas tecnologias de biorremediação.

## Referências

MARTIN, J. W.; KANNAN, K.; BERGER, U.; DE VOOGT, P.; FIELD, J.; FRANKLIN, J.; GIESY, J. P.; HARNER, T. et al. “Analytical challenges hamper perfluoroalkyl research”. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 13, 2004, pg. 248–255.

MOODY, C.; FIELD, J. “Perfluorinated Surfactants and the Implications of Use in Fire-Fighting Foams”. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 18, 2000, pg. 3864–3870.

AHRENS, L. “Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate”. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 1, 2011, pg. 20–31.

SCHULTZ, M.; BAROFSKY, D.; FIELD, J. “Fluorinated alkyl surfactants”. **Environmental Engineering Science**, v. 20, n. 5, 2004, pg. 487–501.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. “Perfluorochemical surfactants in the environment”. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 7, 2002, pg. 146A–152A.

WHITACRE, D. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. 5th ed. New York: Springer Science & Business Media, 2008, 751 p.

HUANG, H.; HUANG, C.; WANG, L.; YE, X.; BAI, C.; SIMONICH, M. T. et al. “Toxicity, uptake kinetics and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS)”. **Aquatic Toxicology**, v. 98, n. 2, 2010, pg. 139–147.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. “Ciências de Espumas - Aplicação na Extinção de Incêndios”. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999, pg. 126–130.

BUCK, R. C.; FRANKLIN, J.; BERGER, U.; CONDER, J. M.; COUSINS, I. T.; DE VOOGT, P. et al. “Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins”. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, 2011, pg. 513–41.

LANGLOIS, I.; BERGER, U.; ZENCAK, Z.; OEHME, M. “Mass spectral studies of perfluorooctane sulfonate derivatives separated by high-resolution gas chromatography”. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 1, 2007, pg. 3547–3553.

GOŁĘBIEWSKI, M.; SIEDLECKA, E.; PASZKIEWICZ, M.; BRZOWSKI, K.; STEPSKI, P. “Perfluorocarboxylic acids in cell growth media and technologically treated waters”. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**, v. 54, 2011, pg. 577–581.