

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
CAMPUS DE ARARAQUARA



**STEPHANE FRANCO**

**“Alquilfenóis em água superficial: estudo analítico e  
determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)”**

**ARARAQUARA – SP  
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
CAMPUS DE ARARAQUARA



**STEPHANE FRANCO**

**“Alquilfenóis em água superficial: estudo analítico e  
determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)”**

Tese apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista  
Julio de Mesquita Filho - UNESP, como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Química.

**ORIENTADORA:  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI**

**ARARAQUARA – SP  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

F825a Franco, Stephane  
Alquilfenóis em água superficial : estudo analítico e  
determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP) /  
Stephane Franco. – Araraquara : [s.n], 2013  
146 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

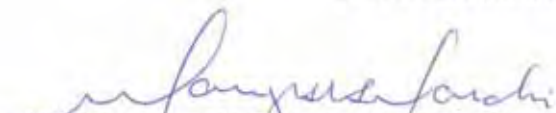
1. Química analítica. 2. Alquilfenóis. 3. Interferentes  
endócrinos. 4. Material particulado. I. Título.

## STEPHANE FRANCO

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Araraquara, 25 de março de 2013.

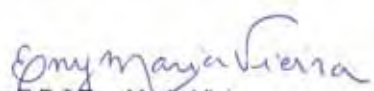
## BANCA EXAMINADORA




Prof.ª Dr.ª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



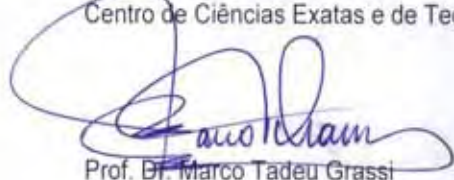
Prof.ª Dr.ª Maria Lucia Ribeiro  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof.ª Dr.ª Eny Maria Vieira  
Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos



Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – CCET/UFSCAR, São Carlos



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi  
Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Stephane Franco

e-mail: stephane\_franco@yahoo.com.br

### FORMACAO ACADEMICA/TITULAÇÃO

#### 2009 – 2013 Doutorado em Química.

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.  
Bolsista da: CAPES, Brasil.

#### 2006 - 2009 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.  
Titulo: Otimização, validação e aplicação de método para análise de diuron e seus metabólitos em urina de ratos utilizando SPE e HPLC-DAD; 2009. Orientadora: Dr<sup>a</sup> Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Bolsista CNPQ, Brasil.

#### 2003 - 2006 Graduação em Química (Bacharelado).

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo Brasil. Dr<sup>a</sup> Mary Rosa Rodrigues de Marchi, Bolsista FAPESP, Brasil

### SEMINÁRIOS MINISTRADOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. 16 Encontro Nacional de Química Analítica. Avaliação do efeito matriz na análise (GC-MS) de alquilfenóis em água. 2011. (Congresso).
2. 12<sup>a</sup> Semana de Química da Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA).Contaminantes emergentes: um risco escondido no ambiente. 2011. (Seminário).
3. 12<sup>a</sup> Semana de Química da Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA).Validação de métodos analíticos. 2011. (Seminário).
4. XII International Congress of Toxicology. Optimization, validation and application of methods for analysis of diuron and their metabolites in urine of rats using SPE and HPLC-UV. 2010. (Congresso).
5. I Workshop em gestão de resíduos na UNESP. Alternativas ao uso de cádmio na determinação de nitrato em solo tratado com aditivos orgânicos. 2010. (Congresso).
6. 1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health. OPTIMIZATION, VALIDATION AND APPLICATION OF METHOD FOR ANALYSIS OF DIURON AND METABOLITES IN URINE OF RATS USING SPE AND HPLC-DAD. 2009. (Congresso).

7. 15 Encontro Nacional de Química Analítica. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE DIURON E SEUS METABÓLITOS POR SPE E HPLC-UV EM URINA DE RATOS. 2009. (Congresso).
8. IV Encontro Nacional de Química Ambiental. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE DIURON E SEUS METABÓLITOS DE DEGRADAÇÃO POR HPLC-DAD. 2008. (Congresso).

## **EXPERIÊNCIA INTERNACIONAL**

Realizou estágio no Departamento de Química Ambiental do (IDAEA) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), em Barcelona, Espanha, trabalhando com compostos orgânicos e técnicas cromatográficas.

*Aos meus pais Maria Lourdes e Celso e meu irmão  
Fernando, com todo amor, dedico.*

## **Agradecimentos**

A conclusão deste trabalho só foi possível a partir da colaboração e apoio expressos sobre diferentes formas. Assim, agradeço:

À Deus pela vida, e todas as dádivas concebidas, dentre elas: a coragem e força para enfrentar todos os obstáculos, as oportunidades de crescimento, de ter uma família estruturada e maravilhosa e de ter grandes amigos.

A minha família, base da minha vida, que me fortalece e que me dá razão para lutar! Amo muito vocês...

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, meu profundo agradecimento pela orientação, amizade, confiança, respeito e todo o aprendizado e crescimento que me foi proporcionado durante esse doutorado e em todos estes 8 anos de permanência no GRESCO. Registro aqui minha sincera admiração e apreço por essa pessoa e profissional muito especial.

Ao Programa de Pós-graduação em Química, bem como, a todos do Instituto de Química da UNESP–Araraquara (professores, equipe administrativa, bibliotecárias) pelo apoio e organização – parabéns pela excelência e qualidade.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

A banca examinadora deste trabalho pela disponibilização e contribuições.

A todos os amigos do GRESCO e, meu muito obrigada para duas pessoas extremamente especiais em minha vida que levarei eternamente comigo: Débora Santos Silva Bezerra e Nathalie Zamariola. Obrigada por toda a colaboração e profissionalismo característicos (todos os questionamentos,



discussões e prévias suportadas), pelos momentos de diversão, danças na cozinha, brigadeiros sem fim....vocês sempre estiveram presentes e sempre pude contar com vocês, em tudo!!! Minhas eternas amigas!!

Aos meus amigos Vinícius Marques Gomes e Pedro Toledo Netto, pelas discussões analíticas, carinho, apoio, cervejas e conversas mais do que divertidas!!

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## Resumo

Os alquilfenóis polietoxilados são surfactantes não iônicos usados em uma grande variedade de produtos para uso doméstico e industrial, sendo que seus produtos de degradação (nonilfenol e octilfenol) são apontados como potenciais alteradores endócrinos. Considerando-se que no Brasil os dados de ocorrência e dispersão destas substâncias no ambiente são incipientes, este trabalho teve como objetivo estabelecer e validar um método para análise de alquilfenóis em água e material particulado em suspensão (MP), e avaliar a ocorrência destas substâncias no Ribeirão das Cruzes, Araraquara (SP), UGRHI-13. Nos métodos para análise de alquilfenóis em amostras de água superficial e MP, utilizou-se extração em fase sólida (SPE) para água e extração sólido-líquido com ultrassom para MP, seguida da determinação por HPLC-FLD. O estudo de efeito de matriz indicou a necessidade da utilização de curvas analíticas construídas na matriz para a quantificação fidedigna dos analitos, tanto para água quanto MP. Os limites de quantificação dos métodos validados foram  $20 \text{ ng L}^{-1}$  para nonilfenol e octilfenol em água superficial e  $0,63 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$  para ambas as substâncias em MP, com recuperação  $> 89\%$  e  $\text{CV} < 22\%$ , para ambos alquilfenóis nas duas matrizes. Foram coletadas amostras em 14 pontos ao longo do Ribeirão das Cruzes, incluindo as zonas urbana e rural do município de Araraquara (SP). Em todas as amostras de água e MP foi possível a detecção de ambos alquilfenóis, no entanto as concentrações estiveram acima dos limites de quantificação de nonilfenol em apenas uma amostra de MP ( $1,34 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) e uma de água ( $35,4 \text{ ng L}^{-1}$ ), enquanto que o octilfenol pode ser quantificado em duas amostras de MP ( $0,78$  e  $1,23 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) e duas de água ( $318$  e  $1.470 \text{ ng L}^{-1}$ ). As concentrações de octilfenol foram mais elevadas do que as de nonilfenol, coincidindo com dados reportados para a Região Metropolitana de Campinas, para ambos alquilfenóis, as concentrações mais elevadas foram encontradas em pontos sob a influência de esgoto sanitário e estão de acordo com valores reportados para regiões urbanizadas de outros países. Estes dados iniciais indicam a necessidade de estudos mais abrangentes sobre a ocorrência destes compostos em mananciais hídricos do estado de São Paulo.

## Abstract

The alkylphenol polyethoxylated are nonionic surfactants used in a wide variety of products for industrial and domestic, and its degradation products (nonylphenol and octylphenol) are mentioned as potential endocrine disrupters. Considering that in Brazil the occurrence data and dispersion of these substances in the environment are incipient, this study aimed to establish and validate a method for analysis of alkylphenols in water and suspended particulate matter (PM), and to evaluate the occurrence of these substances in Ribeirão das Cruzes, Araraquara (SP), UGRHI-13. In methods for analyzing alkylphenols in surface water and MP samples was used solid phase extraction (SPE) and solid-liquid extraction with ultrasound for MP, followed by determination by HPLC-FLD. The study of the effect of matrix indicated the necessity of using calibration curves constructed in the array for the quantification of analytes reliable both for water as MP. The limits of quantification of validated methods were  $20 \text{ ng L}^{-1}$  for nonylphenol and octylphenol in surface water and  $0.63 \text{ mg g}^{-1}$  for both substances in MP with recovery  $>89\%$  and CV  $<22\%$  for both alkylphenols in two matrices. Samples were collected at 14 points along the Ribeirão das Cruzes, including urban and rural areas of the city of Araraquara (SP). In all samples of water and MP was detected both alkylphenols, however concentrations were above the limit of quantification of nonylphenol in only one sample of MP ( $1.34 \text{ mg g}^{-1}$ ) and water ( $35.4 \text{ ng L}^{-1}$ ), while octylphenol can be quantified in two samples of MP ( $0.78$  and  $1.23 \text{ mg g}^{-1}$ ) and two samples of water ( $318$  and  $1470 \text{ ng L}^{-1}$ ). Octylphenol concentrations were higher than those of nonylphenol, coinciding with data reported for the Metropolitan Region of Campinas, for both alkylphenols, the highest concentrations were found at points under the influence of sewage and are consistent with values reported for urbanized regions of other countries. These initial data indicate the need for more comprehensive studies on the occurrence of these compounds in water bodies of the state of São Paulo.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Principais classes de microcontaminantes (ou micropoluentes) orgânicos (PFOS: perfluorooctanos sulfonados, $\alpha$ -HCH: hexaclorociclohexano, DDT: dicloro-difenil-tricloroetano, TBT: tributil estanho, PBDEs: éteres de difenilas polibromadas).....	23
<b>Capítulo I</b>	
<b>Figura I. 1:</b> Proposta de dispersão dos alquilfenóis no ambiente. ....	34
<b>Figura I. 2:</b> Sistema endócrino humano (fonte: Google images).....	37
<b>Figura I.3:</b> Esquema das disfunções endócrinas: (a) resposta natural, (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista (Birkett, 2003).....	38
<b>Figura I. 4:</b> Proposta de rota de degradação dos alquilfenóis etoxilados (Ying, 2002).....	45
<b>Figura I. 5:</b> Esquema da diferença entre as injeções de solução padrão em solvente e com a amostra (adaptada de Hajšlová, 2007).....	57
<b>Capítulo II</b>	
<b>Figura II. 1:</b> Condição otimizada para extração em fase sólida (SPE) para água superficial, seguida da análise por HPLC-FLD.....	69
<b>Figura II. 2:</b> Condição otimizada para extração sólido-líquido para material particulado em ambos os sistemas (HPLC-FLD e GC-MS).....	70
<b>Figura II. 3:</b> Gráficos de linearidade para as substâncias no sistema GC-MS (linha contínua: mediana; linhas pontilhadas: limites superior e inferior).....	74
<b>Figura II. 4:</b> Curvas analíticas para as substâncias no sistema GC-MS.....	75
<b>Figura II. 5:</b> Cromatogramas de soluções padrão: 1. Full Scan NP1EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 2. Íon extraído NP1EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $m/z = 179$ ), 3. Full Scan NP2EO ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 4. Íon extraído NP2EO ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $m/z = 223+237$ ).....	76
<b>Figura II. 6:</b> Cromatograma de uma solução padrão de NP1EO. (1) Cromatograma do íon extraído ( $179 m/z$ ) em sistema GC-MS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (2) Cromatograma full scan em sistema GC-MS/MS com transição: $249,0 \rightarrow 205,2 m/z$ ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).....	77
<b>Figura II. 7:</b> Gráficos de linearidade para o sistema GC-MS/MS .....	78
<b>Figura II. 8:</b> Curvas analíticas com o sistema GC-MS/MS.....	79
<b>Figura II. 9:</b> Gráficos de linearidade para sistema HPLC-FLD.....	80
<b>Figura II. 10:</b> Curvas analíticas sistema HPLC-FLD .....	80

<b>Figura II. 11:</b> Cromatogramas: Testemunha (azul); Ponto na matriz $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (preto); Ponto em solvente $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (vermelho). .....	84
<b>Figura II. 12:</b> Curva na matriz para amostra de água superficial no sistema HPLC-FLD (símbolo vazado : curva no extrato, símbolo cheio: curva em solvente).....	91
<b>Figura II. 13:</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz água superficial. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%. .....	92
<b>Figura II.14:</b> Curva na matriz para amostra de material particulado em suspensão com sistema HPLC-FLD (símbolo vazado : curva no extrato, símbolo cheio: curva em solvente).....	96
<b>Figura II. 15:</b> Coeficientes de variação (CV) obtidos para análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz material particulado em suspensão. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.....	98
<b>Figura II. 16:</b> Cromatogramas dos íons extraídos ( $m/z = 223+237$ ). 1. Ponto 10 da curva ( NP2EO $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 28/03/11; 2. Ponto 6 da curva (NP2EO $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 16/03/11; 3. Solução de NP2EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 14/02/12; 4. Solução de NP2EO ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 21/06/12. ( * picos de sangramento da coluna cromatográfica).....	100
<b>Capítulo III</b>	
<b>Figura III. 1:</b> Localização da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré entre as 22 UGRHs do Estado (IPT, 2000).....	108
<b>Figura III. 2:</b> Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes.....	112
<b>Figura III. 3:</b> Localização do município de Araraquara e da sub-bacia do ribeirão das cruzeiras (Fuller, 2008).....	114
<b>Figura III. 4:</b> Diagrama unifilar referente ao Ribeirão das Cruzes no município de Araraquara – SP, contendo os pontos de amostragem. ....	115
<b>Figura III. 5:</b> Localização dos córregos e do Ribeirão das Cruzes no município de Araraquara (SP). 1. Córrego do Tanquinho, 2. Córrego do Serralhado, 3. Córrego Marivan, 4. Córrego do Cupim, 5. Córrego do Paiol, 6. Córrego do Paiol, 7. Córrego do Lageado, 8. Ribeirão das Cruzes, 9. Ribeirão das Cruzes, 10. Ribeirão das Cruzes, 11. Ribeirão das Cruzes, 12. Ribeirão das Cruzes, 13. Ribeirão das Cruzes, 14. Ribeirão das Cruzes.....	116
<b>Figura III. 6:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Tanquinho (ponto 1).....	117
<b>Figura III. 7:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Serralhado (ponto 2).....	118
<b>Figura III. 8:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego Marivan (ponto 3).....	119

<b>Figura III. 9:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Cupim (ponto 4).....	120
<b>Figura III. 10:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Paiol ( ponto 5).....	121
<b>Figura III. 11:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Paiol (ponto 6).....	122
<b>Figura III. 12:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Lageado (ponto 7).....	123
<b>Figura III. 13:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no rio Ribeirão das Cruzes (Ponto 8).....	124
<b>Figura III. 14:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no rio Ribeirão das Cruzes (Ponto 9).....	125
<b>Figura III. 15:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 10).....	126
<b>Figura III. 16:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 11).....	127
<b>Figura III. 17:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 12).....	128
<b>Figura III. 18:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 13).....	129
<b>Figura III. 19:</b> Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 14).....	130

## ***Lista de Tabelas***

### ***Capítulo I***

Tabela I.1: Propriedades dos alquilfenóis e seus etoxilados .....	31
Tabela I. 2: Trabalhos da literatura que relatam a ocorrência dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados em matrizes ambientais .....	33
Tabela I. 3: Alquilfenóis classificados como alteradores endócrinos por algumas organizações ( Ghiselli, 2007) .....	39
Tabela I. 4: Alguns estudos toxicológicos sobre os alquilfenóis. ....	40
Tabela I. 5: Sumário de alguns trabalhos da literatura que relatam a ocorrência dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados em amostras ambientais.....	51

### ***Capítulo II***

Tabela II. 1: Concentrações das soluções estoque para o sistema GC-MS, utilizando acetato de etila como solvente. ....	62
Tabela II. 2: Condições cromatográficas otimizadas para sistema GC-MS. ....	64
Tabela II. 3: Massas dos fragmentos característicos de cada substância..	65
Tabela II. 4: Condições otimizadas para a análise de alquilfenóis por GC-MS/MS.....	65
Tabela II. 5: Condições cromatográficas otimizadas para sistema HPLC-FLD.....	66
Tabela II. 6: Concentrações das soluções padrão de trabalho utilizadas no sistema GC-MS.....	67
Tabela II. 7: Concentrações das soluções padrão de trabalho utilizadas no sistema HPLC-FLD.....	67
Tabela II. 8: Parâmetros das curvas analíticas para o sistema GC-MS....	75
Tabela II. 9: Parâmetros das curvas analíticas para sistema HPLC-FLD...	80
Tabela II. 10: Valores dos limites de detecção e quantificação instrumentais para sistemas GC-MS e HPLC-FLD.....	81
Tabela II. 11: Valores das recuperações utilizando diferentes solventes de eluição com sistema HPLC-FLD.....	84

