

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS METABÓLITOS DE FTALATOS EM ÁGUA SUPERFICIAL ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Gabriela D. Cerqueira, Zenilda de Lourdes Cardeal, Helvécio Costa Menezes*

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Química, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

[*hmenezes@ufmg.br](mailto:hmenezes@ufmg.br)

1-Resumo

Os ftalatos são compostos químicos conhecidos como Desreguladores Endócrinos (*Endocrine Disrupting Chemicals-EDCs*), que podem interferir no metabolismo endócrino dos seres vivos afetando a saúde do indivíduo, mesmo em baixas concentrações. As águas superficiais ou subterrâneas podem ser contaminadas por esses disruptores e seus metabólitos através do solo, descarte de efluentes industriais e domésticos com ou sem tratamento. Isso ocorre porque os tratamentos convencionais de água e esgoto não são capazes de remover completamente essas substâncias proporcionando a permanência das mesmas no meio aquático. A análise dos metabólitos de ftalatos pode ser realizada para avaliar a relação entre a presença destes compostos no organismo e o surgimento de determinadas doenças buscando estabelecer umnexo-causal para as mesmas. Dessa forma o objetivo desse trabalho consiste em desenvolver método de microextração em fase líquida empregando membrana cilíndricas ocas (*hollow fiber-based liquid phase microextractionHF-LPME*) para amostragem de metabólitos de ftalatos em águas superficiais com análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Após a extração os analitos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas modelo Finigan Trace GC/MS equipado com um sistema de armadilha de íon (*Ion Trap*) da Thermo Scientific. A coluna capilar de (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e fase estacionária contendo 5 % de difenil, 95% dimetilpolisiloxana (HP-5MS) da Agilent Technology. Os parâmetros que afetam a extração foram otimizados através da superfície de resposta da desejabilidade obtida no planejamento Doehlert. Um tempo de 55 min à uma rotação de 2000 rpm utilizando uma

mistura de octanol:octanoato de etila (50:50) como solvente de extração foram escolhidos como ótimos. Conclui-se que o método desenvolvido mostrou-se eficaz na determinação de metabólitos ftalatos obtendo uma boa separação em um tempo curto de análise, possibilitando um futuro monitoramento desses micropoluentes.

Palavras Chave: GC/MS, ftalatos, HF-LPME, águas superficiais

2-Introdução

Atualmente, um dos tópicos mais relevantes na química ambiental é a qualidade da água. A preocupação com micropoluentes, que estão presentes ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Fármacos, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos persistentes (POP) são classes de substâncias muito investigadas devido, principalmente, aos seus efeitos no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2007).

Há grande interesse científico em um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como desreguladores endócrinos(BILA; DEZOTTI, 2007).

Um desregulador ou disruptor endócrino (EDC -endocrine disrupting chemicals) é definido pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos(EPA- *Environmental Protection Agency*) como um agente que interfere na síntese, transporte ou eliminação dos hormônios naturais do organismo(KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015).

Os EDCs fazem parte de uma classe de compostos muito heterogênea e podem ser divididos em: hormônios naturais e artificiais como fitoestrogênio, contraceptivos, medicamentos para o tratamento da tireóide; medicamentos com efeitos colaterais hormonais tais como Naproxeno, Metoprolol, Clorifibrato; químicos industriais tais como plastificantes, retardantes de chama, solventes, 1,4-diclorobenzeno,bifenilpoliclorado (PCBs); produtos secundários do

processo industrial e doméstico como oshidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's), dioxinas, pentaclorobenzeno(KABIR et al., 2015).

O indício que certas substâncias poderiam causar disfunção no sistema endócrino de homens e animais surgiu no começo do século XX. Os primeiros relatos sobre o efeito desses produtos nos seres vivos foram feitos por (CARSON, 1962) que analisou o impacto do DDT (diclorodifeniltricloroetano) no meio ambiente e em animais. Outros problemas foram relatados entre 1948 e 1971 período em que mulheres utilizavam um contraceptivo abortivo que continha o hormônio dietilestilbestrol acusado de ser propensor do desenvolvimento de câncer, alteração no sistema reprodutor e imunológico (BIRKETT; LESTER, 2002).

Nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization- WHO*), a Comissão da Comunidade Europeia (.....) e a Agencia de Proteção Ambiental Americana (*Environmental Protect Agency - EPA*) tem alertado sobre o eminente risco para a saúde humana e animal devido a presença destes compostos ambiente.(BILA; DEZOTTI, 2007; FERNANDEZ; ANDRE; CARDEAL, 2016; MOREIRA, 2014).

