

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Camila Cristina Almeida de Paula

**Avaliação de Carvões Ativados para Extração em Fase
Sólida: Um Método Alternativo para Determinação de
Desreguladores Endócrinos**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ ICEx/ DQ 1032^a

D 565^a

Camila Cristina Almeida de Paula

**Avaliação de Carvões Ativados para Extração em Fase
Sólida: Um Método Alternativo para Determinação de
Desreguladores Endócrinos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química - Química Analítica.

Belo Horizonte

2014

P324a Paula, Camila Cristina Almeida de
2014 Avaliação de carvões ativados para extração em fase
D sólida [manuscrito] : um método alternativo para
determinação de desreguladores endócrinos / Camila
Cristina Almeida de Paula. 2014.
[xiii], 63 f. : il.

Orientadora: Clésia Cristina Nascentes.
Coorientador: Rochel Montero Lago.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.

1. Química analítica- Teses 2. Poluentes orgânicos
aquáticos - Teses 3. Carbono ativado - Teses 4.
Extração (Química) - Teses 5. Análise cromatográfica -
Teses I. Nascentes, Clésia Cristina, Orientadora II.
Lago, Rochel Montero, Coorientador III. Título.

CDU 043



"Avaliação de Carvões Ativados para Extração em Fase Sólida: Um Método Alternativo para Determinação de Desreguladores Endócrinos"

Camila Cristina Almeida de Paula

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Clésia Cristina Nascentes - Orientadora
UFMG

Prof. Rachel Montero Lago - Coorientador
UFMG

Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Belo Horizonte, 01 de agosto de 2014.

Agradecimentos

Agradeço a Professora Clésia Cristina Nascentes pela amizade, compreensão e orientação durante o período de elaboração desse trabalho.

Agradeço ao Professor Rochel Montero Lago pelo companheirismo, co-orientação e pela oportunidade de trabalhar com o tema “contaminantes emergentes” durante minha iniciação científica, o qual despertou em mim o interesse pela área de química analítica, que pretendo seguir durante os próximos passos de minha formação acadêmica.

Agradeço aos Professores Letícia Malta Costa e Rodinei Augusti por terem participado da banca examinadora desse trabalho, bem como pelas contribuições dadas ao longo de seu desenvolvimento.

Agradeço às amigas Fernanda e Ana Luiza pelo apoio, ajuda e companheirismo durante todo o período que convivemos no laboratório e aos colegas Mateus Castro, Júlio, Diego e Aretha, pela imensa contribuição durante a obtenção dos dados de caracterização, otimização e validação desse trabalho.

Agradeço ao Mateus Xavier pela imensa contribuição e parceria durante a elaboração desse trabalho, pela amizade e por proporcionar momentos inesquecíveis em minha vida.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão durante toda essa trajetória acadêmica.

Resumo

Esse trabalho visou a elaboração de um método alternativo de extração/ pré-concentração associado a uma técnica analítica mais acessível para detecção e quantificação dos analitos 17 α -etinilestradiol (EE2), 4-n-nonifenol (NP) e bisfenol A (BPA), comumente classificados como desreguladores endócrinos. Carvões ativados foram utilizados como material adsorvente e a técnica analítica escolhida foi a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia na região do ultravioleta visível (CLAE-UV-vis).

Nesse contexto, três tipos de carvão ativado foram avaliados como possíveis adsorventes para construção de um sistema de extração em fase sólida em fluxo. Os carvões foram avaliados através de comparações entre suas áreas superficiais ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), seus volumes de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) e suas capacidades de adsorção para 17 α -etinilestradiol. O carvão PA 6:1, com maior área superficial e maior capacidade de adsorção ($500 \text{ mg g}^{-1}_{\text{carvão}}$), foi escolhido como material adsorvente para desenvolvimento do método de extração/pré-concentração.

O método de extração/pré-concentração em fluxo foi otimizado por meio de planejamentos experimentais, sendo estudadas as seguintes variáveis: fluxos de pré-concentração e eluição, quantidade de material adsorvente e composição do eluente.

Para cada um dos três analitos estudados, o método foi validado após a otimização para determinação dos parâmetros: linearidade, fator de pré-concentração, limite de detecção e quantificação da técnica e do método analítico, precisão e veracidade. As três curvas de calibração pré-concentradas atenderam às premissas do método dos mínimos quadrados ordinários para a faixa de trabalho proposta (0 a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$). Os fatores de pré-concentração encontrados (3,16 para EE2, 3,53 para NP e 2,77 para BPA) são baixos se comparados aos obtidos por extração em fase sólida com cartuchos comerciais, possivelmente devido à forte interação entre os analitos e o carvão ativado utilizado como adsorvente.

Os limites de quantificação determinados para o método variaram de 22 a $38 \mu\text{g L}^{-1}$, valores considerados elevados e inadequados para monitoramento ambiental. Porém, o método descrito pode ser utilizado, por exemplo, na avaliação da eficiência de processos de tratamento/remoção de poluentes, onde normalmente concentrações mais elevadas são utilizadas.

A veracidade foi avaliada de acordo com os critérios de aceitação definidos pela Comissão Européia (recuperações entre 80 % e 110 %), de modo que apenas as recuperações obtidas para os dois primeiros níveis estudados para o 17 α -etinilestradiol (130% e 120%) não apresentaram concordância. A precisão foi expressa através dos desvios padrão relativos, que variaram entre 2,7 % e 9,6 %, e também estão de acordo com o critério de aceitabilidade definido pela Comissão Européia, que estabelece um desvio padrão relativo de até 10 % para concentrações acima de $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, carvões ativados, adsorção, pré-concentração, CLAE-UV.

Abstract

This work aimed the development of an alternative method of extraction/preconcentration associated with an affordable analytical technique for the detection and quantification of the 17 α -ethinylestradiol (EE2), 4-n-noniphenol (NP) and bisphenol A (BPA) analytes, usually classified as endocrine disrupters. Activated carbons were employed as adsorbent material and the chosen analytical technique was the high performance liquid chromatography coupled with ultraviolet visible spectroscopy (HPLC-UV-VIS).

In this context, three types of activated carbon were evaluated as possible adsorbents for the construction of a solid phase flow extraction system. The carbons were assessed through the comparison between their surface areas ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), their pore volumes ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) and their adsorption capacities for 17 α -ethinylestradiol. The carbon PA 6:1 carbon presented the largest surface area and adsorption capacity ($500 \text{ mg g}^{-1}_{\text{carbon}}$) among all carbons tested, and was chosen to be the adsorbent material used on the development of the present extraction/preconcentration method.

The flow extraction/preconcentration method was optimized an experimental design, with the following variables being investigated: preconcentration and elution flows, the amount of adsorbent material and the composition of the eluent.

For each of the investigated analytes, the validation of the method succeeded its optimization for the determination of the following parameters: linearity, preconcentration factor, detection limit and quantification limit of the technique and of the analytical method, precision and accuracy. All of the three preconcentrated calibration curves met the ordinary least squares (OLS) method premises for the proposed working range (0 to $1000 \mu\text{g L}^{-1}$). The calculated preconcentration factors (3.16 for EE2; 3.53 for NP and 2.77 for BPA) are low when compared to those achieved by solid phase extraction with commercial cartridges, possibly due to the strong interaction between the analytes and the activated carbon employed as adsorbent.

The determined quantification limits of the method ranged from 22 to $38 \mu\text{g L}^{-1}$, which is considered high, making it inadequate for environmental monitoring. Nevertheless, the described method may be employed, for instance, in the evaluation of the efficiency of pollutant treatment/removal processes, where higher concentration levels are often utilized.

The accuracy was assessed according to the European Commission acceptance criteria (recoveries between 80 and 110 %), thus, only the recoveries achieved for the first two investigated levels of 17 α -ethinylestradiol (130 and 120 %) did not present proper agreement. The precision was expressed through relative standard deviations, which ranged from 2.7 to 9.6 % and are also in agreement with the acceptance criteria defined by the European Commission, which establishes a maximum relative standard deviation of 10 % for concentrations over $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Keywords: endocrine disrupters, activated carbons, adsorption, preconcentration, HPLC-UV-VIS.

Lista de Figuras

Figura 1: Principais fontes dos desreguladores endócrinos.	3
Figura 2: Disruptores endócrinos avaliados neste trabalho.	3
Figura 3: Esquema das etapas do processo de extração em fase sólida.	8
Figura 4. Estudo cinético dos carvões ativados - quantidade de 17 α -etinilestradiol adsorvida ($\text{mg}_{\text{analito}} \text{g}^{-1}_{\text{carvão}}$) por tempo (minutos).	16
Figura 5. Espectro EDS e MEV para o carvão PA 6:1.	17
Figura 6. Espectro IV obtido para o carvão PA 6:1.	18
Figura 7. Análise Termogravimétrica da amostra PA 6:1 em atmosfera de ar.	19
Figura 8. Montagem utilizada para realização das etapas de pré-concentração/eluição durante otimização e validação do método.	24
Figura 9. Cromatograma obtido na condições otimizadas para um solução de 6 mg.L^{-1} dos analitos.	28
Figura 10. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao 17 α -etinistradiol.	31
Figura 11. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao 4-n-nonilfenol.	31
Figura 12. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao bisfenol A.	32
Figura 13. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min^{-1}) versus volume de eluente (mL) para a resposta 17 α -etinilestradiol.	33
Figura 14. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min^{-1}) para a resposta bisfenol A.	33
Figura 15. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de pré-concentração (mL min^{-1}) para a resposta 17 α -etinilestradiol.	34
Figura 16. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de pré-concentração (mL min^{-1}) para a resposta de bisfenol A.	34
Figura 17. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min^{-1}) versus fluxo de pré-concentração (mL min^{-1}) para a resposta 17 α -etinilestradiol.	35

Figura 18. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min ⁻¹) versus composição da coluna (mg) para a resposta 17 α -etinilestradiol.	36
Figura 19. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus volume de eluente (mL) para a resposta 17 α -etiniestradiol.	40
Figura 20. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta 17 α -etinilestradiol.	40
Figura 21. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta 17 α -etiniestradiol.	41
Figura 22. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta 4-n-nonilfenol.	41
Figura 23. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta 4-n-nonilfenol.	42
Figura 24. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus composição do eluente (%acetonitrila/metanol) para a resposta 4-n-nonilfenol.	42
Figura 25. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta bisfenol A.	43
Figura 26. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus fluxo de eluição (mL min ⁻¹) para a resposta bisfenol A.	43
Figura 27. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus volume de eluente (mL) para a resposta bisfenol A.	44
Figura 28. Perfil cromatográfico apresentado pelos analitos para as análises de validação do método.	49

Figura 29. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de de calibração pré-concentradas de 17 α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) e 4-n-nonilfenol (NP), respectivamente. 52

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos carvões ativados de acordo com o diâmetro médio de seus poros.(IUPAC, 1972).....	6
Tabela 2: Condições utilizadas na síntese dos carvões ativados ³⁷	14
Tabela 3: Áreas superficiais ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) e volumes de poro ($\text{cm}_3 \text{g}^{-1}$) dos carvões ativados PA 1:1, PA 3:1 e PA 6:1 ³⁷	15
Tabela 4: Variáveis do planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$).....	25
Tabela 5: Variáveis do planejamento composto central em cinco níveis	26
Tabela 6: Gradiente de eluição para separação dos analitos por HPLC-DAD .	27
Tabela 7: Tempo de retenção e comprimento de onda máximo de absorção dos analitos.....	27
Tabela 8: Resultados obtidos na avaliação do potencial adsorvente da areia de quartzo	28
Tabela 9: Resultados para o planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$)	29
Tabela 10: Resultados para o planejamento composto central rotacional em cinco níveis.....	37
Tabela 11: Condições otimizadas do método de pré-concentração/eluição proposto.	44
Tabela 12: Gradiente de eluição para separação dos analitos por HPLC-UV..	47
Tabela 13: Tempo de retenção e comprimento de onda máximo de absorção dos analitos.....	49
Tabela 14: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as curvas de calibração pré-concentradas de 17 α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) e 4-n-nonilfenol (NP).....	51

Tabela 15: Comparação das curvas realizadas com e sem pré-concentração e fator de pré-concentração (FPC) obtido para os analitos estudados	53
Tabela 16: Limites de detecção e quantificação da técnica e do método proposto obtidos para os analitos estudados	54
Tabela 17: Porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo obtidos para amostras de água de torneira enriquecidas em três diferentes concentrações dos analitos estudados.....	55

Sumário

Agradecimentos.....	III
Resumo	IV
Abstract.....	V
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	IX
CAPÍTULO 1: Introdução e Objetivo	1
1.1 Introdução.....	2
1.1.1 Contaminantes emergentes	2
1.1.2 Desreguladores Endócrinos	2
1.1.3. Remoção e quantificação de perturbadores endócrinos em meio aquoso	5
1.2 Objetivo.....	10
CAPÍTULO 2: Caracterização dos Adsorventes.....	11
2.1 Introdução.....	12
2.2 Parte experimental.....	12
2.2.1 Materiais e reagentes.....	12
2.2.2 Instrumentação	13
2.2.3 Soluções para estudo de tempo de equilíbrio	14
2.2.4 Caracterização dos materiais adsorventes	14
2.3 Resultados e Discussão	15
2.3.1 Escolha do material adsorvente	15
2.3.2 Caracterizações	16
CAPÍTULO 3: Otimização do método.....	20

3.1	Introdução.....	21
3.2.	Parte Experimental	22
3.2.1	Materiais e reagentes.....	22
3.2.2	Instrumentação	22
3.2.3	Tratamento estatístico.....	22
3.2.4	Preparo das soluções estoque e de trabalho	22
3.2.5	Condições cromatográficas.....	23
3.2.6	Sistema empregado para pré-concentração/ eluição	23
3.2.7	Preparo da coluna de pré-concentração e avaliação do potencial adsorvente do material dispersante.	24
3.2.8	Otimizações do método de pré-concentração/eluição.....	25
3.3	Resultados e Discussão	26
3.3.1	Otimização das condições cromatográficas	26
3.3.2	Avaliação do potencial adsorvente do material dispersante.....	28
3.3.3	Otimizações do método de pré-concentração/ eluição.....	29
CAPÍTULO 4:	Validação do Método.....	45
4.1	Introdução.....	46
4.2	Parte Experimental	46
4.2.1	Materiais e reagentes.....	46
4.2.2	Instrumentação	46
4.2.3	Soluções da curva de calibração pré-concentrada	47
4.2.4	Soluções da curva de calibração para cálculo do fator de pré-concentração.....	47
4.3	Parâmetros de validação	48
4.3.1	Linearidade	48
4.3.2	Fator de pré-concentração	48
4.3.3	Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	48

4.3.4 Precisão e veracidade	48
4.4 Resultados e discussão	49
4.4.1 Critérios de identificação	49
4.4.1 Linearidade	50
4.4.2 Fator de pré-concentração	52
4.4.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	53
4.4.4 Precisão e Veracidade	54
CAPÍTULO 5: Considerações Finais	56
CAPÍTULO 6: Referências Bibliográficas	59

CAPÍTULO 1

Introdução e Objetivo

1.1 Introdução

1.1.1 Contaminantes emergentes

Atualmente, a qualidade da água é uma questão amplamente discutida dentro da química ambiental e é nesse cenário que os contaminantes emergentes vêm ganhando destaque. Dentre esses contaminantes temos diversos compostos químicos presentes em medicamentos, produtos de higiene, agrotóxicos, embalagens de alimentos, etc., que possuem entrada contínua no meio ambiente através de efluentes industriais e domésticos lançados em corpos d'água.^{1,2} Esses contaminantes, apesar de serem comumente encontrados em concentrações na ordem de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, podem apresentar riscos a saúde humana. Tais poluentes recebem a classificação de emergentes porque muitos ainda não são monitorados, uma vez que a análise química em concentrações baixas é extremamente difícil e não há legislação específica que regulamente e controle a presença destes compostos em águas de abastecimento urbano.^{3,4}

Os reais efeitos causados por esses contaminantes ao meio ambiente e aos seres humanos ainda não foram completamente esclarecidos. Porém, um grupo específico desses contaminantes, denominado de Desreguladores Endócrinos (DE), é descrito mais extensamente na literatura. Algumas publicações relacionam o aparecimento de anomalias no sistema reprodutivo de animais e humanos, bem como a ocorrência de distúrbios metabólicos, à presença desses contaminantes em águas de abastecimento urbano.^{5,6} Isso porque essas substâncias são capazes de interferir no sistema endócrino de seres vivos, mimetizando ou bloqueando a ação de hormônios naturais.⁷

1.1.2 Desreguladores Endócrinos

Várias classes de substâncias orgânicas pertencentes a funções distintas, incluindo substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios) e substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A, hormônios sintéticos, antibióticos, fármacos diversos, entre outras), são classificadas como DE.⁸ A Figura 1 esquematiza as possíveis fontes desses contaminantes.