Tabela II. 12: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações utilizando acetonitrila, metanol e acetona, sequencialmente, na eluição da SPE. Análise por HPLC-FLD. ....	85
Tabela II. 13: Recuperação obtida em segunda avaliação de método para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações utilizando acetonitrila, metanol e acetona, sequencialmente, na eluição da SPE. Análise por HPLC-FLD. ....	86
Tabela II. 14: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a 400 ng L <sup>-1</sup> , acidificada com ácido acético (2% v/v). Análise por HPLC-FLD. ....	87
Tabela II. 15: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a 400 ng L <sup>-1</sup> , sem acidificação. Análise por HPLC-FLD. ....	87
Tabela II.16: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a 400 ng L <sup>-1</sup> , não acidificada ou acidificada com ácido acético (2% v/v), utilizando 10mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL diclorometano/acetona (1:1 v/v) , sequencialmente, como eluentes na SPE. Análise por HPLC-FLD.....	89
Tabela II. .17: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações e acidificada com ácido acético (2% v/v), utilizando 10mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL diclorometano/acetona (1:1 v/v). Análise por HPLC-FLD.....	89
Tabela II. 18: Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos de amostras de água superficial com método validado para sistema HPLC-FLD (n=3).....	91
Tabela II 19: Concentrações dos níveis do teste ponto a ponto utilizando o CV as áreas das curvas analítica e na matriz água superficial. Análise por HPLC-FLD.....	92
Tabela II. 20: Recuperação obtida para amostra de material particulado fortificado (6,1 µg g <sup>-1</sup> ) com os analitos, utilizando extração sequencial com 10 mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10 mL diclorometano/acetona (1:1 v/v) com agitação (vortex) seguida de extração em banho de ultrassom (Figura método.) Análise por HPLC-FLD. ....	94
Tabela II. 21: Recuperação obtida para amostra de material particulado fortificado (5,4 µg g <sup>-1</sup> ) com os analitos, utilizando extração sequencial com metanol, acetonitrila e acetona (10mL de cada) e 3 etapas com 10mL acetonitrila/metanol (70:30%), ambos com agitação (vortex) seguida de extração em banho de ultrassom. Análise por HPLC-FLD. ....	95
Tabela II. .22: Resultados obtidos para as recuperações dos três níveis da curva analítica para análise de material particulado utilizando 10 mL de diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10 mL de diclorometano/acetona (1:1 v/v) como solventes de extração para sistema HPLC-FLD.....	95



Tabela II. 23: Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos de amostras de material particulado em suspensão para sistema HPLC-FLD (n=3).....	96
Tabela II. 24: Concentrações dos níveis do teste ponto a ponto utilizando o CV as áreas das curvas analítica e na matriz água superficial. Análise por HPLC-FLD.....	97
Tabela II. 25: Valores das recuperações utilizando diferentes solventes de eluição com análise por GC-MS.....	101
Tabela II. 26: Resultados obtidos para as recuperações das amostras de água superficial utilizando diclorometano, hexano e acetona como solventes de eluição para sistema GC-MS.....	102
Tabela II. 27: Resultados obtidos para as recuperações dos três níveis da curva analítica para análise de material particulado utilizando diclorometano, hexano e acetona como solventes de eluição para sistema GC-MS (n=3).....	104
<b>Capítulo III</b>	
Tabela III.1. Resultados obtidos na análise dos alquilfenóis em material particulado e água superficial (n=3).....	132

## ***Lista de Abreviaturas e Siglas***

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária  
APEO: Alquilfenóis etoxilados  
CG-ECD: Cromatógrafo a gás acoplado a detector de captura de elétron  
CG-MS: Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas  
CV: coeficiente de variação  
ETA: Estação de tratamento de água  
ETE: Estação de tratamento de esgoto  
HP: Heptilfenol  
HPLC - DAD: Cromatógrafo líquido acoplado a detector por arranjo de diodos  
HPLC-FLU: Cromatógrafo líquido com detector de fluorescência  
INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial  
Kow : constante de partição octanol/água  
LC-MS: Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas  
LD: limite de detecção  
LLE: extração líquido-líquido  
LQ: limite de quantificação  
 $m/z$ : relação carga massa  
MM: massa molecular  
MP: material particulado  
NP: nonilfenol  
NP1EO: Nonilfenol monoetoxilado  
NP2EO: Nonilfenol dietoxilado  
OP: Octilfenol  
OP1EO: Octilfenol monoetoxilado  
OP2EO: Octilfenol dietoxilado  
POP: Poluentes Orgânicos Persistentes  
s: desvio padrão  
SPE: extração em fase solida  
UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

## Sumário

Introdução Geral .....	22
Capítulo I – Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados .....	26
1. Introdução .....	27
2. Revisão da literatura .....	29
2.1 Propriedades físico-químicas, ocorrência e dispersão no ambiente .....	29
2.2 Alquilfenóis como alteradores endócrinos .....	36
2.3 Degradação dos alquilfenóis e etoxilados.....	43
2.4 Legislação .....	46
2.5 Métodos para análise dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados .....	47
2.6 Avaliação do efeito matriz.....	55
Capítulo II – Otimização e validação de método para análise de alquilfenóis e seus etoxilados em matrizes ambientais .....	59
1. Introdução .....	60
2. Materiais e métodos .....	61
2.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes. ....	61
2.2 Limpeza da vidraria e descarte dos resíduos .....	62
2.3 Acondicionamento das amostras.....	63
2.4 Sistema analítico e condições cromatográficas .....	64
2.4.1 Método cromatográfico para sistema GC-MS e GC-MS/MS.....	64
2.4.2 Método cromatográfico para sistema HPLC-FLD .....	65
2.4.3 Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas .....	66
2.5 Método de análise de alquilfenóis em água de rio e material particulado em suspensão .....	68
2.5.1 Água de rio .....	68
2.5.2 Material particulado em suspensão.....	69
2.6 Limites de detecção e quantificação do sistema analítico .....	70
2.7 Precisão e Exatidão do método.....	71
2.8 Limites de detecção e quantificação dos métodos .....	71
2.9 Avaliação do efeito matriz.....	72
3. Resultados e Discussão .....	73
3.1 Avaliação da resposta dos sistemas analíticos.....	73
3.1.1 GC-MS e GC-MS/MS.....	73
3.1.1.1 GC-MS.....	73
3.1.1.2 GC – MS/MS .....	76

3.1.2 HPLC-FLD .....	80
3.1.3 Limites de detecção e quantificação instrumentais.....	81
3.1.4 Comparação entre os sistemas HPLC-FLD, GC-MS e GC-MS/MS .....	82
3.2 Precisão e Exatidão do método.....	83
3.2.1 HPLC-FLD .....	83
3.2.1.1 Água de rio .....	83
3.2.1.2 Material particulado em suspensão.....	93
3.2.2 GC-MS.....	99
3.2.2.1 Água de rio .....	99
3.2.2.2 Material particulado em suspensão.....	103
4. Considerações finais.....	105
Capítulo III – Aplicação de método para análise de alquilfenóis em água superficial e material particulado ao longo do Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP) .....	106
1. Introdução.....	107
2. Caracterização da área de estudo (UGRHI-13).....	108
2.1 Clima.....	109
2.2 Economia.....	110
2.3. Uso e ocupação do solo.....	111
2.4 Captação e tratamento de água em Araraquara .....	111
3. Amostragem .....	113
3.1. Caracterização dos pontos de amostragem.....	113
3.2. Coleta das amostras .....	116
3.3 Córrego do Tanquinho (ponto 1).....	117
3.4 Córrego do Serralhado (ponto 2) .....	118
3.5 Córrego Marivan ( ponto 3).....	119
3.6 Córrego do Cupim (ponto 4) .....	120
3.7 Córrego do Paiol ( ponto 5) .....	121
3.8 Córrego do Paiol (Ponto 6).....	122
3.9 Córrego do Lageado (ponto 7) .....	123
3.10 Ribeirão das Cruzes (Ponto 8) .....	124
3.11 Ribeirão das Cruzes (Ponto 9) .....	125
3.12 Ribeirão das Cruzes (Ponto 10) .....	126
3.13 Ribeirão das Cruzes (Ponto 11) .....	127
3.14 Ribeirão das Cruzes (Ponto 12) .....	128

3.15 Ribeirão das Cruzes (Ponto 13) .....	129
3.16 Ribeirão das Cruzes (Ponto 14) .....	130
4. Resultados e discussão.....	131
<b>Conclusões gerais e perspectivas futuras .....</b>	<b>136</b>
<b>Referências .....</b>	<b>138</b>

## Introdução Geral

Ingrediente essencial da vida, a água possui diversos usos, como o abastecimento público e industrial, recreação, produção de energia elétrica, entre outros. Com o crescente aumento industrial e demográfico, acompanhado da disposição inadequada de esgotos sanitários e efluentes industriais, houve incremento do aporte ambiental de algumas substâncias, principalmente orgânicas, que podem causar impactos na vida aquática e terrestre.

Os microcontaminantes orgânicos, que podem ocorrer em concentrações diminutas ( $\text{ng L}^{-1}$  ou  $\text{ng g}^{-1}$ ) no ambiente e em alimentos, têm sido divididos em diversas classes. A mais conhecida talvez seja a dos **poluentes orgânicos persistentes** (POP – *Persistent Organic Pollutants*) que atualmente inclui 21 substâncias (ou grupos de substâncias) organohalogenadas de uso industrial e em antigos e modernos agroquímicos, como o gama-hexaclorociclohexano (um inseticida, também conhecido como lindano) e o endossulfam, um inseticida ainda de largo uso no Brasil (Stockholm Convention, 2013). As principais características das substâncias desta classe são, claro, a persistência traduzida na bioacumulação e biomagnificação, muitos são carcinogênicos ou mutagênicos, alguns ainda são reconhecidos como alteradores (ou interferentes) endócrinos. Nesta classe, a maior parte das moléculas aparece nas legislações para monitoramento da qualidade ambiental, notadamente água, e de alimentos de consumo humano e animal.

Duas outras classes têm aparecido com frequência na literatura e merecem menção aqui. Os **contaminantes (ou poluentes) emergentes** são aquelas substâncias que ocorrem no ambiente ou em alimentos, e que têm características toxicológicas importantes (carcinogenicidade, mutagenicidade, caráter de alterador

endócrino, etc), mas, que não estão legislados. Pertencem a esta classe, por exemplo, a maioria dos fármacos de uso humano e veterinário, substâncias presentes em produtos de cuidado pessoal, como parabenos e protetores UV, além de substâncias de ocorrência natural, como os estrógenos (Ying, 2002; Raimundo, 2007). A outra classe é a dos **alteradores (ou interferentes) endócrinos**, que congrega as substâncias que podem causar alterações no sistema endócrino de qualquer organismo, mas principalmente para a biota aquática. Nesta classe podem estar substâncias que estão também nas duas outras classes e podem ser naturais ou sintéticas, incluindo além de substâncias orgânicas, algumas inorgânicas também. A Figura 1 ilustra esta divisão.

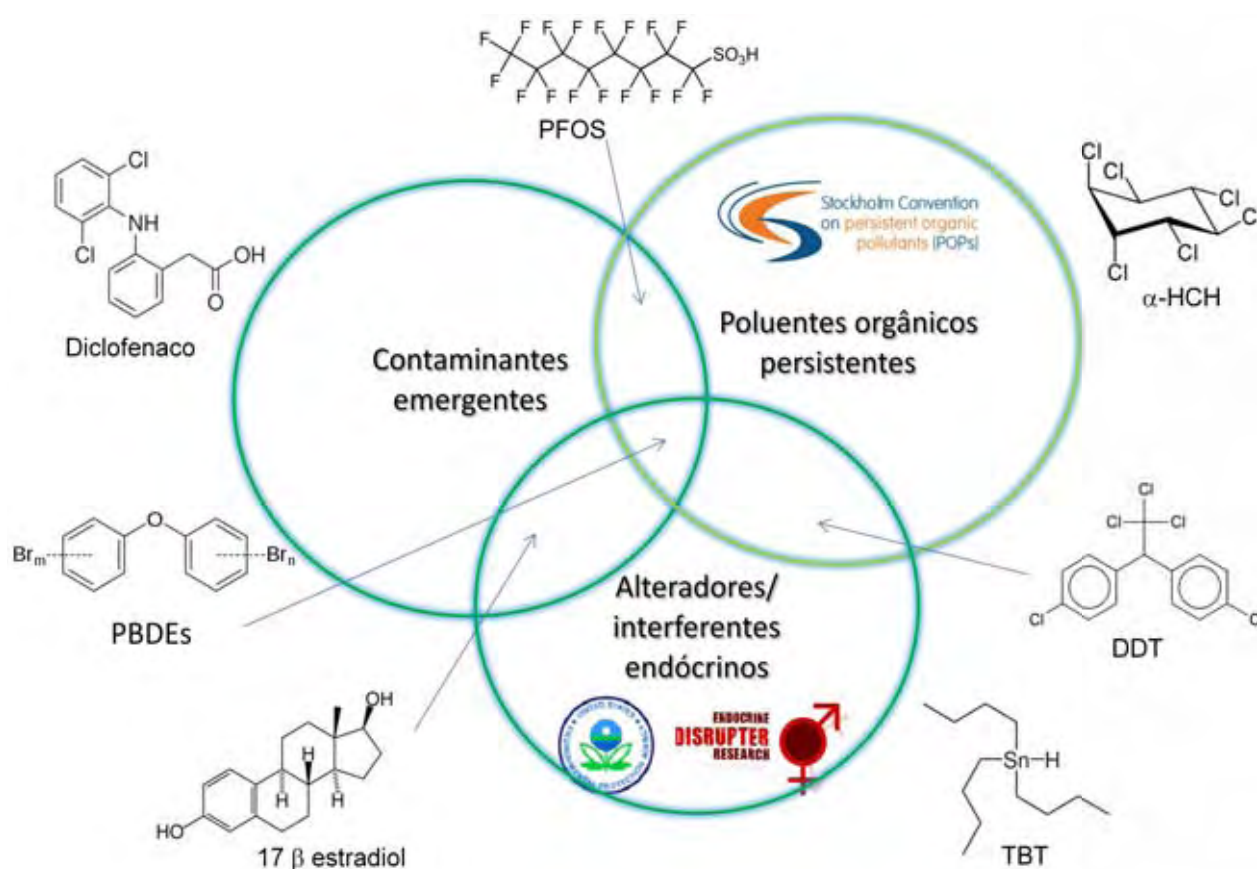


Figura 1: Principais classes de microcontaminantes (ou micropoluentes) orgânicos (PFOS: perfluorooctanos sulfonados, α-HCH: hexaclorociclohexano, DDT: dicloro-difenil-tricloroetano, TBT: tributil estanho, PBDEs: éteres de difenilas polibromadas (Elaborado por: Pro<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Rosa Rodrigues de Marchi)

Dentre os contaminantes emergentes, um grupo de substâncias tem despertado o interesse da comunidade científica, por seu largo uso, resistência a destruição durante os processos de tratamento de esgoto (industriais e sanitário) e por existirem evidências que atua como alterador endócrino para organismos aquáticos (Ying, 2006). Trata-se dos alquilfenóis.

Os alquilfenóis polietoxilados são surfactantes não iônicos usados em uma grande variedade de produtos para uso doméstico e industrial, como aditivos em polímeros, produtos de cuidado pessoal, lubrificantes, pesticidas entre outros produtos (Ying, 2006; Ying, 2002; Fasano, 2012; Kolvenbach, 2012; Gilbert, 2012).

Tendo em vista que os alquilfenóis são produtos de degradação dos alquilfenóis etoxilados, de largo uso em produtos domissanitários e industriais, estando presente ainda em diversas formulações de pesticidas de ampla utilização no Brasil e que podem representar grande risco para a fauna, flora e para os seres humanos, este trabalho teve como objetivo a otimização e validação de método para determinação de alquilfenóis (octilfenol e nonilfenol) e alquilfenóis etoxilados em amostras de material particulado em suspensão e água coletadas ao longo do rio Ribeirão das Cruzes, situado no município de Araraquara (SP), correlacionando com dados de uso e ocupação do solo para atribuição das possíveis fontes de contaminação encontradas.

Neste trabalho serão abordados os estudos analíticos e a aplicação ambiental envolvendo estas substâncias no município de Araraquara (SP). Assim, os capítulos foram distribuídos da maneira descrita a seguir.

No **Capítulo I** serão abordadas as principais características relacionadas aos alquilfenóis e seus etoxilados, onde serão discutidas informações a respeito de suas aplicações industriais, distribuição e degradação no ambiente, atuação como alterador endócrino, ações regulatórias em vigência, métodos de análise com estudo do efeito



matriz para esses compostos de forma a introduzir o contexto abordado nos capítulos posteriores.

No **Capítulo II** será discutida a otimização e validação de métodos para a análise de alquilfenóis em material particulado em suspensão e água superficial, assim como a utilização de ferramentas de controle de qualidade analítico tais como linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e análise de efeito matriz para que se possa garantir a confiabilidade dos resultados gerados neste estudo.

No **Capítulo III**, será apresentada a caracterização dos pontos de amostragem e o estudo da ocorrência de alquilfenóis em material particulado em suspensão e água do rio Ribeirão das Cruzes.

## Capítulo I – Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados

## 1. Introdução

A água é hoje considerada como um dos bens naturais mais importantes do planeta. A preocupação com o uso, destino e principalmente a deterioração dos recursos hídricos tem mobilizado profissionais de todas as áreas na busca da sua preservação. Os múltiplos usos da água compreendem: o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica, as atividades de lazer e recreação, entre outros. A crescente expansão demográfica e industrial observada nas últimas décadas trouxe como consequência o comprometimento das águas dos rios, lagos e reservatórios, podendo ser contaminadas por efluentes domésticos e/ou industriais. A disposição destes efluentes *in natura* nos corpos hídricos pode causar impactos para a vida aquática e terrestre, alterando o equilíbrio do ecossistema, podendo culminar com a alteração da biodiversidade sendo que o tratamento de efluentes muitas vezes não é eficiente na remoção de diversos poluentes (Moura, 2009).