Mas apesar disso, as informações sobre este assunto ainda são bastante limitadas e não há nenhuma avaliação documentada apropriada sobre a população exposta à disruptores endócrinos e os atuais níveis de contaminação dos diversos compartimentos ambientais (KABIR et al., 2015).

Os ftalatos (PEs) se destacam nessa classe de disruptores como compostos orgânicos derivados o ácido 1,2-benzeno dicarboxílico (HUANG et al., 2014).Sua estrutura consiste de um anel benzênico ligado a dois grupos ésteres. Como pode ser visto na figura 1 existem duas cadeias alifáticas e que dependendo da substituição podem gerar mais de 60 tipos de PEs com propriedades distintas.(DE SOUZA, 2013)

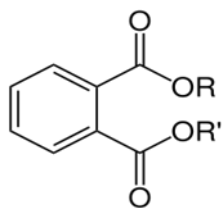


Figura 1. Estrutura geral dos ftalatos.

O PEs são líquidos incolores amplamente utilizados na indústria de PVC (policloreto de vinila) como aditivos que conferem flexibilidade à esse material (GAO; WEN, 2016). Esses compostos começaram a ser utilizados na indústria de plástico a mais de 80 anos atrás. Os PEs são usados principalmente como plastificantes mas também são amplamente utilizados como agentes de estabilização e solubilizantes em outras aplicações como detergentes, produtos da construção civil tais como pisos vinílicos, revestimentos e filmes; óleos lubrificantes; na formulação de pesticidas; solventes; produtos de higiene pessoal ; dispositivos médicos como tubos e embalagens para armazenar sangue) Os ftalatos também são amplamente empregados na fabricação de produtos infantis tais como mamadeira, brinquedos e chupetas, o que aumenta a preocupação com a exposição infantil aos ftalatos (HERRERO et al., 2015; KIM et al., 2014).

Os PEs, também conhecidos como diésteres, podem sofrer transformações como a fotodegradação, degradação bacteriana e metabolização (em animais vertebrados como peixes, por exemplo)(FOURGOUS et al., 2016).

Devido à libertação intensiva e contínua desses poluentes degradáveis para o ambiente através da água de lixiviação de aterros, lama de esgoto, águas superficiais, e sedimentos, alguns de seus produtos de transformação, principalmente os monoésteres podem representar uma preocupação ambiental significativa, pois alguns estudos apontaram maior toxicidade dos metabólitos de ftalatos para os mamíferos, principalmente. Assim, uma tarefa desafiadora recente na ecotoxicologia tem como foco a avaliação do destino e os impactos desses produtos químicos biodegradáveis e seus metabólitos sobre o meio ambiente(FOURGOUS et al., 2016, JONSSON et al., 2003)

2-Objetivos

desenvolver método de microextração em fase líquida empregando membrana cilíndricas ocas (*hollow fiber-based liquid phase microextraction HF-LPME*) para amostragem de metabólitos de ftalatos em águas superficiais com análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

3-Métodos e Materiais

3.1-Materiais

- Frascos de vidro transparente com tampa de rosca de capacidade de 20,0 mL da Supelco (Bellefonte, EUA);
- Micropipetas de volume variado modelo Finnpiquette da Thermo Scientific (West Palm Beach, USA);
- Agulhas hipodérmicas descartáveis adquiridas da BD PrecisionGlide (Franklin Lakes, NJ, USA);
- Septo de borracha em PTFE de 20mm de diâmetro adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA);
- Membrana capilar de polipropileno, Accurel PP Q3/2 (600 μm de diâmetro interno, 0,2 μm de tamanho dos poros e 200 μm de espessura da parede) (Wuppertal, Germany)

3.1.2-Equipamentos

- Purificador de água Elga Purelab Classic (SP, Brasil);
- Banho de ultrassom USC 2800 da Unique (Indaiatuba, SP, Brasil) com frequência de 40 kHz e potência de 120 W;
- Chapa aquecedora com controle de temperatura e agitação magnética da IKA RHon (Wilmington, EUA);
- Agitador de tubos vortéx modelo AP 56 da Phoenix (Araraquara, Brasil);

- Freezer 120 litros da Consul (São Bernado do Campo, Brasil);
- Balança analítica modelo AUW220D da Shimadzu (Quioto, Japão);

3.1.3-Reagentes

- 1-octanol from Sigma-Aldrich, (St. Louis, USA)
- BSTFA + 1 % de TMCS (trimetilclorosilano) from Sigma-Aldrich, (St. Louis USA);
- Acetonitrilo HPLC from J.T. Baker, (Darmstadt, Germany);
- Octanoato de etilo from Sigma-Aldrich, (St. Louis USA)
- Os padrões de MiNP, MOP, MMP, MCHP e MiBP, MEP, MBP, MEHP, MBzP foram adquiridos da AccuStandard (New Haven, USA)

3.2-Métodos

3.2.1- Preparo das soluções

As soluções estoques dos padrões foram preparadas em acetonitrila na concentração de 1000,0 mg L⁻¹. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição das soluções estoque em acetonitrila. Todas as soluções foram armazenadas a -18,0 °C.

