

NAJARA GLENDA FROTA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FTALATOS EM LODO DE ESGOTO
UTILIZANDO A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, área de concentração em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientadora: Prof^a Dr^a Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros – MG

2017

Pereira, Najara Glenda Frota.

P436d 2017 Determinação simultânea de ftalatos em lodo de esgoto utilizando a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura / Najara Glenda Frota Pereira. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2017.
87 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

Orientadora: Prof.^a Gevany Paulino de Pinho.

Banca examinadora: Douglas Lopes Cassimiro, Flaviano Oliveira Silvério, Ulisses Alves Pereira, Gevany Paulino de Pinho.

Referências: f: 81-87.

1. Ftalatos. 2. Lodo de esgoto. 3. ESL-PBT 4. CG-EM. I. Pinho, Gevany Paulino. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 628.3

NAJARA GLENDA FROTA PEREIRA

DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FTALATOS EM LODO DE ESGOTO
UTILIZANDO A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM
BAIXA TEMPERATURA

Prof.^a Dr.^a Gevany Paulino de Pinho
(Orientadora – UFMG/ICA)

Aprovada em 14 de dezembro de 2016.

Montes Claros – MG
2017

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me deixar abater e me mostrar que, mesmo em meio as atribuições eu estarei sempre em seu colo. A São Jorge, santo guerreiro, por me defender estendendo-me o seu escudo.

À minha família, meus pais Marcos e Márcia, minhas irmãs Marcela, Paty e Cristina pelo amor, apoio, carinho e compreensão nas ausências, aos meus sobrinhos Pepeu, Breno, Tefinha e Maria Alice, pelas alegrias e travessuras! Vocês são tudo pra mim, amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado Samuel pelo amor, carinho e por compreender a minha ausência neste período.

À minha orientadora, a Prof^a. Gevany Paulino de Pinho e ao meu coorientador, o Prof. Flaviano Oliveira Silvério, pelo compromisso, confiança e dedicação.

À toda equipe do LPA, em especial à Ane, Érica e Emanuella, as PPG's, pelos momentos alegres e pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos professores Douglas Lopes Cassimiro e Ulisses Alves Pereira por aceitarem compor a banca avaliadora.

Aos meus amigos do G7, pela amizade eterna.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FINEP, CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de bolsas e suporte financeiro deste trabalho.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela infraestrutura.

A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

Um método analítico sensível foi desenvolvido para extração e determinação simultânea de cinco ésteres de ftalatos, dimetilftalato (DMP), dibutilftalato (DBP), butilbenzilftalato (BBP), dietilexilftalato (DEHP) e dnoctilftalato (DNOP) em amostras de lodo de esgoto. Foram otimizados os critérios de execução do método: volume de água, fase extratora, tempo de congelamento, modo de agitação e *clean up* adicional, para extração utilizando a técnica ESL-PBT. O método otimizado consistiu em 4 mL de água, fase extratora composta de ACN/ACT, 90 minutos de congelamento, 30 seg de agitação em vórtexe sem *clean up* adicional. Os resultados experimentais demonstraram porcentagens de extração de $102,64 \pm 4,56$ a $139,08 \pm 10,8$ para todos os ftalatos. A condição cromatográfica e a seleção de íons para cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), também foram avaliadas para determinação simultânea dos analitos em uma única injeção. A quantificação da concentração dos ftalatos DBP e DEHP presentes na amostra inicial foi realizada pelo método da adição de padrão. O LQ para os compostos DMP, BBP e DNOP foi de $40 \mu\text{g Kg}^{-1}$. O método foi aplicado com sucesso para detectar os cinco ftalatos e quantificar a ocorrência de três ftalatos em lodo de esgoto de seis cidades de Minas Gerais.

Palavras-chave: Ftalatos. Lodo de esgoto. ESL-PBT. CG-EM.

ABSTRACT

A sensitive analytical method was optimized for simultaneous extraction and determination of five phthalate esters, dimethylphthalate (DMP), dibutylphthalate (DBP), butylbenzylphthalate (BBP), diethylphthalate (DEHP) and dnoctylphthalate (DNOP) in sewage sludge samples. Were optimized the criteria of method execution: water volume, extractive phase, freezing time, agitation mode and additional clean up for extraction using the SLE-LTP technique. The optimized method consisted of 4 mL of water, extractive phase composed of ACN / ACT, 90 min of freezing, 30 sec of vortexing and without additional clean up. The experimental results demonstrated extraction percentages of 102.64 ± 4.56 to 139.08 ± 10.8 for all phthalates. The chromatographic condition and the selection of ions for gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) were also evaluated for simultaneous determination of the analytes in a single injection. The quantification of the concentration of the phthalates DBP and DEHP present in the initial sample was performed by the standard addition method. The LQ for the DMP, BBP and DNOP compounds was $40 \mu\text{g kg}^{-1}$. The method was successfully applied to detect the five phthalates and to quantify the occurrence of three phthalates in sewage sludge from six cities of Minas Gerais.

Keywords: Phthalates. Sewage sludge. SLE-LTP. GC-MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACE:** Acetona
- ACN:** Acetonitrila
- ACT:** Acetato de Etila
- ANVISA:** Agência nacional de vigilância sanitária
- BBP:** Benzil butil ftalato
- BM:** Branco do método
- BMAT:** Branco da matriz
- CG:** Cromatografia gasosa
- CG-EM:** Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
- CLAE:** Cromatografia a líquido de alta eficiência
- DBP:** Dibutil ftalato
- DEHP:** Dietil hexil ftalato
- DMP:** Dimetil ftalato
- DNOP:** Di-n-octil ftalato
- DPR:** Desvio padrão relativo
- EM:** Extrato da Matriz
- EPA:** Agência de Proteção Ambiental
- ESL-PBT:** Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura
- ETE's:** Estações de tratamento de esgoto
- FSC:** Fluido super crítico
- HEX:** Hexano
- HPA's:** Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- IMAP:** Íons mais abundantes do padrão
- INMETRO:** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- LQ:** Limite de quantificação
- MIS:** Monitoramento de íons seletivos
- OSHA:** Organização Internacional de Saúde Ocupacional
- PVC:** Policloreto de vinila
- TR:** Tempo de retenção
- WFD:** Water Framework Directive

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de esterificação do anidrido ftálico.....	20
Figura 2. Estruturas químicas dos ftalatos avaliados neste trabalho. DMP: Dimetilftalato, DBP: Dibutilftalato, BBP: Benzilbutilftalato, DEHP: Dietilexilftalato, DNOP: Dinocetilftalato.	22
Figura 3. Representação da ESL-PBT. A) Amostra, água e solvente; B) Agitação; C) Congelamento; D) Separação entre as fases; E) Vial de injeção para análise cromatográfica	29
Figura 4. Fotografias de cada etapa da ESL-PBT seguida por centrifugação com Na ₂ SO ₄	40
Figura 5. Cromatograma de íons totais dos cinco ftalatos em ACN na concentração de 500 µg L ⁻¹	44
Figura 6. Primeira coluna: Espectros de massa dos ftalatos identificados com íons mais abundantes. Segunda coluna: Espectros registrados pela biblioteca NIST. A) DMP; B) DBP; C) BBP; D) DEHP; E) DNOP.....	45
Figura 7. Cromatogramas obtidos com diferentes grupos de íons na concentração de 500 µg L ⁻¹ . A) íons mais abundantes do padrão de ftalatos; B) íons da literatura 1; C) íons da literatura 2.....	47
Figura 8. Cromatograma obtido com padrão de ftalatos em solvente utilizando os grupos de íons selecionados (500 µg L ⁻¹).....	49
Figura 9. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes volumes de água.	51
Figura 10. Fotografia dos Vials contendo a fase extratora Hexano/ Acetona após congelamento a - 20 °C por três horas	52
Figura 11. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes fases extradoras.	53
Figura 12. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação em diferentes tempos de congelamento.	55
Figura 13. Cromatogramas dos extratos de amostras não fortificadas (branco) em diferentes tempos de congelamento	56
Figura 14. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação em diferentes modos de agitação.	57

Figura 15. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes adsorventes para clean up	59
Figura 16. Cromatogramas obtidos após injeção dos extratos utilizando diferentes adsorventes para clean up adicional dos extratos	60
Figura 17. Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade da ESL-PBT de ftalatos em lodo de esgoto. A) Padrão de ftalatos em ACN; B) Start do CG; C) ACN pura; D) Mistura ACN/ACT; E) Branco do método; D) Branco da matriz.....	61
Figura 18. DBP. A) Cromatograma e espectro de massas do padrão de ftalatos em ACN a $100 \mu\text{g L}^{-1}$; B) Cromatograma e espectro de massas do extrato de lodo de esgoto não fortificado (branco).....	62
Figura 19. DEHP. A) Cromatograma e espectro de massas do padrão de ftalatos em ACN a $100 \mu\text{g L}^{-1}$; B) Cromatograma e espectro de massas do extrato de lodo de esgoto não fortificado (branco).....	63
Figura 20. Cromatogramas obtidos pela injeção de padrão de ftalatos em ACN nas concentrações de 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$	64
Figura 21. Curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade de três ftalatos estudados em extrato de lodo de esgoto fortificado, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2). A) DMP; B) BBP; C) DNOP	67
Figura 22. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado após exclusão dos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos de Jackknife. A) DMP; B) BBP; C) DNOP	68
Figura 23. Gráficos de probabilidade normal das curvas de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado. A) DMP; B) BBP; C) DNOP	69
Figura 24. Gráficos de independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para três ftalatos. A) DMP; B) BBP; C) DNOP	71
Figura 25. Gráficos de extrapolação da reta para determinação da concentração de DBP e DEHP em lodo de esgoto. A) DBP; B) DEHP	73
Figura 26. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas dos ftalatos DBP e DEHP em extrato de lodo de esgoto fortificado após exclusão dos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos de Jackknife. A) DBP; B) DEHP.....	74

Figura 27. Gráficos de probabilidade normal das curvas dos ftalatos DBP e DEHP em extrato de lodo de esgoto fortificado. A) DBP; B) DEHP	75
Figura 28. Gráficos de independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para os ftalatos DBP e DEHP. A) DBP; B) DEHP....	76
Figura 29. Porcentagem de variação da resposta cromatográfica dos ftalatos DMP, BBP e DNOP preparados em extrato de lodo de esgoto em relação às preparadas em solvente.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos ftalatos avaliados neste trabalho	20
Tabela 2. Tempo de degradação em diferentes tipos de digestão dos cinco ftalatos	25
Tabela 3. Limites máximos de resíduos para lodo de esgoto, produto derivado ou solo, estabelecidos pela resolução CONAMA n.º 375 de 2006 para os cinco ftalatos.	26
Tabela 4. Métodos citados na literatura para extração e análise de ftalatos	28
Tabela 5. Contaminação por ftalatos em solventes comuns ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	31
Tabela 6. Contaminação por ftalatos em materiais de laboratório ($\mu\text{g g}^{-1}$) ...	32
Tabela 7. Grupos de íons estudados para cada ftalato	37
Tabela 8. Parâmetros avaliados na otimização da ESL-PBT de ftalatos em lodo de esgoto	39
Tabela 9. Tempos de retenção dos cinco ftalatos e íons selecionados para análise no CG-EM no modo MIS	48
Tabela 10. Precisão e exatidão dos compostos nos limites de quantificação estudados	65
Tabela 11. Valores de T_L e $T_{\text{crítico}}$ das variâncias dos resíduos da regressão das curvas analíticas de três ftalatos pela estatística t de Levene.	70
Tabela 12. Valores dos limites inferiores da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de três ftalatos pelo teste de Durbin-Watson ($\alpha = 0,05$)	70
Tabela 13. Exatidão e precisão* do método para determinação de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado	72
Tabela 14. Homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas analíticas de três ftalatos pela estatística t de Levene.	75
Tabela 15. Independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de três ftalatos pelo teste de Durbin-Watson	76
Tabela 16. Concentrações dos ftalatos analisados em lodo de esgoto de seis cidades e o LMR	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Lodo de esgoto e uso agrícola.....	17
2.2. Contaminantes orgânicos em lodo de esgoto.....	18
2.3. Ftalatos.....	19
2.4. Ftalatos e riscos associados.....	23
2.5. Ftalatos em lodo de esgoto.....	24
2.6. Métodos de extração e determinação de compostos orgânicos.....	26
2.7. Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura.....	28
2.8. Fontes de contaminação de ftalatos em laboratório.....	30
2.9. Validação de métodos analíticos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Limpeza e preparo de vidrarias.....	35
3.2. Instrumentação.....	35
3.3. Produtos químicos e reagentes.....	35
3.4. Análises cromatográficas.....	36
3.4.1. Seleção de íons.....	37
3.5. Coleta e pré-tratamento de amostras de lodo de esgoto.....	37
3.6. Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) 38	
3.7. Validação do método analítico.....	40
3.7.1. Seletividade.....	41
3.7.2. Limite de quantificação.....	41
3.7.3. Linearidade.....	42
3.7.4. Exatidão e precisão.....	42
3.7.5. Efeito de matriz.....	43

3.8. Aplicação do método em amostras reais	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Análises cromatográficas	44
4.1.1. Seleção de íons.....	46
4.2. Otimização univariada da ESL-PBT	49
4.2.1. Volume de água	50
4.2.2. Fase extratora	51
4.2.3. Tempo de congelamento.....	54
4.2.4. Modo de agitação.....	56
4.2.5. Clean up	58
4.3. Validação.....	60
4.3.1. Seletividade	60
4.3.2. Limite de quantificação.....	64
4.3.3. Linearidade de resposta do método.....	65
4.3.3. Exatidão e precisão.....	72
4.3.2. Efeito de matriz	77
4.4. Aplicação em amostras reais	78
5. CONCLUSÃO.....	81

1. INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto é um subproduto produzido pelas estações de tratamento de esgoto (ETE's) em grande quantidade. A elevada produção desse resíduo tem gerado problemas com relação a sua destinação, pois as formas de manejo mais comuns, como destinação em aterros sanitários e incineração, podem causar danos ambientais e à saúde pública (KRUGER *et al.*, 2014).

Outras formas de manejo do lodo de esgoto vêm sendo estudadas de modo a minimizar o impacto ambiental causado pelas práticas usuais. Dentre elas, a destinação agrícola tem sido apontada como uma alternativa viável tanto economicamente quanto no âmbito ambiental. O lodo de esgoto apresenta quantidades de matéria orgânica e elementos essenciais às plantas que podem reduzir os custos de produção reduzindo a quantidade de fertilizantes minerais a serem utilizados (LEMANSKI *et al.*, 2006). Entretanto, essa prática pode ser perigosa se não forem tomadas medidas de precaução com relação à presença de patógenos, metais pesados e contaminantes orgânicos que pode haver nesse resíduo (BENJAMIN *et al.*, 2015; CIEŚLIK *et al.*, 2015).

No Brasil, a resolução CONAMA n.º 375 de 2006, define critérios e procedimentos para o uso agrícola do lodo de esgoto e dispõe a respeito das substâncias a serem determinadas antes da sua aplicação no solo, dentre elas estão os ésteres de ftalato que são as substâncias de interesse deste trabalho. A resolução estabelece concentrações máximas dessas substâncias que podem estar contidas no lodo de esgoto antes de sua aplicação. Dos cinco ftalatos estudados neste trabalho, apenas três possuem limites máximos estabelecidos pela resolução, são estes: Dimetilftalato (DMP), Dibutilftalato (DBP) e o Dietilxilftalato (DEHP).

Ftalatos são substâncias químicas comumente utilizadas na indústria de bens de consumo, na forma de plastificantes. Essas substâncias podem estar presentes em cosméticos, produtos infantis, utensílios médicos, embalagens de alimentos, dentre outros (BENJAMIN *et al.*, 2015).

Existem diversas técnicas para determinação de substâncias orgânicas, como soxhlet, ultrassom, micro-ondas, dispersão da matriz em fase sólida, dentre outros, sendo estas utilizadas em matrizes ambientais, alimentares e biológicas. Entretanto elas são consideradas dispendiosas, pois demandam um elevado consumo de solventes, maiores tempos de análises ou são consideradas de alto custo (CITULSKI E FARAHBAKHS, 2010). Portanto, há necessidade de se desenvolver o estudo de técnicas analíticas que permitam análises confiáveis na determinação de riscos associados à aplicação do lodo de esgoto e conseqüentemente, oferecendo maior subsídio para uma regulamentação nacional. A proposta deste estudo é otimizar e validar uma técnica de extração de ftalatos em lodo de esgoto, de baixo custo e menor tempo de análise, para quantificação de ftalatos na matriz lodo de esgoto proveniente de ETE's de diferentes cidades utilizando a técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lodo de esgoto e uso agrícola

O lodo de esgoto é um resíduo proveniente do tratamento de águas residuais, altamente complexo quanto à composição. A sua produção mundial tende a aumentar e por consequência cresce a preocupação a respeito da destinação correta desse resíduo (KRUGER *et al.*, 2014). Segundo esse mesmo autor, a produção mundial anual de lodo excede 30 milhões de toneladas (massa seca).

Diante desse quadro, cresce também a preocupação relacionada à destinação desse resíduo para que o lodo de esgoto não se torne um problema ambiental. As destinações mais comuns são a disposição em aterro e a incineração, porém não são as mais adequadas ambientalmente. Outras destinações têm sido estudadas, como o reuso industrial (fabricação de tijolos, cerâmica e cimento), produção de combustível (KWON *et al.*, 2013), recuperação de solos, uso agrícola e florestal (BETTIOL E CAMARGO, 2006), matéria-prima para produção de clínquer (LIU *et al.*, 2015), dentre outras. De forma que o uso agrícola tem sido apontado como uma das alternativas mais sustentáveis (OLOFSSON *et al.*, 2012) e, por isso, sendo bastante utilizada (STASINAKIS, 2012).

Kelessidis e Stasinakis (2012) compararam os diferentes tipos de disposição do lodo de esgoto em países europeus e relataram que 41% são utilizados na agricultura e 12% em compostagem, o que também é considerado utilização agrícola, totalizando 53% de reuso do lodo na agricultura. Nos Estados Unidos e no Canadá mais de 40% do resíduo produzido são utilizados na agricultura (CITULSKI E FARAHBAKHS, 2010).

O uso agrícola do lodo de esgoto está baseado na levada quantidade de matéria orgânica presente em sua composição, com alto teor de nutrientes para as plantas, auxiliando no condicionamento e fertilização do solo (OLOFSSON *et al.*, 2012), além de ser uma alternativa viável economicamente, pois, se utilizado da maneira correta, pode substituir a utilização de fertilizantes industriais.

Entretanto, sua utilização como suplementação no solo tem gerado uma grande preocupação, devido à presença de metais pesados, contaminantes orgânicos e patógenos que podem estar presentes nesta matriz (LANGDON *et al.*, 2011; KRUGER *et al.*, 2014), podendo acarretar danos ambientais às plantas, animais e à saúde humana.