A preocupação com as consequências do uso inadequado dos recursos hídricos teve um incremento acentuado nas décadas de 1970-1980. À época o enfoque estava principalmente voltado para os íons metálicos (“metais pesados”) e, dentre os orgânicos, destacavam-se os compostos organoclorados usados como pesticidas. O interesse por estes contaminantes hídricos estava baseado em efeitos agudos e crônicos causados por estas espécies químicas, segundo estudos toxicológicos desenvolvidos. Dentre estes efeitos os mais considerados eram o câncer e a mutagênese. A partir de 1990 a preocupação tem sido focada em substâncias que apresentam efeitos menos suscetíveis de serem percebidos como um câncer ou mutagênese, mas que podem alterar o sistema hormonal, causando efeitos na homeostase dos organismos, e alterando assim, o desenvolvimento da espécie. Um

livro muito impactante na época foi o “*Our stolen future*”, que relata a possibilidade de efeitos no sistema endócrino de humanos e outros animais serem causados por substâncias presentes no ambiente. Este livro faz um levantamento detalhado de problemas causados por substâncias químicas que, mesmo em baixas concentrações, podem causar efeitos adversos ao sistema reprodutivo e imunológico de animais. (Our Stolen Future, 2013).

Em comum os contaminantes emergentes e os alteradores endócrinos (veja definições na introdução geral deste trabalho) têm que ocorrem no ambiente em concentrações diminutas ( $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), sendo necessárias também estas as concentrações em que podem ser notados os efeitos biológicos, principalmente sobre organismos aquáticos (Ying, 2006; Ying, 2002).

Os contaminantes emergentes e que são também apontados como alteradores endócrinos, merecem destaque pelo amplo uso, são os alquilfenóis. Os alquilfenóis polietoxilados são surfactantes não iônicos usados em uma grande variedade de produtos para uso doméstico e industrial (Ying, 2006; Ying, 2002; Fasano, 2012; Kolvenbach, 2012), sendo que o nonilfenol é utilizado principalmente como surfactante e como aditivo em polímeros, produtos de cuidado pessoal e lubrificantes; enquanto que o octilfenol é empregado principalmente como agente emulsificante em processos de síntese de polímeros em menor quantidade, na indústria têxtil e couro, pesticidas e tintas à base de água (Gilbert, 2012).

Os alquilfenóis polietoxilados podem sofrer degradação, resultando na formação dos alquilfenóis. Essa degradação pode ocorrer em estações de tratamento de esgoto (ETEs) convencionais (Ying, 2002). A ocorrência ambiental dos alquilfenóis vem sendo investigada desde 1970, e por causa de seu uso, persistência, há uma distribuição dessas substâncias por diversas matrizes (Ying, 2002, Bergé, 2012).

Neste Capítulo I serão abordadas as principais características relacionadas aos alquilfenóis e seus precursores etoxilados, sendo apresentadas informações a respeito de suas aplicações industriais, distribuição no ambiente, propriedades físico-químicas, toxicidade, ações regulatórias em vigência para esses compostos e metodologias de análise de forma a introduzir o contexto abordado nos capítulos subsequentes.

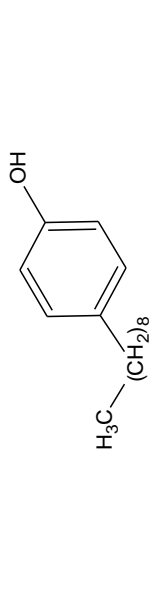
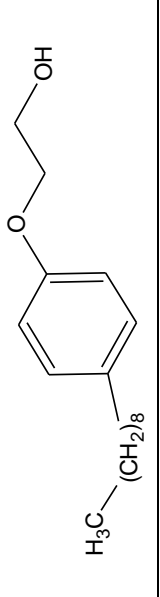
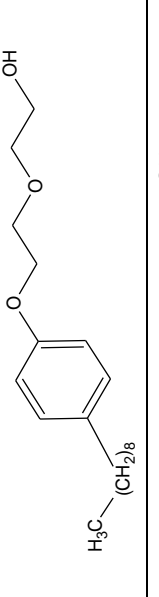
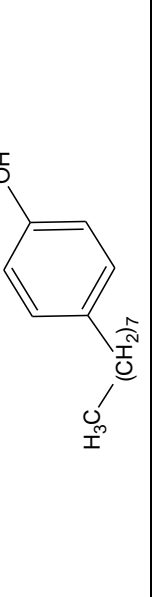
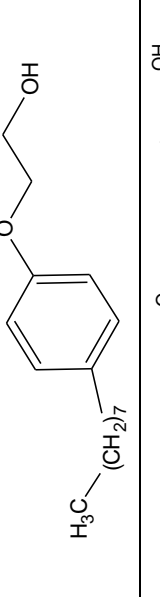
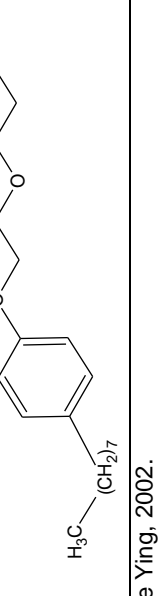
## **2. Revisão da literatura**

### **2.1 Propriedades físico-químicas, ocorrência e dispersão no ambiente**

Os surfactantes pertencem a um grupo de substâncias químicas que são projetadas para terem propriedades de limpeza ou de solubilização. Estas substâncias, geralmente, consistem de um grupo com uma extremidade polar (com ou sem carga formal), e a outra extremidade não polar, geralmente alquílica. Por isso, os surfactantes combinam em uma mesma molécula propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas. Uma propriedade que os surfactantes possuem devido a essa combinação é a habilidade de formar micelas (Ying, 2006). Em baixas concentrações, as moléculas tensoativas existem como monômeros. Em concentrações mais elevadas, a energia livre do sistema pode ser reduzida pela agregação do surfactante em *clusters* (micelas). A concentração na qual isto ocorre é conhecida como concentração micelar crítica (CMC). Em concentrações acima da CMC, os surfactantes incrementam a solubilidade em água de compostos orgânicos hidrofóbicos, por isso podem afetar a mobilidade e a persistência de compostos orgânicos hidrofóbicos no solo ou sedimento (Ying, 2006). A sorção do surfactante ao sedimento ou ao solo depende de muitos fatores, incluindo as propriedades físico-químicas (constantes  $K_{ow}$  e  $K_{oc}$ ), natureza do sedimento e dos

parâmetros ambientais. Estudos de sorção podem ser utilizados para estimar a biodisponibilidade dos surfactantes. Além disso, a sorção possui uma influência significativa na degradação do surfactante no ambiente. A Tabela I.1 lista algumas propriedades físico-químicas dos alquilfenóis e seus etoxilados.

Tabela I.1: Propriedades dos alquilfenóis e seus etoxilados

Substâncias (CAS)	Estruturas	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água à 20°C (mg L <sup>-1</sup> )	log de K <sub>ow</sub>	K <sub>oc</sub> (L kg <sup>-1</sup> )
Nonilfenol (NP) (104-40-5)		220,0	5,43	4,48	245.470
Nonilfenol monoetoxilado (NP1EO) (104-35-8)		264,0	3,02	4,17	288.403
Nonilfenol dietoxilado (NP2EO) (20427-84-3)		308,0	3,38	4,21	151.356
Octilfenol (OP) (1806-26-4)		206,0	12,6	4,12	151.356
Octilfenol monoetoxilado (OP1EO) (51437-89-9)		250,0	8,0	4,10	Não encontrado
Octilfenol dietoxilado (OP2EO) (51437-90-2)		294,0	13,2	4,00	Não encontrado

Fonte: adaptada de Ying, 2002.

K<sub>ow</sub> = coeficiente de partição octanol águaK<sub>oc</sub> = coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

Como os alquilfenóis etoxilados e não etoxilados são sintéticos, a presença destas substâncias no ambiente se deve somente à atividade antropogênica. Os alquilfenóis e seus etoxilados entram no ambiente principalmente pela via industrial e municipal de tratamento de esgoto (efluente e lodo de esgoto), mas também devido à introdução direta como na aplicação de pesticidas, que têm estes compostos em sua formulação, como dispersantes. Estas substâncias foram detectadas em diversas matrizes, como ar, água, solo, sedimento e biota (Ying, 2002), como pode ser observado na Tabela I.2.



Tabela I. 2: Trabalhos da literatura que relatam a ocorrência dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados em matrizes ambientais

Referências	País	Matriz	NP	Concentração			OP
				NP1EO	NP2EO	OP	
Ying (2002)	Espanha	Água superficial	< LD – 644 $\mu\text{g L}^{-1}$	n.a.	n.a.	n.a.	
Ying (2002)	Canadá	Água superficial	< LD – 0,92 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LD – 7,8 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LD – 10 $\mu\text{g L}^{-1}$	< LD	
Ying (2002)	Japão	Água superficial	< LD – 3,08 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,04 – 0,81 $\mu\text{g L}^{-1}$	n.a.	< LD – 0,18 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Ying (2002)	USA	Água superficial	< LD – 95 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,056 – 0,326 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,038 – 0,398 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,00156 – 0,007 $\mu\text{g L}^{-1}$	
Ying (2002)	Canadá	Sedimento	0,1 – 72 $\mu\text{g kg}^{-1}$	<LD – 38 $\mu\text{g kg}^{-1}$	<LD – 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$	<LD – 1,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Ying (2002)	Japão	Sedimento	30 – 13.000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 – 3470 $\mu\text{g kg}^{-1}$	n.a.	3 – 670 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Ying (2002)	USA	Sedimento	<2,9 – 2960 $\mu\text{g kg}^{-1}$	<2,3 – 175 $\mu\text{g kg}^{-1}$	n.a.	n.a.	
Bergé (2012)	USA	Atmosfera	<LD – 95 $\text{ng m}^{-3}$	n.a.	n.a.	n.a.	
Bergé (2012)	Grécia	Atmosfera	<LD – 10,9 $\text{ng m}^{-3}$	<LD – 12,8 $\text{ng m}^{-3}$	n.a.	n.a.	
Bergé (2012)	Alemanha	Atmosfera	0,10 – 1,00 $\text{ng m}^{-3}$	n.a.	n.a.	n.a.	
Bergé (2012)	França	Água de chuva	0,05 – 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$	n.a.	n.a.	n.a.	
Bergé (2012)	Suécia	Água de chuva	0,10 – 1,20 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	n.a.	
Bergé (2012)	Espanha	Lodo de esgoto	0,9 – 194 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	<LD – 525 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	<LD – 325 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	n.a.	
Bergé (2012)	China	Lodo de esgoto	149 – 167 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	27,6 – 30,0 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	9,5 – 11,0 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	n.a.	
Bergé (2012)	USA	Sólido em suspensão	3,58 – 8,39 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	2,03 – 18,3 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	1,09 – 18,2 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	n.a.	
Bergé (2012)	França	Sólido em suspensão	0,29 – 7,11 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	0,04 – 0,69 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	0,02 – 0,76 $\text{mg kg}^{-1}$ (ms)	n.a.	

NP = nonilfenol, NP1EO = nonilfenol monoetoxilado, NP2EO = nonilfenol dietoxilado, OP = octilfenol

LD = Limite de detecção, ms = massa seca

n.a. = não analisado

Para os metabólitos dos alquilfenóis etoxilados (NP e OP), o  $\log K_{ow}$  está entre 4,00 e 4,48, sugerindo que essas substâncias podem estar associadas com a matéria orgânica dos sedimentos dos rios, conseqüentemente com o material particulado (MP), podendo ser significativo o impacto ecotoxicológico para a biota que está associada ao sedimento (bentônicos) ou que está na coluna d'água e ingerem o MP. (Ying, 2002). Uma proposta para a dispersão destas substâncias no ambiente é apresentada na Figura I.1.

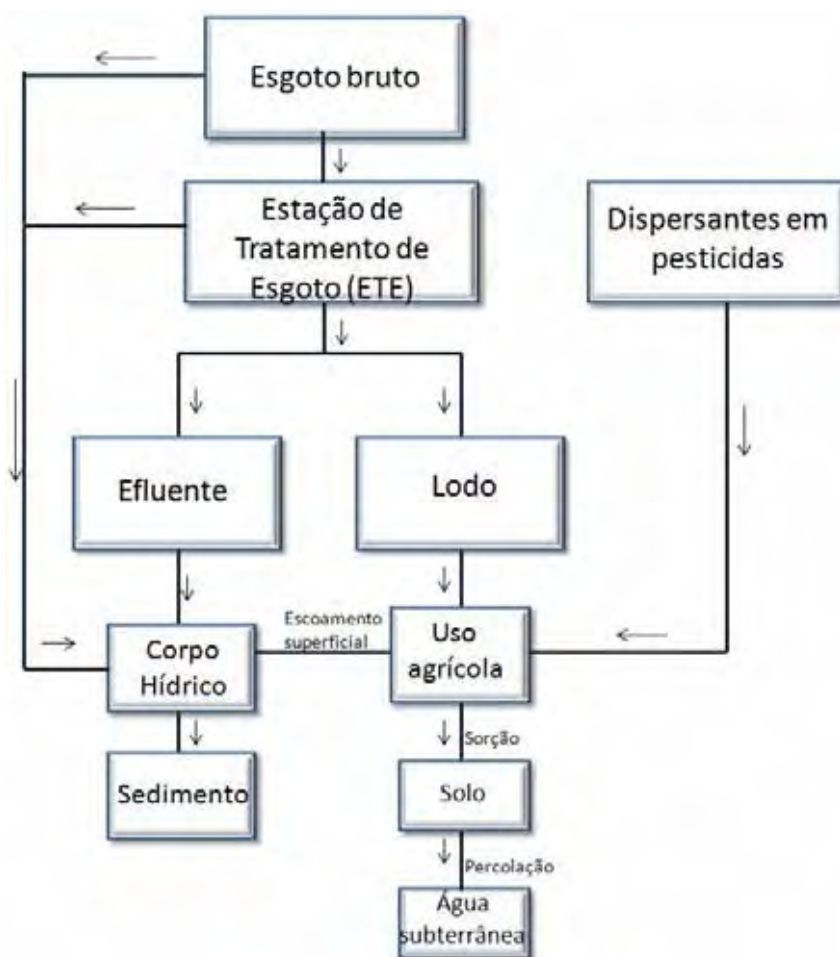


Figura I. 1: Proposta de dispersão dos alquilfenóis no ambiente  
(fonte: elaborada pela autora)

Nos EUA pesquisadores determinaram que 81% das 47 reservas nacionais de água estão contaminadas, e os compostos mais frequentemente detectados foram o bisfenol A (30% das amostras) e o octilfenol monoetoxilado (19% das amostras) (Bono-Blay, 2012).

Zhang, Y. *et al.* (2009), relatam que em todas as amostras analisadas de sedimento do rio Xiamen Bay, na China, foram encontradas concentrações entre 12,90 e 1.160 ng g<sup>-1</sup> (massa seco) de nonilfenol e entre 1,31 e 13,60 ng g<sup>-1</sup> de octilfenol. Os autores alegam que há mais nonilfenol na região devido ao uso intensivo de nonilfenol polietoxilado, considerando que a principal fonte seria o despejo de esgoto municipal. Em outro estudo, Navarro *et al.* (2009) relatam dados de 2003, onde foram verificados níveis de nonilfenol e octilfenol de 30 e 2.330 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, no sedimento do rio Ebro (Espanha).

Os alquilfenóis possuem uma forte tendência a acumular-se também em lodo de estações de tratamento de esgoto. Por terem uma natureza anfifílica, ocorre adsorção desses surfactantes na superfície de partículas ou podem precipitar na presença de íons metálicos (principalmente Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>). Em um estudo desenvolvido por Fernández-Sanjuan, *et al.* (2009), foram determinados altos valores de concentração de NP e NP<sub>1</sub>EO (199 e 47 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente) em lodo de estações de tratamento de esgoto da região da Catalunha (Espanha). Com base nestes valores, estes autores recomendam a melhoria dos sistemas de tratamento das ETE, para retirada destes compostos, e que o lodo de ETE seja analisado antes da disposição no solo, para uso agrícola, pratica comum na Espanha.

Quando os alquilfenóis são introduzidos em corpos hídricos, quer seja pelo despejo *in natura* de efluentes industriais ou municipais, ou pelos efluentes de ETE de onde não foram removidos, os sedimentos com alto teor de matéria orgânica tendem a sorver substâncias orgânicas e como consequência, tem a possibilidade de agir como

um reservatório da substância sorvida. Essas substâncias associadas aos sedimentos podem ser liberadas devido à turbulência da água e processos físicos, tais como difusão molecular e dessorção (Navarro, 2009).

No Brasil, poucos são os trabalhos que estudaram a ocorrência dos alquilfenóis em águas de rios, sedimento e mesmo em lodo de esgoto. Em um deles, Fiedler *et al.* (2007) avaliaram a ocorrência de alquilfenóis em águas superficiais e sedimento de quatro reservatórios (Takimoto 1, Takimoto 2, Pedro e Morro Grande) no Estado de São Paulo (Caucaia do Alto, distrito do município de Cotia). Em água superficial, não foram detectados os alquilfenóis. Nas amostras de sedimentos as concentrações máximas para OP, NP foram de 8,6; 0,6 e 3,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

Em um trabalho desenvolvido neste grupo de pesquisa em colaboração com o Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del agua (IDAEA/CSIC, Espanha) (Moura, 2009), analisou NP, NP1EO e NP2EO, em amostras de afluente e efluente de ETA e ETE da UGRHI-13 (Tietê-Jacaré, região central do estado de SP). Utilizando SPE seguido de CG – MS pode-se observar concentrações muito elevadas dessas moléculas, principalmente nas amostras provenientes das ETEs ( $\text{NP}_{\text{efluente}} = < \text{LD} - 267 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $\text{NP1EO}_{\text{afuente}} = < \text{LQ} - 2963 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $\text{NP2EO}_{\text{afuente}} = < \text{LQ} - 2120 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

Em estudo desenvolvido na Região Metropolitana de Campinas, Raimundo (2007), analisou NP e OP em água do rio Atibaia, que recebe esgoto doméstico não tratado. Utilizando SPE e HPLC – DAD, pode-se observar concentrações também elevadas ( $\text{NP} = 218 \text{ ng L}^{-1}$  e  $\text{OP} = 1029 \text{ ng L}^{-1}$ ).