Figura 1: Principais fontes dos desreguladores endócrinos.

Para esse trabalho foram escolhidas três substâncias consideradas DE bastante citadas na literatura, sendo estas o 17 α -etinilestradiol (EE2), o 4-n-nonilfenol (NP) e o bisfenol A (BPA), cujas estruturas moleculares são apresentadas na Figura 2.

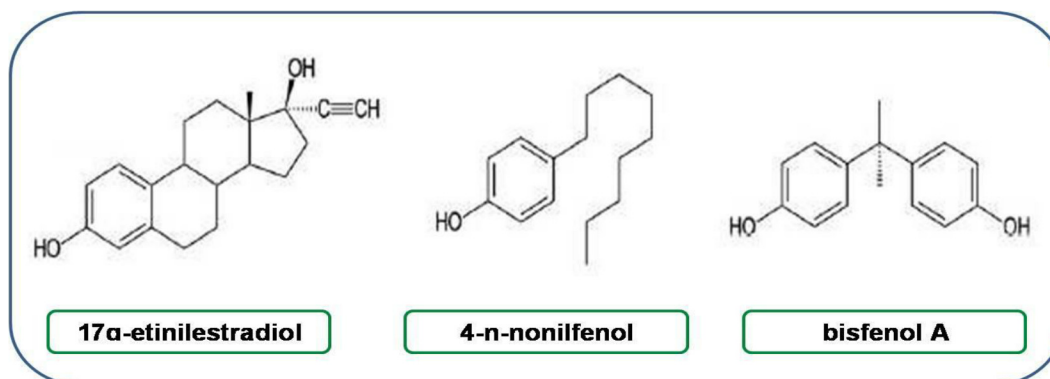


Figura 2: Disruptores endócrinos avaliados neste trabalho.

O hormônio sintético 17 α -etinilestradiol é amplamente utilizado na fabricação de anticoncepcionais, em tratamentos de reposição hormonal e câncer de próstata, sendo sua atividade desreguladora endócrina já constatada.⁹ Sua entrada no meio ambiente é contínua, uma vez que este não é totalmente metabolizado no organismo de usuários do medicamento, sendo excretado através da urina lançada na rede de esgoto. Outro possível veículo de entrada seriam os efluentes das indústrias farmacêuticas, que podem ser lançados no esgoto sem tratamento eficaz que elimine tal contaminante.¹⁰

Assim, visto o crescente uso desses medicamentos por mulheres em idade fértil, a introdução desse perturbador endócrino em corpos d'água vem aumentando consideravelmente. No Brasil, um monitoramento realizado em uma estação de tratamento de esgoto (ETE) na cidade do Rio de Janeiro, detectou a presença de 17α -etinilestradiol em concentrações na ordem de $5,0 \text{ ng L}^{-1}$.¹¹ Estudos mais recentes, realizados em águas superficiais na região de Campinas, determinaram a presença desse analito em faixa de concentração mais elevada ($0,1$ a $4,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).^{12,13}

O 4-n-nonilfenol pertence à classe dos alquilfenóis, compostos nos quais um grupo alquil de qualquer extensão está ligado em uma das posições de um anel fenílico.¹⁴ Esse composto é amplamente utilizado como surfactante não iônico, estando presente em detergentes industriais e domésticos, lubrificantes, emulsificantes, pesticidas, tintas e em produtos de higiene pessoal (maquiagem, cremes de pele, produtos para cabelo e banho). É durante a produção e uso desses produtos que esse contaminante encontra sua rota de entrada no meio ambiente, sendo lançado em esgotos domésticos. Em trabalho recente, concentrações médias de $13,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $4,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas em efluentes de esgoto e águas superficiais, respectivamente¹⁵. Além disso, já foram relatados distúrbios hormonais em seres vivos expostos a esse DE, que por ser lipofílico, pode ser facilmente retido no organismo.^{16,17}

O composto bisfenol A é um monômero muito usado na fabricação de plásticos, tendo destaque os policarbonatos e resinas epóxi.¹⁸ O composto também é utilizado na produção de adesivos, papéis para fax, tubulações, painéis de automóveis e capas de produtos eletrônicos.¹⁹ Mas, a aplicação mais questionável desse DE é sua utilização em revestimentos de latas de conservas e frascos de alimentos para bebês, pois este pode ser liberado e contaminar esses alimentos.¹⁹ Outra fonte de contaminação são alguns polímeros usados no tratamento dentário, que também contêm bisfenol A. Sendo assim, a exposição humana a esse contaminante é ampla, apesar dos esforços a proibição de sua utilização na fabricação de frascos de alimentos,¹⁹ já que estudos relataram sua atividade estrogênica.^{18,20} Os mesmos estudos que determinaram a presença do 4-n-nonilfenol em efluentes e águas superficiais, também determinaram bisfenol A em concentrações médias de $0,7$

e $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente em águas superficiais e efluentes de estações de tratamento de esgoto.¹⁵

1.1.3. Remoção e quantificação de perturbadores endócrinos em meio aquoso

Considerando a frequente ocorrência desses poluentes em meio aquoso e os impactos causados ao meio ambiente e saúde pública, métodos para quantificação são fundamentais para um monitoramento adequado. Aliado à este controle ambiental, processos eficientes e de baixo custo para a remoção destes compostos tem sido demandados, visto que os processos de tratamento de água e esgoto convencionais não apresentam alta taxa de remoção.

Neste contexto, os carvões ativados podem ser uma boa alternativa pois apresentam alta capacidade de adsorção de compostos orgânicos. Esses materiais podem ser empregados tanto para processos adsortivos que objetivam a remoção dos contaminantes de águas e efluentes quanto para métodos de pré-concentração visando a quantificação de baixas concentrações por técnicas analíticas mais acessíveis.

Carvões ativados e Processos adsortivos

O fenômeno de adsorção ocorre quando um ou mais componentes fluidos (líquido ou gás) são depositados sobre uma superfície sólida, por intermédio de forças atrativas entre o fluido e a superfície. O sólido sobre o qual ocorre a adsorção é o denominado adsorvente, enquanto o material retido na superfície é denominado adsorvato.^{11,21}

Diversos materiais podem ser utilizados como adsorventes no processo de tratamento de águas de abastecimento, dentre eles podem ser citados a alumina ativada (Al_2O_3), a sílica gel, o carvão ativado, os óxidos metálicos e resinas adsorventes.

Atualmente, a adsorção em carvão ativado é bastante aplicada ao tratamento de água, uma vez que por meio desta é possível remover compostos causadores de sabor e odor, subprodutos da cloração como os trihalometanos (THM) e compostos orgânicos sintéticos ou naturais que são nocivos à saúde,¹¹ tais como os analitos avaliados nesse trabalho.

A preocupação com a presença de compostos orgânicos nocivos à saúde humana em corpos d'água tem gerado interesse pela técnica de adsorção. Existem relatos do uso de filtros de carvão ativado granular para esses fins desde 1960, principalmente em países como a Dinamarca, Alemanha, EUA e a Inglaterra.²² Mais recentemente, alguns estudos investigaram o uso de carvão ativado na remoção de DE tais como 17 α -etinilestradiol, 4-n-nonilfenol e bisfenol A, obtendo índices de remoção de aproximadamente 99%.^{18,23}

O carvão ativado pode ser produzido a partir de diversas matrizes de materiais carbonáceos de origem vegetal (como madeira, casca de coco), animal (como ossos de animais) ou mineral (como lignita, material betuminoso, etc.). O processo físico de ativação, geralmente, é realizado por meio de uma decomposição térmica da matriz carbonácea, na presença de vapor, em temperaturas entre 900 e 1100 °C. Já o processo químico, ocorre mediante desidratação dos carboidratos do material carbonáceo, na qual produtos como ZnCl₂ ou H₃PO₄ promovem a ativação na ausência de ar sob temperatura entre 500 a 700°C.²²

A matriz carbonácea utilizada para produção do carvão ativado, bem como seu processo de ativação, são fatores que definem suas propriedades estruturais, tais como porosidade e afinidade pelo adsorvato. A área superficial é uma característica decisiva na eficiência adsortiva do carvão produzido, de modo que o tamanho dos poros e sua distribuição ao longo do material irão determinar a finalidade do mesmo.^{24,25} Assim, os carvões ativados podem ser classificados de acordo com o diâmetro médio de seus poros. A Tabela 1 apresenta essa classificação.

Tabela 1: Classificação dos carvões ativados de acordo com o diâmetro médio de seus poros.(IUPAC, 1972)

Classificação do carvão ativado	Diâmetro médio (nm)
Microporoso	< 2
Mesoporoso	2 – 50
Macroporoso	> 50

Apesar da grande área superficial que o processo de ativação do carvão pode gerar, nem todos os poros produzidos são sítios aptos para adsorção. O grau de afinidade entre o composto adsorvato e o material adsorvente também é um fator determinante do processo, e não apenas o tamanho do poro. Isso porque o processo de adsorção pode não ser apenas físico, no qual forças de Van der Waals promovem a interação entre o adsorvato e o adsorvente. Muitas vezes, o processo de adsorção pode ocorrer através da formação de ligações químicas entre grupos funcionais presentes no adsorvato e no adsorvente, alterando a estrutura molecular do adsorvato, e isso dependerá das propriedades químicas do par adsorvato/adsorvente.²⁵ Um exemplo é a adsorção de fenol por carvão ativado funcionalizado, no qual grupos carboxílicos ionizados do carvão podem formar ligações químicas com as hidroxilas das moléculas de fenol.²⁶

Desse modo, alguns carvões ativados serão avaliados nesse trabalho como possíveis materiais adsorventes para proposição de um método de extração/pré-concentração de contaminantes emergentes, tal como o descrito a seguir.

Extração/pré-concentração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) é atualmente a técnica de pré-concentração mais empregada para amostras líquidas, na qual o material adsorvente varia de acordo com características dos analitos.^{27,28} Essa técnica consiste na percolação da solução contendo os analitos de interesse através do sólido adsorvente, comercialmente contido em uma seringa ou outro dispositivo com membranas filtrantes em ambos os lados. Tal conjunto é denominado de coluna de extração. A eluição dos analitos retidos no adsorvente é feita através da passagem de um solvente orgânico pelo qual esses têm maior afinidade. Como, geralmente, o volume de solvente necessário para completa eluição dos analitos é menor do que o volume original da amostra, ocorre a pré-concentração dos analitos do extrato final. Esse fato é importante para adequar técnicas analíticas menos sensíveis à quantificação de analitos que se encontram em baixas concentrações nas amostras de interesse, como acontece com os compostos estudados neste trabalho. Muitas vezes, também é necessário realizar uma etapa de lavagem

antes da eluição, onde um solvente pelo qual os analitos não possuem afinidade é percolado pela coluna de extração para remoção de interferentes.^{27,28} Um esquema clássico das etapas da SPE é apresentado na Figura 3.

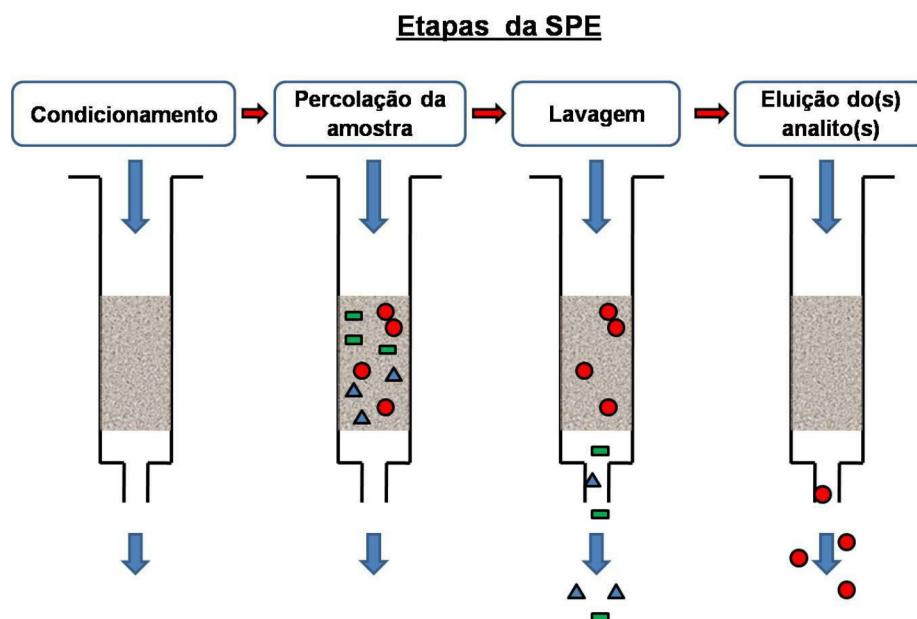


Figura 3: Esquema das etapas do processo de extração em fase sólida.

Na literatura encontram-se trabalhos que usam fases sólidas comerciais para a determinação de contaminantes emergentes, como os cartuchos com sorvente de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidrofílica-lipofílica, podem extrair analitos de média a alta polaridade (antibióticos, medicamentos antifúngicos e antiparasitários de uso humano e veterinário, entre outros), apresentando bons percentuais de recuperação.²⁹

Porém, apesar da eficiência, essas etapas, bem como os adsorventes comumente usados, contribuem para elevação dos custos da análise como um todo, sendo vantajoso propor métodos de extração/pré-concentração alternativos de baixo custo. Dessa maneira, esse trabalho visou a utilização de materiais adsorventes de menor custo, tais como o carvão ativado descrito³⁰, para o desenvolvimento de um método de extração/pré-concentração eficiente para os analitos escolhidos.

Técnicas analíticas aplicadas na detecção e quantificação de DE

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas em química ambiental para promover separações, tendo destaque a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*). A escolha da técnica dependerá das propriedades físico-químicas de volatilidade e polaridade dos analitos de interesse.³¹ Em geral, poluentes voláteis e semi-voláteis, não polares e lipofílicos são separados por cromatografia gasosa. Entretanto, analitos termicamente instáveis não podem ser separados por CG, devido a possíveis degradações, de modo que a HPLC é mais indicada.³¹ Além disso, a volatilidade não é um critério limitante para a cromatografia líquida.³¹ Os analitos aqui estudados não são voláteis e possuem polaridade intermediária, podendo ser separados pela técnica HPLC.

A detecção e a quantificação de DE tais como 17 α -etinilestradiol, 4-n-nonilfenol e bisfenol A em matrizes ambientais como solo, águas, efluentes industriais, sedimentos e amostras biológicas é uma tarefa árdua, visto a baixa concentração em que esses analitos são geralmente encontrados. Assim, a utilização de detectores robustos, sensíveis e seletivos é extremamente necessária para a obtenção de resultados confiáveis. Atualmente, os detectores mais utilizados para quantificação de DE são o espectrômetro de massas (MS, *mass spectrometry*) e suas variações, sendo estes os métodos de detecção mais utilizados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) em estudos ambientais.³² Porém, apesar da alta sensibilidade e seletividade apresentada, estes detectores possuem alto custo de obtenção e manutenção, o que pode impossibilitar a instalação desses equipamentos em laboratórios de rotina e em estações de tratamento de águas e esgotos³³. Além disso, a utilização de detectores mais sofisticados não elimina a etapa de preparo de amostra, pois, geralmente, as amostras devem passar por um processo de limpeza (*clean-up*).

O detector de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta (UV) é uma alternativa mais acessível quando os analitos estudados absorvem nessa região de comprimento de onda. Algumas publicações recentes têm

empregado a detecção por UV para determinação de antibióticos em matrizes biológicas (urina e músculo de frango)³⁴ e ambientais (efluente hospitalar)³⁴ ou anti-inflamatórios em efluentes.^{35,36}

Desse modo, o trabalho descrito aqui propõe o desenvolvimento de um método que utiliza uma técnica analítica mais acessível associada a um processo de extração/pré-concentração alternativo para determinação dos analitos 17 α -etinilestradiol, 4-n-nonilfenol e bisfenol A em meio aquoso. Assim, o método foi otimizado e validado para a finalidade a qual se destina.