2.2. Contaminantes orgânicos em lodo de esgoto

Diversos contaminantes orgânicos estão presentes em bens de consumo, hospitais e indústrias e, conseqüentemente, estão presentes no esgoto tratado pelas estações de tratamento municipais. Alguns desses compostos são removidos durante o tratamento, por degradação ou evaporação, mas outros são altamente lipofílicos e/ou têm alta afinidade com o lodo e podem permanecer nesse resíduo em altas concentrações (LANGDON *et al.*, 2011; PETRIE *et al.*, 2015).

A resolução CONAMA n.º 375 de 2009 lista as principais substâncias orgânicas a serem determinadas em lodo de esgoto ou produto derivado e define concentrações máximas que podem estar presentes nesses resíduos, como os benzenos clorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, poluentes orgânicos persistentes, fenóis clorados e não clorados e ftalatos. Grande parte desses contaminantes já foi quantificada em lodo de esgoto (ELSGAARD, 2010; LANGDON *et al.*, 2011). Apesar disso, de acordo com Petrie *et al.* (2015) a maior parte do lodo utilizado na agricultura é aplicada diretamente no solo sem uma avaliação da presença de contaminantes orgânicos, o que pode acarretar severas conseqüências prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana.

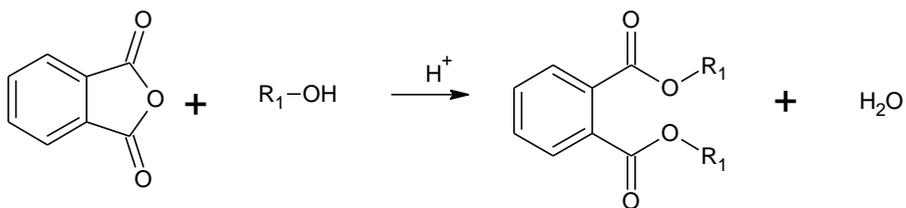
A quantidade de lodo que vem sendo produzida, aliada a sua utilização na agricultura, demanda uma necessidade de obter métodos de determinação de compostos orgânicos, que auxiliem na identificação e quantificação desses compostos, oferecendo embasamento científico à legislação (KRYSELL *et al.*, 2008).

2.3. Ftalatos

O uso de ftalatos em bens de consumo vai de materiais de construção, garrafas plásticas, embalagens de alimentos, aparelhos médicos, produtos infantis, produtos de higiene pessoal, dentre outros, conferindo maior flexibilidade e processabilidade a esses produtos (KRAUSKOPF, 2003; VIEIRA *et al.*, 2011).

De acordo com Brown *et al.* (1996), 88% dos plastificantes usados em PVC (Policloreto de vinila) são do grupo dos ftalatos. O DMP e o DBP (FIGURA 2, PAG. 22) são geralmente encontrados em produtos repelentes para insetos, aplicados diretamente sobre a pele, caracterizando-se o acesso a esses contaminantes por via cutânea, sendo o DBP mais resistente à água que o DMP (GU *et al.*, 2009). O DBP, além de plastificante, também é utilizado como aditivo em adesivos, tintas para impressoras e cosméticos, sendo proibido em cosméticos na União Europeia (KANECO *et al.*, 2006). Os ftalatos não estão quimicamente ligados a seus polímeros, portanto, tendem a transferir-se da matriz ao meio ambiente (WU *et al.*, 2013).

Os ftalatos são derivados do ácido benzenodicarboxílico. Consistem basicamente de um anel benzênico ligado a dois grupos ésteres e, geralmente, possuem aspecto de óleo vegetal, são incolores e inodoros. Comercialmente, são produzidos a partir do anidrido ftálico, obtido pela oxidação no naftaleno, através do processo de esterificação em que um ácido carboxílico reage com um álcool produzindo éster e água, utilizando um ácido mineral como catalisador, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) (LOUREIRO, 2002). O processo de preparação desses compostos está demonstrado na Figura 1.

Figura 1. Processo de esterificação do anidrido ftálico

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Neste estudo, serão avaliados cinco tipos de ftalatos: DMP, DBP, BBP, DEHP e DNOP. Suas respectivas propriedades químicas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos ftalatos avaliados neste trabalho

Ftalato	Ponto de ebulição (°C)	Solubilidade em água		Log K oct/água
		$-\log C_W^{Sat} (w)$	$\mu\text{g mL}^{-1}$	
DMP	284	1,646	$4,5 \times 10^4$	1,53/ 1,83
DBP	340	4,402	1,01	4,57/ 4,37
BBP	370	5,18	<100	4,91/ 4,59
DEHP	384	6,374	$4,1 \times 10^{-2}$	9,64/ 7,06
DNOP	220	6,137	<100	6,99

Fonte: Adaptado de Loureiro (2002).

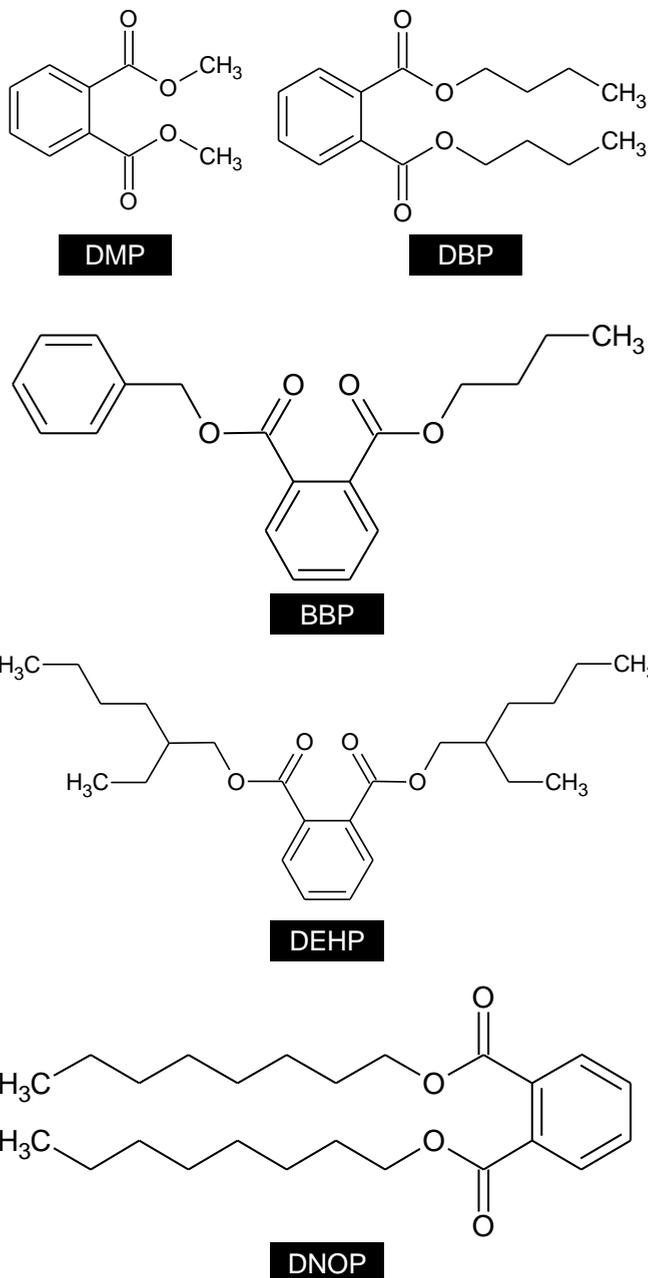
$-\log C_W^{Sat} (w)$: Solubilidade em água;

$\mu\text{g mL}^{-1}$: Solubilidade e água;

Log K_{oct/água}: Coeficiente de partição octanol/água.

Na Tabela 1, observa-se que os ftalatos apresentam baixa solubilidade em água e baixa volatilidade em condições normais de temperatura e pressão (TABELA 1). Aqueles nos quais se predomina estrutura lipofílica são os mais aplicados na indústria, como o DEHP. A solubilidade em água pode ser medida em $-\log C_w^{\text{sat}}$ ou $\mu\text{g mL}^{-1}$. O primeiro parâmetro mede a saturação do composto na água sob a forma logarítmica, enquanto o segundo demonstra de forma mais direta essa solubilidade. O coeficiente de partição octanol/água ($\text{Log } K_{\text{oct/água}}$) mede a tendência do analito de permanecer na fase orgânica ou na aquosa, também refletindo o caráter lipofílico do composto. As estruturas químicas dos compostos avaliados neste estudo estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Estruturas químicas dos ftalatos avaliados neste trabalho. DMP: Dimetilftalato, DBP: Dibutilftalato, BBP: Benzilbutilftalato, DEHP: Dietilexilftalato, DNOP: Dinooctilftalato.



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

2.4. Ftalatos e riscos associados

Ftalatos são considerados contaminantes e estão presentes em produtos de higiene pessoal, hormônios e subprodutos industriais. São considerados compostos de desregulação endócrina, carcinogênicos e de toxicidade reprodutiva (PETROVIC *et al.*, 2002; PETRIE *et al.*, 2015), além de serem classificados entre os de maior nível no ambiente em relação a outros compostos de desregulação endócrina (SÁNCHEZ-AVILA *et al.*, 2012).

As vias de contaminação por ftalatos podem ser inalatória, pela utilização de ftalatos para prolongar a fragrância; oral, através do contato dos alimentos com plásticos filme e PVC ou objetos diretamente levados à boca, como produtos infantis; cutânea, pela aplicação direta na pele de produtos de higiene pessoal que contenham ftalatos e parenteral, esta última podendo ocorrer devido à utilização de materiais médicos em PVC.

Duas classes de substâncias são consideradas desreguladoras endócrinas, podendo ser naturais e artificiais. De forma natural há algumas substâncias no corpo humano e de outros animais além de fitoestrogênios em plantas.

A Agência de proteção ambiental americana (EPA) estabeleceu um limite máximo de ftalatos em água em $6 \mu\text{g L}^{-1}$, e o uso de plastificantes em produtos infantis que podem ser levados à boca foi proibido (CHEN *et al.*, 2004). A OSHA (Occupational Safety and Health Administration) admite $850 \mu\text{g g}^{-1}$ para o DBP e $5 \times 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$ para o DEHP como níveis aceitáveis de exposição em ambiente de trabalho. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) denota que plastificantes não devem conter mais que 1% em peso de ftalato de dibenzila, e para embalagens de alimentos que contenham mais de 5% de gordura, o uso é permitido até o limite de 3% da matéria plástica.

Saillenfait *et al.* (2008) realizaram um estudo para determinar se a exposição intrauterina ao DBP acarretaria alterações no sistema reprodutivo masculino de ratos. Foram verificados, hispospadias (malformação congênita do meato urinário no sexo masculino), prepúcio fendido (pênis cuja pele não cobre a cabeça), criptorquidia (não descida dos testículos) e lesões

histopatológicas nos testículos. Transande *et al.* (2013) relacionaram o aumento da resistência à insulina em adolescentes com concentrações de DEHP na urina. DEHP é o ftalato mais utilizado na indústria para embalagem de alimentos. Clarke e Smith (2011) relataram ameaças à saúde humana e ao meio ambiente devido ao uso de lodo de esgoto no solo contendo compostos desreguladores endócrinos.

Elizalde *et al.* (2012) identificaram a presença de ftalatos em sabonetes, cremes e desodorantes, com efeitos adversos durante a gravidez. Foi verificada diminuição do tempo gestacional, diminuição do perímetro cefálico, tórax, abdômen e peso dos recém-nascidos. A exposição a ftalatos durante o pré-natal também foi associada à anemia em bebês e menor distância ano genital, característica de feminização (SWAN *et al.*, 2005). Também foram relatados baixos níveis de testosterona em homens adultos, associados ao aumento da prevalência da obesidade, resistência à insulina e diabetes (STAHLHUT *et al.*, 2007).

Há pesquisas a respeito da presença de ftalatos em matrizes ambientais como águas residuais, solo, planta, atmosfera, identificando seu destino no ambiente. O estudo desses compostos em lodo de esgoto tem sido realizado de forma lenta devido à composição complexa dessa matriz e das interferências associadas que dificultam a determinação, por isso uma eficiente etapa de *clean up* requer atenção especial nesses trabalhos (PETROVIC *et al.*, 2002; CITULSKI E FARAHBAKSH, 2010, BENJAMIN *et al.*, 2015).

2.5. Ftalatos em lodo de esgoto

Dentre os compostos originários de aplicações industriais, os ftalatos, principalmente o DEHP são encontrados em altos níveis no lodo de esgoto (STASINAKIS, 2012). De acordo com esse mesmo autor, a maioria dos compostos desreguladores endócrinos acabam sendo adsorvidos pelos sólidos em suspensão, logo são encontrados no lodo de esgoto proveniente do tratamento primário e secundário, e a presença destes, depende do seu destino durante o tratamento.

Estudos sobre a presença de contaminantes orgânicos em lodo de esgoto apontam dois ftalatos, DEHP e DNOP, como os mais resistentes à degradação microbiológica (ROGERS, 1996; ÇIFCI *et al.*, 2013). Alterações na temperatura e no tempo de duração do tratamento anaeróbio podem influenciar na biodegradação do DEHP (BENABDALLAH *et al.*, 2006). Shelton *et al.* (1984) relataram que DMP, DEP e DBP foram degradados em uma semana em digestão aeróbia. O BBP diminuiu 75% em duas semanas, porém o DNOP e DEHP persistiram. Uma menor remoção de DEHP também foi observada por Gavalat *et al.* (2003). Outros autores relataram altos níveis de DEHP no lodo de esgoto acima do recomendado para o uso agrícola, entretanto, após compostagem e secagem térmica, a concentração diminuiu para níveis aceitáveis (BAGÓ *et al.*, 2005).

Os ftalatos com cadeias laterais curtas tendem a serem mineralizados e degradados durante a digestão anaeróbia, como o DMP (ROGERS, 1996; JIANLONG *et al.*, 2000). Ftalatos são manufaturados em quantidades muito elevadas, cerca de $0,6 \times 10^6$ toneladas/ano, sendo encontrados no lodo em níveis de 12-1250 mg Kg⁻¹ de peso seco, principalmente o DEHP e o DNOP, pois são os mais resistentes à degradação, como pode ser observado na Tabela 2, devido aos maiores tempos de degradação (WAMS, 1987; ROGERS, 1996; JIANLONG *et al.*, 2000).

Tabela 2. Tempo de degradação em diferentes tipos de digestão dos cinco ftalatos

Ftalato	Degradação Anaeróbica	Degradação Aeróbica
DMP	21 h	23,9 h
DBP	45,6 h	32,1 h
DNOP	498,6 h	513,4 h
DEHP	> 100 anos	> 100 anos

Fonte: Adaptado de Wams, (1987) e Jianlong *et al.*, (2000).

No Brasil, a resolução CONAMA n.º 375 de 2006 estabelece valores máximos a serem determinados desses compostos em lodo de esgoto, produto derivado ou solo apenas para os compostos DMP, DBP e DEHP. Os valores estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Limites máximos de resíduos para lodo de esgoto, produto derivado ou solo, estabelecidos pela resolução CONAMA n.º 375 de 2006 para os cinco ftalatos.

Ftalatos	LMR (mg kg⁻¹)
DMP	0,25
DBP	0,7
BBP	-
DEHP	1
DNOP	-

Fonte: Adaptado da Resolução CONAMA n.º 375 de 2006

2.6. Métodos de extração e determinação de compostos orgânicos

Para a determinação de contaminantes orgânicos, os compostos de interesse devem ser seletivamente removidos da matriz, havendo também uma remoção de interferentes (*clean up* ou isolamento) para posterior análise cromatográfica que pode ser por cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ocorrendo então a identificação e quantificação dos compostos (WISE *et al.*, 2006).

Geralmente, os processos de extração desses compostos utilizam solventes orgânicos como acetona, acetato de etila e tolueno que solubilizam seletivamente esses compostos da matriz de interesse. Para tal processo há uma variedade de métodos que podem ser utilizados (CITULSKI E FARAHBAKHS, 2010), dentre os quais destacam-se soxhlet, ultrassom e agitação mecânica. Entretanto estas técnicas podem ser pouco viáveis devido

ao consumo elevado de solventes e elevado tempo de análise (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Há também técnicas de extração de compostos orgânicos que utilizam menor quantidade de solventes orgânicos e têm um menor tempo de extração, como o fluido supercrítico (FSC) (HUANG *et al.*, 2012), solvente pressurizado (ÁLVAREZ-CASAS *et al.*, 2014), QuEChERS (PRESTES *et al.*, 2009), extração por micro-ondas (VIAN *et al.*, 2011). No entanto essas técnicas são consideradas de alto custo (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

A etapa de *clean up* é geralmente realizada com adsorventes como, sílica, florisil, alumina ou combinações destes, retendo espécies altamente polares na fase estacionária permitindo que compostos moderadamente polares sejam carregados pela fase móvel (FERNANDEZ *et al.*, 2009). Essa etapa é de extrema importância, pois, juntamente com o analito de interesse, podem ser extraídos também interferentes que dificultarão a análise cromatográfica. Tem-se relatado também que a utilização de amostras em quantidades menores tem permitido uma maior porcentagem de recuperação (CHIU *et al.*, 2009), já que quanto maior a massa da amostra, maior será a quantidade de interferentes que poderão ser extraídos, diminuindo a sensibilidade do detector.

O método analítico mais utilizado para determinação de compostos disruptores endócrinos, em especial os ftalatos, é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (PETROVIC *et al.*, 2002; BAGÓ *et al.*, 2005). A CG-EM tem sido identificada como uma técnica bastante sensível para a quantificação de contaminantes em amostras ambientais.

A determinação de ftalatos em matrizes ambientais é verificada recentemente na literatura (TABELA 4).

Tabela 4. Métodos citados na literatura para extração e análise de ftalatos

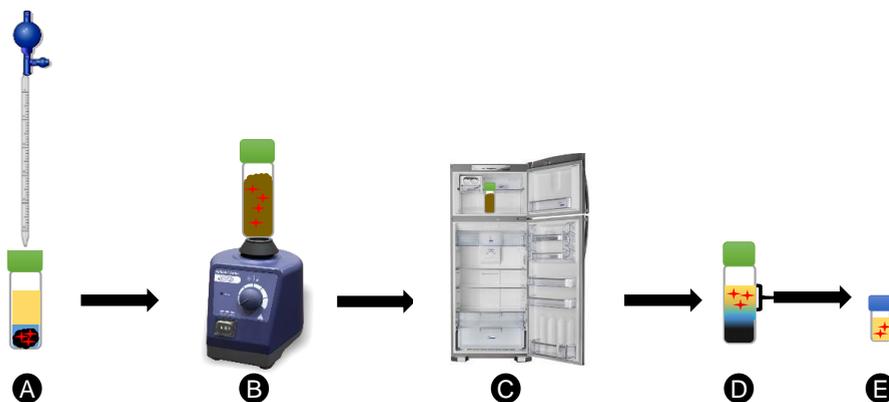
Referência	Matriz	Extração	Análise
Zakharkiv <i>et al.</i> (2015)	Água	Microextração dispersiva em fase-líquida	Cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama
Khosravi e Price, (2015)	Solo e lodo de esgoto	Solvente pressurizado	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
Pirogov <i>et al.</i> (2014)	Solo	Extração sólido-líquido	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa em tandem
Mohammed <i>et al.</i> (2013)	Água	Extração líquido-líquido	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

2.7. Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura

A ESL-PBT foi introduzida a partir do princípio descrito por McCully e McKinley (1964), que utilizaram a purificação em baixa temperatura para determinação de organoclorados em óleo, mas somente décadas depois, Goulart (2004) adaptou a técnica iniciada por McCulley e McKinley com a utilização da extração líquido-líquido anterior ao congelamento para determinação de deltametrina em leite. A técnica permitiu a determinação dos compostos por cromatografia sem a necessidade de uma etapa adicional de clean up. A partir de então, várias modificações foram testadas e validadas para extração de clorobenzenos em lodo de esgoto (PINHO *et al.*, 2014), HPAs em lodo de esgoto (BARBOSA *et al.*, 2014), herbicidas em solo (COSTA *et al.*, 2015a), pesticidas em alface (COSTA *et al.*, 2015b), pesticidas em abacaxi (MORAIS *et al.*, 2014) dentre outros.