## 2.2 Alquilfenóis como alteradores endócrinos

A USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) propõe uma definição que abrange a diversidade de mecanismos envolvidos na perturbação do sistema endócrino, “um alterador endócrino é um agente exógeno que interfere na

síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento, mesmo em baixas concentrações” (Damstra, 2012).

Desta maneira, os alteradores endócrinos pertencem a uma categoria de substâncias que interferem no funcionamento do sistema endócrino. O sistema endócrino (Figura I.2) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como a tireóide, as gônadas e as glândulas supra-renais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progesterônios, a testosterona e a adrenalina (Birkett, 2003).

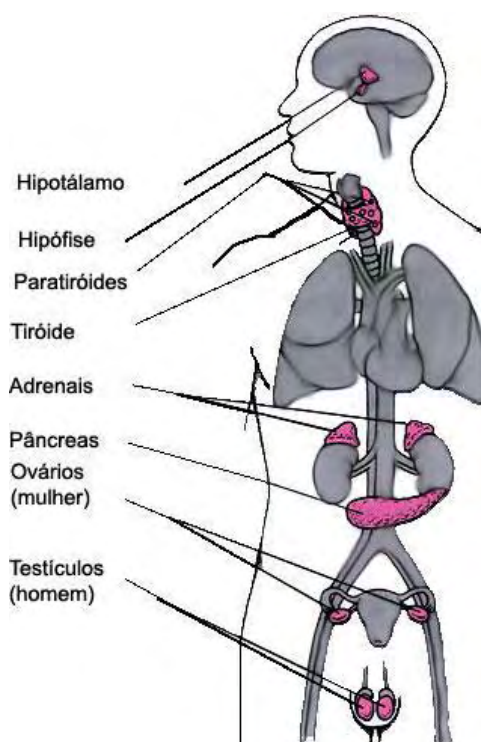


Figura I. 2: Sistema endócrino humano  
(fonte: <http://www.brasilecola.com/biologia/sistema-endocrinico.htm>)

Os alteradores endócrinos podem interferir no funcionamento do sistema endócrino de três formas: imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente

pelo organismo, como, por exemplo, o estrogênio ou a testosterona, desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo (efeito agonista); bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios, impedindo assim a ação dos hormônios naturais (efeito antagonista); ou afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando as concentrações dos hormônios naturais (Bierkett, 2003) (Figura I.3).

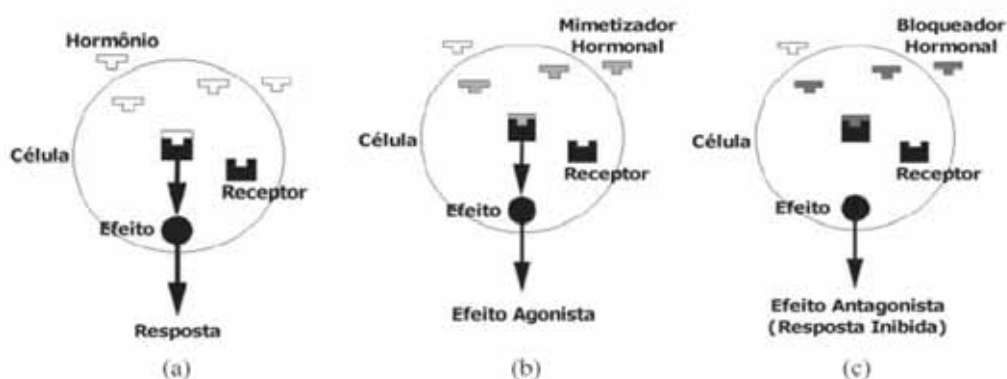


Figura I.3: Esquema das disfunções endócrinas: (a) resposta natural, (b) efeito agonista e (c) efeito antagonista (Birkett, 2003)

Com base em informações da literatura, foi elaborada, por diversas organizações, uma lista de substâncias suspeitas de causar alteração do sistema endócrino. A Tabela I.3 apresenta a classificação para os alquilfenóis perante algumas organizações.

Tabela I. 3: Alquilfenóis classificados como alteradores endócrinos por algumas organizações ( Ghiselli, 2007)

<b>Substância</b>	<b>UKEA</b>	<b>USEPA</b>	<b>OSPAR</b>		<b>JEA</b>	<b>WWF</b>
			<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>		
<i>Nonilfenol</i>	X	X	X		X	X
<i>Nonilfenol etoxilado</i>	X			X		
<i>Octilfenol</i>	X	X	X		X	
<i>Octilfenol etoxilados</i>	X					

UKEA- United Kingdom Environmental Agency; USEPA – United States Environmental Protection Agency; OSPAR – Oslo and Paris Commission; JEA – Japan Environmental Agency; WWF – World Wildlife Foundation.

Em humanos, as principais fontes de exposição aos alquilfenóis são a inalação (MP atmosférico contendo estes contaminantes), ingestão de alimentos contaminados e absorção dérmica, devido ao contato com produtos de cuidado pessoal que contenham estas substâncias (Fasano, 2012). A exposição por ingestão pode acontecer devido o uso de detergentes contendo nonilfenol ou octilfenol etoxilados no processo de lavagem dos legumes antes do empacotamento, que em tal situação, pode levar à contaminação tanto por estas substâncias quanto por seus produtos de degradação (Cacho, 2012). E também pela exposição do alimento à embalagem que contém os alquilfenóis originados da oxidação do aditivo antioxidante/antiozonante trisnonilfenil fosfito (TNPP), adicionado ao material polimérico como o cloreto de polivinila (PVC), poliolefinas e acrílicos (Fasano, 2012). Algumas embalagens não identificam em seus rótulos que o material da própria embalagem possui na sua composição os alquilfenóis, concluindo-se, assim, que a exposição humana à essas substâncias se torna inevitável (Dodson, 2012).

Alguns estudos mostram os riscos que os alquilfenóis apresentam para o ambiente, como por exemplo, os riscos de exposição, bioconcentração, níveis ambientais e riscos ecológicos. A Tabela I.4 sumariza alguns destes dados.

Tabela I. 4: Alguns estudos toxicológicos sobre os alquilfenóis.

<b>Ref</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>Principais informações</b>
Chen, 2010	Alquilfenóis em leite humano e sua relação com hábitos alimentares em Taiwan	OP foi associado com o consumo de óleo de cozinha e cápsulas de óleo de peixe. NP foi associado ao consumo de cápsulas de óleo de peixe e produtos processados de peixe.
Writer, 2010	Alteradores endócrinos nos lagos de Minnesota	A alteração endócrina foi observada em alevinos e peixes residentes nos lagos. A ocorrência destas substâncias antropogênicas nos lagos é de fontes diversas e não somente se limitando a estações de tratamento de águas residuais.
Spehar, 2010	Toxicidade comparativa e bioconcentração de NP em organismos de água doce.	Neste estudo, testes agudos e crônicos foram realizados para determinar a toxicidade e bioconcentração do NP para organismos de água doce. Os resultados apontam que, a longo prazo, a exposição ao NP poderia ter um impacto negativo às espécies de água doce, como a bioacumulação.
Bechi, 2010	Níveis ambientais de NP capazes de afetar a secreção de citosina na placenta humana.	Em testes <i>in vitro</i> , culturas com vilosidades coriônicas da placenta humana foram tratadas com NP. Os resultados apontam que podem ocorrer falhas na implantação do embrião, interrupção da gravidez, ou outras complicações.
Riva, 2010	Avaliação da exposição do NP em <i>Dreissena polymorpha</i>	Os resultados apontam que mexilhões expostos à NP tiveram diminuição geral dos níveis de 17- $\beta$ -estradiol e testosterona, mas o mecanismo pelo qual o NP altera os níveis de esteróides não foi explicitado desconhecido.
Balabanic, 2011	Review sobre o impacto negativo dos compostos alteradores endócrinos na saúde reprodutiva dos humanos	Com base em mais de 61 estudos, foi sugerido que, devido a esta exposição aos alquilfenóis, a quantidade e qualidade do esperma humano diminuiriam nos últimos 50 anos. Também há indicações do aumento de casos de câncer de testículos.
Lozano, 2012	Concentração de Alquilfenóis em peixe e água de rio	Os peixes neste ecossistema aquático estão expostos aos alquilfenóis, presentes tanto na água do rio e nos tecidos dos peixes. Os dados apontam que estas concentrações afetaram os processos fisiológicos destes peixes, mas sem afetar a anatomia do organismo exposto, mesmo assim, resulta no declínio da população.



Quanto à toxicodinâmica, assim que os alquilfenóis entram na corrente sanguínea no corpo humano já se inicia o processo de biotransformação. Neste ponto, os compostos estão sujeitos à glucuronidação e sulfatação; este processo ocorre no fígado. Uma vez convertidos em glucuronídeos e sulfatos seu potencial estrogênico se torna desativado. Em seguida, os conjugados são rapidamente eliminados através dos rins, sendo excretados pela urina. Devido a rápida biotransformação e depuração, apenas níveis baixos dos analitos são susceptíveis de serem encontrados no sangue após um período de tempo a partir da exposição (Asimakopoulos, 2012), sendo relatado que o nonilfenol é eliminado do corpo humano em um período inferior a três horas (Muller, 1998, apud Asimakopoulos 2012). Por outro lado, estudos mostram que em organismos aquáticos o nonil e o octilfenol apresentam tendência a bioacumulação, devido às suas propriedades físico químicas (Ying, 2006). O processo que envolve a transferência direta das substâncias da água para a biota é descrita como bioconcentração, aumentando este fator com o aumento do  $K_{ow}$ , ou seja, quanto maior o  $K_{ow}$  da substância, maior o poder de bioacumulação (Ying, 2006).

Considerando os alquilfenóis, os intermediários são mais lipofílicos e tóxicos, sendo também mais resistentes a biodegradação quando comparados com os etoxilados de cadeias maiores (Chen, 2012). De acordo com a Environmental Protection Agency (2012), os dados disponíveis para a toxicidade aguda e crônica do NP em organismos aquáticos indicam que este é altamente tóxico para peixes, invertebrados e plantas.

O NP exerce efeito adverso no sistema hormonal de peixes mesmo em baixas concentrações. A atividade estrogênica tem sido estudada em sistemas de bioensaios *in vitro* e *in vivo*, levando não só a típicas respostas estrogênicas, como elevada produção de vitelogenina, mas também a redução do crescimento testicular de machos.

Em testes de campo, tem sido demonstrado que os efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) podem causar efeitos estrogênicos em peixes, sendo observadas anomalias reprodutivas, como feminilização de peixes machos (Chen, 2012).

Estudos com algumas espécies de peixes têm indicado possíveis efeitos de alteração endócrina por contaminação com octilfenol e nonilfenol. Observou-se o desenvolvimento de anormalidades no sistema reprodutivo, causando a diminuição das populações (Lye, 1999; Rodgers-Gray, 2001; Rodgers-Gray, 2000). Alguns autores consideram que a partir de  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  o NP pode causar desequilíbrio hormonal em organismos aquáticos (Cruceu, 2012).

Há indicação da exposição fetal a alquilfenóis pela via transplacentária. Em um estudo efetuado com ratos, a mãe exposta, durante a gravidez, a altas doses OP ( $12,5 - 100 \text{ mg kg}^{-1}$  por dia), através de injeções subcutâneas, induziu efeitos adversos sobre os tecidos hepático e do baço dos filhotes (ambos os sexos) na idade adulta, resultando na menor produção de glóbulos vermelhos (indicativo de lesão no baço) (Barlas, 2009).

No entanto, observando os estudos da literatura, se torna um pouco difícil estabelecer uma correlação entre os efeitos biológicos adversos e a exposição a estes compostos com os dados de concentração ambientais encontrados (Lozano, 2012). Os estudos toxicológicos são efetuados geralmente com altas doses, simulando uma exposição aguda. Em geral, não são consideradas as concentrações ambientais encontradas, sendo estas com valores muito menores, mas que também causam algum impacto ao longo do tempo na biota exposta. Estes estudos também são realizados com exposição a uma única substância, verificando assim qual o seu efeito, mas são poucos os estudos efetuados com misturas destas substâncias, avaliando assim os efeitos combinados que podem produzir uma vez que qualquer organismo, em qualquer

nicho ambiental (inclusive o homem) está exposto a várias substâncias e não apenas uma de cada vez.

Por outro lado os dados ambientais sobre a ocorrência e comportamento dos microcontaminantes orgânicos em geral e dos alquilfenóis, em particular, são incipientes, geralmente sendo temporais e espacialmente limitados, além de carecerem muitas vezes de cuidados analíticos que garantam a sua confiabilidade. O ideal seria a integração de diversas áreas, como química, biologia, geologia, oceanografia entre outras, em estudos multifacetados para a melhor obtenção e entendimento dos dados ambientais correlacionados com os efeitos toxicológicos.

### **2.3 Degradação dos alquilfenóis e etoxilados**

A degradação destes surfactantes através da atividade microbiana é a primeira transformação que ocorre no ambiente. A biodegradação é um processo importante para o tratamento dos surfactantes em esgoto bruto nas Estações de Tratamento de Esgoto, onde há aumento da remoção de tais substâncias que iriam para o ambiente, reduzindo assim o impacto sobre a biota. Durante a biodegradação, microorganismos podem utilizar os surfactantes como substrato para produção de energia e nutrientes para as suas reações metabólicas. Existem muitas substâncias e alguns parâmetros ambientais que afetam a biodegradabilidade de um surfactante no ambiente. Os fatores de maior relevância estão relacionados às estruturas químicas dos compostos e as condições físico-químicas do ambiente (Ying, 2006).

Alguns estudos têm demonstrado a complexidade da biodegradação dos alquilfenóis etoxilados (APEO) ao longo do tratamento de esgoto, abordando os mecanismos de adsorção, o que resulta na contaminação do lodo de esgoto (Mcdam, 2011). Apesar desta sorção, uma parte dos APEO se degrada durante o processo de

tratamento do esgoto, sendo comuns concentrações mais elevadas de alquilfenóis (NP e OP) no efluente do que no afluente de ETE (Bizkarguenaga, 2012 ; Moura, 2009).

A biotransformação ocorre quando uma cadeia de APEO é reduzida, gerando cadeias menores (NP1EO, NP2EO, NP3EO, OP1EO, OP2EO, OP3EO), AP (nonilfenol e octilfenol), e uma série de metabólitos carboxilados intermediários (Soares, 2008). Acredita-se que se inicia com o encurtamento das cadeias etoxiladas, levando a cadeias menores dos alquilfenóis etoxilados, contendo uma ou duas unidades etoxiladas. A completa retirada de todos os grupos etoxilados é observada somente em condições anaeróbicas, devido à isso, eles se degradam parcialmente formando os alquilfenóis (nonil e octilfenol), que são persistentes e possuem atividade estrogênica em organismos como os peixes (Ying, 2006). A biotransformação das longas cadeias etoxiladas (NPxEO) ocorre em muitos compartimentos ambientais, resultando na formação de metabólitos de cadeias menores. Estes por sua vez, possuem o poder de se bioacumularem em organismos expostos (Environmental Protection Agency, 2012). Uma proposta para a rota de degradação dos alquilfenóis é apresentada na Figura I.4.

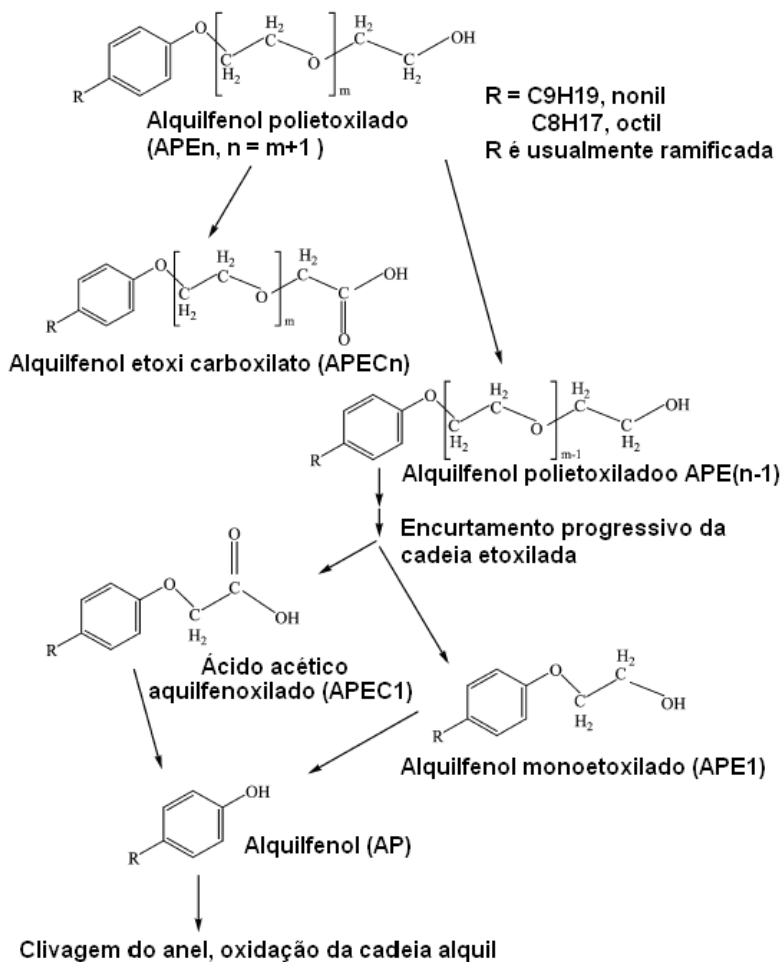


Figura I. 4: Proposta de rota de degradação dos alquilfenóis etoxilados (Ying, 2002)

No entanto, as rotas específicas de biodegradação desses compostos ainda estão sujeitas a debate, e vários estudos têm relatado que a concentração de oxigênio dissolvido, a idade do lodo, bem como a presença de matéria orgânica afeta a remoção de APEO dos lodos das estações de tratamento de esgoto (Mcadam, 2011). A degradação biológica é a que prevalece neste processo, não sendo observado nenhum outro estudo com propostas de outras rotas de degradação, como a abiótica.