1.2 Objetivo

O objetivo geral do trabalho desenvolvido foi avaliar a potencialidade de carvões ativados para a adsorção de 17 α -etinilestradiol, 4-n-nonilfenol e bisfenol A em meio aquoso, de forma a viabilizar um método de extração/pré-concentração para quantificação destes compostos, em baixas concentrações, por HPLC-UV-VIS.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Determinar, dentre os adsorventes, qual o mais adequado para adsorção dos analitos estudados;
- Caracterizar o adsorvente escolhido;
- Otimizar as condições cromatográficas para separação e determinação de 17 α etinilestradiol, 4-n-nonilfenol e bisfenol A por HPLC-UV;
- Otimizar o procedimento de pré-concentração dos analitos citados empregando o adsorvente escolhido;
- Validar o método proposto.

CAPÍTULO 2

Caracterização dos adsorventes

2.1 Introdução

A capacidade adsorptiva de um carvão ativado depende de sua área superficial e dos grupos presentes na superfície, bem como do tamanho médio de seus poros frente ao adsorvato de interesse.³⁷ Em geral, para que ocorra adsorção, as dimensões da molécula adsorvida devem ser compatíveis com as dimensões do poro.³⁷

Além das dimensões dos poros, o formato da partícula e o balanço hidrofílico/hidrofóbico do carvão influenciam no tempo de contato entre o adsorvato e o carvão, necessário para que o processo adsorptivo ocorra. Para um sistema de adsorção em fluxo, tal como o processo de extração/pré-concentração proposto, é desejável que processo de adsorção seja rápido, uma vez que o tempo de contato entre o adsorvato e o material adsorvente é relativamente curto.

Os adsorventes utilizados nesse trabalho foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do *Laboratorio de Materiales Avanzados (LMA) da Universidade de Alicante*, sendo sua síntese descrita mais detalhadamente por Castro *et al.*^{30,38} Três tipos de carvão ativado foram sintetizados a partir de um resíduo de petróleo, o alcatrão de etileno, que foi pirolisado em temperaturas diferentes, para que durante a ativação com diferentes quantidades de hidróxido de potássio fossem geradas diferentes porosidades.

Sendo assim, essa parte do trabalho foi destinada a escolha do carvão ativado que apresentasse o melhor potencial adsorptivo, frente ao analito 17 α -etinilestradiol, e a sua caracterização. Esse analito foi escolhido, por apresentar o maior volume molecular dentre os demais e por normalmente sua concentração no ambiente ser a menor em relação aos outros dois analitos. As áreas superficiais ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) e os volumes de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$) dos carvões³⁸ foram utilizadas para comparação entre os resultados obtidos.

2.2 Parte experimental

2.2.1 Materiais e reagentes

O padrão do analito 17 α -etinilestradiol (pureza ≥ 98 %), foi obtido da Sigma Aldrich (Seelze, Alemanha). O solvente orgânico acetonitrila de grau

cromatográfico também foi adquirido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Os materiais adsorventes utilizados foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Laboratorio de Materiales Avanzados (LMA) da Universidade de Alicante. A água utilizada para preparo de todas as soluções foi deionizada por um purificador Mega Purity (resistividade 18,2 MΩcm). Micropipetas Gilson (Middleton, EUA) de volume variável de 20 a 200 µL e de 100 a 1000 µL foram utilizadas para o preparo das soluções. Balança analítica do modelo AX200 (max. 200 g; min. 0,01 g; erro 0,001 g; d = 0,1 g) foi utilizada na pesagem dos reagentes e adsorventes.

2.2.2 Instrumentação

O espectrofotômetro UV-Vis utilizado para os estudos cinéticos dos carvões ativados foi o UV-2550 da Shimadzu (Kyoto, Japão), no qual o comprimento máximo de adsorção utilizado para identificação do analito foi 280nm.

A análise térmica (TG) foi realizada no equipamento DTG – 60 Shimadzu (Kyoto, Japão), sob as seguintes condições: fluxo de ar de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento 10 °C min⁻¹, faixa de temperatura 25 - 900 °C. Nestas análises foi utilizada uma massa de amostra de 5,0 mg em cadinhos de alumina. Foi utilizada α-alumina como referência para o DTA. As curvas TG/DTG e DTA foram obtidas no laboratório do Grupo de Tecnologias Ambientais do Departamento de Química, UFMG.

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em um equipamento FEI Quanta 200 FEG (Oregon, EUA). As imagens foram obtidas sob tensão de aceleração de 15 kV. As análises por microscopia dispersiva de energia (EDS) foram realizadas no mesmo equipamento, sob as mesmas condições. Todas as micrografias foram obtidas no Centro de Microscopia da UFMG.

Os espectros de infravermelhos (IV) foram registrados em um equipamento ALPHA FT-IR Spectrometer Bruker (Rheinstetten, Alemanha), na região de 4000-500 cm⁻¹, com 32 varreduras. O espectro foi obtido pelo modo de transmitância, utilizado KBr para homogeneização da amostra.

2.2.3 Soluções para estudo de tempo de equilíbrio

As soluções de 17 α -etinilestradiol utilizadas para os estudos cinéticos foram preparadas a partir de uma solução estoque de concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila.

Todas as soluções aquosas preparadas continham 20% v v⁻¹ de acetonitrila, para assegurar a completa dissolução do analito no meio.

2.2.4 Escolha do material adsorvente

Três tipos de carvão ativado, sintetizados a partir de um resíduo de petróleo (o alcatrão de etileno)³⁰ foram avaliados. A nomenclatura utilizada para designar os carvões, no trabalho que descreve sua síntese, foi mantida aqui. A Tabela 2 apresenta as condições em que cada um dos carvões foi produzido.

Tabela 2: Condições utilizadas na síntese dos carvões ativados³⁸

Carvão ativado	Temperatura de pirólise (°C)	Tempo de pirólise (h)	Proporção de KOH utilizado para ativação (m _{KOH} /m _{carvão})	Tempo de ativação (h)	Temperatura de ativação (°C)
PA 1:1	440	1	1/1	2	800
PA 3:1			3/1		
PA 6:1			6/1		

Para determinar qual o melhor material para os fins propostos, foram comparadas suas áreas superficiais (m² g⁻¹) e seus volumes de poros (cm³ g⁻¹) determinados pelo método BET,³⁸ e seus estudos de tempo de equilíbrio.

Os estudos de tempo de equilíbrio foram realizados a partir de 10 mg de cada adsorvente colocados separadamente em contato com 500 mL de solução de 17 α -etinilestradiol 10 mg L⁻¹. Esse sistema foi mantido sob agitação enquanto alíquotas de cada solução foram retiradas de tempos em tempos, filtradas e medidas em um espectrofotômetro UV-VIS ($\lambda = 280$ nm). Para minimizar o efeito da alteração do volume da solução durante o experimento, cada alíquota retirada retornou ao meio reacional após a medição. A avaliação

do potencial adsorvente dos carvões estudados foi feita através da construção de um gráfico que relacionou a quantidade de EE2 adsorvida em função do tempo de contato entre cada material e a solução do analito.

O material que apresentou as melhores características nestes estudos iniciais foi caracterizado também por Análise térmica (TG), Espectroscopia na região do infravermelho (IV), microscopia dispersiva de energia (EDS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Escolha do material adsorvente

As áreas superficiais ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e os volumes de poro ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) de cada carvão ativado avaliado constam na Tabela 3.

Tabela 3: Áreas superficiais ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e volumes de poro ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) dos carvões ativados PA 1:1, PA 3:1 e PA 6:1³⁸

Amostras	Área superficial/ $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	Volume de poro/ $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$		
		Microporo	mesoporo	Total
PA 1:1	1468	0,61	0,02	0,63
PA 3:1	2767	0,95	0,32	1,27
PA 6:1	3250	1,11	0,88	1,99

O gráfico da quantidade 17α -etinilestradiol adsorvida em função do tempo, construído a partir dos estudos de tempo de equilíbrio realizados para cada material é apresentado a seguir (Figura 4).

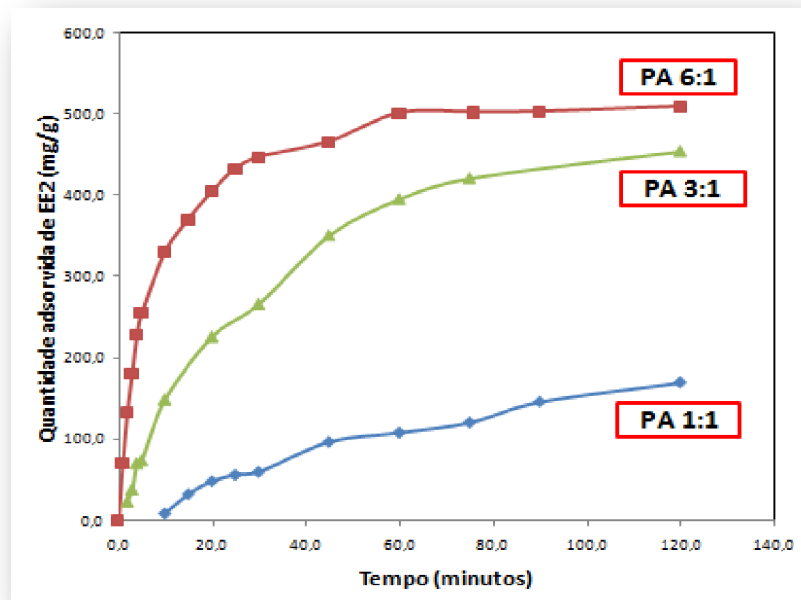


Figura 4. Estudo cinético dos carvões ativados - quantidade de 17α -etinilestradiol adsorvida ($\text{mg}_{\text{analito}} \text{g}^{-1}_{\text{carvão}}$) por tempo (minutos).

Observa-se que o carvão PA 6:1 apresenta uma capacidade de adsorção de 500 mg de analito por g de carvão. Para os carvões PA 3:1 e PA 1:1 observa-se uma forte diminuição na capacidade de adsorção. Essas capacidades de adsorção parecem estar relacionadas diretamente com a área superficial, pois o material que apresentou a maior capacidade de adsorção apresenta a maior área superficial.

Assim, o carvão ativado PA 6:1 foi escolhido como material adsorvente para o desenvolvimento da metodologia de extração/pré-concentração dos analitos estudados, sendo as caracterizações apresentadas a seguir referentes a esse material.

2.3.2 Caracterizações

Microscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 5 apresenta a análise por EDS do carvão PA 6:1, realizada para investigar a composição química do carvão. Essa análise apresenta

informações qualitativas, não permitindo quantificar os elementos presentes na amostra.

A imagem do carvão PA 6:1 obtida por MEV (Figura 5) sugere que o material não apresenta granulometria homogênea nem forma definida, contendo partículas com diâmetro médio entre 25 a 200 μm . Pode se observar também uma superfície aparentemente rugosa, o que condiz com a grande área superficial obtida.

Como é possível observar, o carvão apresenta em sua composição os elementos alumínio, sódio, carbono, e oxigênio. Os dois metais presentes podem ser atribuídos a impurezas, visto a abundância na qual estão presentes na natureza e, possivelmente, na matriz carbônica utilizada na síntese dos carvões. O sinal intenso referente a presença de sílica é atribuído a placa de sílica utilizada para fixação da amostra durante a análise.

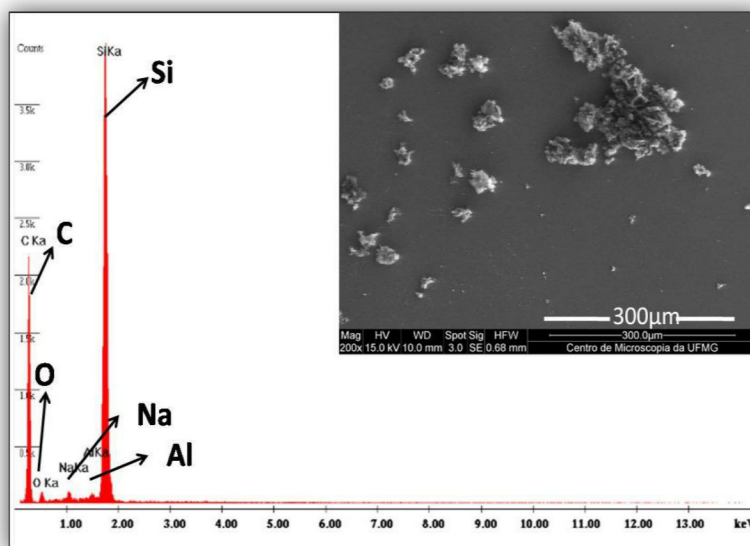


Figura 5. Espectro EDS e MEV para o carvão PA 6:1.

Espectroscopia na região do Infravermelho

A Figura 6 apresenta o espectro obtido na região do IV para o carvão PA 6:1. Essa análise permite confirmar a presença de grupos funcionais na superfície do material, tais como carboxila, carbonila e fenol.

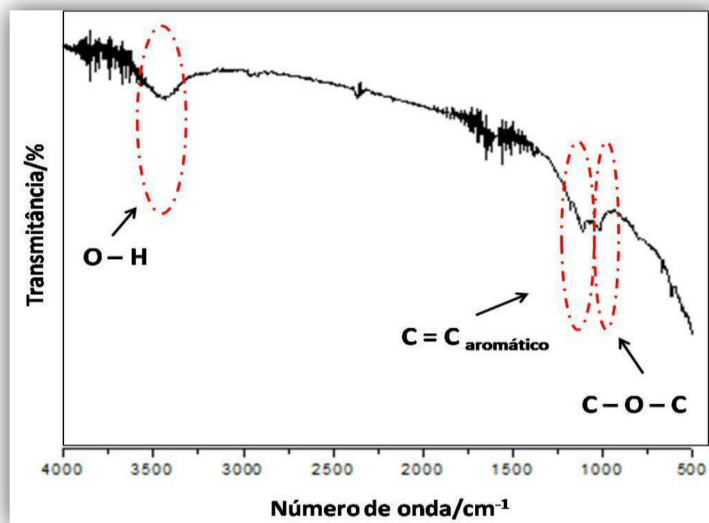


Figura 6. Espectro IV obtido para o carvão PA 6:1.

O estiramento O-H, referente a grupos fenólicos e carboxílicos poder ser observado em torno de 3500 cm^{-1} . As bandas presentes na região entre 1200 e 1000 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos C=C de estruturas aromáticas e estiramentos C-O-C, respectivamente. As baixa intensidades de todas as bandas citadas podem indicar que existem poucos grupos funcionais nesse carvão.

Análise Térmica (TG)

A Figura 7 apresenta a curva de análise térmica (TG) e sua primeira derivada (DTA) para a amostra PA 6:1.

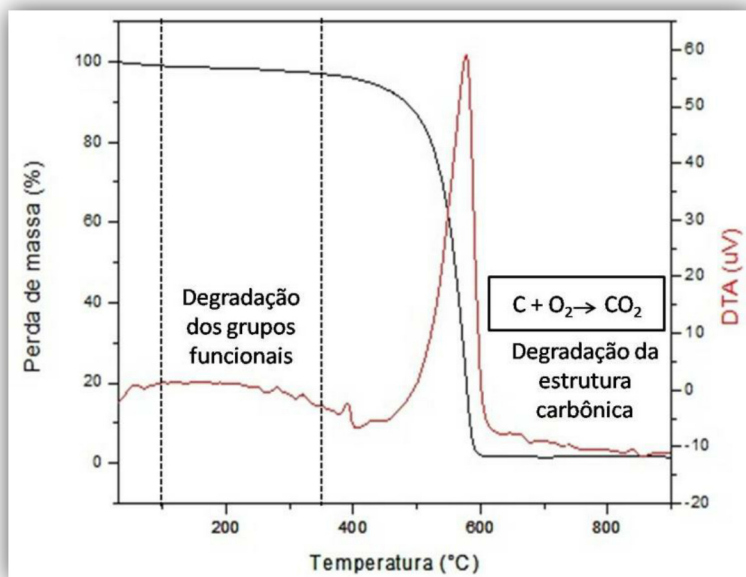


Figura 7. Análise Termogravimétrica da amostra PA 6:1 em atmosfera de ar.

A degradação térmica de carvões pode ser dividida em três estágios, sendo o primeiro referente a perda de água superficial (entre 50 e 100 °C), o segundo relacionado à degradação de grupos funcionais (entre 100 e 350 °C) e o terceiro atribuído à oxidação da estrutura carbônica a CO_2 .³⁹ A curva TG apresentada mostra que as perdas de massa referentes a água e aos grupos funcionais não foram significativas quando comparadas a perda referente a estrutura carbônica, o que está de acordo com interpretação do espectro IV.