3.2.2-Método de extração

O procedimento de extração consistiu primeiramente na preparação da membrana de popropileno (600 mm de diâmetro, parede com espessura de 20 mm e poros de 0,2 mm) que seria utilizada para a extração. Dessa forma, 10 cm da fibra foi embebida no solvente de extração (octanol:octanolato de etila) por 10 segundos e o excesso foi retirado por meio da introdução da fibra em uma proveta contendo água, a qual foi sonicada por 10 segundos.

Logo após foi introduzida na fibra de 25,0 μL uma mistura de octanol:octanoato de etila (50:50) (fase receptora). As duas extremidades da membrana são conectadas como mostra a figura 2 e posteriormente introduzida é em um frasco contendo a solução padrão (fase doadora). O frasco foi agitado, através da introdução de uma barra magnética de teflon, por 55 min em temperatura ambiente.

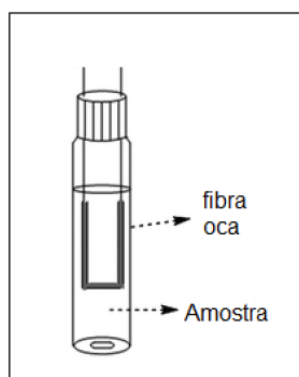


Figura 2. Esquema da LPME (adaptado de Zhang, Hu et al. 2013)

Após a extração, Uma alíquota de 13,0 μL da fase receptora foi transferida para outro frasco de 2,0 mL, que continha 25,0 μL de BSTFA e 5,0 μL de acetonitrila. O frasco foi agitado por 30 segundos em seguida, deixado em repouso por 5 min. Após o término da derivatização a amostra foi analisada por GC/MS.

3.2.3- Sistema cromatográfico

Após a extração os analitos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas modelo Finigan Trace GC/MS equipado com um sistema de armadilha de íon (*Ion Trap*) da Thermo Scientific. A coluna capilar de (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e fase estacionária contendo 5 % de difenil, 95% dimetilpolisiloxana (HP-5MS) da Agilent Technology. O programa de temperatura empregado: forno à 120 $^{\circ}\text{C}$ inicialmente, aquecimento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 190 $^{\circ}\text{C}$, aquecimento de 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 210 $^{\circ}\text{C}$, aquecimento de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 230 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 2 min, aquecimento de 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$ mantida por 5 min. O tempo total de corrida foi de 27 min. O gás de arraste utilizado foi hélio com o um fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do injetor foi programada para 250 $^{\circ}\text{C}$ no modo splitless por 1,2

mim, seguido por uma taxa de 1:50 split. O espectrômetro de massas operou no modo de ionização de elétrons (EI) 70 eV. A temperatura da interface GC/MS foi de 300 °C e temperatura da fonte de íons foi de 230 °C a análise foi realizada no modo *Segment Scan*.

4- Resultados e discussões

4.1- Otimização da metodologia

Além das características inerentes do analito outros fatores têm sido considerados como base para o processo de otimização, a fim de conseguir uma extração eficiente. O rendimento pode ser aumentado testando diferentes solventes, escolhendo a melhor membrana capilar ajustando o pH do meio de acordo com o pKa dos analitos ,adicionando sais na solução doadora (efeito “*salting out*”),controlando tempo, temperatura e agitação do sistema (ALSHARIF et al., 2016; HO; PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2002; OLIVEIRA et al., 2008)

4.1.2. Escolha do solvente da extração

A escolha da fase aceptoras que seria utilizada na extração foi feita através da análise das áreas obtidas utilizando octanol, octanoato de etila e a mistura deles no recobrimento e preenchimento da fibra oca. Como pode ser observado na Figura 3. A mistura entre os solventes (octanol:octanoato de etila) na proporção (1:1), apresentou maior eficiência de extração para a maioria dos compostos, e portanto, foi escolhido como solvente de extração.