## 2.4 Legislação

Regulamentos existem para proteger a população, mas há necessidade de constantemente atualizá-los com base em novos conhecimentos. No entanto, a falta de informações suficientes sobre o comportamento e o destino destas substâncias no ambiente complicam as atividades de organizações internacionais para estabelecer limites e normativas (Iparraguirre, 2012).

Muitos países, incluindo os membros da União Europeia, aprovaram medidas para restringir o uso de AP em aplicações domésticas (Cruceu, 2012). Em termos de legislação ou recomendações, desde o ano 2000, nonil e octilfenol foram inclusos na lista prioritária de substâncias perigosas na Directiva 2000/60/EC; e desde 2003 uma política de redução foi implementada na União Europeia para o nonilfenol (Asimakopoulos, 2012). A Directiva 2008/105/EC do Parlamento Europeu indica que os compostos perigosos devem ser monitorados em águas superficiais (Cruceu, 2012). Esta lista inclui o NP e o OP, com níveis máximos fixados em 2,0 e 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente; e também o NP1EO e o NP2EO, entretanto estes não possuem valores legislados (Sánchez-Avila, 2009).

No Brasil, a legislação ambiental não cita os alquilfenóis como poluentes prioritários. A Resolução CONAMA 430, de 13/05/2011 (Brasil, 2013c), complementar à Resolução CONAMA 357 (Brasil, 2013b), que regulamenta os parâmetros de qualidade de águas superficiais para fins de classificação dos corpos d'água. Apesar da ausência de limites para os alquilfenóis na Resolução CONAMA 430, houve um avanço na avaliação das condições e padrões de lançamento de efluentes ao se incluir critérios de ecotoxicidade (Brasil, 2013c). Estes compostos estão igualmente ausentes da Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25/03/2004 (Brasil, 2013d), revogada com a portaria

2914 de 12/12/11 (Brasil, 2013a), que estabelece os padrões de potabilidade da água para consumo humano.

## **2.5. Métodos para análise dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados**

Para prevenir a perda dos analitos por reações e degradações biológicas, muitos autores tem usado procedimentos para melhorar a estabilidade dos analitos em matrizes ambientais complexas, assegurando a integridade da amostra. Frequentemente, para amostras de água, formaldeído tem sido usado para prevenir a degradação biológica dos alquilfenóis etoxilados, armazenando as amostras em freezer (-20 °C) ou estocando a 4 °C. Nestes estudos não são mencionados os tempos que as amostras podem ser armazenadas antes da análise (Morales, 2009).

Embora a USEPA recomende a acidificação de amostras de água (pH < 3), argumentando que esta seria a melhor forma de preservar os alquilfenóis etoxilados, outros autores consideram que o uso de SPE seja mais eficiente para preservar alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados, do que a utilização de conservantes químicos (formaldeído ou ajuste de pH) e o uso de baixas temperatura (Morales, 2009).

Por estes compostos estarem em baixas concentrações (<  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no ambiente, é necessário o uso de técnicas de pré tratamento das amostras para a eliminação de potenciais interferentes das matrizes, bem como para a pre-concentração destes analitos. Esse procedimento melhora significativamente a detectabilidade do método analítico (Morales, 2009, Cruceiru, 2012).

Os métodos analíticos convencionais usados para extrair alquilfenóis de amostras líquidas são baseados na extração líquido-líquido (LLE), seguidos de cromatografia gasosa ou líquida utilizando diversos detectores (Ying, 2002). Apesar da LLE oferecer resultados precisos e eficientes, mais tempo é consumido e utilizam-se volumes

elevados de solventes, que frequentemente são tóxicos e dispendiosos (Morales, 2009). Para exemplificar, um trabalho utilizou LLE para extrair NP e OP de 200 g de sedimento. Adicionou ao sedimento 200 mL de água Mili-Q, centrifugando por 30 min; o sobrenadante foi removido e o resíduo foi centrifugado com mais 200 mL de água Mili-Q por 15 min. Os sobrenadantes foram combinados e depois realizou-se uma vigorosa agitação com duas porções de 100 mL de diclorometano como solvente na LLE; posteriormente 15 mL de hexano foi adicionado, evaporado até a secura e reconstituído com 100 µL de acetona (Duong, 2009). A recuperação para o NP e para o OP foi de 62,9% e 63,8%, respectivamente; sendo que para uma boa recuperação os valores devem ser de 70 – 120% (Ribani, 2004). Embora esta técnica seja ainda utilizada, existe uma forte tendência em substituir a LLE por SPE (*solid phase extraction*) para amostras líquidas (Morales, 2009). Diversos artigos apresentam métodos que utilizam SPE para extrair os alquilfenóis e seus etoxilados de amostras de água (Zhao, 2009, Zhang Y., 2009; Micic, 2009; Ying, 2002; Asimakopoulos, 2012).

Desenvolvida na década de 80, a extração em fase sólida (SPE) tem se destacado como uma poderosa ferramenta para isolar e purificar substâncias. Este método é uma alternativa à LLE porque reduz o consumo de solventes e o tempo de análise, e também pode ser automatizada. A SPE é uma técnica efetiva para extração de contaminantes em baixas concentrações e tem sido muito utilizada nos últimos anos (Iparraguirre, 2012). Vários tipos de sorventes presentes nos cartuchos, colunas e seringas tem sido empregados com sucesso para a extração ou pré concentração dos alquilfenóis e seus etoxilados. Basicamente, todos os sorventes empregados em SPE para os alquilfenóis e os alquilfenóis etoxilados podem ser utilizados com algumas modificações, gerando três tipos básicos de sorventes: base de sílica, base de polímeros e base de carbono. Sorventes apolares, de fase reversa, com base de sílica, foram os primeiros usados em SPE para compostos de alquilfenóis em amostras de



água. Entre esses sorventes ( $C_2$ ,  $C_8$  e  $C_{18}$ ), o mais utilizado é o  $C_{18}$ . A retenção dos alquilfenóis etoxilados pelo  $C_{18}$  é praticamente feita por interações apolares de Van der Waals entre o analito e o sorvente. Já com sorventes poliméricos as interações não são baseadas somente nas forças de Van der Waals, mas também por interações  $\pi - \pi$  do analito com os anéis aromáticos que compõe a estrutura do sorvente (Morales, 2009).

Alguns métodos incluem uma etapa de derivação dos alquilfenóis e seus etoxilados após a extração e antes da análise cromatográfica (Micic, 2009; Zhang Y., 2009; Ribeiro, 2009b; Ribeiro, 2009a; Zhao, 2009; Hibberd, 2009; Dodson, 2012; Bizkarguenaga 2012; Cacho 2012), porém esta etapa além de aumentar o tempo de análise também pressupõe a utilização de reagentes altamente tóxicos.

Considerando-se a análise por cromatografia líquida, a separação dos alquilfenóis e seus metabólitos em uma única análise apresentam diversas dificuldades que torna complicada a escolha da coluna analítica apropriada e o modo de separação. A fase reversa tem sido muito utilizada para análises dos alquilfenóis etoxilados e de seus metabólitos em LC-MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas). Colunas com fase reversa ( $C_{18}$ ,  $C_8$ ) separam de acordo com a natureza hidrofóbica, então, a mistura dos surfactantes que contém muitas moléculas hidrofóbicas podem ser determinadas corretamente. Entretanto, a separação utilizando fase reversa não é afetada pela quantidade de grupos etoxilados, e apenas os alquilfenóis, os mono e di etoxilados podem ser separados dos outros oligômeros etoxilados, que co-eluem em um único pico, sendo este composto por todos os outros compostos etoxilados que contem mais de três grupos etoxila. Neste caso, a distinção entre os oligômeros com cadeias maiores é realizada somente por detecção com MS, sendo que com outras técnicas, como por exemplo, detecção com UV-DAD, não é recomendada para a determinação de todos os oligômeros dos alquilfenóis etoxilados, pois apresenta baixa seletividade e baixa sensibilidade comparada com outros detectores (Morales, 2009).

Devido a limitação da cromatografia líquida para as substâncias etoxiladas, quando não for utilizado um detector de espectrometria de massas, a maior parte dos trabalhos utiliza cromatografia gasosa com detector de massas (CG-MS) para análise dos alquilfenóis e seus etoxilados em amostras de água de rio. Na Tabela I.5 estão sumarizados alguns destes métodos.

Tabela I. 5: Sumário de alguns trabalhos da literatura que relatam a ocorrência dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados em amostras ambientais.

Ref	País	Matriz	Substâncias	Método	LD e LQ	Concentração nas amostras
Micic, 2009	Austria	Água de rio, sedimento e material particulado	NP, NP1EO, NP2EO, OP, OP1EO, OP2EO	Água: SPE, derivação, CG-MS Sedimento e MP: liofilização, extração com metanol, derivação, CG-MS	Água: LQ = 0,1 µg L <sup>-1</sup> (NP, NP1EO, NP2EO) LQ = 0,005 µg L <sup>-1</sup> (OP, OP1EO, OP2EO) Sedimento e MP: LQ = 0,02 mg kg <sup>-1</sup> (NP, NP1EO, NP2EO) LQ = 0,0015 mg kg <sup>-1</sup> (OP) LQ = 0,0025 mg kg <sup>-1</sup> (OP1EO) LQ = 0,003 mg kg <sup>-1</sup> (OP2EO)	Sedimento: NP = 2,83 mg kg <sup>-1</sup> NP1EO = 2,10 mg kg <sup>-1</sup> NP2EO = 0,28 mg kg <sup>-1</sup> OP = 0,035 mg kg <sup>-1</sup> OP1EO = 0,005 mg kg <sup>-1</sup> OP2EO = 0,007 mg kg <sup>-1</sup> Material particulado NP = 0,18 mg kg <sup>-1</sup> NP1EO = 0,12 mg kg <sup>-1</sup> NP2EO = 0,10 mg kg <sup>-1</sup> OP = 0,003 mg kg <sup>-1</sup> OP1EO = <LD OP2EO = <LD Água: Todas = < LD
Zhang Y., 2009	China	Água de rio	NP, OP	SPE, CG - MS	LQ = 26,1 ng L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 3,6 ng L <sup>-1</sup> (OP)	NP = 75,2 - 1520 ng L <sup>-1</sup> OP = 20,9 - 63,2 ng L <sup>-1</sup>
Zhao, 2009	China	Água de rio	NP, OP	SPE, derivação, CG-MS	LQ = 7,0 ng L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 1,0 ng L <sup>-1</sup> (OP) LD = 2,0 ng L <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,3 ng L <sup>-1</sup> (OP)	NP = 28,1 - 8890ng L <sup>-1</sup> OP = 1,0 - 2470 ng L <sup>-1</sup>
Fernandez-Sanjuan, 2009	Espanha	Lodo de esgoto	NP, NP1EO, NP2EO, OP	Extração com diclorometano e acetona, SPE, CG-MS	LD = 0,9 mg kg <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,3 mg kg <sup>-1</sup> (OP) LD = 0,7 mg kg <sup>-1</sup> (NP1EO) LD = 1,7 mg kg <sup>-1</sup> (NP2EO)	NP = 4,8 - 199 mg kg <sup>-1</sup> NP1EO = 3,2 - 47 mg kg <sup>-1</sup> NP2EO = < LD OP = 0,3 - 23,5 mg kg <sup>-1</sup>
Zhang X., 2009	China	Sedimento	NP, OP	SPE, derivação, CG-MS	LD = 0,05 ng g <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,03 ng g <sup>-1</sup> (OP)	NP = 12,9 - 1159,99 ng g <sup>-1</sup> OP = 1,31 - 13,60 ng g <sup>-1</sup>
Duong, 2009	Coréia do sul	Sedimento	NP, OP	LLE, derivação, CG-MS	LD = 10 ng g <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,5 ng g <sup>-1</sup> (OP)	NP = 57,7 - 367,0ng g <sup>-1</sup> OP = <LD - 10,3 ng g <sup>-1</sup>
Gasperi, 2009	França	Água de rio	4-p-NP, p-tert-OP	LLE, SPE, CG-MS	LQ = 0,01 ng L <sup>-1</sup> (NP, OP)	NP = <LD OP = <LD
Hibberd, 2009	Reino Unido	Água de rio, sedimento	NP, OP	SPE, derivação, MAE, CG-MS	Água LQ = 0,04 ng L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 0,32 ng L <sup>-1</sup> (OP) LD = 0,01 ng L <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,1 ng L <sup>-1</sup> (OP) Sedimento: LQ = 0,27 ng g <sup>-1</sup> (NP) LQ = 0,47 ng g <sup>-1</sup> (OP) LD = 0,08 ng g <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,14 ng g <sup>-1</sup> (OP)	Água NP = <LD - 4,4 ng L <sup>-1</sup> OP = <LD - 37,6 ng L <sup>-1</sup> Sedimento NP = <LD - 11,0 ng g <sup>-1</sup> OP = 4,7 - 31,3 ng g <sup>-1</sup>

OP = octilfenol; OP1EO = octilfenol monoetoxilado; OP2EO = octilfenol dietoxilado; NP = nonilfenol, NP1EO = nonilfenol monoetoxilado; NP2EO = nonilfenol dietoxilado  
LLE = extração líquido - líquido; SPE = extração em fase sólida; MAE = microwave assisted extraction; GC-MS = cromatografia gasosa acoplada com detector espectrômetro de massas; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação

Tabela I.5: continuação

Ref	País	Matriz	Substâncias	Método	LD e LQ	Concentração nas amostras
Ribeiro, 2009b	Portugal	Água de rio	NP, OP	SPE, derivação, HPLC-ECD, CG-MS	LQ = 39,0 ng L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 28,0 ng L <sup>-1</sup> (OP) LD = 13,0 ng L <sup>-1</sup> (NP) LD = 9,0 ng L <sup>-1</sup> (OP)	NP = <LD OP = <LD
Ribeiro, 2009 a	Portugal	Água de rio	NP, OP	SPE, derivação, HPLC -DAD, CG-MS	LQ = 21,8 ng L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 12,0 ng L <sup>-1</sup> (OP) LD = 7,0 ng L <sup>-1</sup> (NP) LD = 3,8 ng L <sup>-1</sup> (OP)	NP = <LD OP = <LD
Lin, 2009	Taiwan	Leite	NP, OP	LLE, SPE, CG-MS	LQ = 1,0 ng g <sup>-1</sup> (NP) LQ = 0,03 ng g <sup>-1</sup> (OP) LD = 0,3 ng g <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,01 ng g <sup>-1</sup> (OP)	NP = 2,9 – 8,8 ng g <sup>-1</sup> OP = <LD – 0,1 ng g <sup>-1</sup>
Moura, 2009	Brasil	Água de rio, esgoto	NP, NP1EO, NP2EO	SPE, CG-MS	LQ = 0,64 mg L <sup>-1</sup> (NP) LQ = 0,890 mg L <sup>-1</sup> (NP1EO) LQ = 0,796 mg L <sup>-1</sup> (NP2EO) LD = 0,21 mg L <sup>-1</sup> (NP) LD = 0,297 mg L <sup>-1</sup> (NP1EO) LD = 0,267 mg L <sup>-1</sup> (NP2EO)	Água NP = < LD – 0,5 µg L <sup>-1</sup> NP1EO = < LD – 4 µg L <sup>-1</sup> NP2EO = < LQ – 1,31 µg L <sup>-1</sup> Esgoto NP = < LD – 267 µg L <sup>-1</sup> NP1EO = < LQ – 2963 µg L <sup>-1</sup> NP2EO = < LQ – 2120 µg L <sup>-1</sup>
Raimundo, 2007	Brasil	Água	NP, OP	SPE, HPLC - DAD	LD = 17ng L <sup>-1</sup> (NP) LD = 20 ng L <sup>-1</sup> (OP)	NP = 218 ng L <sup>-1</sup> OP = 1029 ng L <sup>-1</sup>

OP = octilfenol; OP1EO = octilfenol monoetoxilado; OP2EO = octilfenol dietoxilado; NP = nonilfenol, NP1EO = nonilfenol monoetoxilado; NP2EO = nonilfenol dietoxilado  
LLE = extração líquido – líquido; SPE = extração em fase sólida; GC-MS = cromatografia gasosa acoplada com detector espectrómetro de massas; HPLC-DAD = cromatografia líquida acoplada com detector de arranjo de diodos; HPLC-ECD = cromatografia líquida acoplada com detector de captura de elétrons; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação

A maioria dos métodos encontrados na literatura para análise de alquilfenóis e seus etoxilados realiza a derivação com N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) dessas moléculas, com posterior análise por CG-MS (Micic, 2009; Zhao, 2009a; Zhang X., 2009; Duong, 2009), havendo predominância de estudos envolvendo água de rio. Estudos em material particulado são escassos, e os poucos trabalhos existentes também utilizam a silição antes da análise por GC-MS. Por exemplo, Micic *et al.* (2009) analisaram nonilfenol, octilfenol e seus etoxilados em material particulado do Rio Danubio (Áustria). Para o método foi utilizado 0,5 g de material particulado liofilizado e homogeneizado em almofariz, extração por ASE (*accelerated solvent extraction*) com metanol. O extrato foi evaporado até a secura com fluxo de nitrogênio e derivado com 100 µL de 5% MSTFA/TMIS (*N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/ trimethylsilane iodide*) em solução de hexano. As recuperações situaram-se acima de 79,8%.

Outro aspecto que deve ser considerado é a otimização e validação do método de extração sem o uso da matriz de estudo. Alguns estudos são realizados utilizando água de alta pureza (geralmente obtida de sistema Milli-Q) para obtenção da precisão e exatidão do método, sendo que as análises são realizadas em água de rio, água subterrânea, água pluvial ou marítima, com todas as substâncias presentes nestas amostras, que, possivelmente, acarretarão em algum efeito matriz (Iparraguirre, 2012, Cruceu, 2012, Bizkarguenaga, 2012, Iparraguirre, 2011).