A partir das características avaliadas, acredita-se que o carvão ativado PA 6:1 seja um bom adsorvente para compostos orgânicos que serão foco deste trabalho.

CAPÍTULO 3

Otimização do método

3.1 Introdução

Esse capítulo foi dedicado aos procedimentos de otimização do método analítico realizados nesse trabalho e a todas as etapas que se sucederam para estes fins. Ferramentas quimiométricas foram empregadas para a otimização.

As técnicas quimiométricas têm sido empregadas para otimizar condições experimentais em diversos campos da ciência.⁴⁰ As aplicações mais comuns estão centradas na elaboração de planejamentos experimentais para determinação das condições ótimas de sistemas que envolvam mais de uma variável. Esses planejamentos são realizados através da criação de modelos matemáticos que levam em consideração todas as variáveis que interferem no sistema, bem como as interações entre essas variáveis que podem influenciar negativa ou positivamente à resposta final. A principal vantagem do uso de quimiometria nesse caso é a capacidade de reunir informações úteis sobre o sistema pela realização de um número mínimo de experimentos, o que proporciona economia de tempo e dos recursos despendidos durante o procedimento de otimização.^{40,41}

Muitas vezes, em um sistema, diversas variáveis (ou fatores) podem influenciar a resposta final. Entretanto, alguns desses fatores considerados inicialmente podem não apresentar uma influência significativa sobre a resposta. Desse modo, um planejamento experimental inicial pode ser executado para determinar as variáveis realmente significativas e as interações entre elas. Após selecionar essas variáveis, é necessário avaliar em quais níveis essas devem ser fixadas para a obtenção de uma "resposta ótima" do sistema. Para isso, um planejamento experimental que proporcione a construção de uma superfície de resposta deve ser elaborado. E nesse planejamento, as variáveis que não foram selecionadas na etapa inicial devem ser fixadas durante todo o experimento.^{40,41}

Nesse trabalho foi realizado inicialmente um planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$), para determinação das variáveis significativas do método de extração/pré-concentração desenvolvido. Posteriormente, foi realizado um planejamento composto central ($2^3 + 2.3 + 3 = 17$) para determinação das condições ótimas do método.

3.2. Parte Experimental

3.2.1 Materiais e reagentes

Os padrões dos analitos 17 α -etinilestradiol (pureza ≥ 98 %), bisfenol A (pureza ≥ 99 %) e 4-nonilfenol (pureza ≥ 99 %) foram obtidos da Sigma Aldrich (Seelze, Alemanha). Os solventes orgânicos metanol e acetonitrila de grau cromatográfico foram adquiridos da J.T. Baker (Nova Jersey, EUA). Os materiais adsorventes utilizados foram cedidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Materiales Avanzados (LMA) da Universidade de Alicante. A água utilizada para preparo de todas as soluções foi desionizada por um purificador Mega Purity (resistividade 18,2 M Ω cm). A areia de quartzo utilizada é comercialmente denominada de "areia de aquário" e foi adquirida em uma loja de artigos para aquários na cidade de Belo Horizonte. O ácido clorídrico 37% m/v utilizado para preparo da solução de lavagem da areia foi obtido da Merck (São Paulo, Brasil). Micropipetas Gilson (Middleton, EUA) de volume variável de 20 a 200 μ L e de 100 a 1000 μ L foram utilizadas para o preparo das soluções. Balança analítica do modelo AX200 (max. 200 g; min. 0,01 g; erro 0,001 g; d = 0,1 g) foi utilizada na pesagem de todos os materiais.

3.2.2 Instrumentação

O cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo Finnigan Surveyor HPLC System acoplado ao detector Finnigan Suveryor PDA detector Thermo (Waltham, EUA) foi utilizado para a otimização do método. A bomba peristáltica utilizada durante a pré-concentração foi a Minipuls 3 Gilson (Middleton, EUA).

3.2.3 Tratamento estatístico

Os tratamentos estatísticos dos dados obtidos nas otimizações foram realizados através do programa Statistica versão 8.0.

3.2.4 Preparo das soluções estoque e de trabalho

As soluções estoque de 17 α -etinilestradiol e bisfenol A foram preparadas em concentração de 1000 mg L⁻¹ em acetonitrila. Já a solução estoque de 4-n-nonilfenol foi preparada na mesma concentração em metanol, por ser mais solúvel nesse solvente. Para preparo das soluções aquosas de

trabalho, foi utilizada uma solução de 50 mg L⁻¹, preparada a partir das soluções estoques dos analitos.

Todas as soluções aquosas de trabalho preparadas continham 10% v v⁻¹ de metanol e 10% v v⁻¹ de acetonitrila, para assegurar a completa dissolução dos analitos no meio.

Todas as soluções descritas foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas em refrigerador a 4 °C.

3.2.5 Condições cromatográficas

Para se obter uma separação adequada dos analitos e picos cromatográficos bem definidos, ajustou-se as seguintes condições cromatográficas: tipo de eluição (gradiente ou isocrática), composição da fase móvel, comprimento de onda máximo de absorção (μm) , volume de injeção (μL), fluxo de injeção (mL min⁻¹) e tempo total de corrida (min). A coluna cromatográfica utilizada foi a Discovery HS F5 da Sigma Aldrich (15 cm x 2,1 mm, 3 μm) e sua temperatura foi mantida em 35 °C. Para otimização dessas condições foram utilizadas soluções de 10 mg L⁻¹ de cada analito, que foram introduzidas separadamente no cromatógrafo.

3.2.6 Sistema empregado para pré-concentração/ eluição

O método de pré-concentração desenvolvido nesse trabalho envolveu duas etapas. A primeira etapa consistiu na pré-concentração dos analitos via percolação de 10,0 mL de uma solução de concentrações conhecidas dos mesmos por um coluna que continha o material adsorvente. A segunda etapa consistiu na eluição desses analitos, através da percolação em contra-fluxo, de uma pequena quantidade de solvente. Os fluxos de pré-concentração e eluição, bem como o material adsorvente e a composição do eluente, são variáveis importantes desse sistema e foram otimizadas nesse trabalho. A montagem utilizada para o desenvolvimento do método é mostrada na Figura 8.

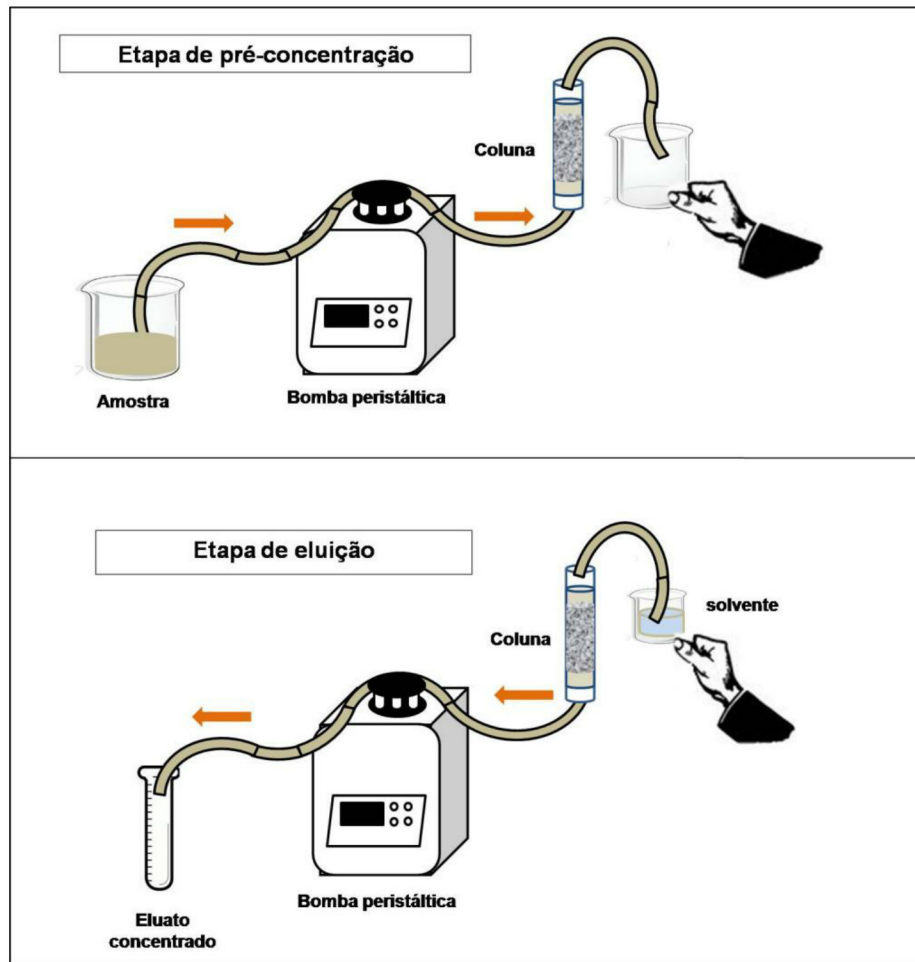


Figura 8. Montagem utilizada para realização das etapas de pré-concentração/eluição durante otimização e validação do método.

3.2.7 Preparo da coluna de pré-concentração e avaliação do potencial adsorvente do material dispersante.

As colunas para pré-concentração/eluição do analito foram preparadas através do empacotamento de uma determinada quantidade de material adsorvente em colunas de vidro de aproximadamente 0,7 cm de diâmetro e 4,5 cm de comprimento. Como as partículas do material adsorvente são muito pequenas foi necessário utilizar um material inerte como dispersante, para evitar um empacotamento que dificultasse a passagem dos fluídos. Desta forma o adsorvente foi misturado a 1,0 g de areia de quartzo, antes de ser empacotado, para assegurar uma dispersão homogênea do adsorvente. Para eliminação de possíveis contaminantes, a areia foi previamente lavada com

10,0 mL de uma solução de HCl 20% v v⁻¹ e posteriormente lavada com água purificada, até o alcance de pH neutro.

Para se verificar se o dispersante utilizado era eficiente e realmente inerte, determinou-se a capacidade de adsorção da areia de quartzo através de um teste que envolveu apenas a etapa de pré-concentração do método descrito anteriormente, utilizando-se 10,0 mL de uma solução aquosa de 5 mg L⁻¹ dos analitos. Para tal, foram preparadas duas colunas, uma contendo 5,0 mg do carvão PA 6:1 e 1,0 g de areia (COL 1), e outra contendo apenas 1,0 g de areia (COL 2). As alíquotas recolhidas para os testes com ambas as colunas foram denominadas de ACOL 1 e ACOL 2, respectivamente. Essas alíquotas foram injetadas no sistema cromatográfico para avaliação dos resultados.

3.2.8 Otimizações do método de pré-concentração/eluição

Planejamento fatorial - Avaliação das variáveis significativas.

Inicialmente, para determinação das variáveis significativas do sistema, foi feito um planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$). As variáveis estudadas foram o fluxo de pré-concentração dos analitos (mL min⁻¹), o fluxo de eluição (mL min⁻¹), o volume de eluente (mL) e a massa de adsorvente utilizada na coluna, denominada de composição da coluna (mg). Independentemente da quantidade de material adsorvente, a massa de areia de aquário adicionada foi fixada em 1,0 g. A Tabela 4 apresenta as variáveis estudadas em seus respectivos níveis.

Tabela 4: Variáveis do planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$)

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Fluxo de eluição (mL min ⁻¹)	0,5	1,0	1,5
Fluxo de pré-concentração (mL min ⁻¹)	1,0	1,5	2,0
Volume de eluente - metanol (mL)	1,0	2,0	3,0
Composição da coluna (mg)	5,0	10	15

Desse modo, um total de 19 experimentos foram realizados em ordem aleatória, nos quais 10,0 mL de uma solução de 1,0 mg L⁻¹ dos analitos foram utilizados em cada etapa de pré-concentração/eluição. Essa alta concentração dos analitos foi utilizada para se assegurar sinais mensuráveis por HPLC-DAD.

Superfície de resposta

Após a avaliação das variáveis significativas do sistema, um planejamento composto central rotacional em cinco níveis foi elaborado para construção de superfícies de resposta que indicassem uma possível condição operacional ótima para o sistema estudado. As variáveis estudadas nesse caso foram o fluxo de eluição (mL min⁻¹), o volume de eluente (mL) e a composição do eluente (% acetonitrila/ metanol). O fluxo de pré-concentração foi mantido em 2,0 mL min⁻¹ e a massa de material adsorvente em 5,0 mg dispersos em 1,0 g de areia de aquário. A Tabela 5 apresenta as variáveis estudadas em seus respectivos níveis.

Tabela 5: Variáveis do planejamento composto central em cinco níveis

Variáveis	Níveis				
	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Fluxo de eluição (mL min ⁻¹)	0,30	0,50	0,75	1,0	1,2
Volume de eluente (mL)	1,0	1,4	2,0	2,6	3,0
Composição eluente - (% acetonitrila/ metanol)	0/100	30/70	50/50	70/30	100/0

Nesse planejamento, novamente um total de 17 experimentos foram realizados em ordem aleatória, sendo 3 desses experimentos no ponto central. Para esse estudo também foram usados 10,0 mL de uma solução de 1,0 mg L⁻¹ dos analitos em cada etapa de pré-concentração/eluição.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Otimização das condições cromatográficas

Após a avaliação visual dos cromatogramas obtidos com condições previamente descritas na literatura e de alguns ajustes para o equipamento

utilizado, definiu-se que a eluição em gradiente foi mais adequada que a isocrática. A mistura de solventes escolhida foi água: metanol. Na Tabela 6 é apresentado gradiente de eluição utilizado.

Tabela 6: Gradiente de eluição para separação dos analitos por HPLC-DAD

Tempo/min	% metanol	% água
0	50	50
8,0	100	0
12,0	100	0
12,5	50	50
20,0	50	50

O fluxo de eluição mais adequado foi de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, sendo o volume de injeção de $10,0 \text{ }\mu\text{L}$ e tempo total de corrida de 20 minutos. Para determinação do tempo de retenção de cada analito e dos respectivos comprimentos de onda máximos de absorção, apresentados na Tabela 7, as três soluções de 10 mg L^{-1} foram injetadas separadamente no equipamento, sendo as medidas realizadas entre 200 e 600 nm. Na Figura 9 é apresentado um cromatograma obtido nas condições otimizadas.

Tabela 7: Tempo de retenção e comprimento de onda máximo de absorção dos analitos

Analitos	Tempo de retenção/min	Comp. máximo de absorção/nm
17 α -etinilestradiol	14,99	278
4-n-nonilfenol	18,30	279
bisfenol A	15,87	281

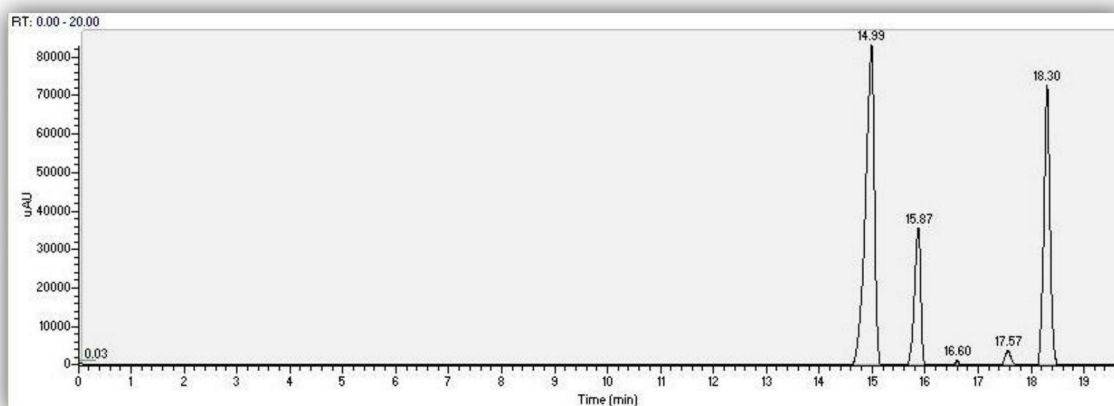


Figura 9. Cromatograma obtido na condições otimizadas para um solução de 6 mg.L⁻¹ dos analitos.