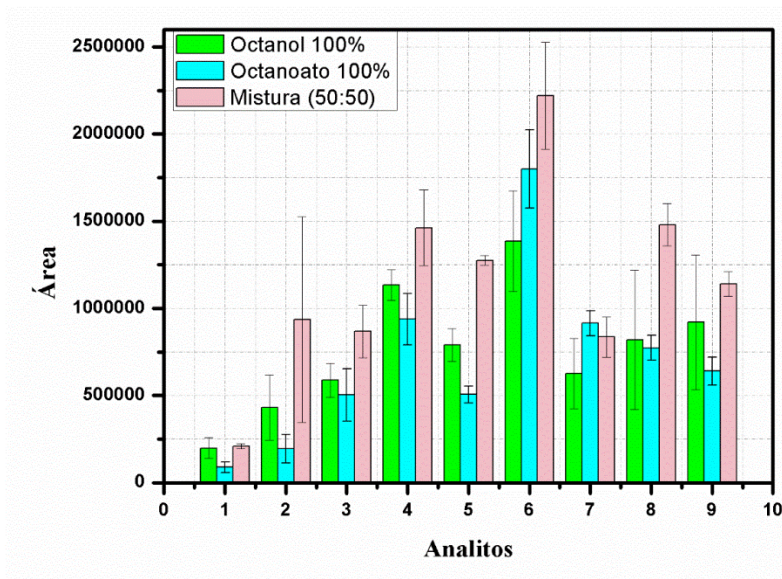


Figura 3. Área obtida para os analitos com diferentes solventes de extração.

4.1.3. Planejamento Doehlert

O planejamento experimental 2³ realizado por (FERNANDEZ et al., 2016) mostrou que as variáveis tempo de extração e agitação foram significativas, em um intervalo de 95 % de confiança, para todos os compostos estudados. Dessa forma foi realizado um superfície de resposta do tipo Doehlert com ponto central, que permitiu encontrar a condição ótima para essas duas variáveis. A superfície de resposta Doehlert foi realizada como descrito na tabela 1.

Tabela 1. Experimento da superfície de resposta Doehlert

Experimento	Rotação (rpm)	Tempo (min)
E1	1200	47,5
E2	1200	62,5
E3	2000	70
E4	2800	62,5
E5	2800	47,5
E6	2000	40
E7 (C)	2000	55
E8 (C)	2000	55
E9 (C)	2000	55

As áreas obtidas para cada experimento foram tratadas no software Statistica versão 8.0 da Statsoft (Hamburgo, Alemanha) e a superfície de resposta obtida é apresentada na Figura 4.

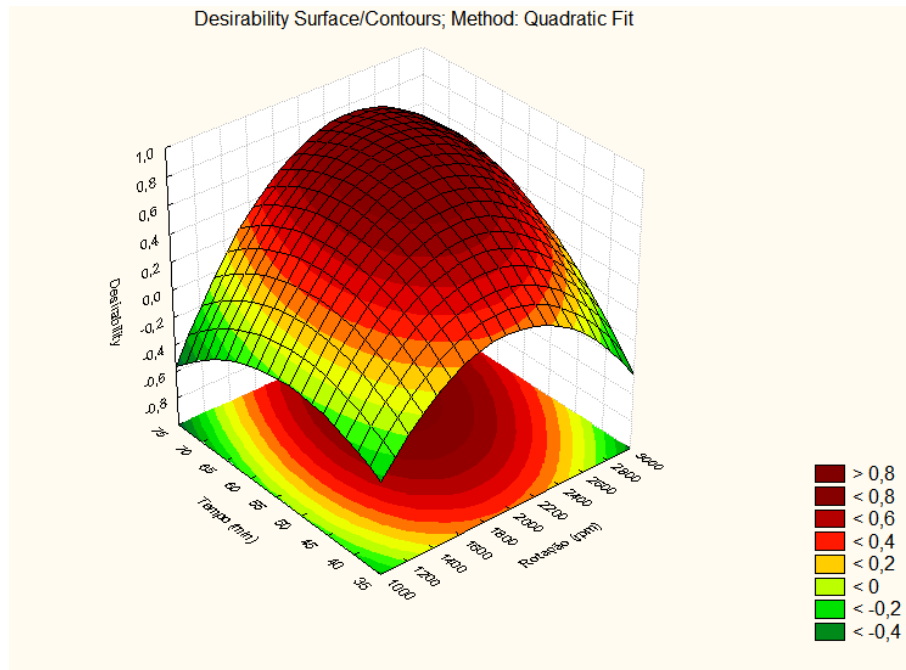


Figura 4. Superfície de resposta Doehlert

A superfície de resposta obtida mostrou que 55 min de extração e 2000 rpm de rotação foram as condições ótimas para o experimento.