Considerando-se que o material particulado tem características físico-químicas similares às do sedimento do mesmo local, pode-se inferir que os métodos para analisar os alquilfenóis e seus etoxilados em sedimento também

podem ser válidos para analisar estas moléculas em material particulado; com isso, a maioria dos métodos, para ambas as amostras, utiliza a etapa de derivação (Zhang X., 2009; Duong, 2009; Bizkarguenaga, 2012).

Um dos poucos trabalhos da literatura que não utiliza essa etapa é o de CHEN *et al.* (2006), que analisa nonilfenol e octilfenol em sedimento. Este método utiliza 10 g de sedimento na extração com diclorometano, por Soxhlet (48 h), empregando-se 4-tert-butilfenol como *surrogate*. O extrato foi concentrado e adicionou-se hexano. O extrato de hexano foi purificado através de uma coluna de sílica gel (1 cm i.d. x 9 cm). Foi eluído da coluna com 20 mL de diclorometano/ hexano (4:6) e 40 mL de diclorometano/hexano (8:2). O extrato foi concentrado a 0,5 mL sob fluxo de nitrogênio, adicionado 4- $\alpha$ -cumilfenol como padrão interno, e analisado por CG-MS. A recuperação para este método foi de 106 e 87% para nonilfenol e octilfenol, com desvio padrão relativo (RSD) de 5 e 7% para NP e OP, respectivamente, onde não são descritas as concentrações utilizadas para este estudo de recuperação.

Outra observação a ser realizada é que a maioria dos artigos na literatura não menciona como foram obtidos os limites dos métodos, sendo frequente o uso de um simples cálculo empregando o fator de concentração propiciado pelo tratamento da amostra, sobre o valor dos limites instrumentais, que por sua vez também não são obtidos com rigor estatístico (Ribani, 2004).

## 2.6 Avaliação do efeito matriz

A identificação e quantificação de microcontaminantes orgânicos tem se tornado um desafio crescente para a Química Analítica, uma vez que é necessário identificar e quantificar baixas concentrações em matrizes complexas. Ferramentas analíticas altamente seletivas, com detectabilidade cada vez melhor e sensíveis, além de métodos para preparação da amostra, mais rápidos, passíveis de automação e que minimizem o consumo de solventes orgânicos tem sido desenvolvidos com a finalidade de se obter resultados analíticos mais confiáveis, rápidos e econômicos. Para garantir que um método de análise gere resultados confiáveis e adequados para o uso pretendido, deve-se passar por uma avaliação denominada validação, ou seja, o processo de estabelecer o desempenho e limitações de um método e identificar as influências que podem alterar suas características (Eurachem Working Group, 1998).

Os estudos de validação devem, sempre que possível, ser conduzidos para estabelecer um cenário realista, verificando qualquer tipo de interferência, e deverá também abranger os níveis de concentração em que as substâncias são encontradas na matriz estudada (Ellison, 2002). No entanto, a maioria dos artigos e protocolos para validação analítica não mencionam o efeito matriz (Eurachem Working Group, 2012; Thompson, 2002). Componentes da matriz podem afetar as análises, suprimindo ou aumentando o sinal analítico. Resultados indicando recuperações superiores a 100%, ou com baixa precisão são atribuídos a este efeito (Eeckhaut, 2009). O efeito matriz não depende apenas das características dos compostos, mas também das condições analíticas e das características próprias do sistema analítico utilizado.

Na cromatografia a gás, este efeito é atribuído a fenômenos que ocorrem particularmente no injetor, coluna e detector (Poole, 2007). No injetor, a amostra é exposta a temperaturas elevadas e o tempo de residência pode ser suficiente para que os analitos se liguem aos sítios ativos do *liner*. Quando apenas os analitos em solvente são analisados, ocorre a interação com os grupos silanóis da parede interna do *liner*, resultando em uma menor quantidade dos analitos entrando na coluna. Quando a matriz contendo os analitos é injetada, os constituintes polares da própria matriz co-extraídos interagem com o material do *liner*, resultando em uma maior quantidade dos analitos entrando na coluna, gerando um aumento na resposta do detector, obtendo assim recuperações não aceitáveis quando utilizada curva analítica construída com padrões em solvente (Schenck, 2000; Hajšlová, 1998). Este efeito pode ser observado na Figura I.5.



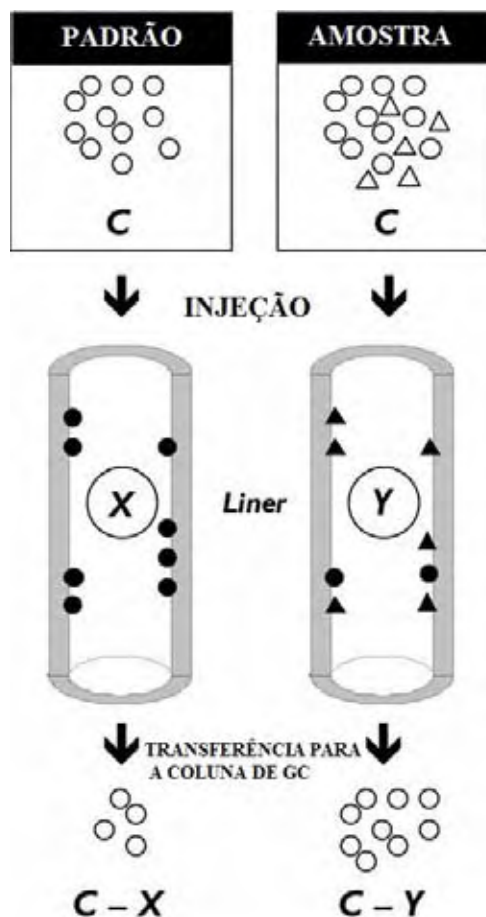


Figura I. 5: Esquema da diferença entre as injeções de solução padrão em solvente e com a amostra (adaptada de Hajšlová, 1998)

No entanto, recentemente, o efeito matriz tem sido mais descrito para sistemas LC-MS/MS e GC-ECD (Zhang, 2011; Nguyen, 2011; Insa, 2007; Vlachos, 2007; Freitas, 2009). Alguns autores descrevem este efeito também para análises com GC-MS, principalmente devido ao tipo do *liner* utilizado (Schenck, 2000). O analisador de íons tipo *ion trap* do espectrômetro de massas também aumenta o efeito matriz devido à superfície de metal do detector em comparação ao detector de chama fotométrica (Schenck, 2000).

Existem várias maneiras de avaliar o efeito matriz. Uma delas (Sánchez-Avila, 2009) é a construção de duas curvas analíticas para os padrões dos

analitos, uma em solvente puro e outra no extrato da matriz em um determinado intervalo de concentrações. As diferenças entre os parâmetros da regressão (coeficientes angulares e lineares) das duas curvas são calculadas para estimar se a matriz tem um efeito positivo (aumento da sensibilidade) ou negativo (diminuição da sensibilidade) sobre os resultados das análises. Um resultado acima de 10% indica a existência do efeito matriz, podendo influenciar a análise quantitativa da amostra (Thompson, 2002).

Outro método para avaliação do efeito matriz é a comparação ponto por ponto da curva de calibração utilizando-se o CV(%) obtido entre a área/concentração na matriz e no solvente, onde a diferença deve ser inferior a 20% (Instituto Nacional de Metrologia, 2012; Cardoso, 2008). As equações que descrevem os cálculos para ambos os métodos, estão apresentadas abaixo.

$$1) \% \text{ efeito matriz} = \left( \frac{\delta_{\text{matriz}} - \delta_{\text{solvente}}}{\delta_{\text{solvente}}} \right) \times 100$$

$$2) CV(\%) = \left( \frac{\bar{x}_a}{\bar{x}_b} \right) \times 100$$

Onde:

$\delta$ : coeficiente angular da curva de calibração

$\bar{x}_a$ : desvio padrão entre a área / concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente

$\bar{x}_b$ : média entre a área / concentração obtida em cada ponto da curva na matriz e no solvente

Havendo o efeito de matriz, avaliado por qualquer dos métodos, é mandatória a utilização de curvas analíticas construídas no extrato da matriz, para assegurar a confiabilidade das análises.

## Capítulo II – Otimização e validação de método para análise de alquilfenóis e seus etoxilados em matrizes ambientais

---

## 1. Introdução

A análise de microcontaminantes orgânicos em matrizes ambientais, que geralmente são complexas, demanda um protocolo analítico que além da pré-concentração dos analitos, para que possam ser quantificados com exatidão e precisão adequada, também se deve incluir um apurado estudo da faixa de aplicação do método e de suas limitações, cujo estudo tem sido denominado validação analítica (Morales, 2009).

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), validação é o processo no qual se obtém a garantia de que o método atende às exigências das aplicações pretendidas, gerando uma maior confiabilidade dos resultados. Alguns parâmetros de confiabilidade presentes na literatura nacional têm como base, em sua maioria, critérios estabelecidos pela ANVISA, INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Ribani, 2004). Dentre esses parâmetros analíticos para a validação de métodos de separação estão: a seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão (repetibilidade) e exatidão (Instituto Nacional de Metrologia, 2012)

Neste Capítulo II toda a parte analítica deste trabalho é apresentada, incluindo a otimização das condições de análise dos alquilfenóis por GC-MS e HPLC-FLD; a otimização das condições de pré-tratamento das amostras por SPE para água superficial e extração sólido-líquido para material particulado, e a avaliação do desempenho do método analítico otimizado, incluindo o estudo do efeito matriz para as duas matrizes de estudo.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes.

Os solventes hexano, metanol, acetonitrila, acetona, diclorometano e acetato de etila utilizados foram da Mallinckrodt (Xalostoc, Mexico), sendo todos grau HPLC.

Os compostos 4-n-nonylphenol (NP) (pureza > 99%), 4-nonylphenol-mono-ethoxylate (NP1EO) (pureza > 98%), 4-nonylphenol-di-ethoxylate (NP2EO) (pureza > 98%), 4-n-octylphenol (OP) (pureza > 99%), 4-octylphenol-mono-ethoxylate (OP1EO) (solução 10ng  $\mu\text{L}^{-1}$  em acetona), 4-octylphenol-di-ethoxylate (OP2EO) (solução 10ng  $\mu\text{L}^{-1}$  em acetona) e 4-n-heptylphenol (HP) (pureza > 99%, padrão interno) foram obtidos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha).

As soluções estoque e as de trabalho foram preparadas em acetato de etila ao se trabalhar com o sistema GC-MS, e, para o sistema HPLC-FLD, foram preparadas em metanol. As soluções-estoque (Tabela II. 1) foram armazenadas a - 4° C por 8 meses. As soluções de trabalho ( Tabela II . 6 e I I . 7) foram preparadas a partir de diluições das soluções-estoque e armazenadas a - 4°C por 4 semanas. Houve esta preocupação no tempo de armazenamento das soluções de trabalho para que não se pudesse propiciar algum comportamento não usual à degradação das substâncias.

Tabela II. 1: Concentrações das soluções estoque para o sistema GC-MS, utilizando acetato de etila como solvente.

<b>Substâncias</b>	<b>Solução padrão inicial (solução estoque) <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>
NP	100
NP1EO	2500
NP2EO	1000
OP	100
OP1EO	2
OP2EO	2
Heptilfenol	100

Os filtros de fibra de vidro (0,45  $\mu\text{m}$  diâmetro de poro, Macherey-Nagel, Alemanha) utilizados para a obtenção do material particulado foram calcinados a 450°C por 120min, esfriados e pesados em seguida, sendo mantidos embrulhados em papel alumínio à temperatura ambiente até o momento de utilização.

Para a extração em fase sólida (SPE) utilizou-se cartuchos Strata-X (200 mg/6mL, Phenomenex, USA).

## 2.2 Limpeza da vidraria e descarte dos resíduos

Os frascos para armazenamento das amostras (vidro âmbar, 4 litros) foram lavados utilizando: a) solução aquosa de 4% de Extran<sup>MR</sup> alcalino deixando-os de molho por 24 horas; b) tríplex enxague com água potável; c) tríplex enxague com água desionizada ou de alta pureza; d) enxague acetona; e) secagem em estufa a 50°C.

Os resíduos gerados nas análises foram descartados em galões de polietileno de alta densidade (20L) devidamente identificados e encaminhados para o Entrepósito de Resíduos do Instituto de Química – Unesp (Araraquara) juntamente com a ficha de identificação correspondente, seguindo procedimentos vigentes nesta instituição.

### **2.3 Acondicionamento das amostras**

As amostras de água foram coletadas em frascos âmbar de 4 L previamente lavados (item 2.2) e, em campo, ambientados com as amostras. As amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório, em caixa isotérmica, utilizando gelo sintético. No laboratório foram imediatamente processadas, incluindo filtração e SPE.

As amostras de material particulado em suspensão foram obtidas a partir dos filtros das amostras de água. Estes filtros foram embalados individualmente em papel alumínio, etiquetados, e armazenados em freezer à -4°C, sendo analisados em duas semanas.

Já para as análises das amostras de água superficial, os cartuchos de SPE foram utilizados logo após o processo de filtração, cujas extrações se processaram até o final diretamente, não havendo a necessidade do armazenamento do cartucho em freezer.

Para a otimização dos métodos foi utilizada a água do Ribeirão das Cruzes, em um ponto considerado com pouca ou nenhuma influência antrópica, situado no Hotel Fazenda Salto Grande (Araraquara, SP) (S21°48'12.94" O48°13'11.46").

## 2.4 Sistema analítico e condições cromatográficas

### 2.4.1 Método cromatográfico para sistema GC-MS e GC-MS/MS

O equipamento utilizado para as análises foi o cromatógrafo a gás (CG) modelo 3800 Varian, equipado com detecção por espectrometria de massas (Saturn 2000), injetor automático split/splitless. O tratamento dos resultados obtidos pelo CG-MS foi realizado através do software Varian Pró Star Workstation 6.9.2. As condições otimizadas do método estão apresentadas na Tabela II.2 e as massas utilizadas na Tabela II.3.

Tabela II. 2: Condições cromatográficas otimizadas para sistema GC-MS

<i>Equipamento</i>	GC 3800 Varian, Massas Saturn 2000
<i>Coluna</i>	Phenomenex (USA), ZB-5MSi (30m, 0,25mm i.d., 0,25µm)
<i>Vazão do gás de arraste (He)</i>	1 mL min <sup>-1</sup>
<i>Temperatura do injetor</i>	250° C
<i>Temperatura da linha de transferência</i>	280° C
<i>Volume de injeção</i>	2µL
<i>Splitless/Split</i>	1/20 (t = 1,5 min)
<i>Gradiente de aquecimento do forno</i>	70° C (1min) --- 15° C/min --- 150° C (1min) --- 8° C/min --- 280° C (6min)



Tabela II. 3: Razão massa/carga características de cada substância

Compostos	m/z ions	Ions de quantificação
NP	220, 107	220
NP1EO	179, 107	179
NP2EO	223, 237	223
OP	206, 107	206
OP1EO	179, 135	179
OP2EO	223, 135	223
Heptilfenol*	192, 107	107

\*padrão interno

Para a otimização do método MS/MS deve-se primeiro desenvolver um método Automated Methods Development (AMD), em que é selecionada a melhor condição de ionização para MS/MS selecionando a melhor energia e o íon pai para ser fragmentado. As melhores energias e fragmento de transição deste método podem ser observados na Tabela II.4.

Tabela II. 4: Condições otimizadas para a análise de alquilfenóis por GC-MS/MS

<i>Substância</i>	<i>Massa Molar (g/mol)</i>	<i>Transição (m/z) (pai → filho)</i>	<i>Energia (V)</i>	<i>Janela do tempo de retenção (min)</i>
NP	220,0	220 → 220	0,50	17,04 – 17,75
NP1EO	249,0	249,0 → 205,2	1,00	17,75 – 20,00
NP2EO	297,2	297,2 → 295,1	0,20	22,00 – 24,50
OP	106,0	106 → 106,9	0,90	13,80 – 15,80
OP1EO	205,2	205,2 → 189,0	0,50	15,80 – 17,04
OP2EO	207,0	207,0 → 191,3	0,80	20,00 – 22,00
Heptilfenol	106,9	106,9 → 106,9	0,40	12,70 – 13,80

#### 2.4.2 Método cromatográfico para sistema HPLC-FLD

O equipamento utilizado para as análises foi o cromatógrafo líquido (HPLC) modelo 920 Varian, equipado com o detector de fluorescência e injetor automático. O tratamento dos resultados obtidos pelo HPLC-FLD foi realizado

através do software Galaxie (versão 1.9.302.530). As condições otimizadas do método estão resentedas na Tabela II. 5.

Tabela II. 5: Condições cromatográficas otimizadas para sistema HPLC-FLD

<i>Equipamento</i>	HPLC 920 Varian, detecção por fluorescência		
<i>Coluna</i>	Phenomenex (USA), Genimi (15cm, 4,6 mm, 5µm)		
<i>Fase móvel</i>	Metanol / Água (80:20%) (modo isocrático)		
<i>Vazão da fase móvel</i>	1mL min <sup>-1</sup>		
<i>Temperatura do forno</i>	30° C		
<i>Volume de injeção</i>	20 µL		
<i>Deteção</i>	Tempo (min)	$\lambda$ excitação (nm)	$\lambda$ emissão (nm)
	0	400	800
	7,5	400	800
	7,6	225	310
	15,0	225	310

Optou-se em apenas trabalhar com o nonilfenol e com o octilfenol no sistema HPLC-FLD devido a não fluorescência das substâncias etoxiladas e a não separação dos oligômeros etoxilados.

#### 2.4.3 Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas

A utilização de diferentes faixas de trabalho foi necessária neste estudo, devido cada sistema de detecção apresentar diferentes detectabilidades para estas substâncias (Tabela II.6 e Tabela II.7). Também foi considerado o fato de

que os alquilfenóis etoxilados estejam em menor concentração no ambiente, sendo utilizadas concentrações maiores para os não etoxilados (Ying, 2002).