3.3.2 Avaliação do potencial adsorvente do material dispersante

No intuito de avaliar se a areia de quartzo utilizada como dispersante poderia adsorver os analitos, foram realizados ciclos de pré-concentração para as colunas COL 1 e COL 2, obtendo-se as amostras denominadas de ACOL 1 e ACOL 2. Para tal, 10 mL de uma solução de 5,0 mg L⁻¹ dos analitos foi utilizada num fluxo de 2 mL min⁻¹. O controle foi feito através da análise de uma alíquota dessa solução (branco). As áreas dos picos cromatográficos obtidas nas análises das alíquotas recolhidas são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos na avaliação do potencial adsorvente da areia de quartzo

Amostras	Áreas do picos cromatográficos		
	17 α -etinilestradiol	4-n-nonilfenil	Bisfenol A
Controle (5 mg L ⁻¹)	916526 (100%)	240411 (100%)	347440 (100%)
ACOL 1	174345 (19%)	34739 (14%)	43768 (13%)
ACOL 2	891380 (97%)	212253 (88%)	276277 (80%)

Os resultados mostram que o carvão ativado PA 6:1 associado ao material dispersante (COL 1) se mostrou satisfatório quanto a utilização proposta, uma vez que reteve cerca de 81% do 17 α -etinilestradiol, 86% do 4-n-nonilfenol e 87% de bisfenol A contido nas alíquotas analisadas. O material utilizado como dispersante (COL 2) se mostrou praticamente inerte para o 17 α -

etinilestradiol, pois reteve apenas cerca de 3% desse analito presente na amostra. Já para os demais analitos, a areia de aquário apresentou uma adsorção um pouco maior, retendo cerca de 12% do 4-n-nonilfenil e 20% de bisfenol A contido nas amostras.

Ainda assim, a principal contribuição no processo adsorptivo é do carvão e a areia de aquário foi mantida como material dispersante, por ter apresentado bom desempenho para a finalidade pretendida e ser de fácil aquisição.

3.3.3 Otimizações do método de pré-concentração/ eluição

O planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3$) gerou um total de 19 experimentos, cuja análise resultou nas áreas dos picos cromatográficos que constam na Tabela 9. Um controle analítico, correspondente a uma alíquota da solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada analito, que não passou pelo método de pré-concentração, foi analisado e utilizado para calcular os fatores de pré-concentração, apresentados entre parênteses na Tabela 9. Esse fator equivale a razão entre as áreas obtidas para cada experimento e para o controle.

Tabela 9: Resultados para o planejamento fatorial completo com ponto central ($2^4 + 3 = 19$)

Experimentos	Áreas do picos cromatográficos		
	17 α -etinilestradiol	4-n-nonilfenil	Bisfenol A
1	1049678 (5,8)	202625 (1,0)	248660 (6,6)
2	1233621 (6,8)	237577 (1,1)	290161 (7,7)
3	1051797 (5,8)	239925 (1,1)	220174 (5,9)
4	922208 (5,1)	205194 (1,0)	160037 (4,3)
5	512438 (2,8)	137474 (0,7)	178061 (4,7)
6	296641 (1,6)	174822 (0,8)	239498 (6,4)
7	288214 (1,6)	107080 (0,5)	154952 (4,1)
8	494079 (2,7)	126693 (0,6)	178326 (4,7)
9	1174014 (6,5)	227271 (1,1)	173221 (4,6)

10	1400000 (7,7)	164148 (0,8)	377346 (10,0)
11	2978 (0,02)	5614 (0,03)	6950 (0,2)
12	1373120 (7,6)	217911 (1,0)	248752 (6,6)
13	380721 (2,1)	154261 (0,7)	242583 (6,5)
14	5546 (0,03)	28659 (0,1)	17185 (0,5)
15	703125 (3,9)	183407 (0,9)	219406 (5,8)
16	414522 (2,3)	257033 (1,2)	286292 (7,6)
17	1232058 (6,8)	208360 (1,0)	247364 (6,6)
18	1167349 (6,4)	281294 (1,3)	259351 (6,9)
19	1264273 (7,0)	220408 (1,0)	292590 (7,8)
controle	181544	210741	37588

Para determinação das variáveis significativas dentre as estudadas, foi feito um tratamento estatístico nos dados obtidos. Os dados referentes a cada analito foram tratados separadamente, uma vez que as variáveis significativas para um determinado analito não são obrigatoriamente significativas para os demais.

As Figuras 10, 11 e 12 se referem aos gráficos de Pareto para os dados referentes ao 17 α - etinilestradiol, 4-n-nonifenol e bisfenol A, respectivamente.

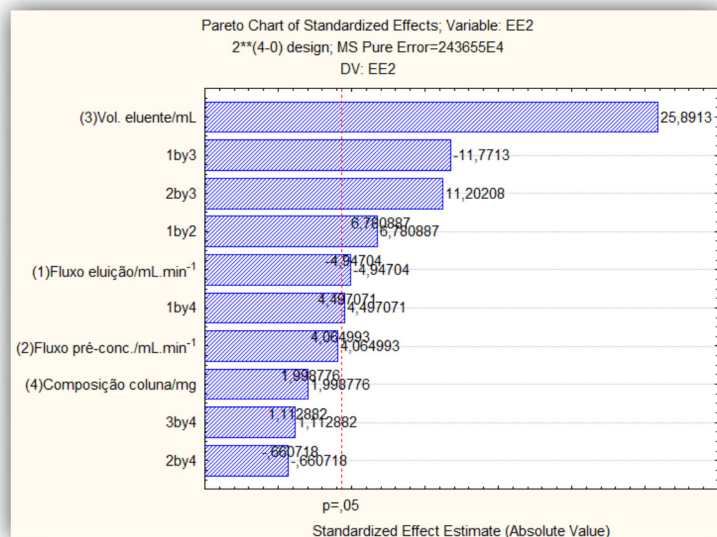


Figura 10. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao 17 α - etinilestradiol

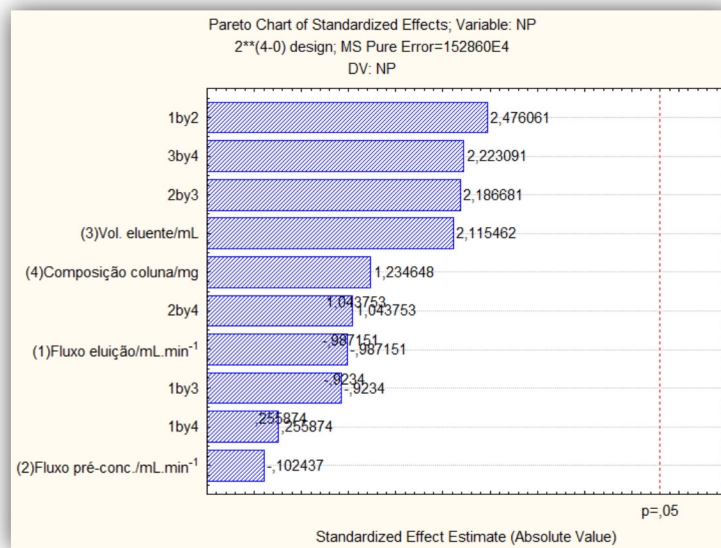


Figura 11. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao 4-n- nonilfenol.

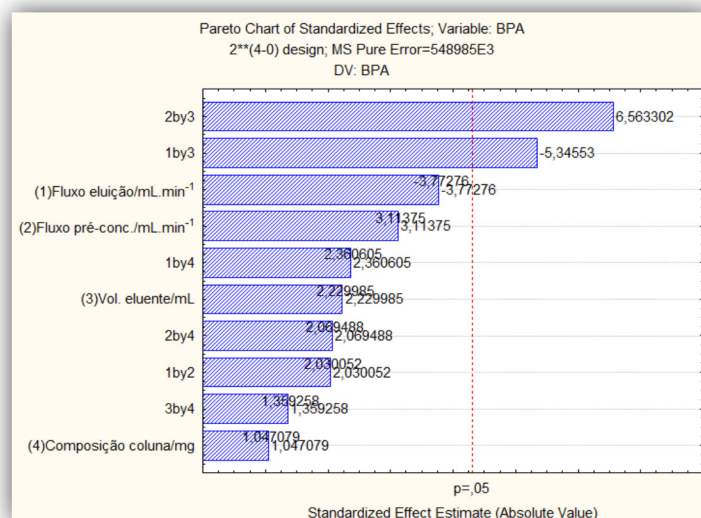


Figura 12. Gráfico de Pareto para os dados obtidos referentes ao bisfenol A.

Para 4-n-nonilfenol, nenhuma das variáveis estudadas apresentou efeito significativo dentro do domínio experimental avaliado (Figura 11). Observando os dados da Tabela 9, verifica-se que as áreas obtidas em todos os experimentos realizados são muitas vezes menores ou próximas da área obtida para a solução controle (baixos fatores de pré-concentração). Isso indica que as condições avaliadas não foram adequadas para a pré-concentração deste analito.

Analisando os demais gráficos foi possível perceber que apenas as variáveis volume de eluente e fluxo de eluição (mL min^{-1}) foram significativas para o analito 17α -etinilestradiol a um nível de confiança de 95%, sendo que o volume de eluente apresentou efeito positivo e o fluxo apresentou efeito negativo. Isso indica que maiores volumes e menores fluxos de eluição conduzem a uma maior pré-concentração desse analito. Isso pode indicar que esse analito interage fortemente com o adsorvente, sendo necessário maiores volumes de metanol para a eluição quantitativa. Esse fato deve sobrepor o efeito da diluição causado pelo maior volume de eluente utilizado. As interações 1x3 e 2x3 foram significativas para 17α -etinilestradiol e bisfenol A e as interações 1x2 e 1x4 foram significativas apenas para o etinilestradiol. Para se avaliar melhor essas interações, são apresentados nas Figuras 13 a 18 os gráficos de contorno para as interações significativas.

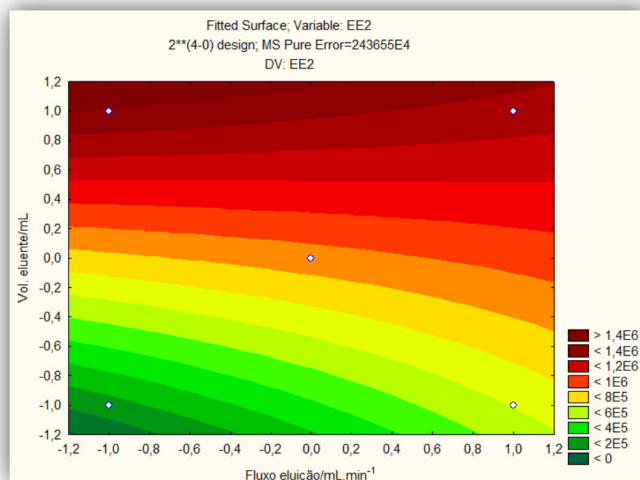


Figura 13. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min⁻¹) versus volume de eluente (mL) para a resposta 17 α -etinilestradiol.

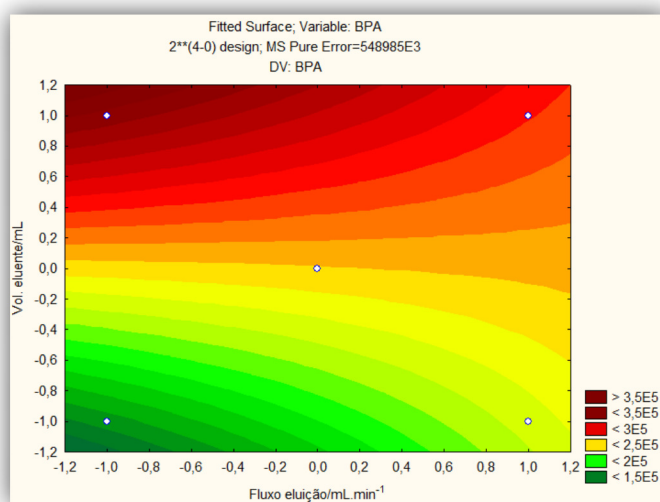


Figura 14. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min⁻¹) para a resposta bisfenol A.

Tanto para etinilestradiol quanto para bisfenol A, a interação entre o fluxo de eluição e o volume de eluente foi negativa e como pode se observar nas Figuras 13 e 14, as maiores respostas foram obtidas para os maiores volumes de metanol e menores fluxos de eluição, o que já foi discutido anteriormente para os efeitos das variáveis principais.

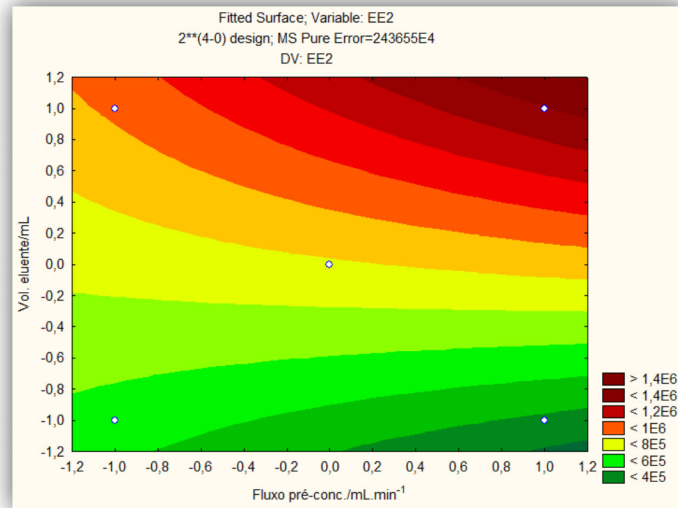


Figura 15. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de pré-concentração (mL min⁻¹) para a resposta 17 α -etinilestradiol.

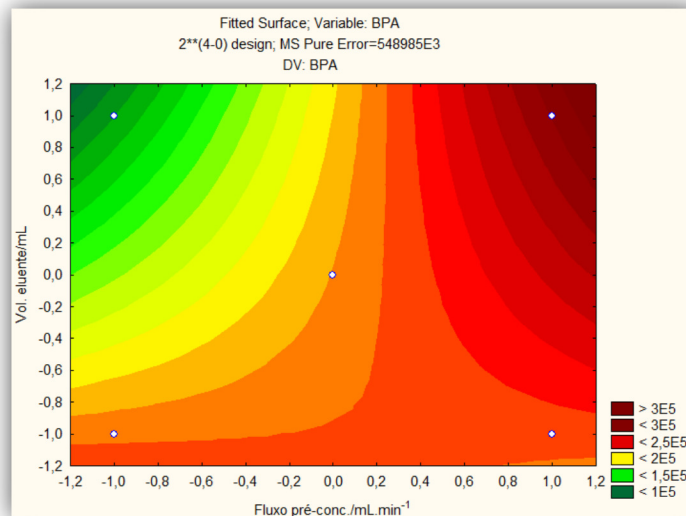


Figura 16. Curva de nível para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de pré-concentração (mL min⁻¹) para a resposta de bisfenol A.

A interação entre o fluxo de pré-concentração e o volume de eluente foi positiva para 17 α -etinilestradiol e bisfenol A, indicando que quanto maior o fluxo de pré-concentração, maior o volume de eluente necessário para se obter melhores respostas (Figuras 15 e 16). Maiores fluxos de pré-concentração devem arrastar os analitos mais fortemente através da coluna. Como a eluição

foi realizada em contra-fluxo, maior volume de eluente é necessário para remover os analitos que tiverem percorrido um caminho maior dentro da coluna de pré-concentração.

A interação entre fluxo de pré-concentração e fluxo de eluição foi positiva e significativa para 17 α -etinilestradiol e como se pode observar pela Figura 17, a medida que se aumenta o fluxo de pré-concentração, deve-se aumentar o fluxo de eluição para se manter maiores fatores de pré-concentração. Isso corrobora o fato de altos fluxos de pré-concentração arrastarem o analito por um caminho maior dentro da coluna, sendo necessário contra-fluxos de eluição maiores para remover o 17 α -etinilestradiol da coluna.

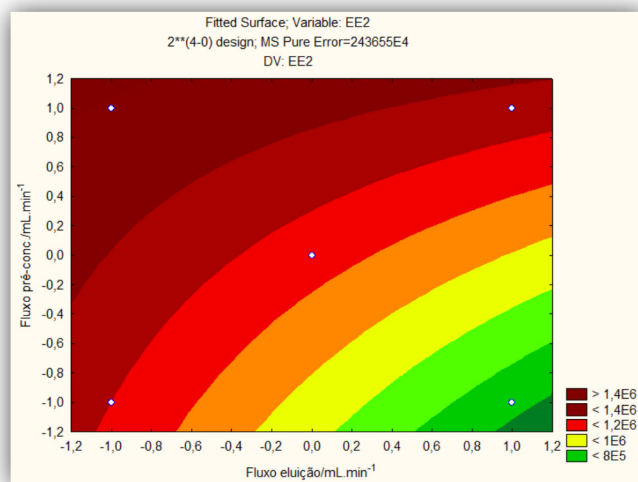


Figura 17. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min⁻¹) versus fluxo de pré-concentração (mL min⁻¹) para a resposta 17 α -etinilestradiol.