A ESL-PBT consiste no agrupamento das etapas de extração e *clean up* é uma técnica simples, com baixo consumo de solventes e de execução mais rápida. A técnica parte do princípio da solubilidade do composto em solvente orgânico e da diferença de densidade e temperatura de fusão entre o solvente e a água. Nessa técnica, a amostra é colocada em contato com água e um solvente menos denso do que a água, com ponto de fusão abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sistema é agitado e levado em congelador por um determinado período de tempo. Durante o congelamento, ocorre a separação das fases por diferença de densidade, então, a matriz sólida com os interferentes fica retida na fase aquosa congelada enquanto o analito de interesse permanece na fase orgânica líquida. O extrato obtido é então transferido para um *vial* de injeção para posterior análise cromatográfica (FIGURA 3).

Figura 3. Representação da ESL-PBT. A) Amostra, água e solvente; B) Agitação; C) Congelamento; D) Separação entre as fases; E) *Vial* de injeção para análise cromatográfica



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

2.8. Fontes de contaminação de ftalatos em laboratório

O maior desafio na determinação de ftalatos é a contaminação durante os processos de extração, limpeza e análise no laboratório, através dos materiais e solventes que podem conter ftalatos. Em estudo realizado por Lopez-Avila e Beckert (1989), pelo menos seis ftalatos foram encontrados em quase todos os solventes orgânicos geralmente utilizados. Apenas no cloreto de metileno foi encontrado um único ftalato (TABELA 5).

Também foram encontrados significativos níveis de ftalatos em substâncias comumente utilizadas na etapa de *clean up*, como florissil, alumina e sílica gel, bem como em filtros e dedais de papel (TABELA 6).

Tabela 5. Contaminação por ftalatos em solventes comuns ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Ftalato	Acetona	Hexano	Acetato de Etila	Isoctano	Cloreto de Metileno
Dimetilftalato	<0,1	<0,1	<0,2 – 3,45	<10	<6
Dietilftalato	<0,1 – 0,4	<0,1	<0,2	<10	<6
Diisobutilftalato	<0,1 – 0,35	<0,1 – 0,35	<0,2	<10	<6
Dibutilftalato	<0,1 – 0,5	<0,1	<0,2 – 2,9	<10 – 103	<6
Diamilftalato	<0,1	<0,1	<0,2	<10	<6
Diexilftalato	<0,1 – 0,45	<0,1 – 0,87	<0,2 – 0,75	<10 – 42	<6
Benzilbutilftalato	<0,1 – 0,46	<0,1	<0,2	<10	<6
Dietilexilftalato	<0,1 – 0,45	<0,1 – 0,4	<0,2 – 2,2	<10 - 69	<6
Diciclohexilftalato	<0,1	<0,1	<0,2	<10	<6
Di-n-octilftalato	<0,1	<0,1	<0,2	<10	8.8
Dinonilftalato	<0,1	<0,1	<0,2	<10	<6

Fonte: Adaptado de Lopez-Avila e Beckert, (1989).

Tabela 6. Contaminação por ftalatos em materiais de laboratório ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Ftalato	Florisil	Alumina	Silica Gel	Sulfato de sódio	Fibra de Vidro	Filtro de papel	Dedais de Papel
Dimetilftalato	6,2	129	-	0,7	27,4	67,5	35
Dietilftalato	5,3	28	15	1,8	2,2	<1,0	2,3
Diisobutilftalato	0,9	29	0,6	0,8	3	11,5	2,3
Dibutilftalato	<0,5	14	0,8	3,5	<2,0	6,5	<2,0
Diamilftalato	<0,5	5,8	<0,5	0,5	<2,0	<1,0	<2,0
Dihexilftalato	0,8	1,2	3,8	3,3	13	15,5	17
Benzilbutilftalato	<0,5	0,6	18	4,7	4	3,3	3,0
Dietilexilftalato	2,3	4,8	1,3	1,0	4,4	11	2,8
Diciclohexilftalato	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<2,0	<1,0	<2,0
Di-n-octilftalato	1,5	<0,5	0,7	<0,5	5	<1,0	<2,0
Dinonilftalato	2,3	<0,5	<0,5	<0,5	<2,0	<1,0	<2,0

Fonte: Adaptado de Lopez-Avila e Beckert, (1989).

Para minimizar o risco de contaminação por ftalatos, algumas precauções devem ser adotadas: qualquer contato com material plástico deve ser evitado, todas as vidrarias devem ser devidamente limpas, com detergente, seguido por água em abundância, água destilada três vezes e secagem em estufa a 60 °C. Para cada série de amostras, deve ser feita uma amostra em branco, uma injeção da amostra no CG deve ser feita a partir do mesmo frasco (LOPEZ-AVILA E BECKERT, 1989).

2.9. Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos objetiva demonstrar com estudos experimentais que o procedimento analítico avaliado é adequado à utilização de interesse, assegurando a confiabilidade dos resultados (RUMEL, 2000; THOMPSON *et al.*, 2002; PEREIRA E MAGALHÃES, 2011; SANCO, 2013).

No Brasil, agências credenciadas, como o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), disponibilizam roteiros para validação de métodos. No âmbito internacional, há a União Internacional de Química pura e Aplicada (IUPAC) e a Comissão Europeia que também estabelecem parâmetros de validação a serem seguidos. Em geral, todos esses guias definem como as figuras de mérito a serem analisadas; a seletividade, exatidão e precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez.

A seletividade é a capacidade do método em identificar os analitos de interesse sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante em uma amostra complexa, que não sejam os próprios analitos de interesse (RUMEL, 2000; PEREIRA E MAGALHÃES, 2011).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) constitui a menor concentração do analito capaz de ser quantificada com um nível aceitável de precisão e exatidão, definindo a capacidade do método de quantificar de forma adequada a substância (THOMPSON *et al.*, 2002; SANCO, 2013).

A linearidade é a capacidade do método de produzir resultados proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma faixa de concentração estabelecida, ou seja, a linearidade demonstra que as curvas de calibração produzidas pelo procedimento analítico podem ser ajustadas pela equação de uma reta (PEREIRA E MAGALHÃES, 2011; SANCO, 2013).

A exatidão representa o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensuramento. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Os limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas e pode ser representada de três maneiras; pela repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (PEREIRA E MAGALHÃES, 2011; SANCO, 2013).

O efeito de matriz é um estudo de seletividade que verifica possíveis interferências que podem ser causadas por coextrativos da matriz analisada, podendo gerar superestimação ou subestimação da resposta instrumental (PEREIRA E MAGALHÃES, 2011). Na análise de soluções padrão em solvente puro por cromatografia, os sítios ativos do *liner* estão disponíveis para interagir com os analitos. Já quando se utilizam extratos na matriz fortificados, os analitos competem com os coextrativos da matriz pelos sítios ativos do *liner*, com isso, mais analitos são introduzidos na coluna cromatográfica, sendo detectados e obtendo uma maior resposta em relação ao padrão no solvente (HAJŠLOVÁ E ZROSTLIKOVA, 2003). A intensidade do efeito de matriz pode variar de uma amostra para outra de acordo com a concentração do analito na matriz ou mesmo pelo sistema cromatográfico (PINHO, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Limpeza e preparo de vidrarias

Devido ao possível risco de contaminação das amostras por ftalatos provenientes de materiais plásticos e outros, foram utilizados apenas materiais de vidro e alumínio. Além disso, para limpeza dos materiais durante os procedimentos, foram seguidos os critérios sugeridos por Lopez-Avila e Beckert (1989). Todo o material utilizado foi lavado com detergente, enxaguado com água em abundância, lavado três vezes com água destilada, lavado com acetona e seco em estufa a 60 °C.

3.2. Instrumentação

Os instrumentos utilizados durante todo o procedimento foram: balança analítica da Shimadzu (São Paulo, Brasil) para pesagem de amostras, padrões e reagentes; estufa da Ethik Technology (São Paulo, Brasil) para manipulação de amostras e solventes; vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil) e banho ultrassom da Unique (São Paulo, Brasil) para agitação das amostras, centrífuga da Kindly (São Paulo, Brasil) para separação de fases e seringa manual da Agilent Technologies para fortificação.

3.3. Produtos químicos e reagentes

Os analitos alvo estudados neste trabalho foram os cinco ftalatos, Dimetilftalato, Dibutilftalato, Benzilbutilftalato, Dietilexilftalato e Di-n-octilftalato. Todos os padrões analíticos utilizados neste estudo são de grau de pureza superior a 99% e foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Além disso, outros reagentes químicos e solventes como hexano grau HPLC (HEX), acetonitrila (ACN), acetato de etila (ACT), acetona (ACE) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) são de alto grau de pureza e foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções estoque individuais foram preparadas em ACN na concentração de 500 mg L⁻¹. Uma solução intermediária contendo os cinco ftalatos na concentração de 20 mg L⁻¹ foi preparada a partir da diluição das soluções estoque individuais. As demais soluções foram preparadas a partir da diluição da solução intermediária. Todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar a 4 °C na geladeira com as tampas plásticas revestidas com papel alumínio.

3.4. Análises cromatográficas

A medição dos analitos alvo foi realizada utilizando cromatógrafo a gás (Agilent Technologies - GC 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (Agilent Technologies - MS 5975C). Foi utilizada a coluna cromatográfica capilar DB-5 MS (Agilent Technologies) com fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30m comprimento x 0,32mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme interno) para separação e quantificação dos analitos. Neste estudo, foi utilizada uma única condição de análise cromatográfica capaz de identificar e quantificar os cinco ftalatos em uma única injeção. Para tanto, foi utilizado o gás Hélio (99,9999% de pureza) como gás de arraste a uma taxa de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do injetor *split/splitless* foi mantida a 280 °C e o volume de amostra injetado foi de 1 µL no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*) utilizando autoinjeter Combi PAL. A programação de temperatura do forno iniciou-se em 70 °C, com taxa de aquecimento 26 °C min⁻¹ até a temperatura de 208 °C, seguida por nova taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até a temperatura de 300 °C, totalizando 19 minutos de análise. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte de íons a 230 °C. O controle do instrumento e aquisição de dados foram feitos com auxílio do software ChemStation (E.02.02.1431 copyright © 1989-2011) da Agilent Technology.

3.4.1. Seleção de íons

A identificação dos compostos foi realizada através do monitoramento de íons seletivos (MIS), que permite a seleção de um ou mais fragmentos que caracterizam as moléculas, favorecendo melhores resultados quantitativos. Para cada composto foi selecionado um grupo de três íons.

Foram avaliadas três situações de escolha de íons, e foi selecionada aquela que favoreceu uma melhor identificação dos sinais e sensibilidade do equipamento aos ftalatos. Foram examinados os grupos constituídos pelos íons mais abundantes de cada composto, verificados no cromatograma de íons totais (CIT) obtido a partir de injeções de padrão de ftalatos em solvente puro. Além disso, foram estudados grupos de íons descritos em duas literaturas (GIBSON *et al.*, 2005; SABLAYROLLES *et al.*, 2005). Os diferentes grupos de íons avaliados para cada composto estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Grupos de íons estudados para cada ftalato

Ftalato	Íons mais abundantes do Padrão (CIT)	GIBSON <i>et al.</i>, (2005)	SABLAYROLLES <i>et al.</i> (2005)
DMP	77, 163, 164	77, 163, 194	104, 135, 163
DBP	149, 150, 223	149, 150, 223	104, 149, 150
BBP	91, 149, 281	91, 149, 260	91, 149, 206
DEHP	57, 149, 167	149, 150, 279	43, 149, 167
DNOP	149, 150, 279	135, 163, 194	149, 167, 279

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

3.5. Coleta e pré-tratamento de amostras de lodo de esgoto

Para a otimização e validação do método, amostras de lodo de esgoto foram coletadas no leito de secagem da ETE da cidade de Juramento (MG, Brasil) em abril de 2014. As amostras foram armazenadas em frasco de vidro com tampa plástica revestida por papel alumínio e conservadas em geladeira a 4 °C. Para a etapa de aplicação do método, foram coletadas amostras de

lodo de esgoto das cidades de Belo Horizonte (MG, Brasil), Claro dos Poções (MG, Brasil), Corinto (MG, Brasil), Curvelo (MG, Brasil), Juramento (MG, Brasil) e Montes Claros (MG, Brasil), para avaliação do grau de contaminação do lodo. Antes de cada teste, as amostras de lodo de esgoto foram deixadas à temperatura ambiente, homogeneizadas e peneiradas em peneira de inox de 1 mm.

Antes de iniciar a ESL-PBT, 4,000 g de amostras de lodo de esgoto foram pesadas em *vials* de 22 mL e fortificadas com 100 μL de solução padrão contendo os cinco ftalatos na concentração de 8 mg L⁻¹ com auxílio de seringa de inox. Os *vials* foram mantidos durante três horas em capela, cobertos com papel alumínio com furos para evaporação do solvente e interação dos compostos com a matriz.

3.6. Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

Para avaliar a eficiência de extração da técnica para ftalatos em amostras de lodo de esgoto, uma série de experimentos foi realizada adotando a otimização univariada do método. Em todos os experimentos foram avaliadas as porcentagens de recuperação dos ftalatos, volume e limpeza do extrato obtido após a ESL-PBT. Foram avaliados cinco parâmetros em níveis diferentes (TABELA 8).

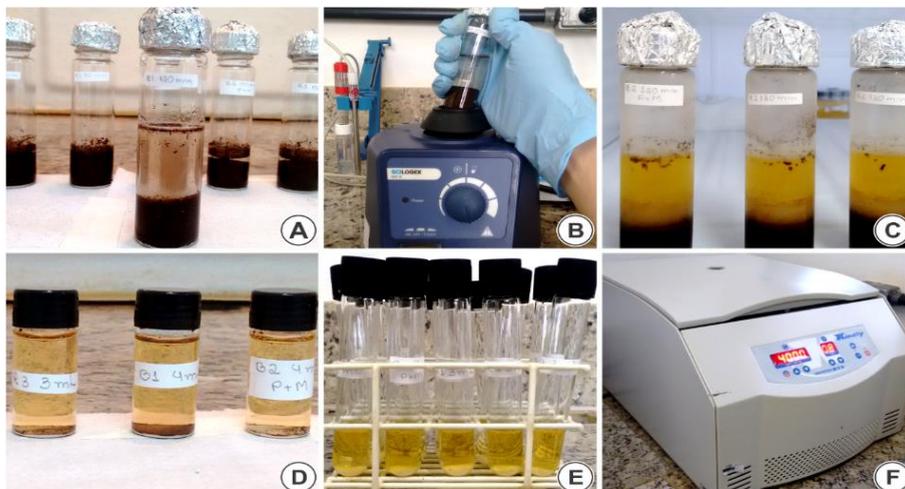
Tabela 8. Parâmetros avaliados na otimização da ESL-PBT de ftalatos em lodo de esgoto

Parâmetros	Níveis
Volume de água (mL)	1, 2, 3 e 4
Fase extratora (8 mL)	ACN (8 mL) ACN/ACT (6,5 mL/1,5 mL) HEX/ACE (6,5 mL/ 1,5 mL)
Tempo de congelamento (min)	30, 60, 90, 120 e 180
Modo de homogeneização	Vórtex (30 s, 1 min) Ultrassom (15, 30 min)
Adsorventes para <i>clean up</i> (25 mg)	Sem adsorvente, florisil, C18, PSA, alumina

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

O procedimento de extração otimizado consistiu em adicionar aos *vials* contendo 4,000 g de amostra de lodo de esgoto fortificadas; 4 mL de água destilada e 8 mL da mistura extratora composta por ACN/ACT na proporção de 6,50/ 1,50 mL, em seguida, o sistema foi homogeneizado em vórtex por 30 seg e levado ao freezer a -20 °C por 90 min. Após o congelamento da fase aquosa com o lodo de esgoto, um volume de 2,5 mL da fase extratora recuperada foi transferido para tubos de ensaio de vidro de 15 mL contendo 350 mg de Na₂SO₄. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 min e centrifugados a 4000 rpm durante 10 min. Após a secagem, cerca de 1 mL do extrato centrifugado foi transferido para *via*l de injeção e armazenado em freezer a -20 °C até o momento da análise cromatográfica (FIGURA 4).

Figura 4. Fotografias de cada etapa da ESL-PBT seguida por centrifugação com Na₂SO₄



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

As porcentagens de recuperação foram calculadas comparando as áreas obtidas nos cromatogramas de amostras de lodo de esgoto fortificadas com padrão de ftalatos em concentração conhecida e submetida a ESL-PBT com a área dos sinais de ftalatos nos cromatogramas de solução padrão preparada no extrato da matriz na mesma concentração (EQUAÇÃO 1).

Equação 1

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{A_{\text{amostra fortificada}}}{A_{\text{padrão na matriz}}} \times 100$$

Onde:

A = Área cromatográfica

3.7. Validação do método analítico

Para validação do método proposto, seguiram-se as diretrizes sugeridas por (SANCO, 2013) para o controle de qualidade de métodos de análises de resíduos de pesticidas em alimentação humana e animal na União Europeia.

As figuras de mérito avaliadas neste trabalho foram: seletividade, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

3.7.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método, foi realizada uma investigação a respeito da possibilidade de detecção de coextrativos no mesmo tempo de retenção dos ftalatos. Também foram analisadas as possíveis fontes de contaminação provenientes da ESL-PBT. Para avaliação da presença de coextrativos na matriz, foi realizada uma comparação entre os cromatogramas obtidos pela injeção de padrão de ftalatos em solvente e os cromatogramas obtidos pela injeção de extrato recuperado após o processo de extração sem fortificação das amostras (amostras branco). Para avaliação da contaminação proveniente do processo de extração, foram analisados cromatogramas obtidos pelo start do CG, que é uma simulação da análise sem injeção de amostra; pela injeção de ACN; da mistura ACN/ACT e do extrato branco do método (BM). O BM é o extrato obtido pelo processo de extração otimizado sem a presença de lodo de esgoto. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

3.7.2. Limite de quantificação

Para determinar o limite de quantificação (LQ) instrumental dos compostos foi analisada a relação sinal/ruído de cromatogramas em solvente puro pelo método visual. A partir desta avaliação, foi proposta a menor concentração com a qual seria possível quantificar os compostos com segurança, obtendo uma relação sinal ruído de 10. Após definido o limite de quantificação instrumental, foi determinado o limite de quantificação do método, em que, amostras de lodo de esgoto foram fortificadas e submetidas a ESL-PBT nas condições otimizadas e foi realizada análise por CG-EM para confirmação.