Tabela II. 6: Concentrações das soluções padrão de trabalho utilizadas no sistema GC-MS

Pontos da curva	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )						
	OP	OP1EO	OP2EO	NP	NP1EO	NP2EO	HP*
P1	0,01	0,01	0,01	0,5	0,1	0,05	1
P2	0,05	0,02	0,02	1,5	0,3	0,08	1
P3	0,1	0,03	0,03	2,5	0,5	0,1	1
P4	0,5	0,04	0,04	3,5	0,8	0,3	1
P5	1,0	0,05	0,05	5,0	1,0	0,5	1
P6	1,5	0,06	0,06	6,0	1,3	0,7	1
P7	2,0	0,07	0,07	7,0	1,5	0,9	1
P8	2,5	0,08	0,08	8,0	1,8	1,0	1
P9	3,5	0,09	0,09	9,0	2,0	1,3	1
P10	4,0	0,1	0,1	10	2,5	1,5	1

\*padrão interno

Tabela II. 7: Concentrações das soluções padrão de trabalho utilizadas no sistema HPLC-FLD

Pontos da curva	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	OP	NP
P 14	0,004	0,004
P 13	0,006	0,006
P 12	0,008	0,008
P 11	0,02	0,02
P 10	0,04	0,04
P 9	0,06	0,06
P 8	0,08	0,08
P 7	0,1	0,1
P 6	0,2	0,2
P 5	0,4	0,4
P 4	0,6	0,6
P 3	0,8	0,8
P 2	1	1
P 1	5	5

A partir dessas concentrações foi efetuado o teste de Huber (Valente, 2012) para exclusão de pontos anômalos em relação a linearidade em um determinado intervalo de confiança.

O teste de Huber (Valente, 2012), consiste na determinação do intervalo linear, calculando-se a Área/Concentração (A/C) para cada composto em cada nível de concentração. Em seguida é calculada a mediana desses valores e calcula-se a diferença entre os valores de A/C e mediana calculando-se a média dos resultados obtidos. O intervalo de confiança é obtido pela subtração ou adição da mediana com a multiplicação da média por um fator previamente determinado, que pode variar de 2 a 8, sendo 2 o fator mais restritivo. Neste trabalho, a constante utilizada foi  $k=5$ . Após a construção do gráfico, valores que permaneceram fora desse intervalo foram descartados, pois encontraram-se fora da linearidade. As curvas analíticas para cada analito foram construídas a partir dos resultados obtidos pelo teste, tendo na ordenada a relação entre as áreas do analito e do padrão interno ( $A / A_{\text{heptilfenol}}$ ) quando analisada por GC-MS) e na abscissa os valores das concentrações dos analitos. Nas análises por HPLC/FLD os valores da ordenada foram apenas as áreas obtidas para o analito. Como na análise por HPLC a amostra injetada é transferida integralmente para a coluna cromatográfica, não há necessidade do uso do padrão interno para correção de erros devido a transferência parcial da amostra para a coluna, como pode ocorrer em GC.

## **2.5 Método de análise de alquilfenóis em água de rio e material particulado em suspensão**

### **2.5.1 Água de rio**

Para ambos os sistemas de análise (HPLC-FLD e GC-MS), a condição otimizada para tratamento da amostra foi a mesma, diferenciando apenas no solvente utilizado para reconstituição do extrato, imediatamente antes da

análise cromatográfica, sendo utilizado acetato de etila para GC-MS e metanol para HPLC-FLD (Figura II. 1). Previamente à extração (30min), as amostras foram acidificadas com 2% (v/v) de ácido acético.

<b>Condicionamento</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 mL MeOH</li> <li>• 10 mL Água Milli Q</li> </ul>
<b>Amostra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 500mL (acidificada com 2% (v/v) de ácido acético)</li> </ul>
<b>Limpeza</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5mL MeOH/Água Milli Q ( 5:95%)</li> </ul>
<b>Eluição</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10mL DCM/HEX(1:1)</li> <li>• 10 mL DCM/ACE (1:1)</li> </ul>
<b>Secagem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitrogênio</li> </ul>
<b>Ressuspensão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 µL de MeOH (HPLC) ou</li> <li>• 500 µL de HP em ACET. ET. ( 1 µg mL<sup>-1</sup> ) (GC)</li> </ul>

(MeOH : metanol; DCM: diclorometano; HEX: hexano; ACE: acetona; ACET. ET.: acetato de etila; HP: heptilfenol)

Figura II. 1: Condição otimizada para extração em fase sólida (SPE) para água superficial, seguida da análise por HPLC-FLD

### 2.5.2 Material particulado em suspensão

Utilizou-se a extração sólido-líquido, os filtros contendo as amostras foram recortados em pequenos pedaços e colocados em tubos de 40 mL onde foi adicionada a mistura extratora (Figura II. 2).

<b>Amostra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Filtro picado contendo material particulado de 500mL de água de rio</li> </ul>
<b>Mistura extratora</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•10 mL DCM/HEX (1:1) (2x)</li> <li>•10 mL DCM/ACE (1:1) (1x)</li> </ul>
<b>Vórtex</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•1 min</li> </ul>
<b>Ultrassom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•10 min</li> </ul>
<b>Centrífuga</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•10 min a 1700 rpm</li> </ul>
<b>Secagem</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Nitrogênio</li> </ul>
<b>Ressuspensão</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•500 <math>\mu</math>L de Metanol (HPLC) ou</li> <li>•500 <math>\mu</math>L de HP em ACET. ET. (1 <math>\mu</math>g mL<sup>-1</sup>) (GC)</li> </ul>

(DCM: diclorometano; HEX: hexano; ACE: acetona; ACET. ET.: acetato de etila; HP: heptilfenol)

Figura II. 2: Condição otimizada para extração sólido-líquido para material particulado em ambos os sistemas (HPLC-FLD e GC-MS)

## 2.6 Limites de detecção e quantificação do sistema analítico

Para ambos os sistemas (GC-MS e HPLC-FLD), o limite de detecção (LD) foi determinado pela menor concentração do analito que foi possível distinguir da linha de base (método visual). O limite de quantificação (LQ) foi baseado no teste de Huber, como sendo o primeiro valor dentro do intervalo de linearidade.

## 2.7 Precisão e Exatidão do método

A precisão do procedimento analítico foi estimada a partir de triplicatas, tanto das injeções quanto das extrações, sendo expressa como o coeficiente de variação (CV) de 9 resultados (triplicata de extração x triplicata da análise). Para o cálculo do CV utilizou-se o valor do desvio padrão entre as amostras multiplicado por um fator de 100 e dividido pela média entre as medições (Instituto Nacional de Metrologia, 2012).

A exatidão dos métodos foi avaliada através de ensaios de recuperação utilizando amostras enriquecidas com os analitos em três concentrações para cada tipo de matriz (água superficial e material particulado).

## 2.8 Limites de detecção e quantificação dos métodos

Os Limites de Detecção (LD) dos métodos foram calculados utilizando a equação matemática apresentada abaixo (Thier, 1987).

$$LD = \frac{2 \cdot t_{f,95} \cdot \sigma_{com}}{S} \quad \sigma_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_a^2 + (n-1)\sigma_b^2}{m+n-2}}$$

Sendo:

$\sigma_a$  – desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.

$\sigma_b$  – desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra testemunha

m – número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação

n – número de repetições da aplicação do método à amostra testemunha

f – número de graus de liberdade, estimado por m+n-2

S – coeficiente angular da curva analítica

Os Limites de Quantificação (LQ) dos métodos foram estabelecidos como sendo os menores valores de concentração da amostra fortificada que permaneceram dentro do intervalo aceito de recuperação (70 – 120%), com Coeficiente de Variação (CV) inferior a 20% (Thier, 1987).

## **2.9 Avaliação do efeito matriz**

O efeito matriz foi avaliado pela construção de curvas analíticas no extrato da matriz, em comparação com as curvas construídas com os padrões em solvente. A avaliação foi feita através do coeficiente angular da equação obtida na regressão linear da curva. De acordo com Thompson (2002), o efeito matriz pode promover uma influência positiva ou negativa na sensibilidade dos resultados, portanto pode ser calculado através da diferença entre o coeficiente angular da curva feita na matriz e no solvente, multiplicada por 100, sendo aceitável uma diferença de até 10%.

Também foi utilizado o método para avaliação do efeito matriz com a comparação ponto por ponto da curva do analito em solvente com a curva do analito na matriz. A diferença entre o CV(%) obtido entre a área/concentração na matriz e no solvente deve ser inferior a 20% (Instituto Nacional de Metrologia, 2012; Cardoso, 2008).



### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Avaliação da resposta dos sistemas analíticos**

Na aplicação do teste de Huber, os valores situados fora dos limites de confiança para a linearidade não foram incluídos na construção da curva analítica. O CV gerado em cada um dos pontos da curva realizada em triplicata analítica e de injeção (n=9 injeções por ponto) manteve-se abaixo de 20% indicando a repetibilidade do sistema analítico.

Em estudos encontrados na literatura, muitas vezes na construção da curva analítica não são efetuados testes estatísticos para avaliação da linearidade, além do que em alguns casos, a faixa de trabalho sequer abrange as concentrações reais detectadas no ambiente. Dessa forma, os erros encontrados nas curvas analíticas podem ser propagados e levando a resultados equivocados, sejam eles sub ou superestimados.

##### **3.1.1 GC-MS e GC-MS/MS**

###### **3.1.1.1 GC-MS**

Utilizando as soluções preparadas com as concentrações da Tabela II.6, e analisando-as pelo método cromatográfico otimizado, as curvas de linearidade e analíticas foram obtidas, podendo ser visualizadas nas Figuras II. 3 e II. 4, e os parâmetros das curvas na Tabela II. 8.

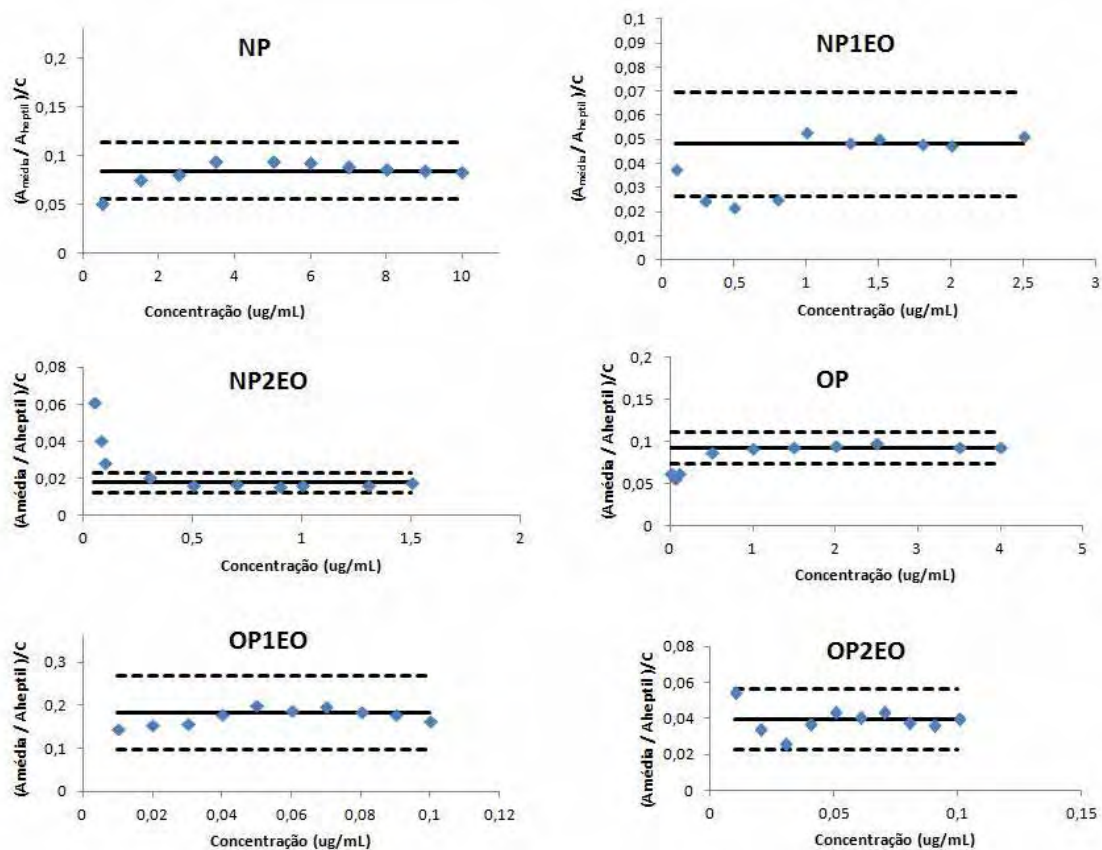


Figura II. 3: Gráficos de linearidade para as substâncias no sistema GC-MS (linha contínua: mediana; linhas pontilhadas: limites superior e inferior).

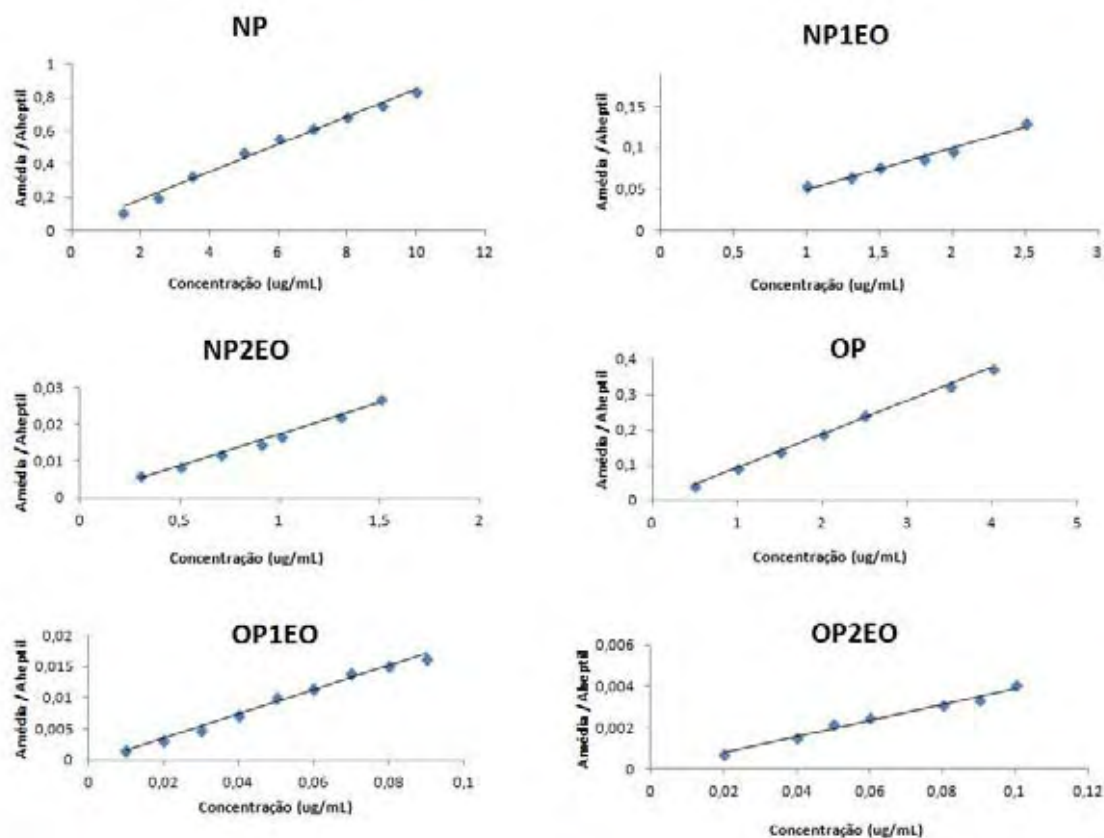


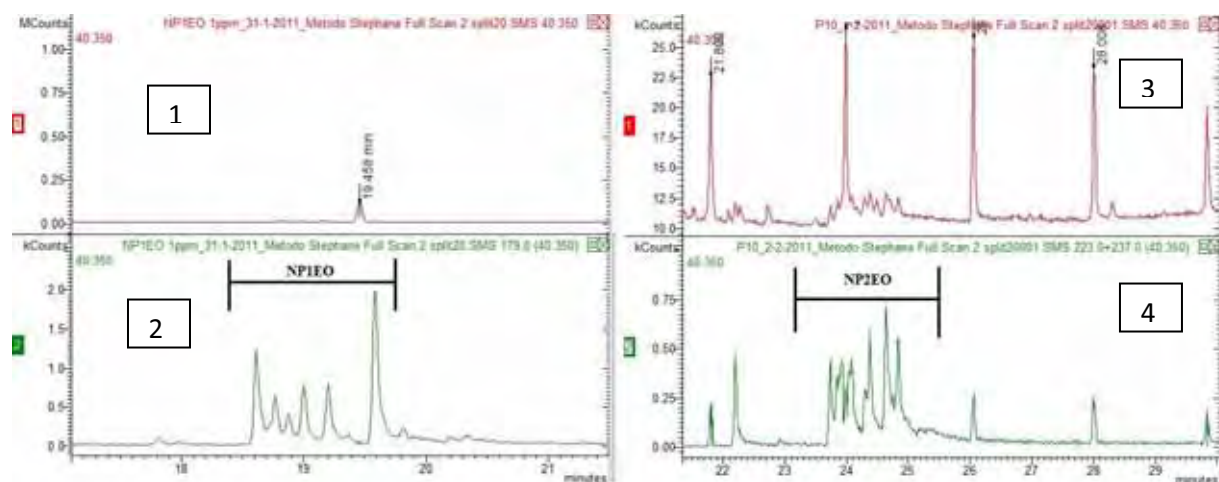
Figura II. 4: Curvas analíticas para as substâncias no sistema GC-MS

Tabela II. 8: Parâmetros das curvas analíticas para o sistema GC-MS

Substâncias	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta	$r^2$
<b>NP</b>	1,5 – 10	$y = 0,02 + 0,08 x$	0,99
<b>NP1EO</b>	1,0 – 2,5	$y = -5,6\text{E-}4 + 0,05 x$	0,98
<b>NP2EO</b>	0,3 – 1,5	$y = 1,42\text{E-}4 + 0,02 x$	0,99
<b>OP</b>	0,5 – 4,0	$y = -6,16\text{E-}4 + 0,09 x$	0,99
<b>OP1EO</b>	0,01 – 0,09	$y = -5,2\text{E-}4 + 0,20 x$	0,99
<b>OP2EO</b>	0,02 – 0,1	$y = 1,11\text{E-}5 + 0,04 x$	0,98

Os coeficientes de correlação das curvas obtidas estão de acordo com os valores indicados pelo INMETRO (acima de 0,98) (Instituto Nacional de Metrologia, 2012). Além disso, considerando o fator de concentração de 1000 vezes que o pré-tratamento possibilita, o intervalo incluído nestas curvas está de acordo com as concentrações ambientais reportadas na literatura.