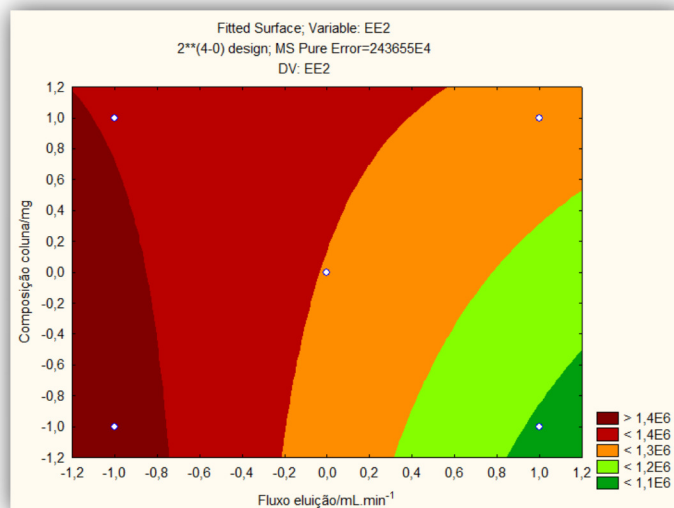


Figura 18. Curva de nível para as variáveis fluxo de eluição (mL min^{-1}) versus composição da coluna (mg) para a resposta 17α -etinilestradiol.

Uma pequena interação significativa e positiva também foi observada entre a composição da coluna e o fluxo de eluição (Figura 18), de forma que em baixos fluxos de eluição a quantidade de carvão na coluna não afeta a resposta, mas a medida que maiores fluxos de eluição são empregados, a quantidade de carvão deve aumentar para garantir maiores respostas.

Desse modo, para construção da superfície de resposta, foram escolhidas as variáveis volume de eluente e fluxo de eluição, pois ambas mostram tendências relevantes, sendo os efeitos principais significativos para 17α -etinilestradiol e interações significativas para esse analito e para bisfenol A. As variáveis fluxo de pré-concentração e composição da coluna foram fixadas em seus níveis superior ($2,0 \text{ mL min}^{-1}$) e inferior (5,0 mg), respectivamente. Isso porque, a primeira variável apresentou uma tendência positiva e um maior fluxo de pré-concentração significaria um menor tempo, melhorando a frequência analítica do método. Já a segunda variável foi fixada utilizando uma menor massa de adsorvente para evitar o desperdício do material, uma vez que esse não mostrou ser um fator relevante no estudo.

Sendo assim, o planejamento composto central rotacional realizado ($2^3 + 2.3 + 3 = 17$) foi construído avaliando a variável fluxo de eluição em níveis menores pois foi essa a tendência que esta apresentou no planejamento inicial.

A variável volume de eluente foi avaliada dentro da mesma faixa (entre 1,0 e 3,0 mL) do primeiro planejamento, mas acrescentando a composição do eluente como nova variável, afim de melhorar a etapa de eluição dos analitos, tentando assim aumentar os fatores de pré-concentração.

Os resultados obtidos para a construção das superfícies de resposta são mostrados na Um controle analito, correspondente a uma alíquota da solução de 1,0 mg L⁻¹ de cada analito, que não passou pelo método de pré-concentração, também foi analisado e utilizado para calcular os fatores de pré-concentração, apresentados entre parênteses na Tabela 10. Esse fator equivale a razão entre as áreas obtidas para cada experimento e para o controle.

Tabela 10. Um controle analito, correspondente a uma alíquota da solução de 1,0 mg L⁻¹ de cada analito, que não passou pelo método de pré-concentração, também foi analisado e utilizado para calcular os fatores de pré-concentração, apresentados entre parênteses na Tabela 10. Esse fator equivale a razão entre as áreas obtidas para cada experimento e para o controle.

Tabela 10: Resultados para o planejamento composto central rotacional em cinco níveis

Experimentos	Áreas dos picos cromatográficos		
	17 α -etinilestradiol	4-n-nonilfenil	Bisfenol A
1	55232 (0,3)	163510 (4,2)	182813 (1,6)
2	819417 (3,8)	537886 (13,9)	724031 (6,2)
3	1623459 (7,6)	392906 (10,2)	594901...(5,1)
4	1018319 (4,8)	528801 (13,7)	520455 (4,5)
5	566624 (2,7)	274026 (7,1)	330074 (2,8)
6	739168 (3,5)	254456 (6,6)	427161 (3,7)
7	409404 (1,9)	106450 (2,8)	177297 (1,5)
8	949247 (4,5)	322541 (8,4)	508721 (4,4)

9	376479 (1,8)	114940 (3,8)	207299 (1,8)
10	373811 (1,8)	147611 (3,8)	208784 (1,8)
11	518570 (2,4)	287075 (7,4)	346187 (3,0)
12	758811 (3,6)	124327 (3,2)	221140 (1,9)
13	490072 (2,3)	355354 (9,2)	423108 (3,6)
14	966801 (4,5)	265460 (6,9)	425815 (3,6)
15	936546 (4,4)	317426 (8,2)	374867 (3,2)
16	977150 (4,6)	320918 (8,3)	376578 (3,2)
17	915628 (4,3)	299553 (7,8)	461052 (3,9)
controle	213182	38588	116804

As equações 1, 2 e 3 descrevem as superfícies de resposta construídas para os sistemas 17 α - etinilestradiol (EE2), 4-n-nonifenol (NP) e bisfenol A (BPA), respectivamente. Essas equações representam os efeitos das variáveis e interações significativas na resposta analítica de cada um dos sistemas estudados. As variáveis foram codificadas como X_1 (fluxo de eluição), X_2 (volume de eluente) e X_3 (composição do eluente), para facilitar a construção das equações matemáticas, sendo Y a área do pico cromatográfico (resposta) para cada analito estudado.

- **Equação 1**

$$Y_{EE2} = - 15333 X_1^2 - 60178 X_2^2 - 63474 X_1 - 162837 X_2 - 125253 X_1X_2 + 69168 X_1X_3 - 21428 X_2X_3 + 929387$$

- **Equação 2**

$$Y_{NP} = - 39114,4 X_1^2 + 24202,5 X_3^2 - 55771,8 X_1 + 59805,0 X_3 - 39218,8 X_1X_3 - 39975,3 X_2X_3 + 305402,3$$

- **Equação 3**

$$Y_{BPA} = - 65731,8 X_1 + 395579,1$$

Analisando as equações é possível perceber que o fluxo de eluição (X_1) foi significativo e negativo para todos os 3 analitos estudados, confirmando os resultados obtidos no primeiro planejamento. Menores fluxos parecem ser mais eficientes na remoção dos analitos da coluna, talvez devido a forte interação entre analitos e adsorvente. Como o material PA 6:1 apresenta grande quantidade de microporos e mesoporos, é possível que os analitos tenham ficados retidos nessas cavidades, dificultando assim a remoção. Fluxos muito altos não permitem que o eluente penetre nos poros, diminuindo assim a eficiência da eluição. Já o volume do eluente apresentou efeito negativo para todos os analitos, embora tenha sido significativo apenas para o EE2. Isso demonstra que com um eluente com composição diferente é possível eluir os analitos com volumes menores. O efeito da composição do eluente foi significativo apenas para o 4-n-nonilfenol, tendo indicado que o aumento da proporção de acetonitrila melhora o sinal analítico para esse composto. Para bisfenol A o efeito da composição do eluente também foi positivo e apesar de não ter sido significativo, foi o segundo maior efeito observado.

A interação volume de eluente versus composição do eluente foi negativa para todos os três analitos, sendo significativa para EE2 e NP. Isso indica que aumentando-se a porcentagem de acetonitrila no eluente, consegue-se eluir os analitos com menor volume da mistura. A interação fluxo de eluição versus volume do eluente também foi negativa para todos os analitos, sendo significativa apenas para o EE2.

Pelas superfícies de resposta (Figuras 19 a 27) pode-se observar melhor os efeitos descritos.

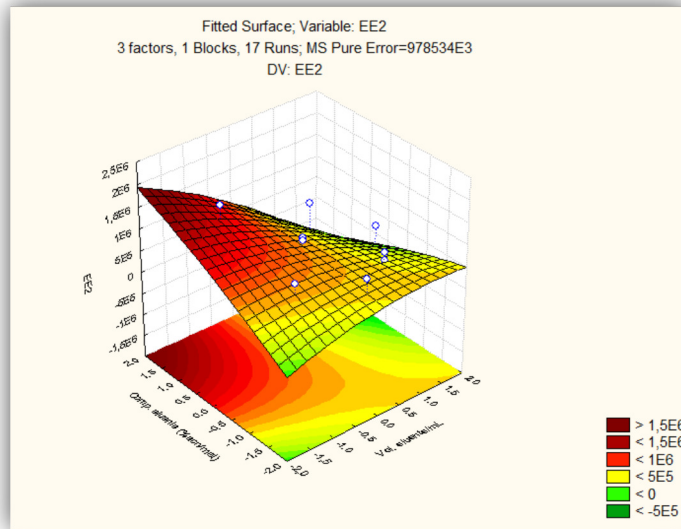


Figura 19. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus volume de eluente (mL) para a resposta 17 α -etinilestradiol. Fluxo de eluição (mL min⁻¹) fixo em seu nível superior.

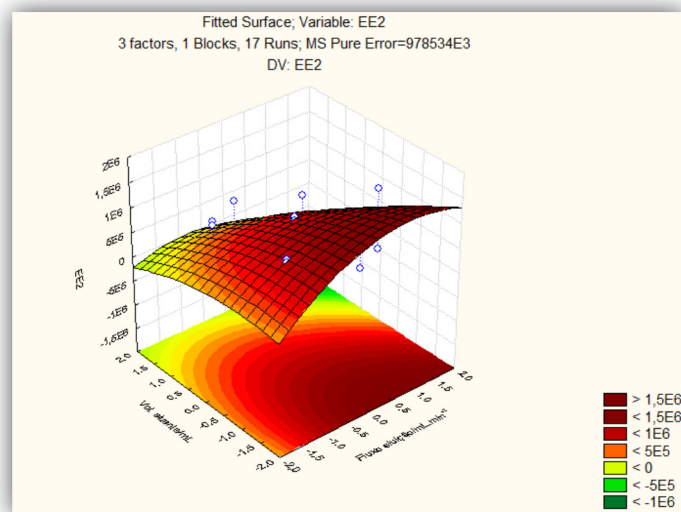


Figura 20. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min⁻¹) para a resposta 17 α -etinilestradiol. Composição do eluente (% acetonitrila/ metanol) fixo em seu nível superior.

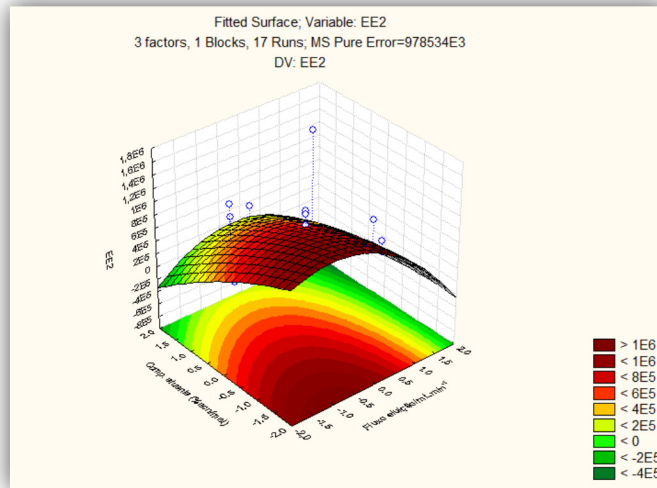


Figura 21. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/metanol) versus fluxo de eluição (mL min^{-1}) para a resposta 17 α -etionilestradiol. Volume de eluente (mL) fixo em seu nível superior.

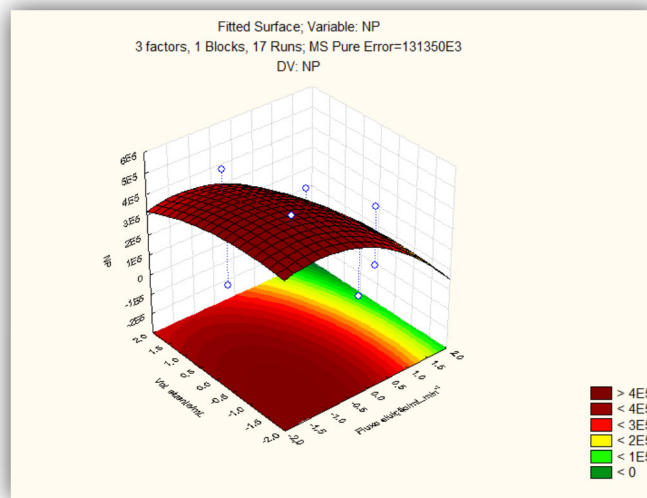


Figura 22. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min^{-1}) para a resposta 4-n-nonilfenol. Composição do eluente (% acetonitrila/ metanol) fixo em seu nível superior.

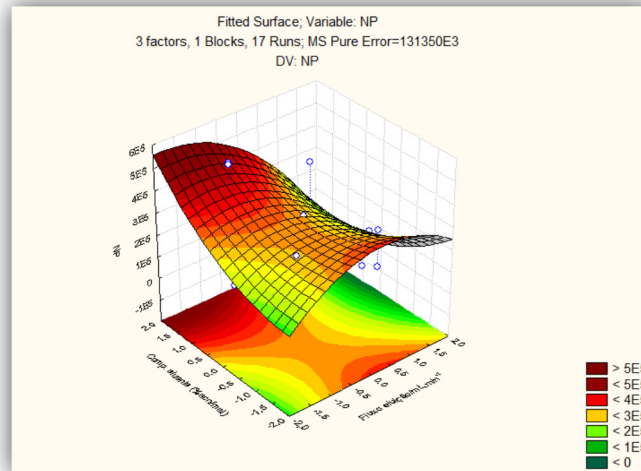


Figura 23. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/ metanol) versus fluxo de eluição (mL min^{-1}) para a resposta 4-n-nonilfenol. Volume de eluente (mL) fixo em seu nível superior.

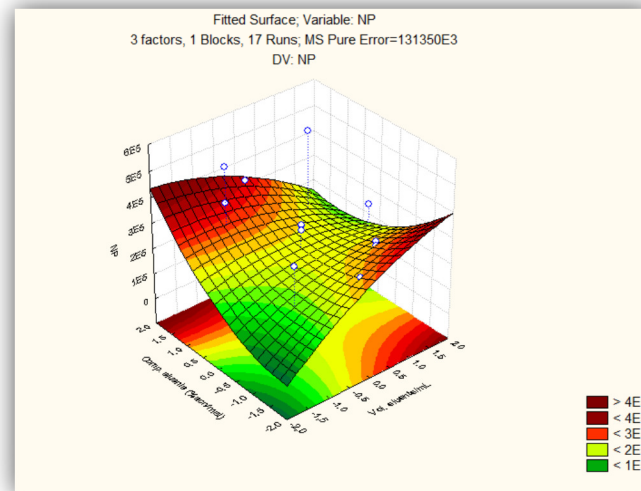


Figura 24. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus composição do eluente (%acetonitrila/metanol) para a resposta 4-n-nonilfenol. Fluxo de eluição (mL min^{-1}) fixo em seu nível superior.

De forma geral, observando-se as superfícies de resposta obtidas para 17α -etinilestradiol e 4-n-nonilfenol, verificou-se a mesma tendência para as variáveis volume de eluente e fluxo de eluição, pois ambas tenderam para

valores entre os níveis -1 e 0. Já a variável composição do eluente tendeu para valores entre os níveis +1 e +1,682.