3.7.3. Linearidade

A linearidade de resposta do método foi verificada pela curva analítica preparada em extrato da matriz (EM) em sete níveis de concentração, sendo obtida na faixa de concentração de 20 a 140 $\mu\text{g L}^{-1}$ para DMP, BBP e DNOP, de 40 a 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DBP e 0,5 a 6 mg L^{-1} para o DEHP em três replicatas independentes para cada nível. Aplicou-se o método dos mínimos quadrados aos dados experimentais para estimar os parâmetros de regressão. Os valores dispersos foram tratados e confirmados pelo teste de Jackknife com exclusão máxima de 22,2% dos dados. A avaliação da regressão seguiu os parâmetros de normalidade, avaliado pelo teste de Ryan & Joiner, homocedasticidade, avaliado pelo teste de Levene e independência de resíduos avaliada pelo teste de Durbin & Watson.

3.7.4. Exatidão e precisão

A exatidão foi avaliada utilizando ensaios de recuperação em três níveis de concentração, 20, 40 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos DMP, BBP e DNOP. Amostras em triplicata foram submetidas a ESL-PBT e analisadas por CG-EM. Para cada nível de concentração, os valores de recuperação foram confrontados com o intervalo sugerido por Sanco (2013) de 70 a 120%. Para o DBP e DEHP a exatidão foi verificada por adição padrão, a partir da curva analítica preparada em extrato da matriz em sete níveis de concentração, na faixa de concentração de 40 a 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DBP e 0,5 a 6 mg L^{-1} para o composto DEHP em três replicatas independentes para cada nível. O ponto onde a reta cortou o eixo das ordenadas correspondeu à área do pico da substância a ser determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta definiu, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra.

A precisão do método foi avaliada conforme condição reiterativa, demonstrada através dos valores de DPR obtidos em experimento de recuperação dos ftalatos em amostras de lodo de esgoto, conforme orientado por Sanco (2013), que sugere valores menores que 20%. Foi executado o

processo de extração dos contaminantes em sete replicatas de forma idêntica na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos DMP, BBP e DNOP. Não foi possível determinar para os ftalatos DBP e DEHP.

3.7.5. Efeito de matriz

O efeito dos componentes da matriz sobre a variação de resposta do detector foi avaliado em três níveis de concentração (20, 40 e $60 \mu\text{g L}^{-1}$) para os compostos DMP, BBP e DNOP. Para tanto, foram preparadas soluções padrão dos ftalatos preparados em ACN e em extrato da matriz. O experimento foi realizado em triplicata e o efeito de matriz confirmado pela comparação de áreas.

3.8. Aplicação do método em amostras reais

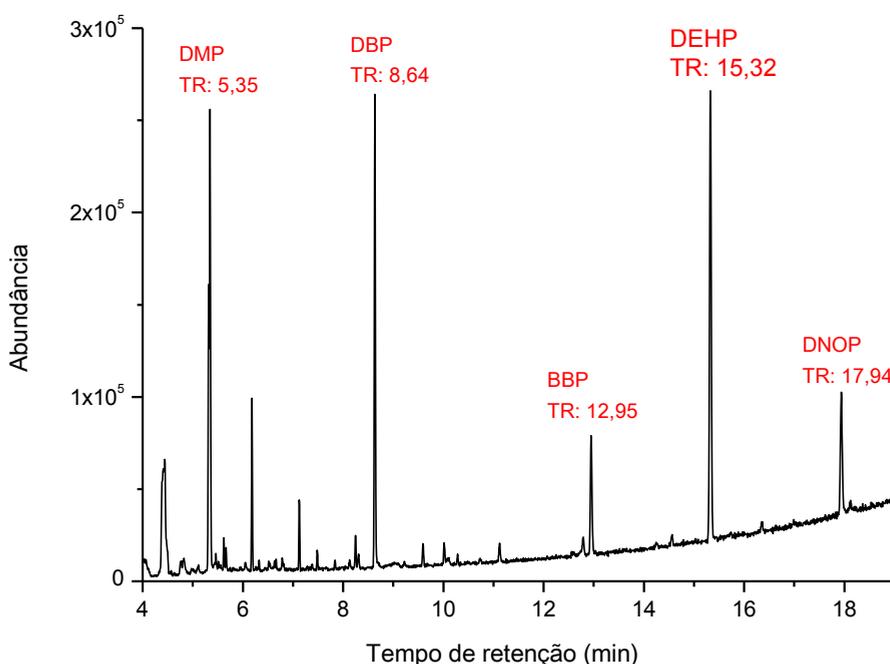
O método validado foi aplicado em amostras de lodo de esgoto de seis diferentes cidades de Minas Gerais, para identificação dos cinco ftalatos e quantificação da concentração de três ftalatos (DMP, BBP e DNOP). A quantificação foi feita pelo método da padronização externa, no qual as áreas das substâncias encontradas na amostra foram comparadas com as áreas obtidas com soluções padrão em concentração conhecida. As concentrações foram verificadas pela equação da reta resultante da curva analítica preparada em solvente. Para os compostos que estavam presentes nas amostras na etapa de otimização do método, não foi possível quantificar pois, o método a ser utilizado seria a adição de padrão, o que se tornou inviável economicamente devido à elevada quantidade de análises que seriam necessárias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises cromatográficas

Para identificação e separação dos cinco compostos, foram otimizadas as condições cromatográficas através da injeção de solução padrão contendo os cinco ftalatos. O cromatograma de íons totais (CIT) está apresentado na Figura 5.

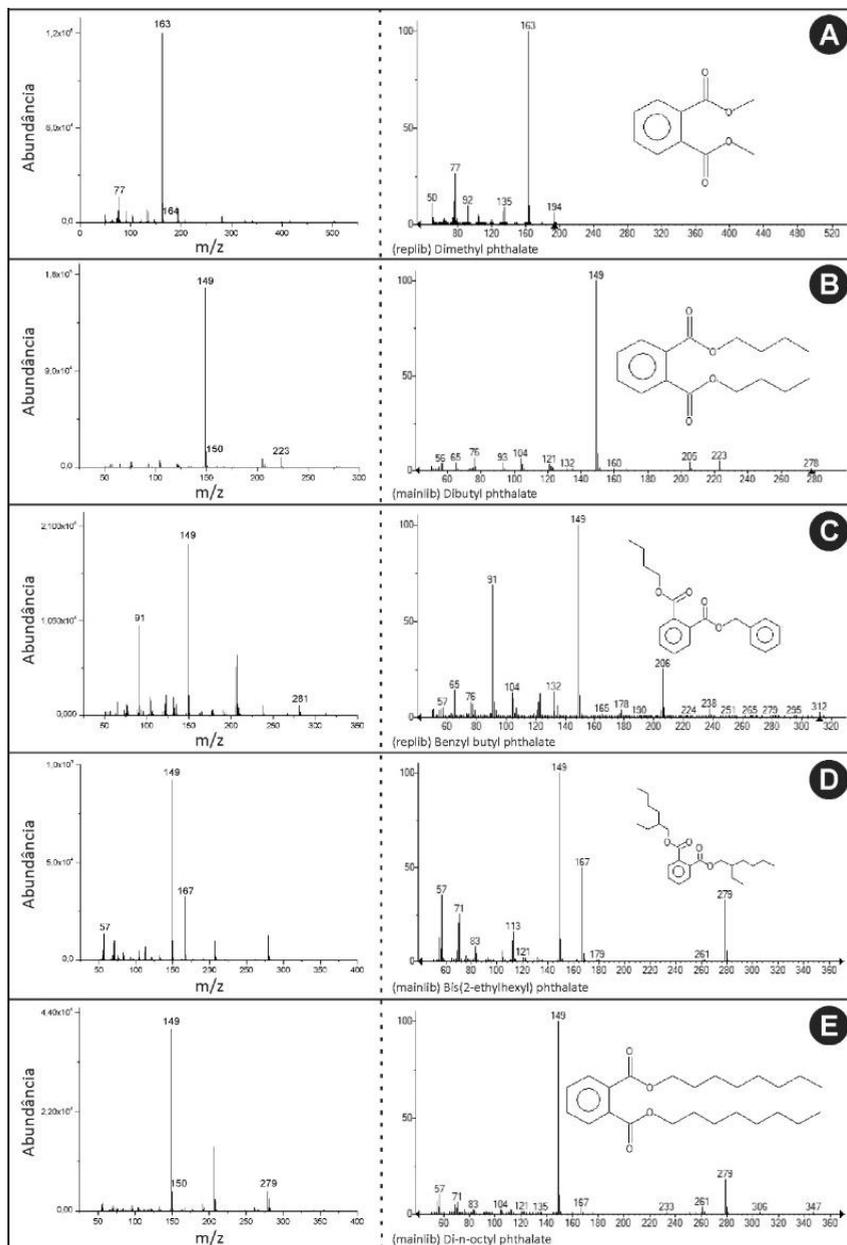
Figura 5. Cromatograma de íons totais dos cinco ftalatos em ACN na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A figura 5 mostra os tempos de retenção (TR) de cada ftalato bem como seus respectivos íons mais abundantes. Na Figura 6, são apresentados os espectros de massas obtidos nas análises por CG-EM e os espectros fornecidos pela biblioteca NIST para cada ftalato.

Figura 6. Primeira coluna: Espectros de massa dos ftalatos identificados com íons mais abundantes. Segunda coluna: Espectros registrados pela biblioteca NIST. A) DMP; B) DBP; C) BBP; D) DEHP; E) DNOP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

4.1.1. Seleção de íons

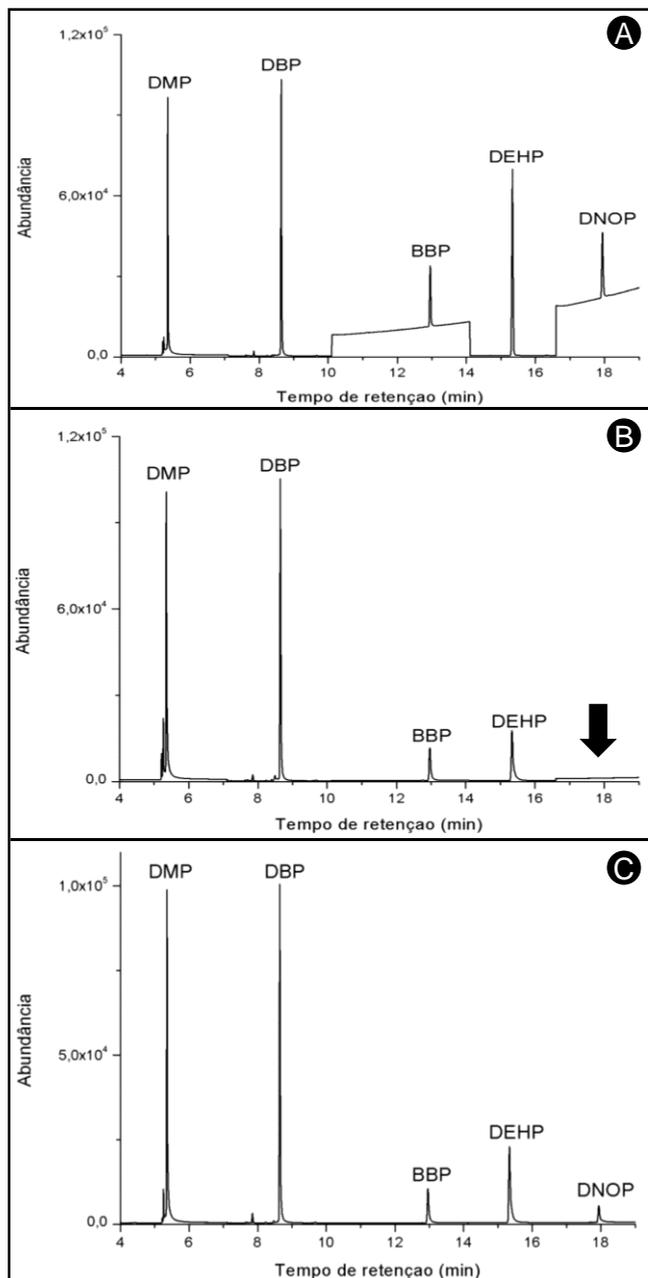
As condições para monitoramento de íons seletivos (MIS) foram otimizadas visando melhorar a sensibilidade do espectrômetro de massas para os ftalatos e obter cromatogramas de melhor qualidade. De acordo com os critérios sugeridos por Sanco (2013) para identificação de compostos devem-se utilizar grupos de três íons para cada ftalato avaliado.

Neste trabalho, foram avaliadas três condições: íons mais abundantes do padrão de ftalatos, íons empregados pela Literatura 1 (GIBSON *et al.*, 2005) e íons empregados pela Literatura 2 (SABLAYROLLES *et al.*, 2005) (TABELA 7, PAG 37).

A tomada de decisão baseou-se na seleção de íons que resultou em melhores perfis cromatográficos, avaliando se houve a detecção de todos os compostos e aspectos que demonstrem a qualidade dos cromatogramas, como por exemplo, alterações nas linhas de base, presença de muitos ruídos, definição de picos e etc.

No cromatograma obtido utilizando os grupos de íons mais abundantes do padrão, foi observada a detecção dos cinco compostos, entretanto há alterações na linha de base que desfavorecem a qualidade do cromatograma (FIGURA 7 A). No cromatograma obtido com os grupos de íons da Literatura 1, o DNOP não foi detectado conforme mostrado pela seta (FIGURA 7 B). Enquanto no cromatograma obtido com os grupos de íons da Literatura 2 verificou-se a presença dos cinco compostos e um bom perfil cromatográfico (FIGURA 7 C).

Figura 7. Cromatogramas obtidos com diferentes grupos de íons na concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$. A) íons mais abundantes do padrão de ftalatos; B) íons da literatura 1; C) íons da literatura 2



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Diante desses resultados, os grupos de íons selecionados para a quantificação dos ftalatos DMP, DBP e DEHP foram os obtidos da seleção de íons mais abundantes, e para os ftalatos BBP e DNOP foram selecionados os grupos descritos pela literatura 2 (SABLAYROLLES *et al.*, 2005). A aquisição de dados foi dividida conforme a Tabela 9.

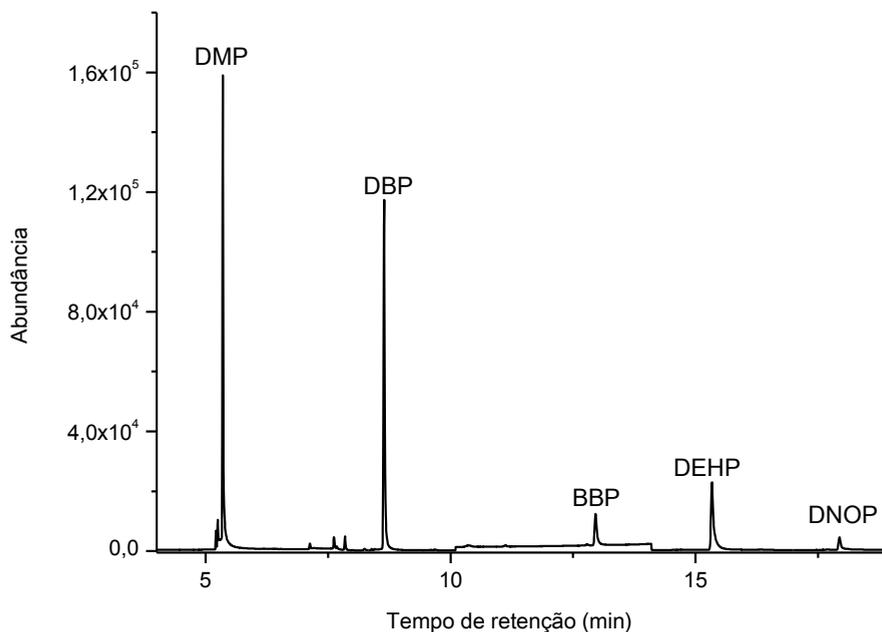
Tabela 9. Tempos de retenção dos cinco ftalatos e íons selecionados para análise no CG-EM no modo MIS

Ftalato	Tempo de retenção (min)	Íons Selecionados (<i>m/z</i>)
DMP	5,35	77,163,164
DBP	8,64	149,150,223
BBP	12,95	91,149,206
DEHP	15,33	57,149,167
DNOP	17,94	149,167,279

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

O cromatograma obtido pela injeção do padrão de ftalatos em ACN utilizando os grupos de íons selecionados está demonstrado na Figura 8, a partir dessa avaliação, foi confirmado que as variáveis de análise empregadas foram adequadas para que houvesse uma boa identificação dos compostos.

Figura 8. Cromatograma obtido com padrão de ftalatos em solvente utilizando os grupos de íons selecionados ($500 \mu\text{g L}^{-1}$)



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A fragmentação das moléculas demonstrada por Yin *et al.* (2014) confirma os picos base utilizados neste estudo. O pico base dos compostos com cadeias laterais alquila (DMP, DBP, DEHP, DNOP) é o m/z 149, indicando semelhança no perfil de fragmentação, exceto para o DMP, cujo pico base é o m/z 163, gerado pela clivagem do seu íon molecular. O pico base do composto BBP também é m/z 149, entretanto a presença do grupo benzil na cadeia lateral indica um perfil de fragmentação diferente dos demais compostos com cadeia lateral alquila.