4.1.4 Análise Cromatográfica

O cromatograma obtido para a análise dos metabólitos de ftalatos derivatizados por GC/qMS no modo *Segment Scan* é apresentado na Figura 5.

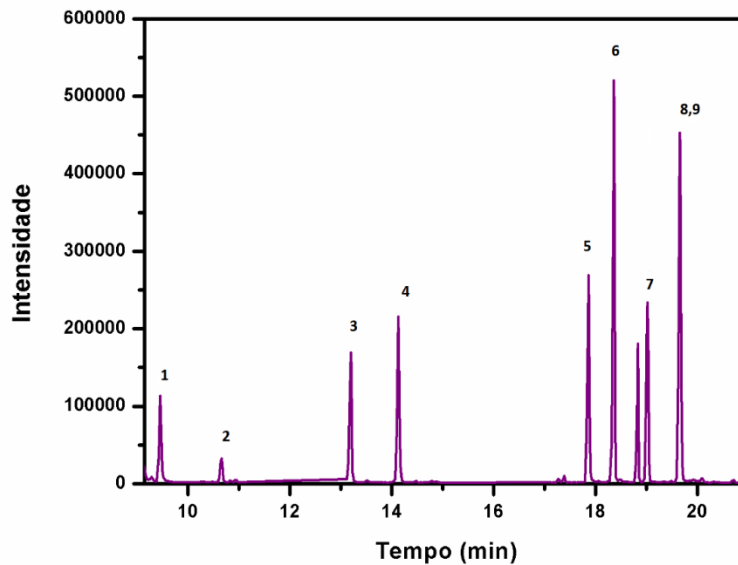


Figura 5. Cromatograma dos compostos estudados após derivatização por GC/MS, modo *Segment Scan*.

Como pode ser visto o método cromatográfico desenvolvido apresentou boa resolução em um tempo curto de análise.

5-Conclusões

O método HF-LPME foi eficiente para extração dos metabólitos de ftalatos em solução aquosa. Foi possível otimizar o tempo de equilíbrio e a rotação para todos os analitos simultaneamente utilizando a função deseabilidade em um planejamento Doehlert. O método proposto é simples, rápido e apresenta boa resolução cromatográfica. O uso da LPME possibilitará a aplicação do método em matrizes complexas.

6-Agradecimentos

À CAPES pelo financiamento

Ao Programa de Pós Graduação em Química do DQ-UFMG

À Rede Mineira de Cromatografia Avançada – RMCA.

7-Referências

ALSHARIF, A. M. A. et al. Efficiency of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction Chromatography Methods in the Separation of Organic Compounds: A Review. **Journal of Chromatographic Science**, 2016.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. IWA Publishing, 2002. ISBN 1843390310.

CARSON, R. **Silent Spring**. Greenwich, Connecticut: Fawcett Publications 1962.

DE SOUZA, F. L. **Processos eletro-oxidativos aplicados à degradação de dimetil ftalato**. 2013. Universidade de São Paulo

FERNANDEZ, M. A.; ANDRE, L. C.; CARDEAL, Z. L. Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. **J Chromatogr A**, v. 1481, p. 31-36, Jan 20 2016.

FOURGOUS, C. et al. Phthalate metabolites in the European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 1053-1059, 2016.

GAO, D.-W.; WEN, Z.-D. Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 541, p. 986-1001, 2016.

HERRERO, L. et al. Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples. **Anal Chim Acta**, v. 853, p. 625-36, Jan 01 2015.

HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions. **Analyst**, v. 127, n. 5, p. 608-613, 2002.

HUANG, T. et al. Gender and racial/ethnic differences in the associations of urinary phthalate metabolites with markers of diabetes risk: national health and nutrition examination survey 2001–2008. **Environmental Health**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

JONSSON, S. et al. Mono- and diesters from o-phthalic acid in leachates from different European landfills. **Water research**, v. 37, n. 3, p. 609-617, 2003.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

KIM, M. et al. Simultaneous analysis of urinary phthalate metabolites of residents in Korea using isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. **Sci Total Environ**, v. 470-471, p. 1408-13, Feb 01 2014.

MOREIRA, M. A. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise de plastificantes, alquilfenóis e seus metabólitos em alimentos e urina. 2014.

OLIVEIRA, A. R. M. D. et al. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.