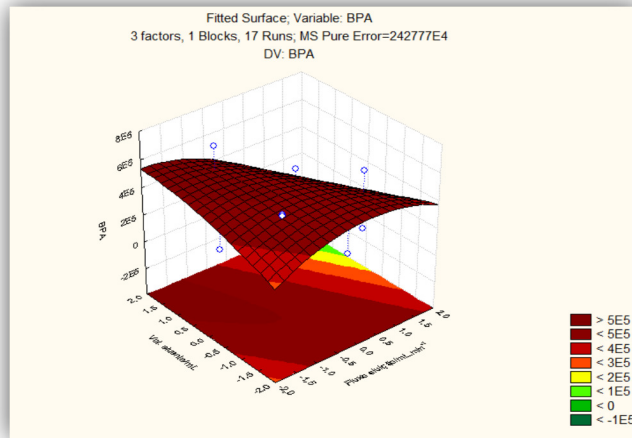


Figura 25. Superfície de resposta para as variáveis volume de eluente (mL) versus fluxo de eluição (mL min⁻¹) para a resposta bisfenol A. Composição do eluente (% acetonitrila/ metanol) fixo em seu nível superior.

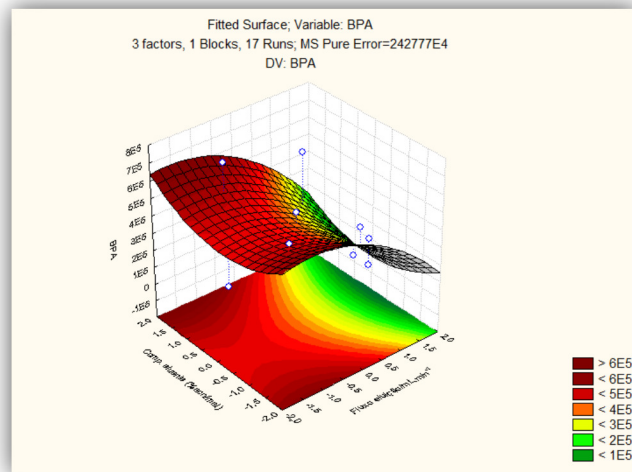


Figura 26. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetonitrila/ metanol) versus fluxo de eluição (mL min⁻¹) para a resposta bisfenol A. Volume de eluente (mL) fixo em seu nível superior.

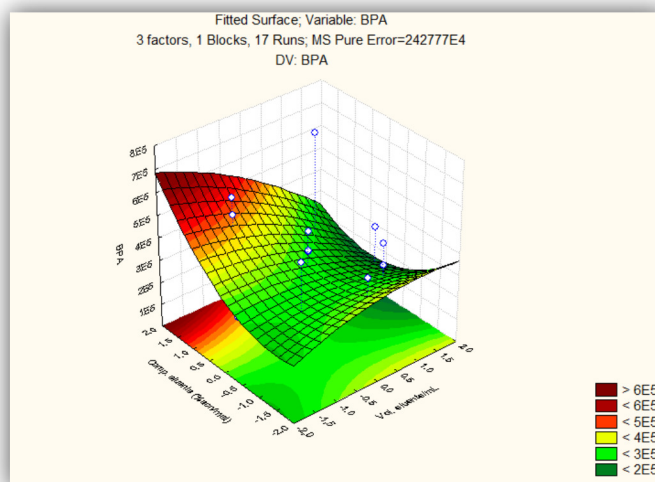


Figura 27. Superfície de resposta para as variáveis composição do eluente (%acetona/metanol) versus volume de eluente (mL) para a resposta bisfenol A.

Por fim, ao avaliar as superfícies obtidas para a resposta bisfenol A, foram observadas as mesmas tendências que os demais analitos apresentaram. Desse modo, após avaliar todos os planejamentos realizados, foi possível estabelecer as condições otimizadas para o método de pré-concentração proposto nesse trabalho. A Tabela 11 apresenta todas essas condições.

Tabela 11: Condições otimizadas do método de pré-concentração proposto.

Condições otimizadas do método e seus respectivos valores	
Material adsorvente (mg)	5,0
Material dispersante (g)	1,0
Volume de solução para pré-concentração (mL)	10,0
Fluxo de pré-concentração (mL min⁻¹)	2,00
Volume de eluente (mL)	1,5
Fluxo de eluição (mL min⁻¹)	0,6
Composição eluente (%acetona/ metanol)	70/30

CAPÍTULO 4

Validação do método

4.1 Introdução

O principal objetivo desse trabalho foi a elaboração de um método analítico de baixo custo e acessível, que fosse capaz de detectar e quantificar os analitos estudados em baixas concentrações. Desse modo, o método foi validado de acordo com a versão 4 do guia de validação do INMETRO⁴² e com os critérios de aceitação definidos pela comissão europeia (EC – *European Commission*)⁴³. Todos os dados necessários para validação do método foram obtidos por HPLC-UV-vis.

Os parâmetros estudados para validação do método foram linearidade, fator de pré-concentração, limite de detecção e quantificação, precisão e veracidade. O tratamento estatístico dos dados obtidos durante a validação foi feito utilizando planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2010). Os dados das curvas de calibração foram avaliados, primeiramente, através do teste de *Jackknife*, para retirada de valores discrepantes.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Materiais e reagentes

Os analitos e solventes utilizados na etapa de validação do método foram os mesmos já citados do capítulo 2.

4.2.2 Instrumentação

Todas as amostras obtidas para validação do método de pré-concentração, foram submetidas à análise em um outro equipamento (HPLC-vis-UV *Shimadzu*) devido à problemas operacionais com o equipamento e a coluna utilizados durante a etapa de otimização do método. Sendo assim, as novas condições cromatográficas estabelecidas foram: coluna Shim - pack XR - ODS, 2,2 μm , 100 x 3,0 mm, temperatura da coluna 40 °C, fluxo de injeção 0,2 mL min⁻¹ volume de injeção 10 μL e fase móvel em gradiente (Tabela 12).

Tabela 12: Gradiente de eluição para separação dos analitos por HPLC-UV

Tempo/min	% metanol	% água
0	30	70
2,0	80	20
6,5	100	0
9,5	100	0
10,0	30	70
14,0	30	70

O detector UV-vis utilizado foi o SPD - 20A, que realizou a medição em 280 nm.

4.2.3 Soluções da curva de calibração pré-concentrada

As soluções para construção da curva de calibração pré-concentrada foram preparadas em balões de 50,0 mL, a partir da solução estoque de 50mg L⁻¹ dos analitos, sobre as mesmas condições descritas no capítulo 2. Foram preparadas seis soluções nas concentrações de 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg L⁻¹, além do branco, que continha água, metanol e acetonitrila nas mesmas proporções que nos demais pontos da curva. Essas sete soluções passaram pelo método de pré-concentração/eluição em triplicata.

4.2.4 Soluções da curva de calibração para cálculo do fator de pré-concentração

As soluções para construção dessa curva foram preparadas em balões de 25,0 mL, da mesma maneira que as soluções anteriores. Foram preparados seis pontos nas concentrações de 500, 750, 1000, 1500, 2000 e 4000 µg L⁻¹, além do branco, em triplicata. Tais soluções não passaram pelo processo de pré-concentração/eluição, sendo as análises feitas após o preparo das mesmas. As concentrações utilizadas foram maiores do que aquelas empregadas na curva de calibração pré-concentração para garantir sinal analítico mensurável usando o detector UV.

4.3 Parâmetros de validação

4.3.1 Linearidade

A linearidade da curva pré-concentrada foi determinada por regressão de mínimos quadrados ordinários. A adequação dos dados ao modelo matemático linear proposto foi analisada através dos resíduos. A avaliação de desvios da linearidade e de significância da regressão foi feita através de parâmetros fornecidos pela tabela ANOVA.

4.3.2 Fator de pré-concentração

O fator de pré-concentração foi determinado através da razão entre os coeficientes angulares da curva de calibração que passou pelo método de pré-concentração proposto e da curva construída sem utilização desse método. Para essa finalidade, os parâmetros de linearidade avaliados para a curva pré-concentrada também foram avaliados para a curva que não passou pelo método proposto, de modo que esta apresentou concordância com todos os critérios estabelecidos.

4.3.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Para a determinação do LD e do LQ do método, foram realizadas medidas de 7 brancos analíticos independentes, que passaram pelo método de pré-concentração. Para o cálculo de LD foi usada a expressão $LD = t.s$, onde s é o desvio padrão e t a distribuição de Student para 6 graus de liberdade e 99% de confiança. Para o cálculo de LQ foi usada a expressão $LQ = k.s$, onde k corresponde a um fator numérico, que nesse caso foi igual a 10. As médias dos brancos analíticos independentes não foram consideradas nas expressões utilizadas para cálculo de LD e LQ, pois as médias para os analitos 17 α -etinilestradiol e bisfenol A apresentaram valores negativos.

4.3.4 Precisão e veracidade

A repetitividade foi o critério escolhido para avaliação da precisão.

Para avaliação da precisão e da veracidade (% de recuperação), dopou-se amostras de água de torneira em três níveis de concentração: 100, 250 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos 3 analitos estudados. Cada amostra passou pelo processo de

pré-concentração. O estudo foi realizado em quintuplicata, de forma independente. Após análise das amostras, foram calculadas as médias, os respectivos desvios padrão, coeficientes de variação e porcentagem de recuperação de cada nível estudado.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Critérios de identificação

O comprimento de onda máximo de absorção utilizado para obtenção dos cromatogramas, utilizado o detector UV- Vis, foi 280 nm. Os tempos de retenção de cada analito são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Tempo de retenção e comprimento de onda máximo de absorção dos analitos

Analitos	Tempo de retenção/min	Comp. máximo de absorção /nm
17 α -etinilestradiol	10,05	280
4-n-nonilfenol	12,26	
bisfenol A	9,50	

O perfil cromatográfico, obtido nas condições cromatográficas utilizadas para leitura das amostras preparadas para validação do método, é mostrado na Figura 28.

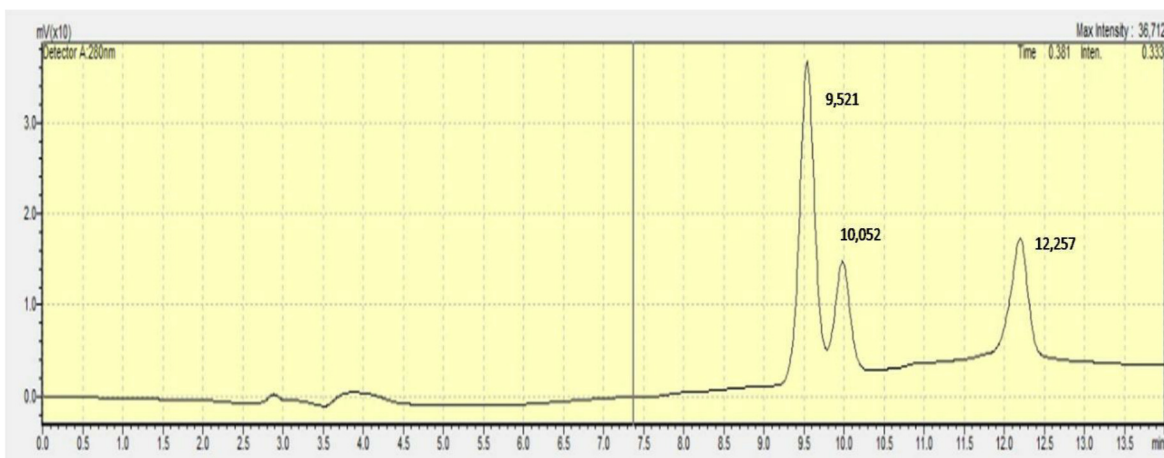


Figura 28. Perfil cromatográfico apresentado pelos analitos para as análises de validação do método.

4.4.1 Linearidade

O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi utilizado para estimar os parâmetros da equação linear: $Y = aX + b$, onde Y representa a resposta do equipamento, X a concentração dos padrões dos analitos, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. Esse método de regressão linear assume que os resíduos seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos, se sua variância for constante ao longo do eixo x .⁴⁴

Para avaliação dos requisitos de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos foram utilizados os testes de Ryan & Joiner,⁴⁵ Levene modificado por Brown & Forsythe⁴⁶ e Durbin & Watson,⁴⁷ respectivamente. O teste F (ANOVA) foi adotado para verificar a significância da regressão e do desvio da linearidade⁴⁸. Os resultados obtidos foram resumidos na Tabela 14.

A realização do teste de Ryan-Joiner confirmou que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, pois os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). Os coeficientes de correlação (R) obtidos: 0,951; 0,963; 0,975 foram superiores ao R crítico: 0,944; 0,948; 0,952 (Tabela 14) para as três curvas de calibração do método de pré-concentração/eluição dos analitos 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e 4-n-nonilfenol, respectivamente.

A independência dos resíduos foi avaliada pelo teste de Durbin-Watson. Para os dados serem considerados independentes, os valores de d calculados devem estar dentro do intervalo apresentado na Tabela 14. Valores de d abaixo dos limites inferiores ($d = 1,11$) indicam correlação positiva, já valores de d acima dos limites superiores ($d = 2,89$) indicam correlação negativa. Os valores de d foram: 1,748; 2,341 e 1,327 para as curvas de calibração do método de pré-concentração dos analitos EE2, BPA e NP, respectivamente (Tabela 14), estando esses valores dentro do intervalo estabelecido para EE2 e para BPA, confirmado a independência dos resíduos. O valor de d para NP não está dentro do intervalo, indicando que este teste é inconclusivo para esse analito, não sendo possível determinar se os dados são autocorrelacionados ou não.

Tabela 14: Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as curvas de calibração pré-concentradas de 17 α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) e 4-n-nonilfenol (NP).

Estatística	Curva EE2	Curva BPA	Curva NP
Número de observações			
N	17	16	16
Normalidade			
R	0,951	0,963	0,975
R _c	0,944	0,948	0,952
P	p > 0,05	p > 0,10	p > 0,10
Independência			
D	1,748	2,341	1,327
<i>Não há autocorrelação</i>	1,380 < d < 2,619	1,370 < d < 2,629	1,370 < d < 2,629
P	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Homoscedasticidade			
t _L	0,614	0,147	0,084
P	0,548	0,885	0,934
Regressão			
F	2,354 x 10 ⁺³	1,620 x 10 ⁺³	1,893 x 10 ⁺³
P	6,589 x 10 ⁻¹⁸	3,581 x 10 ⁻¹⁴	2,412 x 10 ⁻¹⁶
Desvio da linearidade			
F	1,265	3,634	3,080
P	3,410 x 10 ⁻¹	5,766 x 10 ⁻²	6,789 x 10 ⁻²

A homoscedasticidade dos resíduos das regressões foi estimada a partir de t_L (Tabela 14). A Figura 29 mostra que não houve diferença significativa entre as variâncias estudadas nos grupos 1 e 2 para curvas.

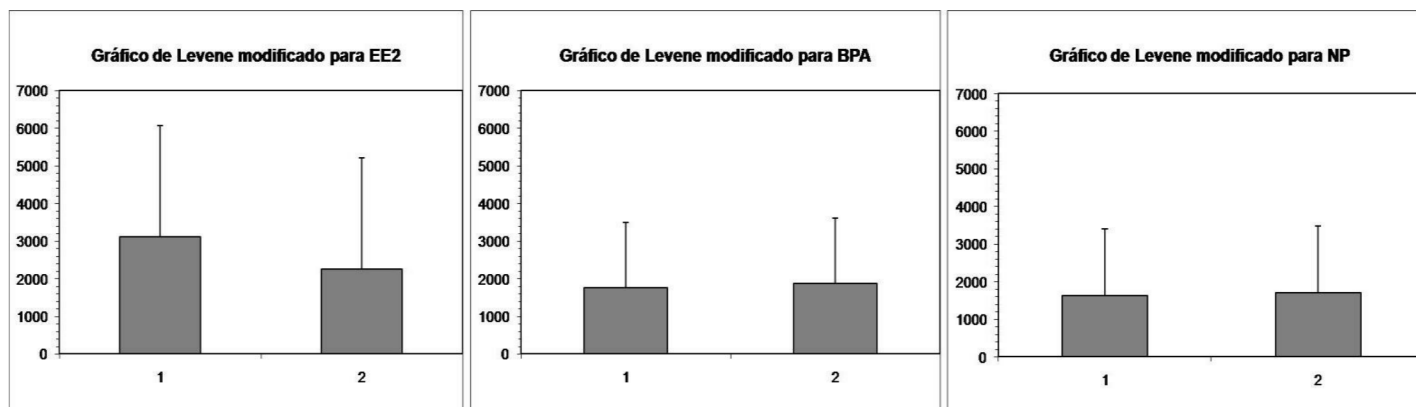


Figura 29. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de de calibração pré-concentradas de 17α -etinilestradiol (EE2), bisfenol A (BPA) e 4-n-nonilfenol (NP), respectivamente.