4.2. Otimização univariada da ESL-PBT

A eficiência da ESL-PBT pode ser influenciada por fatores como o volume de água adicionado, a escolha da fase extratora, o tempo de congelamento, o modo de agitação e a utilização de adsorventes para *clean*

up adicional (LIU *et al.*, 2015), sendo então necessário um estudo detalhado desses parâmetros analíticos a fim de maximizar as porcentagens de recuperação da extração. As melhores condições foram selecionadas de acordo com as porcentagens de recuperação dos ftalatos, qualidade dos cromatogramas obtidos e volume de extrato obtido após a ESL-PBT. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados submetidos a análise estatística pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

4.2.1. Volume de água

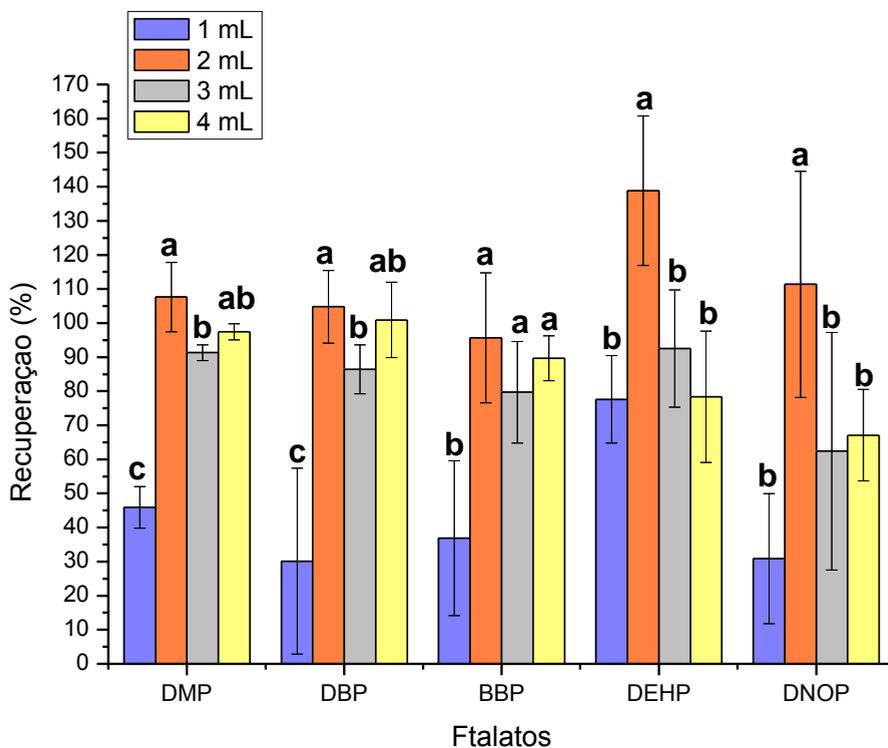
Visando obter uma técnica universal para extração de ftalatos em lodo de esgoto, foi avaliado inicialmente o volume de água necessário para alcançar o congelamento da amostra e a separação entre a fase aquosa e o solvente. Diferentes volumes de água foram adicionados a 4,000 g de lodo de esgoto fortificado e 8 mL de ACN. Essa mistura foi agitada em vórtex por um minuto e depois levada ao freezer a aproximadamente -20 °C por três horas.

As melhores porcentagens de recuperação foram obtidas para os volumes de 2 e 4 mL, enquanto, para o volume de 1 mL, as porcentagens de recuperação de quatro dos cinco compostos não foram satisfatórias (FIGURA 9). Para o volume de 2 mL, foi observado possível efeito de matriz (porcentagens superiores a 100%) e elevado DPR, principalmente para o último composto, DNOP. Outro parâmetro considerado foi o volume de fase extratora recuperado após o congelamento, que foi maior, utilizando-se 4 mL de água, sendo recuperados cerca de 5 mL de extrato.

A partir dos resultados obtidos, foi escolhido o volume de 4 mL para dar continuidade à otimização do método proposto. Entretanto há trabalhos que, apesar de não terem otimizado o volume de água, apresentaram bons resultados utilizando a proporção 2:1 de fase extratora e fase aquosa (VIEIRA *et al.*, 2007; PINHO *et al.*, 2010b; COSTA *et al.*, 2015; DASENAKI E THOMAIDIS, 2015) e a proporção 1:1 de peso da amostra e fase aquosa (COSTA *et al.*, 2015). Um maior volume de água adicionado à amostra permitiu um congelamento homogêneo dos componentes da matriz, como proteínas,

lipídeos e matéria orgânica, fazendo com que os compostos de interesse migrem mais facilmente para a fase extratora com a qual têm afinidade.

Figura 9. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes volumes de água.



* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

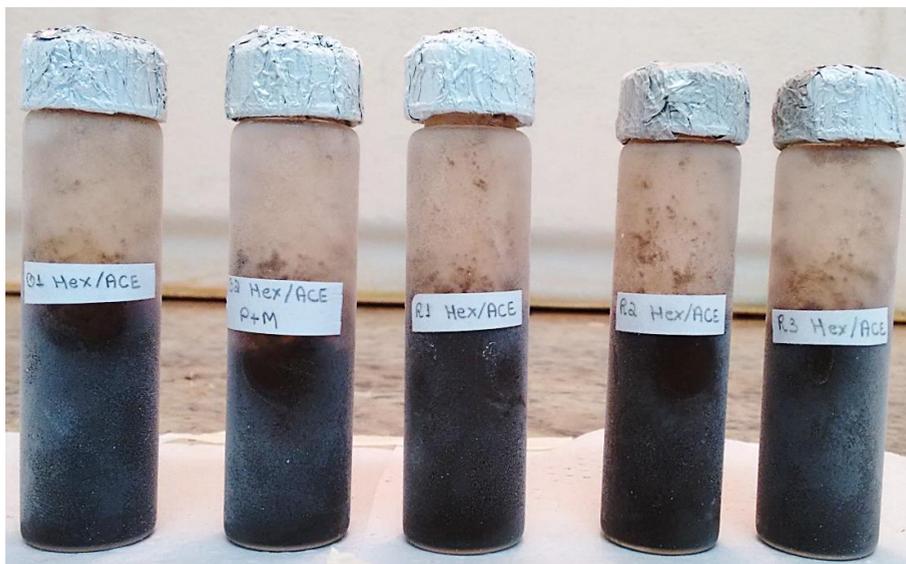
4.2.2. Fase extratora

Para que haja a extração dos compostos da matriz estudada é necessário que se utilize um solvente orgânico miscível à temperatura ambiente, com temperatura de congelamento inferior à da água e com polaridade compatível com o analito de interesse. Neste trabalho, foram

testados três diferentes fases extratoras: ACN (8 mL), ACN/ACT (6,5/1,5 mL) e HEX/ACE (6,5/1,5 mL).

As diferentes fases extratoras foram adicionadas à amostra fortificada e hidratada com 4 mL de água. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min e depois levada ao freezer a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três horas. A fase extratora composta por HEX/ACE se mostrou inviável para a técnica ESL-PBT, pois não houve separação das fases após o congelamento (FIGURA 11), já que a diminuição da polaridade da mistura dificulta o congelamento da fase aquosa. Essa característica de não separação entre fases também foi citada por outros trabalhos que testaram HEX como fase extratora (HUANG *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

Figura 10. Fotografia dos Vials contendo a fase extratora Hexano/ Acetona após congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três horas

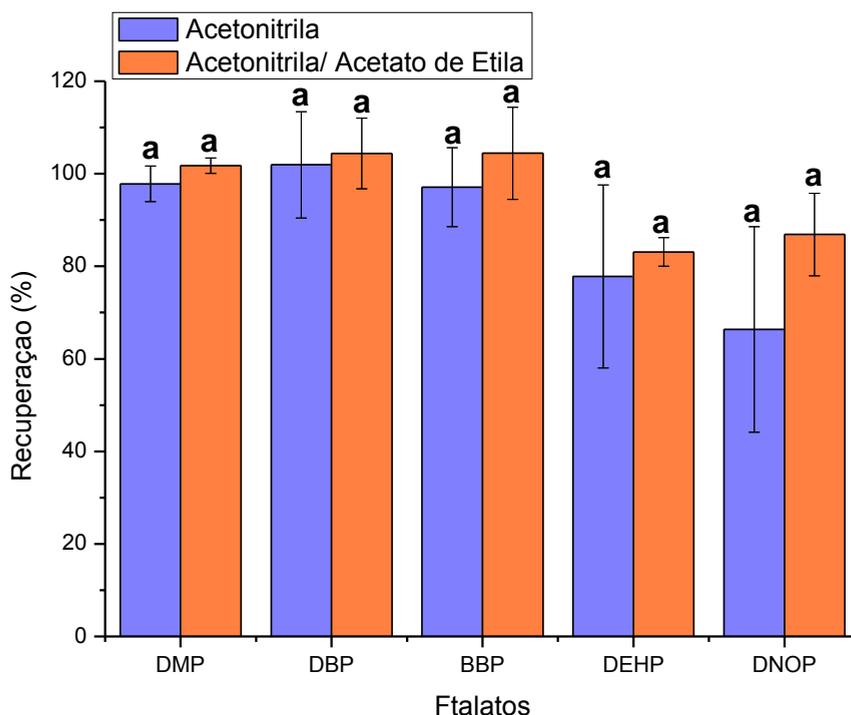


Fonte: Da autora, 2016.

Já com a utilização das fases extratoras ACN e ACN/ACT observou-se fácil congelamento e recuperações que não diferem estatisticamente ($> 60\%$). Entretanto, a fase extratora ACN/ACT apresentou menor DPR, (<10) (FIGURA

11). Diante destes resultados, foi escolhida a fase extratora constituída por ACN/ ACT na proporção de 6,5/ 1,5 mL para dar continuidade ao processo de otimização do método.

Figura 11. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes fases extradoras.



* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

Estudos anteriores empregaram essa mesma fase extratora com sucesso para extração de agrotóxicos em tomate (PINHO *et al.*, 2010c), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em lodo de esgoto (Barbosa *et al.*, 2014), herbicidas em solo (COSTA *et al.*, 2015a), agrotóxicos em alface (COSTA *et al.*, 2015), agrotóxicos em abacaxi (MORAIS *et al.*, 2014) entre outros. A diminuição da polaridade da fase extratora pela adição de ACT eleva

a extração dos compostos menos polares como o DNOP, entretanto, o volume máximo que pode ser adicionado é de 1,5 mL para evitar a separação de fases antes do congelamento (VIEIRA *et al.*, 2007; MAGALHAES *et al.*, 2013; MORAIS *et al.*, 2014; PINHO *et al.*, 2014).

4.2.3. Tempo de congelamento

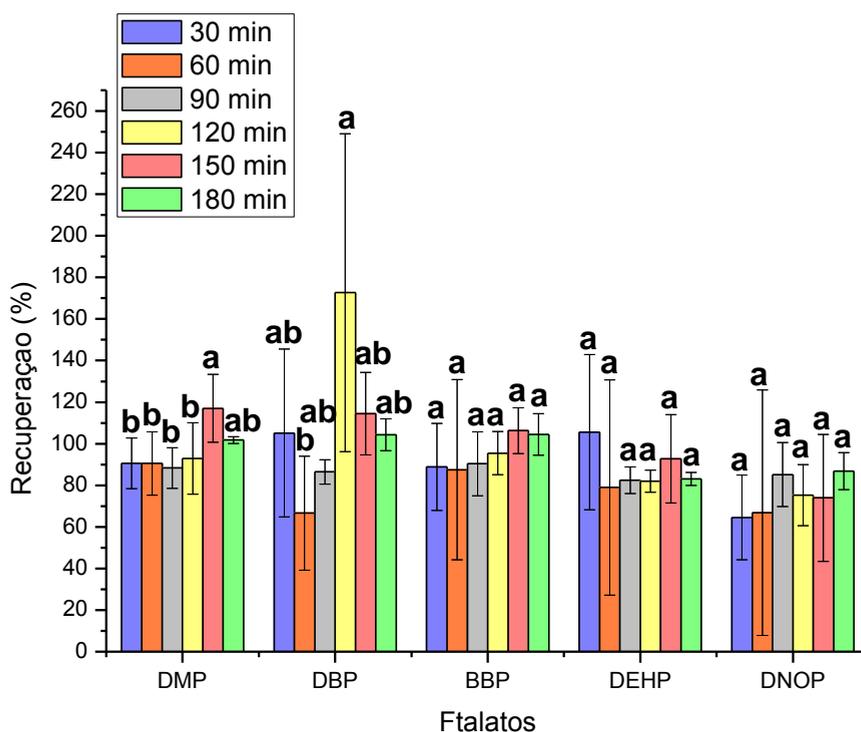
A etapa de congelamento, além de ser imprescindível para o processo de extração dos analitos, pelo favorecimento de separação entre as fases, realiza também a limpeza dos extratos, precipitando lipídeos e proteínas resultantes da amostra (ZHAN *et al.*, 2013). Neste trabalho, foram testados os seguintes tempos de congelamento: 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. Após fortificação, adição de água, adição da fase extratora e agitação das amostras, estas foram colocadas em freezer a -20 °C durante os diferentes tempos de congelamento testados.

Foi observado o congelamento de todas as amostras após 30 min no freezer. Outros trabalhos observaram o congelamento apenas após 2 a 3 h (COSTA *et al.*, 2015), isso pode estar relacionado a características específicas da matriz utilizada.

Foram avaliadas as porcentagens de recuperação dos compostos em diferentes tempos de congelamento (FIGURA 12). Porém, não foi observada diferença estatística significativa para BBP, DEHP e DNOP entre os tempos de congelamento. Trabalhos anteriores também não verificaram diferença significativa na recuperação de compostos entre diferentes tempos de congelamento (SOUSA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015; FRANÇA *et al.*, 2016). Isso se deve ao fato de que a extração ocorre efetivamente antes da etapa de congelamento, não havendo necessidade de maiores tempos de congelamento para ocorrer aumento significativo na extração dos compostos. Para o DMP, ocorreu variação significativa apenas com 150 min de congelamento, e para o DBP houve oscilação da extração em função do tempo de congelamento, variando entre 66 e 172%. Para o DBP, a diferença entre os resultados podem ser atribuídos ao elevado DPR. Diante dos resultados obtidos até então, foi escolhido o tempo de congelamento de 90 min para

prosseguir o processo de otimização do método, pois este tempo apresentou porcentagens de recuperação entre 80 e 100% e menores valores de DPR (< 16%).

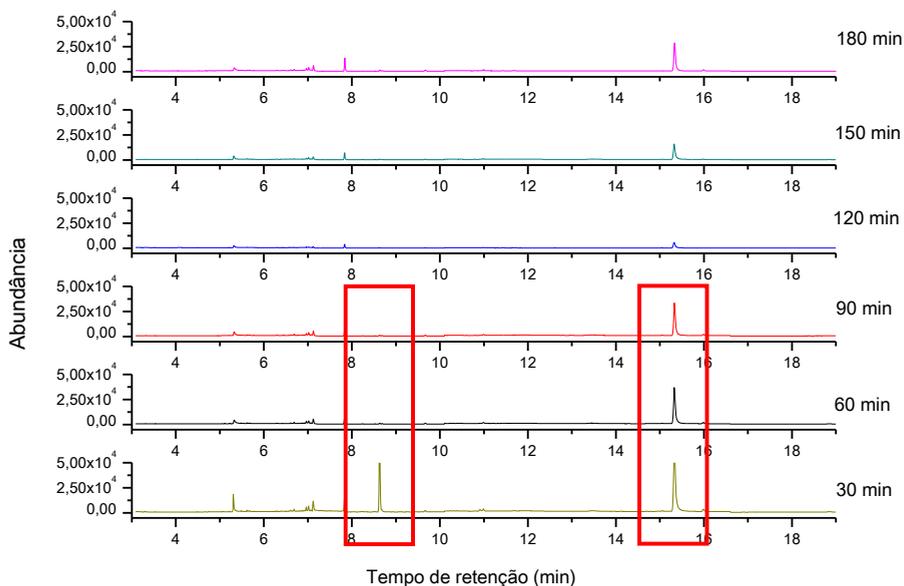
Figura 12. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação em diferentes tempos de congelamento.



* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

A Figura 13 mostra os cromatogramas obtidos após análise dos extratos de lodo de esgoto não fortificados (branco) nos seis tempos de congelamento estudados. No intervalo de 30 a 90 min, observou-se uma redução na intensidade dos sinais dos componentes da matriz, comprovando o *clean up* dos extratos durante a etapa de congelamento. Tempos superiores a 90 min não proporcionaram um incremento na limpeza dos extratos.

Figura 13. Cromatogramas dos extratos de amostras não fortificadas (branco) em diferentes tempos de congelamento

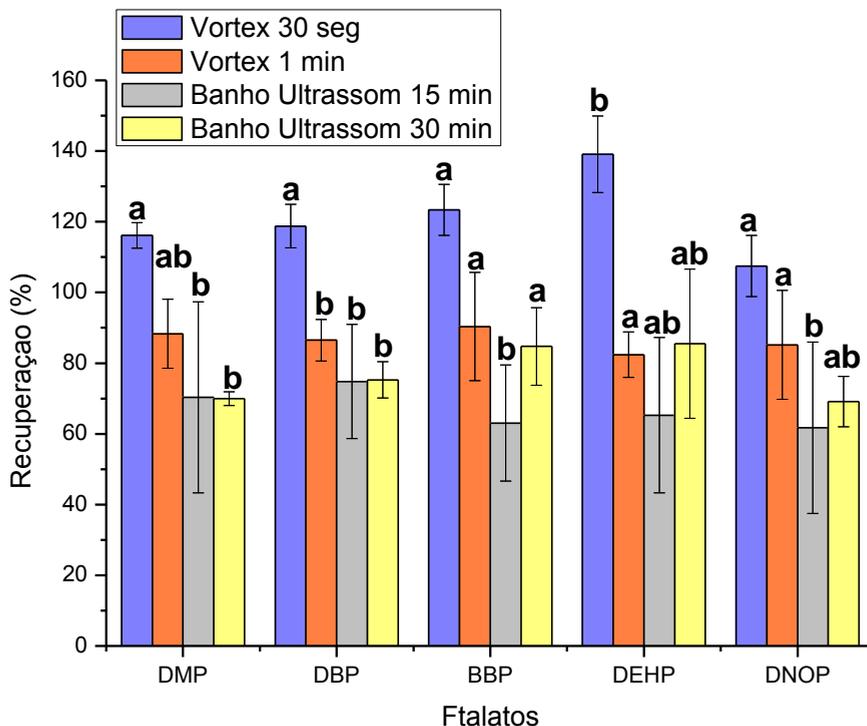


Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

4.2.4. Modo de agitação

A etapa de agitação do sistema é de extrema importância, pois promove uma maior interação entre a amostra e o solvente, podendo ter influência significativa sobre a eficiência de extração dos compostos (COSTA *et al.*, 2015). Foram testados os seguintes modos e tempos de agitação: vórtex por 30 seg e 1 min e banho ultrassom por 15 e 30 min. Após fortificação, hidratação e adição da fase extratora, o sistema foi agitado sob diferentes condições e em seguida, levado a freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 minutos. Os resultados estão apresentados na Figura 14.

Figura 14. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação em diferentes modos de agitação.



* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

Comparando-se os diferentes modos de agitação, o vórtex mostrou-se superior à agitação por banho ultrassom para todos os compostos (FIGURA 14). Os resultados mostraram que o tempo de homogeneização em vórtex por 30 seg propiciou melhor recuperação dos ftalatos DBP e DEHP, portanto escolheu-se esse tempo para prosseguir a otimização do método.

Esse resultado ocorreu devido ao fato de que a agitação em banho ultrassônico não promoveu um contato eficiente entre as fases resultando em baixas porcentagens de recuperação e maiores valores de DPR nas análises (GOULART *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores relataram resultados similares

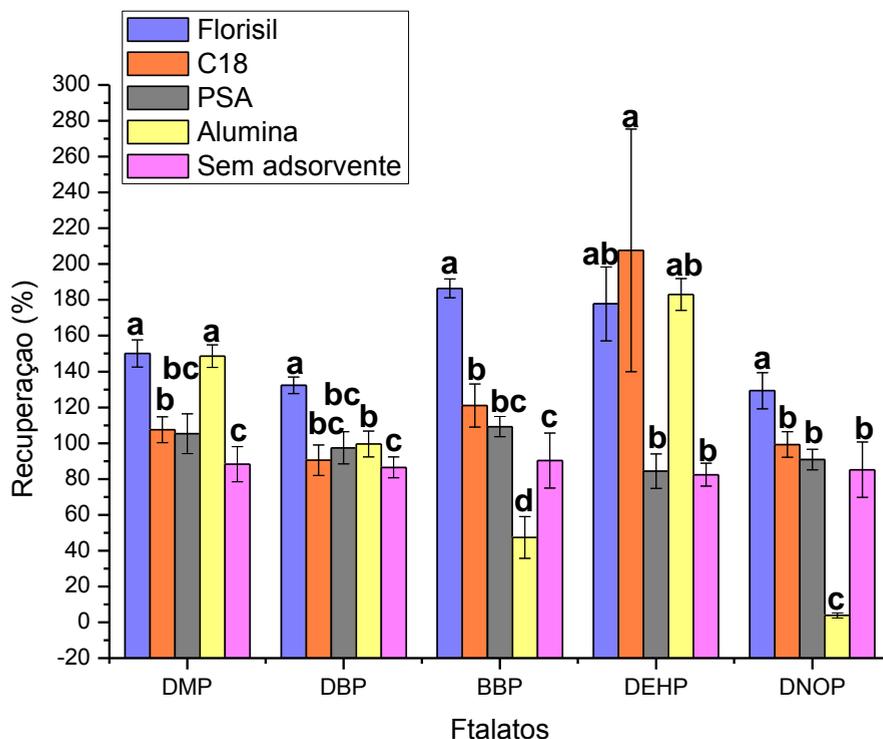
utilizando a agitação em vórtex (GOULART *et al.*, 2012; MAGALHÃES *et al.*, 2012; MAGALHAES *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014).

4.2.5. Clean up

Embora a maior parte dos componentes da matriz sejam removidos pelo congelamento, alguns ácidos orgânicos, pigmentos, lipídeos e outros ainda podem persistir no extrato, resultando em cromatogramas com picos de interferentes que podem atrapalhar a detecção e quantificação dos compostos de interesse. Portanto, em determinadas situações é necessária uma etapa de *clean up* adicional para limpeza dos extratos antes da injeção (LIU *et al.*, 2016). Neste trabalho, foram avaliados quatro adsorventes (florisil, C18, PSA e alumina) e se compararam as porcentagens de recuperação obtidas e a qualidade dos cromatogramas, pela presença ou não de interferentes.

Antes de se realizar o procedimento de extração, os adsorventes avaliados foram lavados com ACN para minimizar possíveis contaminações. Após a ESL-PBT, 2,5 mL do extrato obtido, foi misturado com 350 mg de Na_2SO_4 e 25 mg de adsorvente. O sistema foi homogeneizado e centrifugado. As porcentagens de recuperação obtidas estão apresentadas na Figura 15.

Figura 15. Gráfico representativo das porcentagens de recuperação utilizando diferentes adsorventes para *clean up*

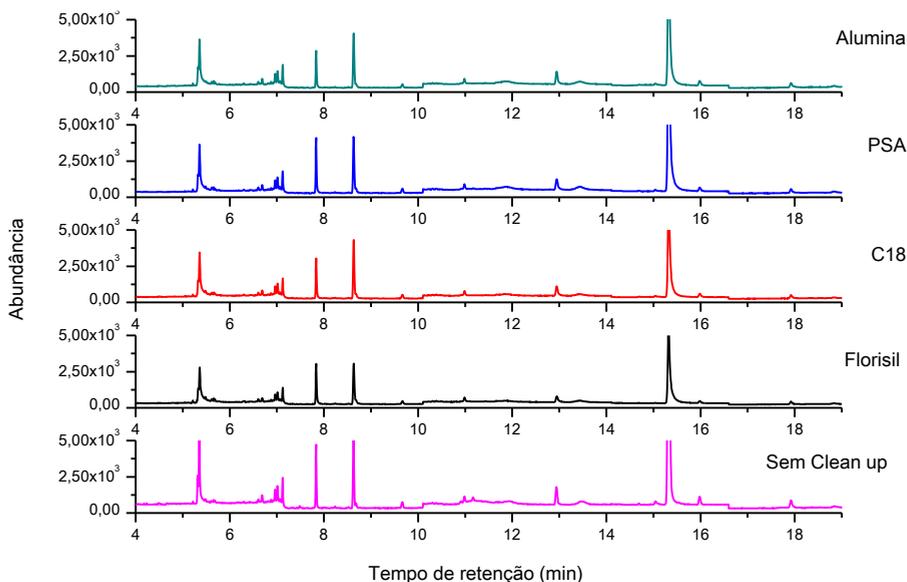


* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste *t* a nível de 5% de probabilidade.

A utilização de todos os adsorventes aumentou as porcentagens de recuperação de todos os compostos (FIGURA 15). Avaliando os cromatogramas obtidos após injeção dos extratos, não é observada melhora significativa na qualidade dos cromatogramas com ou sem utilização de adsorventes (FIGURA 13). As elevadas porcentagens de recuperação em conjunto com a não alteração da qualidade dos cromatogramas, indicam contaminação das amostras pelos adsorventes. Informação suportada por Lopez-Avila e Beckert, (1989), que em documento da EPA, avaliou a presença de ftalatos em materiais de laboratório e constatou a presença destes na maior

parte dos adsorventes utilizados para *clean up* (TABELA 6, PAG. 32). Diante desse fato, optou-se por não realizar *clean up* adicional no processo de extração otimizado.

Figura 16. Cromatogramas obtidos após injeção dos extratos utilizando diferentes adsorventes para *clean up* adicional dos extratos



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

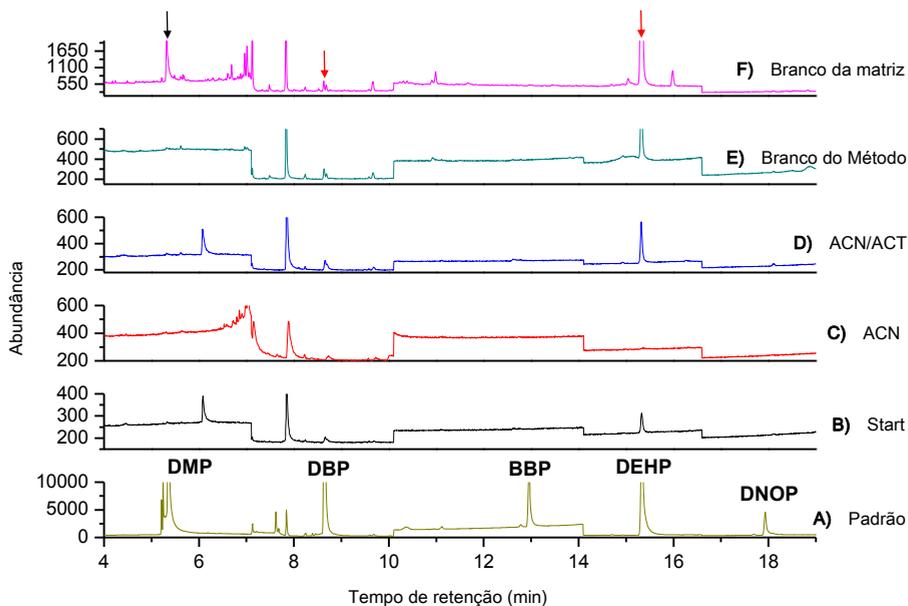
4.3. Validação

4.3.1. Seletividade

A seletividade é a capacidade do método de garantir que o pico de resposta do analito seja exclusivamente do composto de interesse, não havendo no mesmo tempo de retenção outros componentes da matriz (SANCO, 2013). Neste caso, para avaliar a seletividade do método, foi investigada a presença de coextrativos na matriz, comparando o cromatograma de extrato de lodo de esgoto sem fortificação (branco da matriz) com o padrão de ftalato sem ACN. Foi realizado também um estudo a respeito

das fontes de contaminação provenientes do método (branco do método) (FIGURA 17).

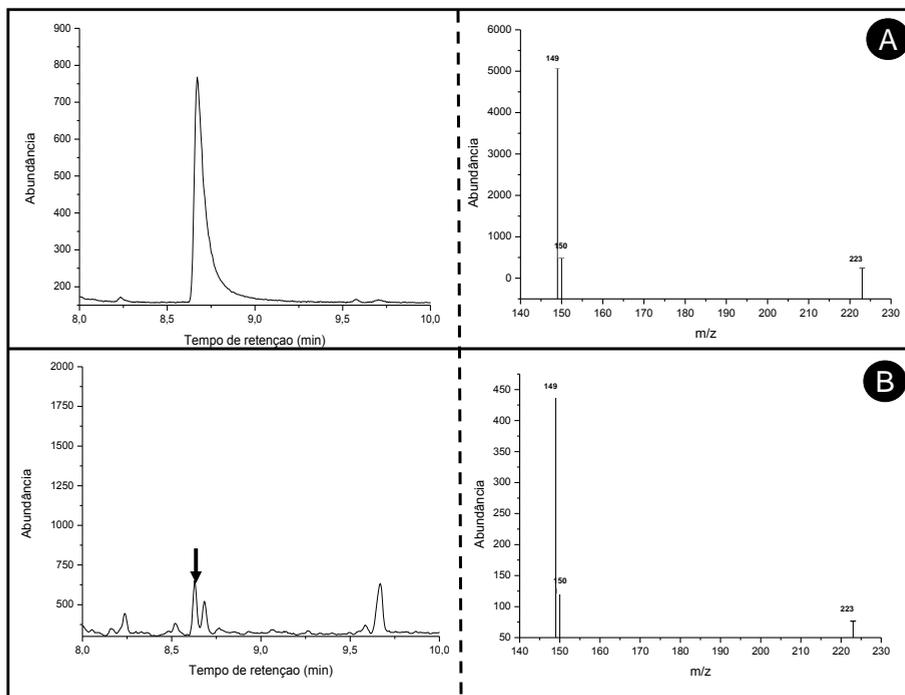
Figura 17. Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade da ESL-PBT de ftalatos em lodo de esgoto. A) Padrão de ftalatos em ACN; B) Start do CG; C) ACN pura; D) Mistura ACN/ACT; E) Branco do método; D) Branco da matriz



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

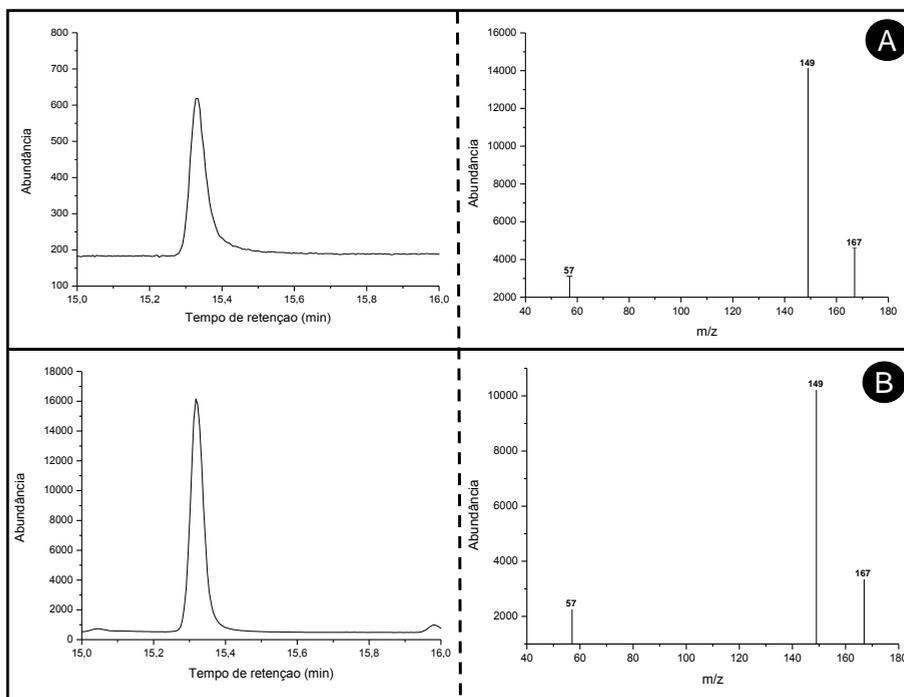
Apesar da complexidade da matriz, foi observado que não há componentes da matriz lodo de esgoto nos tempos de retenção dos compostos, entretanto, há a presença dos próprios ftalatos DBP e DEHP, indicados pelas setas vermelhas (FIGURA 17 F). O que é comprovado pelos perfis de fragmentação apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente para o DBP e o DEHP. Há um interferente próximo ao composto DMP no tempo de retenção 5,32 min que está presente no branco da matriz, ele não interfere na quantificação do DMP e está indicado pela seta preta na Figura 14 F.

Figura 18. DBP. A) Cromatograma e espectro de massas do padrão de ftalatos em ACN a $100 \mu\text{g L}^{-1}$; B) Cromatograma e espectro de massas do extrato de lodo de esgoto não fortificado (branco)



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Figura 19. DEHP. A) Cromatograma e espectro de massas do padrão de ftalatos em ACN a $100 \mu\text{g L}^{-1}$; B) Cromatograma e espectro de massas do extrato de lodo de esgoto não fortificado (branco)



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

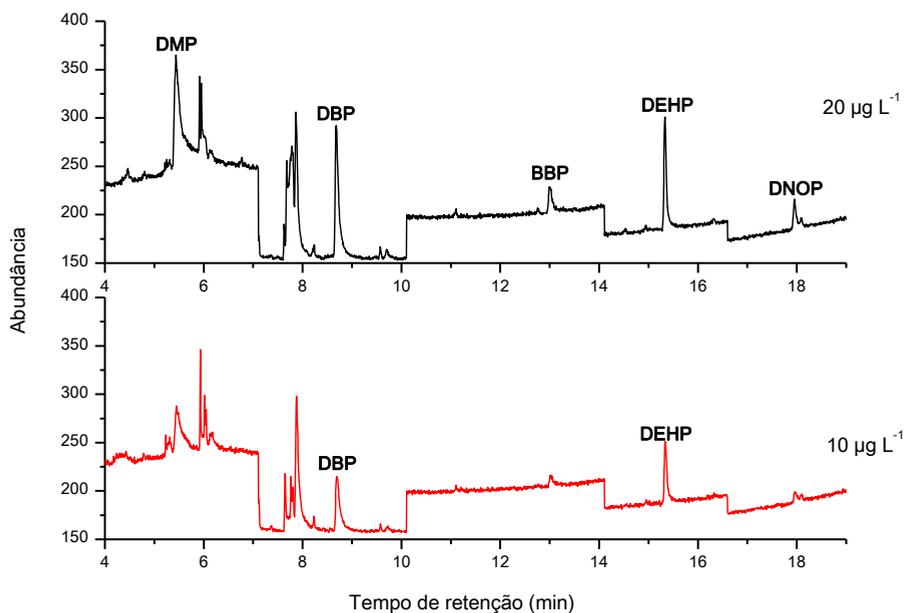
Apesar de todos os cuidados necessários para determinação de ftalatos, ainda há fontes de contaminação provenientes do processo de extração e análise como: o “Start do CG”, que é uma simulação da análise cromatográfica, mas sem injeção da amostra; os solventes utilizados no preparo de amostras, no caso, a ACN e o ACT e o branco do método, que é o extrato resultante do processo sem a presença da amostra. Em todos os casos, há a presença dos compostos DBP e DEHP nos cromatogramas, exceto a ACN que apresentou quantidades irrelevantes dos compostos. (FIGURA 17 B, C, D e E)

A avaliação dos extratos denominados branco do método, que é a ESL-PBT sem a utilização do lodo de esgoto, apresentou concentrações estimadas de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ e $120 \mu\text{g L}^{-1}$ dos contaminantes DBP e DEHP respectivamente.

4.3.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão (SANCO, 2013). O limite de quantificação instrumental foi estimado inicialmente pelo método visual, injetando soluções padrão de ftalatos em ACN nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (FIGURA 20).

Figura 20. Cromatogramas obtidos pela injeção de padrão de ftalatos em ACN nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

No cromatograma obtido na concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, todos os compostos foram quantificados com precisão. Já no cromatograma obtido na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, somente os ftalatos DBP e DEHP apresentaram picos bem definidos, sendo possível identificar e quantificar (FIGURA 20). Dessa forma, estabeleceu-se o LQ para o DMP, BBP e DNOP como 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para DBP e DEHP 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em ACN.

O limite de quantificação do método foi determinado fortificando amostras de lodo de esgoto na concentração de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, correspondendo a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato, em triplicata. Para os compostos DMP, BBP e DNOP, foram verificadas porcentagens de recuperação entre 70 e 120%, $\text{DPR} \leq 20\%$ e relação sinal ruído maior ou igual a 10, o que corrobora com os critérios sugeridos por SANCO (2013), como se observa na Tabela 10.

Tabela 10. Precisão e exatidão dos compostos nos limites de quantificação estudados

Ftalatos	% de recuperação	DPR	LQ (mg Kg⁻¹)	LMR (mg Kg⁻¹)
DMP	108,42	2,25	0,04	0,25
BBP	107,17	3,91	0,04	-
DNOP	97,98	10,18	0,04	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Entretanto, para o ftalatos DBP e DEHP não foi possível determinar o LQ, uma vez que não foi encontrada amostra de lodo de esgoto isenta desses compostos.

SANCO (2013) especifica ainda que os valores estabelecidos como LQ devem ser menores do que o LMR dos compostos, que de acordo com a resolução CONAMA, n.º 375 de 2009; são de 250, 700 e $1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os compostos DMP, DBP e DEHP, respectivamente. Para os demais ftalatos, não são estabelecidos valores limite (TABELA 3, PAG. 26).