A faixa inicialmente proposta, de $0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, não apresentou desvio da linearidade pelo teste F (ANOVA) de desvio da linearidade e significância da regressão para nenhuma das curvas. Assim, a linearidade foi confirmada para as três curvas de calibração do método de pré-concentração/eluição para os analitos 17α -etinilestradiol, bisfenol A e 4-n-nonilfenol (NP). Todas as curvas apresentaram alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,025$) (Tabela 14), indicando a adequação do uso do MMQO para a faixa de trabalho proposta.

4.4.2 Fator de pré-concentração

A partir das equações obtidas para as curvas pré-concentradas (CPC) e para as curvas que não passaram pela pré-concentração (CSPC), calculou-se os fatores de pré-concentração (razão entre as inclinações de CPC e CSPC). As equações e os fatores de pré-concentração são apresentados na Tabela 15

Os fatores de pré-concentração variaram de 2,77 a 3,53 para os analitos estudados. Esses fatores de pré-concentração são baixos se comparados aos obtidos por extração em fase sólida com cartuchos comerciais. Isso se deve, em parte, a forte interação entre os analitos e o carvão ativado utilizado como

adsorvente, sendo necessário um maior volume de eluente para a remoção dos analitos da coluna. As alternativas para se tentar melhorar os fatores de pré-concentração seriam aumentar o volume de amostra utilizado e/ou evaporar o eluato e retomar para um volume menor. Nos dois casos, o tempo demandado para a pré-concentração seria maior, sendo necessário avaliar a viabilidade.

Tabela 15: Comparação das curvas realizadas com e sem pré-concentração e fator de pré-concentração (FPC) obtido para os analitos estudados

Analitos	Curva Pré-concentrada		Curva Normal		FPC
	Equação	R	Equação	R	
EE2	$y = 126289x + 5978$	0,996	$y = 39990x + 8926$	0,992	3,16
BPA	$y = 69976x + 10959$	0,996	$y = 26640x + 19394$	0,995	2,77
NP	$y = 63177x + 454,0$	0,996	$y = 17884x - 4089$	0,997	3,53

4.4.3 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Após a aquisição dos dados, os valores do intercepto e da inclinação das curvas de calibração do método de pré-concentração/eluição foram estimados. As equações obtidas pelo MMQO foram utilizadas para o cálculo das concentrações de 17 α -etinilestradiol, bisfenol A e 4-n-nonilfenol nos brancos analíticos. Essas concentrações foram utilizadas para a estimativa do LD e LQ da técnica. Para se calcular os limites de detecção e quantificação do método, dividiu-se os valores de LD e LQ pelo fator de pré-concentração (Tabela 16). O LD e LQ do método expressam as concentrações aproximadas que podem ser efetivamente determinadas pelo método proposto.

Tabela 16: Limites de detecção e quantificação da técnica e do método proposto obtidos para os analitos estudados

Analitos	LD técnica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ técnica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ método ($\mu\text{g L}^{-1}$)
17 α - etinilestradiol	22	7,0	70	22
Bisfenol A	21	7,5	66	24
4-n-nonilfenol	42	12	134	38

Os LD e LQ determinados indicam que a técnica utilizada (HPLC-UV) não se adequaria a estudos cujo objetivo seriam análises para monitoramento ambiental de água superficiais, uma vez que os analitos estudados geralmente são encontrados em concentrações menores dos que as apresentadas na Tabela 16. Entretanto, essa técnica, possivelmente, poderia ser aplicada para avaliar a eficiência de processos de tratamento/remoção desses poluentes em efluentes, nos quais normalmente esses compostos estão presentes em concentrações mais elevadas.

4.4.4 Precisão e Veracidade

A partir dos resultados obtidos para a quintuplicata das amostras em 3 níveis de concentração, calculou-se a porcentagem de recuperação para avaliar a veracidade e o desvio padrão relativo e o limite de repetitividade para avaliar a precisão do método proposto (Tabela 17).

A veracidade foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação, utilizando-se uma matriz branca fortificada, pois não existem materiais certificados disponíveis. De acordo com os critérios de aceitação definidos pela comissão europeia (EC – *European Commission*)⁴³, que estabelecem para concentrações acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ recuperações entre 80 % e 110 %, apenas as recuperações obtidas para os dois primeiros níveis estudados para o 17 α -etinilestradiol (130% e 120%) e para o primeiro nível do bisfenol A (79,1%) não estão dentro do intervalo estabelecido.

Tabela 17: Porcentagem de recuperação e desvio padrão relativo obtidos para amostras de água de torneira enriquecidas em três diferentes concentrações dos analitos estudados

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Desvio padrão relativo (%)
17- α etiniestradiol		
100	130	9,24
200	122	2,67
750	95,8	6,73
bisfenol A		
100	93,0	6,75
200	95,6	9,56
750	92,9	3,09
4-n-nonilfenol		
100	79,1	4,43
200	80,2	3,67
750	98,7	7,60

A precisão foi estudada em três níveis de repetitividade e foi expressa através do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação. Os desvios padrão relativos para todos os analitos nos três níveis estudados variaram entre 2,7 % e 9,6 %, e também estão de acordo com o critério de aceitabilidade definido pelo EC⁴³, que estabelece um desvio padrão relativo de até 10 % para concentrações acima de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

CAPÍTULO 5

Considerações finais

Estudos iniciais mostraram a potencialidade do carvão ativado PA 6:1 para adsorção do EE2. Diante disso, duas possibilidades de aplicação foram propostas: desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de contaminantes emergentes e desenvolvimento de um processo de remoção destes contaminantes em meio aquoso. Apesar dos dois trabalhos terem sido desenvolvidos paralelamente, apenas a primeira parte foi finalizada, sendo os resultados obtidos apresentados nessa dissertação. Isso ocorreu devido à vários problemas com os equipamentos para a determinação dos analitos.

Um método alternativo para detecção e quantificação dos analitos 17 α -etinilestradiol (EE2), 4-n-nonifenol (NP) e bisfenol A (BPA) por HPLC-UV foi proposto. Para isso, montou-se um sistema em fluxo simplificado para melhorar a repetibilidade do sistema de pré-concentração. O método de extração/pré-concentração foi desenvolvido em duas etapas. A primeira consistiu na pré-concentração dos analitos via percolação de uma solução de concentrações conhecidas dos mesmos por uma coluna que continha o material adsorvente. A segunda consistiu na eluição desses analitos através da percolação em contra-fluxo de uma pequena quantidade de solvente. Para construção da coluna, utilizou-se areia de aquário como material dispersante, para assegurar sua homogeneidade. O potencial adsorvente da areia frente ao carvão PA 6:1 foi avaliado e mostrou que o carvão foi responsável pela maior porcentagem da adsorção dos analitos. A otimização da etapa de extração/ pré-concentração foi realizada por meio de planejamentos experimentais. Durante a etapa de otimização, verificou-se que os analitos interagem fortemente com o adsorvente, sendo necessários volumes relativamente grandes para a remoção dos compostos da coluna. Isso poderia resultar em baixos fatores de pré-concentração. Ainda assim, como forma de aprendizado, decidiu-se dar sequência aos estudos para proposição do método.

Na etapa de validação, verificou-se que realmente os fatores de pré-concentração foram baixos e os limites de quantificação inadequados para monitoramento ambiental, ainda que as concentrações desses analitos estejam aumentando gradativamente no ambiente. Por outro lado, a precisão e a veracidade obtidas nos níveis de concentração avaliados foram satisfatórios de uma forma geral. Uma recuperação maior que 110% foi obtida para dois níveis

de EE2, o que pode ter sido causado por algum outro composto ou mesmo do EE2, presente na água de torneira.

Pretende-se verificar a viabilidade de aumentar os fatores de pré-concentração do método, aumentando o volume de amostra utilizado e secando o solvente após a etapa de eluição e retomando o extrato para um volume mínimo. Apesar dessas etapas diminuir a frequência analítica, estas podem aproximar os limites de quantificação a valores mais apropriados para aplicações mais gerais. Outra possibilidade é a análise dos extratos por uma técnica mais sensível, como por exemplo a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Muitos trabalhos descritos na literatura utilizam a extração em fase sólida com cartuchos comerciais aliada à LC-MS para a quantificação dos analitos avaliados neste trabalho.

Acredita-se que o processo para remoção de contaminantes emergentes empregando esse carvão ativado é promissor, uma vez que o mesmo possui alta área superficial e grande afinidade pelos compostos aqui estudados. Isso porque, no processo de remoção, a interação dos analitos com o adsorvente não tem necessariamente que ser totalmente reversível, como ocorre nos métodos de pré-concentração.

Portanto, devido aos baixos fatores de pré-concentração determinados para todos os analitos e aos elevados LD e LD da técnica analítica, pode-se concluir que a metodologia desenvolvida, utilizando o carvão ativado PA 6:1 como adsorvente, seria mais aplicada à processos de tratamento/remoção de poluentes, tais como os analitos estudados, do que à procedimentos que envolvam etapas de pré-concentração.

CAPÍTULO 6

Referências Bibliográficas

- 1 Farré, M. I., Pérez, S., Kantiani, L. & Barceló, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **27**, 991-1007, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010 (2008).
- 2 Kuster, M. *et al.* Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology* **358**, 112-123, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2008.05.030 (2008).
- 3 Health, I. f. E. a. Information Exchange and International Co-ordination on Endocrine Disrupters. (2003).
- 4 Bila, D. M. & Dezotti, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Química Nova* **30**, 651-666 (2007).
- 5 Hoenicke, R., Oros, D. R., Oram, J. J. & Taberski, K. M. Adapting an ambient monitoring program to the challenge of managing emerging pollutants in the San Francisco Estuary. *Environmental Research* **105**, 132-144, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2007.01.005 (2007).
- 6 Darbre, P. D. *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology* **24**, 5-13, doi:10.1002/jat.958 (2004).
- 7 Pessoa, G. d. P., Santos, A. B. d., Souza, N. C. d., Alves, J. A. C. & Nascimento, R. F. d. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. *Química Nova* **35**, 968-973 (2012).
- 8 Fernandes, A. N. *et al.* *Química Nova* **34**, 1526 (2011).
- 9 Communites, C. o. t. E. Communication from the commission to the Council and the European Parliament on the Implementation of the Community Strategy for Endocrine Disrupters - a Range of Substances Suspected of Interfering with the Hormone Systems of Humans and Wildlife. 262 (2001).
- 10 Barceló, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**, xiv-xvi, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01106-3 (2003).
- 11 Ternes, T. A., Kreckel, P. & Mueller, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of The Total Environment* **225**, 91-99, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00335-0 (1999).
- 12 Raimundo, C. C. *Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia* Dissertação (Mestrado em Química Analítica) thesis, Universidade Estadual de Campinas, (2007).
- 13 Ghiselli, G. & Jardim, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova* **30**, p.695-706 (2007).
- 14 Birkett, J. J. & N.Lester, J. *Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes* (Lewis Publishers, 2002).

- 15 Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J., Aparicio, I. & Alonso, E. Determination of emerging and priority industrial pollutants in surface water and wastewater by liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **406**, 3709-3716, doi:10.1007/s00216-014-7689-8 (2014).
- 16 Solé, M. *et al.* Estrogenicity Determination in Sewage Treatment Plants and Surface Waters from the Catalonian Area (NE Spain). *Environmental Science & Technology* **34**, 5076-5083, doi:10.1021/es991335n (2000).
- 17 Jobling, S. & Sumpter, J. P. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology* **27**, 361-372, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(93)90064-8 (1993).
- 18 Fürhacker, M., Scharf, S. & Weber, H. Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* **41**, 751-756, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00466-X (2000).
- 19 Begley, T. H., Biles, J. E. & Hollifield, H. C. Migration of an epoxy adhesive compound into a food-simulating liquid and food from microwave susceptor packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**, 1944-1945, doi:10.1021/jf00011a010 (1991).
- 20 Fromme, H. *et al.* Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research* **36**, 1429-1438, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00367-0 (2002).
- 21 Snoeyink, V. L. *Water Quality and Treatment: A Handbook of Community Water Supplies*. 781-867 (American Water Works Association, 1990).
- 22 Masschelein, W. J. "Adsorption." *In: Unit Processes in Drinking Water Treatment*. 321-363 (Marcel Dekker, INC., 1992).
- 23 Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A., Hara, M. & Higuchi, A. *Water Res.* **37**, 3530 (2003).
- 24 Donati, C., Drikas, M., Hayes, R. & Newcombe, G. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Research* **28**, 1735-1742, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(94)90245-3 (1994).
- 25 Newcombe, G., Drikas, M. & Hayes, R. Influence of characterised natural organic material on activated carbon adsorption: II. Effect on pore volume distribution and adsorption of 2-methylisoborneol. *Water Research* **31**, 1065-1073, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00325-9 (1997).
- 26 Guillarduci, V. V. S., Mesquita, J. P., Martelli, P. B. & Gorgulho, H. F. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. *Química Nova* **29**, 1226-1232 (2006).
- 27 Petrović, M., Hernando, M. D., Díaz-Cruz, M. S. & Barceló, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A* **1067**, 1-14, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.110 (2005).

- 28 Hernández, F., Sancho, J. V., Ibáñez, M. & Guerrero, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**, 466-485, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.012> (2007).
- 29 Díaz-Cruz, M. S. & Barceló, D. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **386**, 973-985, doi:[10.1007/s00216-006-0444-z](http://dx.doi.org/10.1007/s00216-006-0444-z) (2006).
- 30 Martínez-Escandell, M., de Castro, M. M., Molina-Sabio, M. & Rodríguez-Reinoso, F. KOH activation of carbon materials obtained from the pyrolysis of ethylene tar at different temperatures. *Fuel Processing Technology* **106**, 402-407, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.09.005> (2013).
- 31 Giger, W. Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants. *Anal Bioanal Chem* **393**, 37-44, doi:[10.1007/s00216-008-2481-2](http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2481-2) (2009).
- 32 *Analytical Methods Approved for Drinking Water Compliance Monitoring of Organic Contaminants* <<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/labcert/analyticalmethods.cfm#approved>> (2014).
- 33 Silva, C. G. A. d. & Collins, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova* **34**, 665-676 (2011).
- 34 Kumar, A., Kumar Malik, A., Kumar Tewary, D. & Singh, B. Gradient HPLC of antibiotics in urine, ground water, chicken muscle, hospital wastewater, and pharmaceutical samples using C-18 and RP-amide columns. *Journal of Separation Science* **31**, 294-300, doi:[10.1002/jssc.200700373](http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200700373) (2008).
- 35 Rani, S., Kumar, A., Malik, A. K. & Singh, B. Liquid Chromatographic Determination of Quinolones in Water and Human Urine Samples After Microextraction by Packed Sorbent. *Journal of AOAC International* **95**, 261-267, doi:[10.5740/jaoacint.10-383](http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.10-383) (2012).
- 36 Aguilar-Arteaga, K., Rodríguez, J. A., Miranda, J. M., Medina, J. & Barrado, E. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC. *Talanta* **80**, 1152-1157, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.042> (2010).
- 37 Brady, R. D. "Activated Carbon Processes." In: *Water Treatment Plant Design*. 377-416 (AWWA e ASCE, 1990).
- 38 Castro, M. C. M. d. *Preparación de Carbones Activados con KOH a Partir de Residuos de Petróleo. Adsorción de Hidrógeno* Doutorado thesis, Universidad de Alicante, UA, Espanha. , (2013).
- 39 Zhang, M. e. a. Synthesis, Characterization and Environmental Implications of Graphene-Coated Biocar. . *Science of The Total Environment* **435**, 567-572 (2012).

- 40 Brereton, R. G. *Chemometrics data analysis of the laboratory and chemical plant*. (John Wiley and Sons, 2003).
- 41 Brereton, R. G. in *Applied Chemometrics for Scientists* 1-8 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007).
- 42 (CT-05), C. T. d. Q. (ed Divisão de Acreditação de Laboratórios (Dicla) da Cgcre) (INMETRO, 2011).
- 43 Commission, E. in *Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002* Vol. L 221/8 (ed Official Journal of the European Communities) (Official Journal of the European Communities, 2002).
- 44 Smith, H. *Applied regression analysis*. (Wiley, 1998).
- 45 Ryan, T. A. & Joiner, B. L. *Normal probability plots and tests for normality*. (The State College: Pennsylvania State University,, 1976).
- 46 Brown, M. B. & Forsythe, A. B. Robust tests for the equality of variances. *Journal of the American Statistical Association* **69**, 364-367 (1974).
- 47 Durbin, J. & Watson, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika* **38**, 159-178 (1951).
- 48 Souza, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Tese de doutorado thesis, UFMG, (2007).