4.3.3. Linearidade de resposta do método

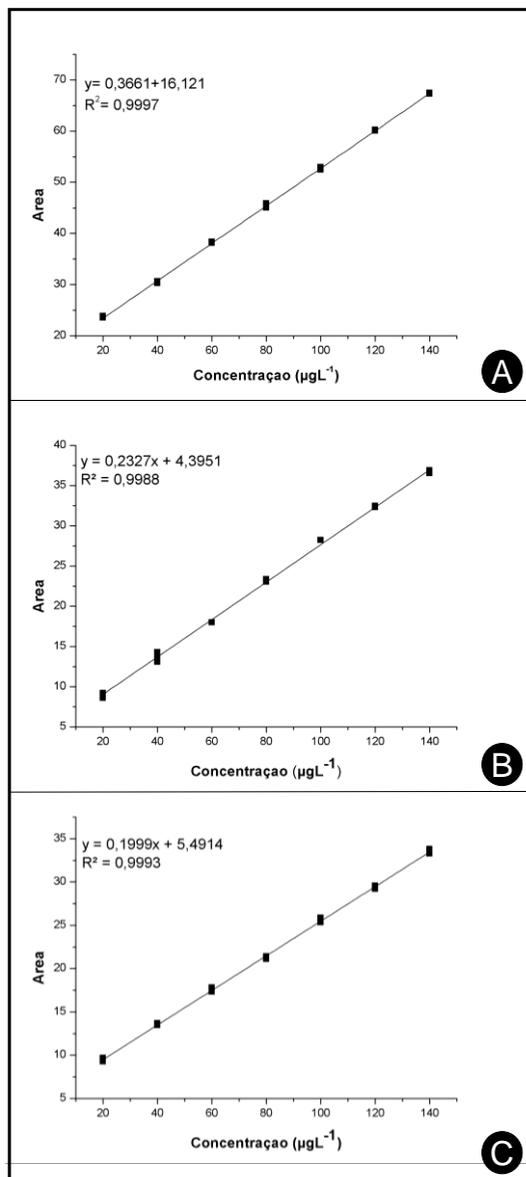
A linearidade é a capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Neste trabalho, a linearidade foi avaliada utilizando-se sete níveis de concentração, sendo equidistantes e avaliados em triplicata.

Para os compostos DMP, BBP e DNOP, a faixa de concentração variou entre 20 e 140 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os dados de calibração para os três ftalatos foram obtidos aplicando o modelo de regressão linear, e os coeficientes de determinação (R^2) para as curvas analíticas preparadas em extrato da matriz foram superiores a 0,99 (FIGURA 21).

Para avaliação da linearidade, foi utilizado o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram confirmados pelo teste de resíduos de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos correspondente ao limite de 22,2% dentre as 21 replicatas. Através do reconhecimento dos pontos que afetavam o ajuste do modelo, foi possível tratá-los (FIGURA 22).

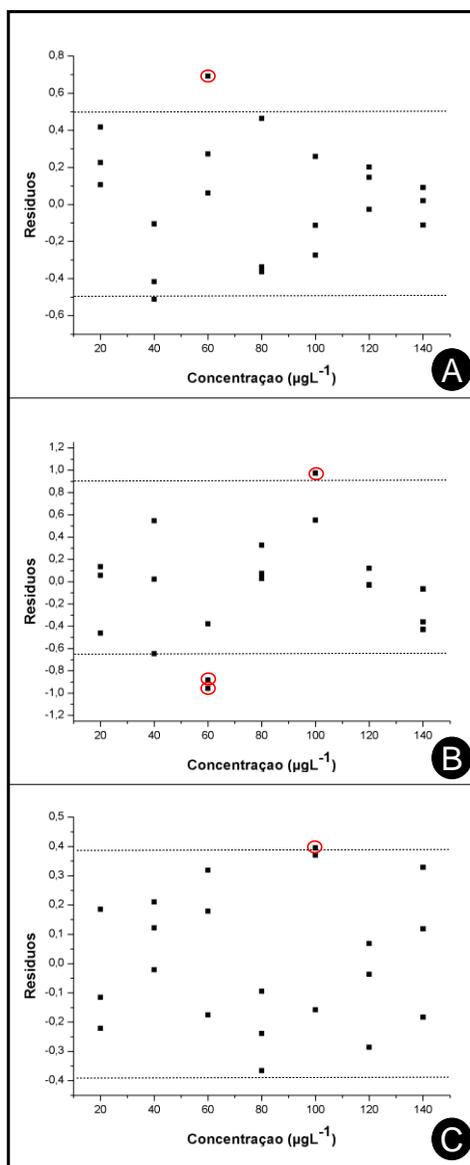
A distribuição normal dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner. Os coeficientes de correlação calculados (R) foram superiores aos coeficientes de correlação críticos ($R_{\text{crítico}}$), indicando que o desvio de normalidade não foi significativo para as curvas de três ftalatos (FIGURA 23).

Figura 21. Curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade de três ftalatos estudados em extrato de lodo de esgoto fortificado, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2). A) DMP; B) BBP; C) DNOP



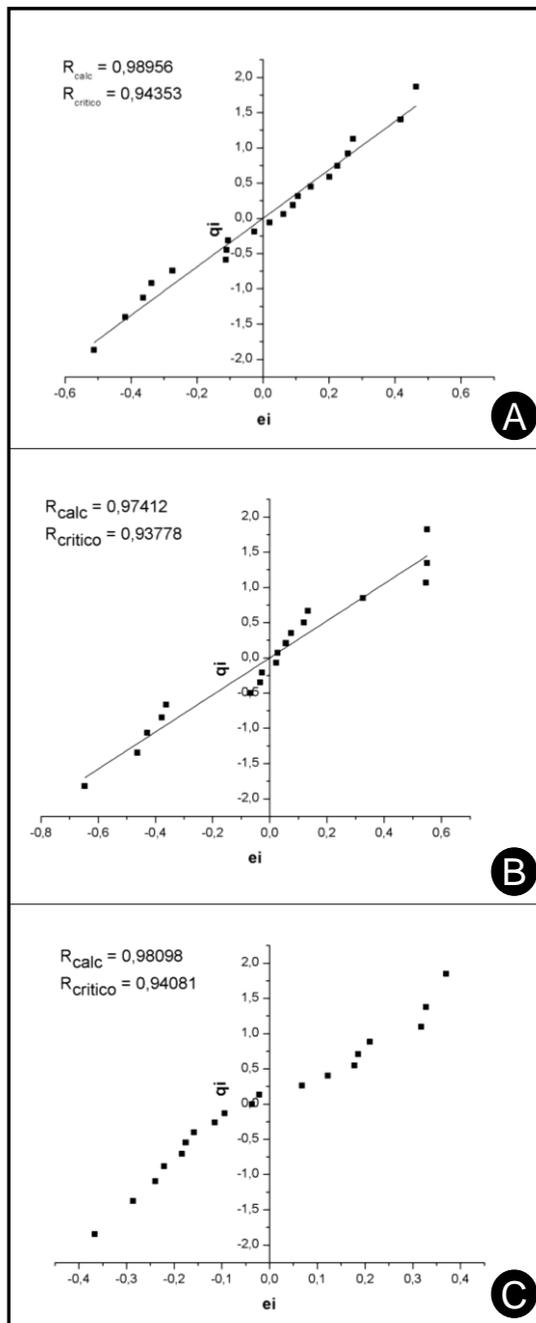
Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Figura 22. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado após exclusão dos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos de Jackknife. A) DMP; B) BBP; C) DNOP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Figura 23. Gráficos de probabilidade normal das curvas de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado. A) DMP; B) BBP; C) DNOP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pela estatística t de Levene, os valores em todas as curvas avaliadas apresentaram t_L inferior ao $t_{\text{crítico}}$. Inferindo que os resíduos da regressão apresentaram variabilidade constante ao longo dos níveis de concentração, demonstrando a distribuição homogênea dos resíduos (TABELA 11).

Tabela 11. Valores de T_L e $T_{\text{crítico}}$ das variâncias dos resíduos da regressão das curvas analíticas de três ftalatos pela estatística t de Levene.

Ftalatos	Estatística	
	t_L	$t_{\text{crítico}}$
DMP	0,819	0,99
BBP	0,390	0,99
DNOP	-0,214	0,99

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A independência dos resíduos foi demonstrada pelo teste de Durbin-Watson, apresentando os limite inferiores (d_L) e superiores (d_U) menores que a estatística d , ao nível de significância de $\alpha = 0,05$, manifestando a não autocorrelação entre os valores (TABELA 12).

Tabela 12. Valores dos limites inferiores da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de três ftalatos pelo teste de Durbin-Watson ($\alpha = 0,05$)

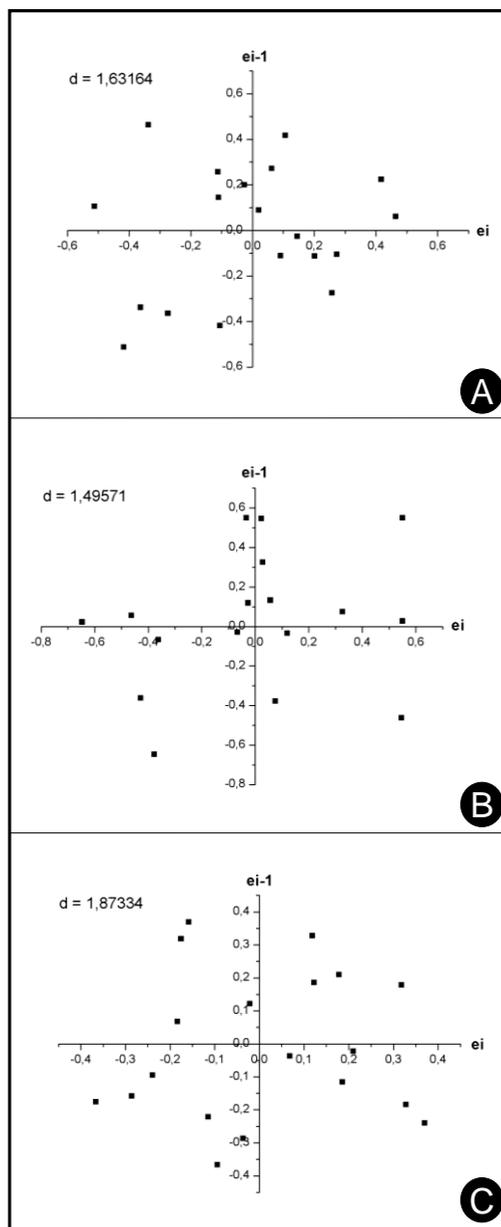
Ftalatos	Estatística		
	d	d_L	d_U
DMP	1,63163	1,20049	1,41037
BBP	1,49571	1,15667	1,39072
DNOP	1,87334	1,20049	1,41037

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A independência também pôde ser comprovada visualmente. A distribuição aleatória dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos

demonstra homogeneidade, sem tendências positivas ou negativas para três ftalatos (FIGURA 24).

Figura 24. Gráficos de independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para três ftalatos. A) DMP; B) BBP; C) DNOP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Pela confirmação das três premissas relativas ao MMQO (normalidade, homocedasticidade e independência), a linearidade foi confirmada para três ftalatos, na faixa de concentração estudada, sem ponderações.

4.3.3. Exatidão e precisão

A exatidão representa o grau de concordância entre o resultado analítico e o verdadeiro, ou a aceitação do valor de referência (SANCO, 2013). A exatidão foi avaliada através de ensaios de recuperação em três concentrações distantes para os ftalatos DMP, BBP e DNOP, conforme apresentado na Tabela 12. As médias de recuperação encontraram-se dentro dos valores de aceitabilidade de exatidão (70% a 120%) para todos os compostos (SANCO, 2013). A precisão foi avaliada sob condições de repetitividade na concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos DMP, BBP e DNOP. Os valores de DPR foram inferiores a 20%, demonstrando concordância entre os resultados (TABELA 13).

Tabela 13. Exatidão e precisão* do método para determinação de três ftalatos em extrato de lodo de esgoto fortificado

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação média (%) \pm DPR		
	DMP	BBP	DNOP
20*	100,98 \pm 1,01	98,46 \pm 8,53	92,21 \pm 10,84
40	110,36 \pm 14,86	88,57 \pm 6,00	75,82 \pm 9,38
200	100,25 \pm 2,78	96,31 \pm 8,11	79,72 \pm 8,96

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Para os compostos DBP e DEHP, a exatidão foi demonstrada pelo método de adição de padrão. Para o DBP, como as amostras de lodo de esgoto apresentaram um pequeno sinal desse ftalato, a curva analítica funcionou como o método de adição de padrão. O mesmo foi feito para o DEHP. A faixa de concentração para o DBP variou entre 40 e $160 \mu\text{g L}^{-1}$, pois o primeiro ponto

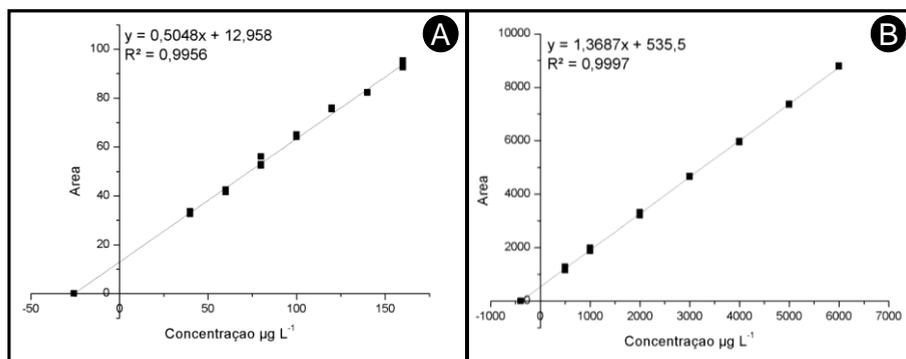
da curva foi definido como a concentração que obtivesse um sinal analítico três vezes maior do que o interferente, que neste trabalho é expresso pelo branco do método, que é a contaminação proveniente de vidrarias, reagentes, solventes e análise cromatográfica. Para o DEHP, a faixa linear variou entre 500 e 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$, seguindo o mesmo raciocínio utilizado para o DBP.

O sinal analítico obtido quando uma solução-padrão a 360 $\mu\text{g L}^{-1}$ em ACN é analisada no CG-EM é três vezes maior que o sinal analítico obtido na avaliação do branco do método para os ftalatos DBP e DEHP. Portanto, somente em concentrações superiores a 40 e 360 $\mu\text{g L}^{-1}$, pode-se quantificar estes ftalatos em extrato da matriz de lodo.

Os dados de calibração para ambos os ftalatos foram obtidos aplicando o modelo de regressão linear, e os coeficientes de determinação (R^2) para as curvas analíticas preparadas em extrato da matriz foram superiores a 0,99 (FIGURA 25).

As concentrações dos ftalatos DBP e DEHP nas amostras de lodo foram quantificadas por extrapolação da reta, que para o DBP foi de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para o DEHP foi de 391 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme demonstrado na Figura 25.

Figura 25. Gráficos de extrapolação da reta para determinação da concentração de DBP e DEHP em lodo de esgoto. A) DBP; B) DEHP

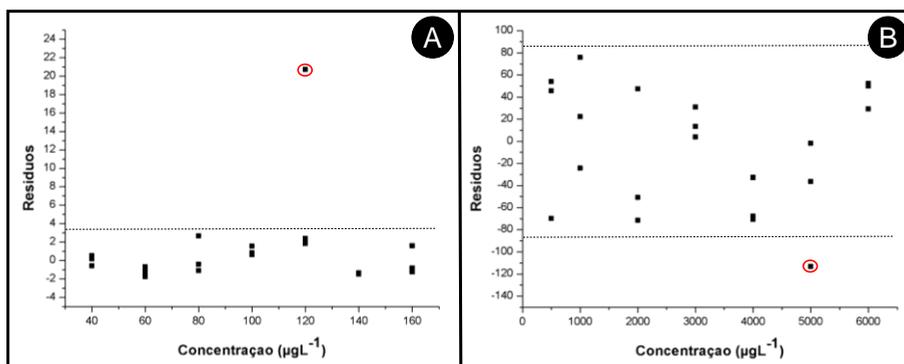


Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

Para avaliação da linearidade, foi utilizado o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram confirmados pelo

teste de resíduos de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos correspondente ao limite de 22,2% dentre as 21 replicatas. Através do reconhecimento dos pontos que afetavam o ajuste do modelo, foi possível tratá-los (FIGURA 26).

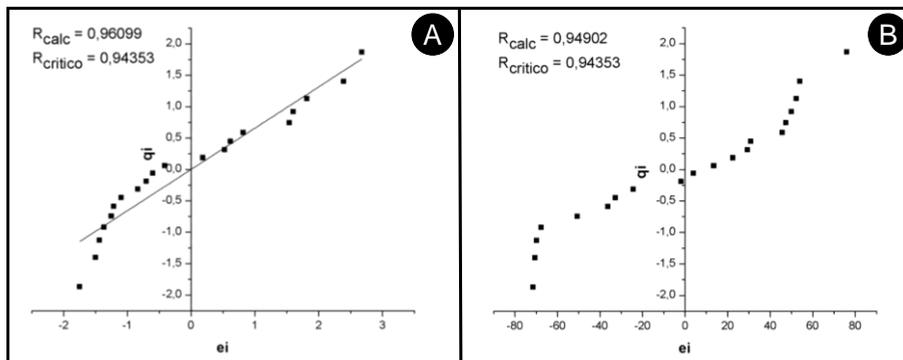
Figura 26. Gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas dos ftalatos DBP e DEHP em extrato de lodo de esgoto fortificado após exclusão dos valores dispersos diagnosticados pelo teste de resíduos de Jackknife. A) DBP; B) DEHP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A distribuição normal dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner. Os coeficientes de correlação calculados (R) foram superiores aos coeficientes de correlação críticos ($R_{\text{crítico}}$), indicando que o desvio de normalidade não foi significativo para as curvas de ambos os ftalatos (FIGURA 27).

Figura 27. Gráficos de probabilidade normal das curvas dos ftalatos DBP e DEHP em extrato de lodo de esgoto fortificado. A) DBP; B) DEHP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pela estatística t de Levene, os valores em todas as curvas avaliadas apresentaram t_L inferior ao t_{critico} . Inferindo que os resíduos da regressão apresentaram variabilidade constante ao longo dos níveis de concentração, demonstrando a distribuição homogênea dos resíduos (TABELA 14).

Tabela 14. Homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas analíticas de três ftalatos pela estatística t de Levene.

Ftalatos	Estatística	
	t_L	t_{critico}
DBP	-0,799	0,99
DEHP	-4,402	0,99

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A independência dos resíduos foi demonstrada pelo teste de Durbin-Watson, apresentando os limite inferiores (d_L) e superiores (d_U) menores que a estatística d , ao nível de significância de $\alpha = 0,05$, manifestando a não autocorrelação entre os valores (TABELA 15).

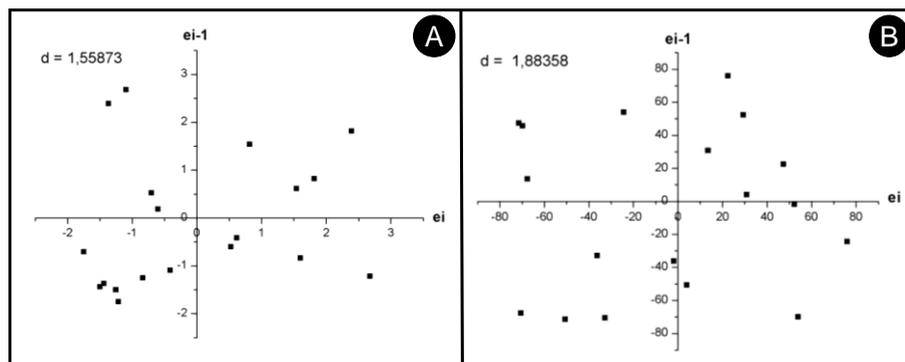
Tabela 15. Independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de três ftalatos pelo teste de Durbin-Watson

Ftalatos	Estatística		
	d	d_L	d_U
DBP	1,55873	1,20049	1,41037
DEHP	1,88358	1,17938	1,40070

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

A independência também foi comprovada visualmente, a distribuição aleatória dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos demonstra homogeneidade, sem tendências positivas ou negativas para dois ftalatos (FIGURA 28).

Figura 28. Gráficos de independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para os ftalatos DBP e DEHP. A) DBP; B) DEHP



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

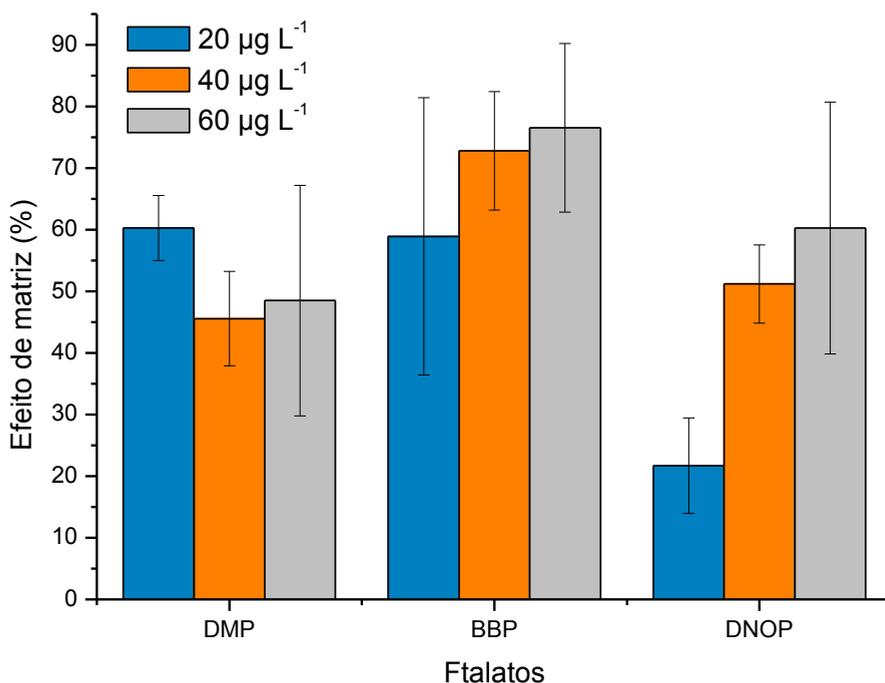
Pela confirmação das três premissas relativas ao MMQO, normalidade, homocedasticidade e independência, a linearidade também foi confirmada para os ftalatos DBP e DEHP, na faixa de concentração estudada, sem ponderações.

4.3.2. Efeito de matriz

O efeito de matriz é um estudo de seletividade que tem como objetivo verificar se há interferências causadas por diversas substâncias que compõem a matriz estudada, que podem gerar diminuição ou ampliação dos sinais dos compostos (SANCO, 2013).

O efeito dos coextrativos na resposta cromatográfica dos ftalatos foi avaliado através da comparação entre as áreas dos compostos preparados em ACN e em extrato da matriz para DMP, BBP e DNOP. A porcentagem de variação da resposta cromatográfica foi calculada pela equação $\% = (\bar{A}_{\text{matriz}} - \bar{A}_{\text{solvente}}) / \bar{A}_{\text{solvente}} \times 100$ e está demonstrada na Figura 29.

Figura 29. Porcentagem de variação da resposta cromatográfica dos ftalatos DMP, BBP e DNOP preparados em extrato de lodo de esgoto em relação às preparadas em solvente



Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

De acordo com Hajslová *et al.*, 2003, o efeito de matriz tende a aumentar com a diminuição da concentração. No entanto, neste trabalho, para os ftalatos BBP e DNOP observou-se um aumento do efeito de matriz com o aumento da concentração. Esta característica foi observada por Pinho *et al.*, 2010, na determinação de agrotóxicos em matrizes alimentares. Já para o ftalato DMP, foi observado maior efeito de matriz na menor e na maior concentração, essa variação pode estar relacionada à dificuldade de integração do composto, devido à presença de uma coeluição próxima ao tempo de retenção. Não foi possível determinar o efeito de matriz para os ftalatos DBP e DEHP pois estes já estão presentes na amostra de lodo utilizada.

4.4. Aplicação em amostras reais

Neste trabalho, foi utilizado o método da padronização externa para quantificação de ftalatos DMP, BBP e DNOP em amostras reais. Através da equação resultante da linearidade, item 4.3.3, foi possível calcular a concentração de cada composto na amostra a partir das áreas obtidas nos cromatogramas. Foram avaliadas amostras de lodo de esgoto coletadas em seis cidades: Claros dos Poções, Corinto, Montes Claros, Belo Horizonte, Juramento e Curvelo. Os cinco ftalatos analisados foram detectados nas amostras avaliadas. Entretanto, foi possível quantificar apenas o DMP, BBP e DNOP, pois a determinação das concentrações dos ftalatos DBP e DEHP, poderia ser realizada apenas pelo método da adição de padrão, o que tornou inviável a análise, uma vez que, esse método demanda elevado tempo e consumo de padrões e solventes (TABELA 16).

Tabela 16. Concentrações dos ftalatos analisados em lodo de esgoto de seis cidades e o LMR

Ftalatos	Concentração (mg.kg ⁻¹)						
	LMR	Belo Horizonte	Claros dos Poções	Corinto	Curvelo	Juramento	Montes Claros
DMP	0,5	0,169	0,143	0,098	nd	0,055	nd
DBP	0,7	*	*	*	*	*	*
BBP	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DEHP	1,2	*	*	*	*	*	*
DNOP	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

*Detectado, mas não quantificado.

A Resolução CONAMA n.º 375 de 2006 estabelece limites máximos de resíduos em lodo de esgoto para utilização agrícola apenas para os compostos DMP, DBP e DEHP (TABELA 3, PAG. 26), as concentrações encontradas de DMP nas amostras de lodo de esgoto de todas as cidades avaliadas encontraram-se abaixo do LMR estabelecido pela legislação, enquanto para os ftalatos BBP e DNOP foram encontradas quantidades abaixo do limite de quantificação do método.

5. CONCLUSÃO

Um método sensível foi otimizado para determinação simultânea de cinco ftalatos em amostras de lodo de esgoto. Foram obtidas recuperações satisfatórias (102 a 139%) ao final do experimento, e o método analítico desenvolvido foi validado com sucesso. O valor do LQ do método foi de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ para os ftalatos DMP, BBP e DNOP, valores sensíveis o suficiente para quantificar ftalatos em amostras de lodo de esgoto. Os parâmetros para validação do método, seletividade, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão foram verificados com sucesso, o que credenciou o método a ser aplicado em amostras reais. Os cinco ftalatos foram detectados nas seis cidades e foram encontradas concentrações do ftalato DMP nas amostras de lodo de esgoto de todas as cidades analisadas, entretanto esses valores foram inferiores ao LMR estabelecido pela legislação.

REFERÊNCIAS

Çifci, D. İ., Kinacı, C. and Arıkan, O. A. Occurrence of Phthalates in Sewage Sludge from Three Wastewater Treatment Plants in Istanbul, Turkey. **Clean Soil Air Water**, 41: 851–855, 2013.

ÁLVAREZ-CASAS, M. et al. Effect of experimental parameters in the pressurized solvent extraction of polyphenolic compounds from white grape marc. **Food chemistry**, v. 157, p. 524-532, 2014.

BAGÓ, B. et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate in sewage sludge and post-treated sludge: quantitative determination by HRGC-MS and mass spectral characterization. **Chemosphere**, v. 59, n. 8, p. 1191-1195, 2005.

BARBOSA, É. S. et al. Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 404-410, 2014.

BENABDALLAH EL-HADJ, T.; DOSTA, J.; MATA-ALVAREZ, J. Biodegradation of PAH and DEHP micro-pollutants in mesophilic and thermophilic anaerobic sewage sludge digestion. **Water Sci. Technol.**, v. 53, n. 8, p. 99-107, 2006.

BENJAMIN, S. et al. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 298, p. 58-72, 2015.

BERNARDI, G. et al. An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up. **Talanta**, v. 161, p. 40–47, 2016.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**, p. 25-35, 2006.

BRASIL, CONAMA. Resolução n. 375. 2006

BRASLAU, R.; SCHÄFFNER, F.; EARLA, A. Polymeric phthalates: Potential nonmigratory macromolecular plasticizers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1175-1184, 2013.

BROWN, D. et al. The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. **Chemosphere**, v. 32, n. 11, p. 2177-2187, 1996.

CAVALCANTE, R. M. et al. Técnicas de extrações e procedimentos de clean-up para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em sedimentos da costa do Ceará. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1371-1377, 2008.

CHEN, C. Y. et al. Rapid identification of phthalates in blood bags and food packaging using ToF-SIMS. **Applied Surface Science**, v. 231–232, p. 447-451, 2004.

CHIU, T. Y. et al. The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in sewage sludges and the derivation of partition coefficients in wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 24, p. 4923-4926, 2009.

CIEŚLIK, B. M.; NAMIEŚNIK, J.; KONIECZKA, P. Review of sewage sludge management: standards, regulations and analytical methods. **Journal of Cleaner Production**, v. 90, p. 1-15, 2015.

CITULSKI, J. A.; FARAHBAKHS, K. Fate of Endocrine-Active Compounds during Municipal Biosolids Treatment: A Review. **Environmental Science Technology**, v. 44, n. 22, p. 8367-8376, 2010.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 226-247, 2011.

COSTA, A. I. et al. Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chem**, v. 181, p. 64-71, 2015.

COSTA, A. I. G. et al. Mobility and persistence of the herbicide fomesafen in soils cultivated with bean plants using SLE/LTP and HPLC/DAD. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 22, n. 5, p. 3457-66, 2015.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**. v. 880, p. 103–121, 2015.

ELIZALDE, V. M. et al. Exposición prenatal a ftalatos. Anemia materna, duración de la gestación y somatometría del recién nacido. **Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia**, v. 39, n. 4, p. 153-158, 2012.

ELSGAARD, L. Toxicity of xenobiotics during sulfate, iron, and nitrate reduction in primary sewage sludge suspensions. **Chemosphere**, v. 79, n. 10, p. 1003-1009, 2010.

FERNANDEZ, M. P. et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 393, n. 3, p. 957-968, 2009.

FRANÇA, J. A. et al. Simultaneous determination of prescription drugs, cocaine, aldicarb and metabolites in larvae from decomposed corpses by LC–

MS–MS after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Forensic Toxicology**, v. 33, n. 1, p93-103, 2016.

GAVALA, H. N. et al. Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. **Chemosphere**, v. 52, n. 4, p. 673-682, 2003.

GIBSON, R. et al. Analysis of 4-nonylphenols, phthalates, and polychlorinated biphenyls in soils and biosolids. **Chemosphere**, v. 61, n. 9, p. 1336-1344, 2005.

GOULART, S. M. et al. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 6, p. 1154-1165, 2012.

GU, J.-G. et al. Degradation of the endocrine-disrupting dimethyl phthalate carboxylic ester by *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 isolated from the South China Sea and the biochemical pathway. **Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 450-455, 2009.

HAJŠLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 181-197, 2003.

HINCK, J. E. et al. Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. **Science of The Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 376-402, 2007.

HUANG, Z.; SHI, X.-H.; JIANG, W.-J. Theoretical models for supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1250, p. 2-26, 2012.

HUANG, J.-X.; LU, D.-H.; WANG, F.-H. Low temperature purification method for the determination of abamectin and ivermectin in edible oils by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**. v. 25, n. 4, p. 635–639, 2014.

JIANLONG, W. et al. Microbial degradation of phthalic acid esters under anaerobic digestion of sludge. **Chemosphere**, v. 41, n. 8, p. 1245-1248, 2000.

KAMBIZ KHOSRAVI, GORDON W. PRICE. Determination of phthalates in soils and biosolids using accelerated solvent extraction coupled with SPE cleanup and GC–MS quantification, **Microchemical Journal**, Volume 121, P. 205-212, 2015.

KANECO, S. et al. Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of dibutyl phthalate in aqueous solution—kinetics, mineralization and reaction mechanism. **Chemical Engineering Journal**, v. 125, n. 1, p. 59-66, 2006.

KELESSIDIS, A.; STASINAKIS, A. S. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. **Waste Management**, v. 32, n. 6, p. 1186-1195, 2012.

KRAUSKOPF, L. G. How about alternatives to phthalate plasticizers? **Journal of Vinyl and Additive Technology**, v. 9, n. 4, p. 159-171, 2003.

KRUGER, O.; GRABNER, A.; ADAM, C. Complete Survey of German Sewage Sludge Ash. **Environmental Science Technology**, v. 48, n. 20, p. 11811-11818, 2014.

KRYSELL, M. et al. Certified reference materials for organic contaminants in sewage sludge: a feasibility study. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 13, n. 10, p. 553, 2008.

KWON, E. E.; YI, H.; KWON, H. H. Urban energy mining from sewage sludge. **Chemosphere**, v. 90, n. 4, p. 1508-1513, 2013.

LANGDON, K. A. et al. Selected personal care products and endocrine disruptors in biosolids: An Australia-wide survey. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 6, p. 1075-1081, 2011.

LEMAINSKI, J. et al. Utilização do biossólido da CAESB na produção de milho no Distrito Federal. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 30, n. 4, p. 741-750, 2006.

LIU, G. et al. Scenarios for sewage sludge reduction and reuse in clinker production towards regional eco-industrial development: a comparative energy-based assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 103, p. 371-383, 2015.

LIU, Y. et al. Low-temperature precipitation for the determination of residual organotin compounds in plant oil using dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 3685 -3691, 2015.

LIU, Y. et al. Fast and effective low-temperature freezing extraction technique to determine organotin compounds in edible vegetable oil. **J. Sep. Sci.**, v. 39, n. 12, p. 2380-7, 2016.

LOPEZ-AVILA, V.; BECKERT, W. Single Laboratory Evaluation of Method 8060-Phthalate Esters. **Research and Development**, 1989.

LOUREIRO, I. R. **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. Tese de Doutorado em Química. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. 2002.

MAGALHAES, E. J. et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean

up procedure and gas chromatography-mass spectrometry analysis. **J Chromatogr A**, v. 1309, p. 15-21, 2013.

MAGALHÃES, E. J. et al. Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-MS/MS. **Scientific Research**. v. 3, p. 118-124, 2012.

MCCULLY, K. A.; MCKINLEY, W. P. Determination of chlorinated pesticide residues in fat by electron capture gas chromatography. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 47, n. 4, p. 652, 1964.

MORAIS, E. H. D. C. et al. Determination of thiamethoxam, triadimenol and deltamethrin in pineapple using SLE-LTP extraction and gas chromatography. **Food Control**. v. 42, p. 9–17, 2014.

MOHAMMED F. ZAATER, YAHYA R. TAHBOUB, AYMAN N. AL SAYYED; Determination of Phthalates in Jordanian Bottled Water using GC-MS and HPLC-UV: Environmental Study. **J Chromatogr Sci**; vol: 52 (5): p. 447-452, 2013.

OLOFSSON, U.; BIGNERT, A.; HAGLUND, P. Time-trends of metals and organic contaminants in sewage sludge. **Water Research**, v. 46, n. 15, p. 4841-4851, 2012.

PEDROZA, M. M. et al. **Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão**. Revista Liberato. 11: 89-XX p. 2010.

PEREIRA, M. C.; MAGALHÃES, W. F. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica-Resíduos e Contaminantes em Alimentos**: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.– Brasília: MAPA/ACS 2011.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.

PETROVIC, M. et al. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 974, n. 1–2, p. 23-51, 2002.

PINHO, G. P. et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307-1311, 2010b.

PINHO, G. P. et al. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, 2010c.

PINHO, G. P. et al. Determination of chlorobenzenes in sewage sludge by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1292-1301, 2014.

PIROGOV, A. V.; TOLMACHEVA, N. G.; SHPIGUN, O. A. Extraction and subsequent determination of dialkyl phthalates in the soil using gas chromatography combined with tandem mass spectrometry. **Moscow University Chemistry Bulletin**, v. 69, n. 4, p. 158-162, 2014.

PRESTES, Osmar D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009

RIBANI, M. et al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quím. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROGERS, H. R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **Science of the Total Environment**, v. 185, n. 1, p. 3-26, 1996.

RUMEL, D. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. 2000.

SABLAYROLLES, C. et al. Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables. **Journal of chromatography A**, v. 1072, n. 2, p. 233-242, 2005.

SAILLENFAIT, A.-M.; SABATÉ, J.-P.; GALLISSOT, F. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat. **Reproductive Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 107-115, 2008.

SANCO, E. C. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. **SANCO/12571**, 2013.

SHELTON, D. R.; BOYD, S. A.; TIEDJE, J. M. Anaerobic biodegradation of phthalic acid esters in sludge. **Environmental science & technology**, v. 18, n. 2, p. 93-97, 1984.

SOUSA, D. A. et al. Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. **Microchemical Journal**. v. 114, p. 266-272, 2014.

STAHLHUT, R. W. et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult US males. **Environmental health perspectives**, p. 876-882, 2007.

STASINAKIS, A. S. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 432-440, 2012.

SWAN, S. H. et al. Decrease in Anogenital Distance among Male Infants with Prenatal Phthalate Exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1056-1061, 2005.

SÁNCHEZ-AVILA, J.; TAULER, R.; LACORTE, S. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. **Environment International**, v. 46, p. 50-62, 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

TRASANDE, L. et al. Urinary Phthalates and Increased Insulin Resistance in Adolescents. **Pediatrics**, v. 132, n. 3, p. e646, 2013.

VIAN, M. A. et al. A remarkable influence of microwave extraction: Enhancement of antioxidant activity of extracted onion varieties. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1472-1480, 2011.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. D. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Quím. Nova**, v. 30, n. 3, p. 535-540, 2007.

VIEIRA, M. G. A. et al. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

WAMS, T. J. Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant—a review. **Science of the total environment**, v. 66, p. 1-16, 1987.

WISE, S. A. et al. Standard reference materials (SRMs) for determination of organic contaminants in environmental samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 386, n. 4, p. 1153-1190, 2006.

WU, J. et al. Cloning of a dibutyl phthalate hydrolase gene from *Acinetobacter* sp. strain M673 and functional analysis of its expression product in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2483-2491, 2013.

YIN, P. et al. Mass Spectral Fragmentation Pathways of Phthalate Esters by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**. v. 47, n. 9, p. 1579-1588, 2014.

ZAKHARKIV, I. B.; ZUI, M. F.; ZAITSEV, V. N. Dispersive liquid-phase microextraction for determination of phthalates in water | SpringerLink. **Journal of Water Chemistry and Technology**, v. vol:37, p. pág:78 -84, 2015.

ZHAN, J. et al. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 138, n. 2-3, p. 827-34, 2013.