De acordo com Fernández-Sanjuan (2009), para a obtenção das áreas para o NP1EO e NP2EO deve-se somar os picos característicos, como é mostrado na Figura II. 5, tendo sido adotado este procedimento neste trabalho.



**Figura II. 5:** Cromatogramas de soluções padrão: 1. Full Scan NP1EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 2. Íon extraído NP1EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $m/z = 179$ ), 3. Full Scan NP2EO ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 4. Íon extraído NP2EO ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $m/z = 223+237$ ).

### 3.1.1.2 GC - MS/MS

A técnica GC-MS/MS vem sendo amplamente utilizada, principalmente em análises ambientais, pois através das duas etapas de fragmentação, pode-se obter melhores detectabilidade e sensibilidade na resposta para os analitos (Herbert, 2003).

As mesmas soluções utilizadas para a otimização da análise por GC-MS (Tabela II. 6) foram analisadas no modo MS/MS, onde foram mantidas as mesmas condições cromatográficas (Tabela II. 2). Para tal procedimento foi necessária a otimização da melhor energia de ionização. Vários métodos foram testados, e as melhores condições obtidas estão na Tabela II. 4.

Alguns picos cromatográficos foram obtidos com melhor resolução. As substâncias NP1EO e NP2EO apresentaram apenas um pico no modo MS/MS, visto que no modo MS havia a necessidade da somatória de todos os picos para a obtenção da área total de uma substância (Fernández-Sanjuan, 2009). A diferença dos perfis dos picos cromatográficos entre os modos MS e MS/MS podem ser observados na Figura II. 6.

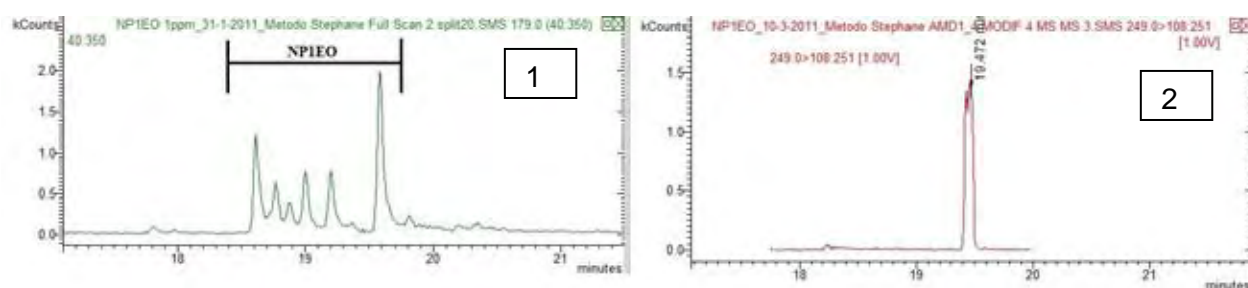


Figura II. 6: Cromatograma de uma solução padrão de NP1EO. (1) Cromatograma do íon extraído (179 m/z) em sistema GC-MS ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); (2) Cromatograma full scan em sistema GC-MS/MS com transição:  $249,0 \rightarrow 205,2 \text{ m/z}$  ( $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Utilizando-se o método GC-MS/MS otimizado, foram construídos os gráficos de linearidade e as curvas analíticas para as substâncias, como podem ser observadas nas Figuras II. 7 e II. 8.

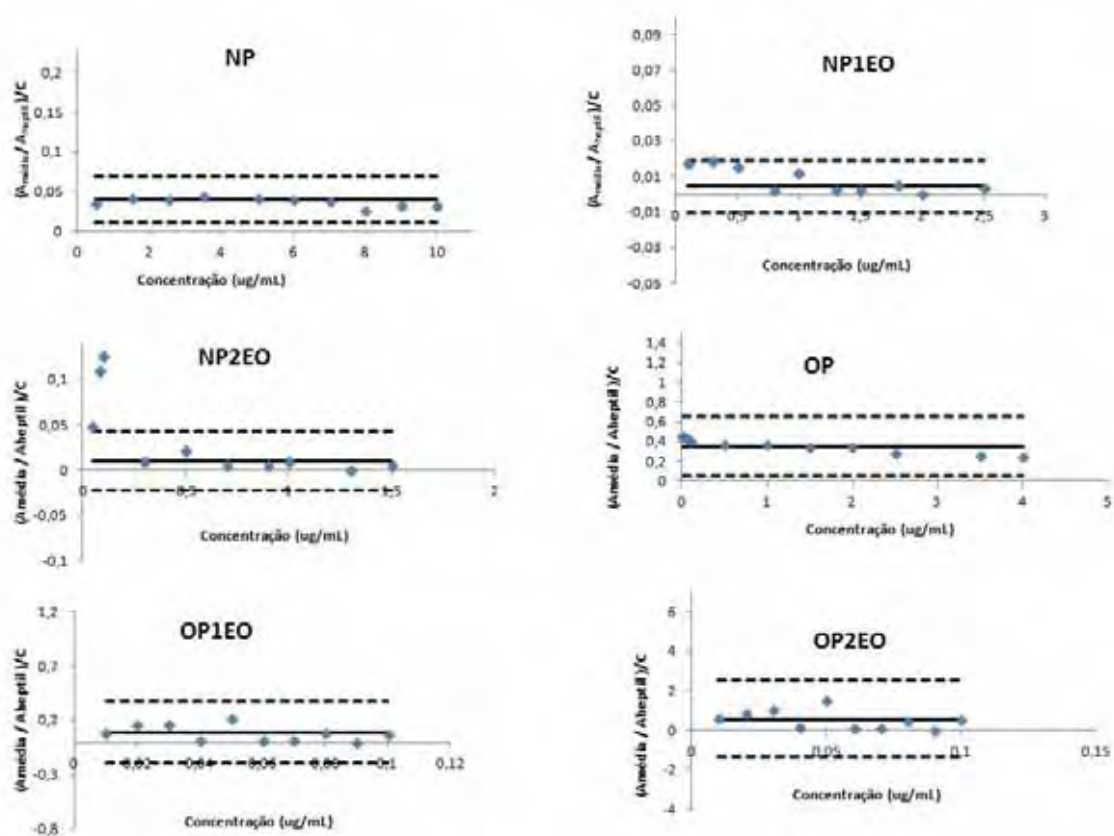


Figura II. 7: Gráficos de linearidade para o sistema GC-MS/MS

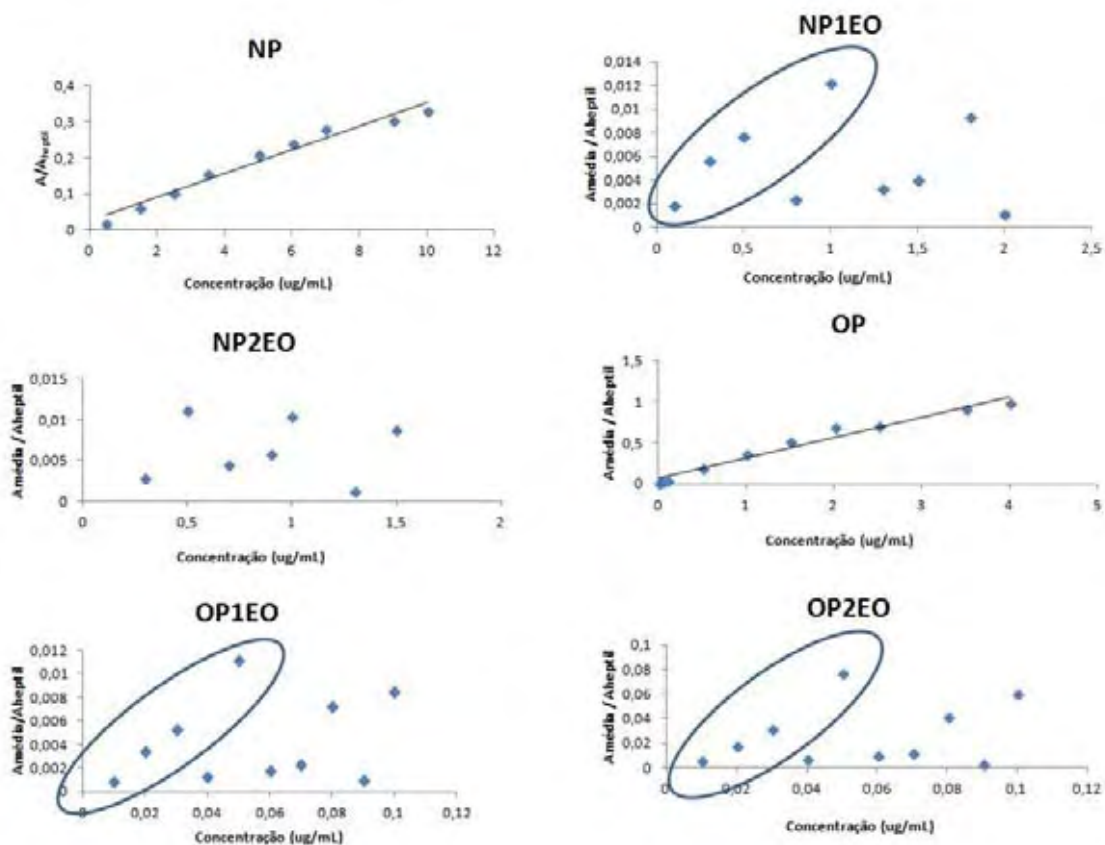


Figura II. 8: Curvas analíticas com o sistema GC-MS/MS

Pode-se observar na Figura II. 8. que, para NP e OP a correlação dos pontos é aceitável ( $r^2 = 0,97$ ; para ambas as substâncias). Já para as substâncias etoxiladas, não houve uma boa correlação entre as concentrações neste intervalo de trabalho. Apenas no trecho com as menores concentrações pode-se observar uma boa correlação. Esta restrição do intervalo de trabalho se torna desinteressante, visto que as concentrações destas substâncias etoxiladas se apresentam no ambiente em uma ampla faixa (décimos de  $\text{ng L}^{-1}$  até centenas de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (Ying, 2002). Com isso, optou-se utilizar o método *full scan* para a quantificação das substâncias e o método MS/MS para análises qualitativas, pois os picos dos etoxilados do NP apresentam melhor resolução do que no modo MS.

### 3.1.2 HPLC-FLD

As curvas de linearidade e analíticas podem ser observadas nas Figuras II. 9 e II. 10, e os parâmetros das curvas na Tabela II. 9.

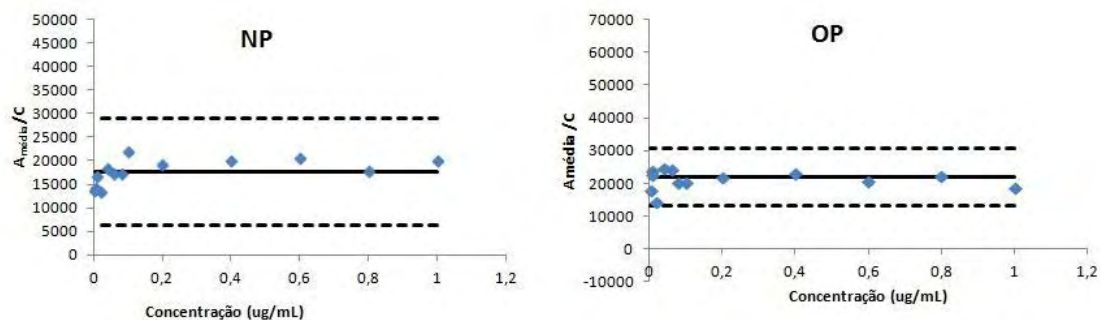


Figura II. 9: Gráficos de linearidade para sistema HPLC-FLD

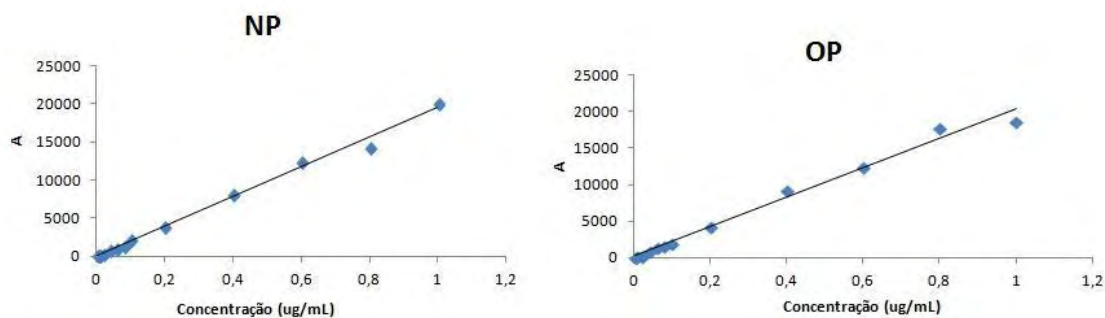


Figura II. 10: Curvas analíticas sistema HPLC-FLD

Tabela II. 9: Parâmetros das curvas analíticas para sistema HPLC-FLD

Substâncias	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação da reta	$r^2$
NP	0,004 – 1	$y = -24,10 + 19509 x$	0,99
OP	0,004 – 0,8	$y = -5,704 + 22014 x$	0,99



Os coeficientes de correlação das curvas obtidas estão de acordo com os valores indicados pelo INMETRO (acima de 0,98) (Instituto Nacional de Metrologia, 2012). Além disso, considerando o fator de concentração de 1000 vezes que o pré-tratamento possibilita, o intervalo incluído nestas curvas está de acordo com as concentrações ambientais reportadas na literatura e são menores do que os obtidos com o sistema GC-MS.

### 3.1.3 Limites de detecção e quantificação instrumentais

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais, determinados de acordo com a seção 2.6, encontram-se na Tabela II. 10 para ambos os métodos cromatográficos.

Tabela II. 10: Valores dos limites de detecção e quantificação instrumentais para sistemas GC-MS e HPLC-FLD

Substâncias	GC-MS		HPLC-FLD	
	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
NP	0,5	1,5	0,004	0,004
NP1EO	0,1	0,1	-----	-----
NP2EO	0,05	0,3	-----	-----
OP	0,01	0,5	0,004	0,004
OP1EO	0,01	0,01	-----	-----
OP2EO	0,01	0,02	-----	-----

Pode-se observar que os limites para o nonil e octilfenol são menores no sistema HPLC-FLD do que no GC-MS. Estas duas substâncias são confirmadas como alteradores endócrinos (Ying, 2002), sendo que há muitas controvérsias sobre o poder estrogênico de seus etoxilados (Ghiselli, 2007). Com isso, a utilização do HPLC-FLD se torna interessante nas análises das

amostras de interesse deste estudo, pois as concentrações que são quantificadas em amostras de água são da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Ying, 2002; Bergé, 2012). Como as amostras passarão por um processo de extração e pré-concentração (SPE), nos extratos a concentração deverá ser da ordem de  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **3.1.4 Comparação entre os sistemas HPLC-FLD, GC-MS e GC-MS/MS**

Apesar da técnica GC-MS ser a mais utilizada na literatura para a análise desta classe de substâncias, pode-se observar que os limites utilizando HPLC-FLD são muito menores quando comparados aos limites da técnica GC-MS. Embora não seja possível analisar os alquilfenóis etoxilados por HPLC-FLD, os limites são muito menores para o nonilfenol e octilfenol, sendo estes os mais apontados como alteradores endócrinos. Apesar do GC-MS não ter os mais baixos limites deste estudo, pode-se utilizar esta técnica para a identificação das substâncias etoxiladas em amostras ambientais. Como a sensibilidade da GC-MS/MS não é aceitável para os etoxilados, esta técnica pode ser utilizada para a identificação e confirmação dos etoxilados, sendo que é uma técnica mais precisa na identificação de substâncias devido a sua fragmentação sequencial e picos com melhor resolução do que quando se utiliza a GC-MS. Como não foi possível a otimização do método de extração para o sistema GC-MS devido a problemas técnicos do equipamento, e a baixa detectabilidade do sistema GC-MS/MS, optou-se em analisar apenas o nonilfenol e o octilfenol nas amostras ambientais, e para alguma possível confirmação utilizar os

sistemas GC-MS e GC-MS/MS apenas para confirmação do pico através do fragmentograma.

## **3.2 Precisão e Exatidão do método**

### **3.2.1 HPLC-FLD**

#### **3.2.1.1 *Água de rio***

Um primeiro estudo de recuperação, utilizando a fortificação de água subterrânea (mais próxima da amostra real), foi realizado utilizando o cartucho Strata-X. Foram efetuadas, em triplicata, as seguintes extrações: a) branco (sem a amostra), b) testemunha (amostra sem analito), c) amostra fortificada com nível intermediário da curva analítica ( $100 \text{ ng L}^{-1}$ ), d) ponto na matriz (extrato da amostra não fortificada com ressuspensão com solução padrão em solvente ( $0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O tempo de fortificação foi de 2h. As condições do procedimento da extração podem ser visualizadas na Figura II. 1, contudo, apenas os solventes de eluição foram modificados para tentar se obter condições aceitáveis para se validar o método neste primeiro estudo de otimização. Foram avaliados quatro proporções de solventes de eluição: 10 mL de acetonitrila/ acetona (50:50 v/v), 10 mL de acetonitrila/metanol (70:30 v/v), 10 mL de acetonitrila/metanol ( 30:70 v/v) e 4mL de metanol seguido de 4mL de acetonitrila e 4mL de acetona.

As recuperações foram calculadas através do ponto matriz, visto que há coeluição dos picos de interferentes com os analitos, como pode ser observado na Figura II.11.

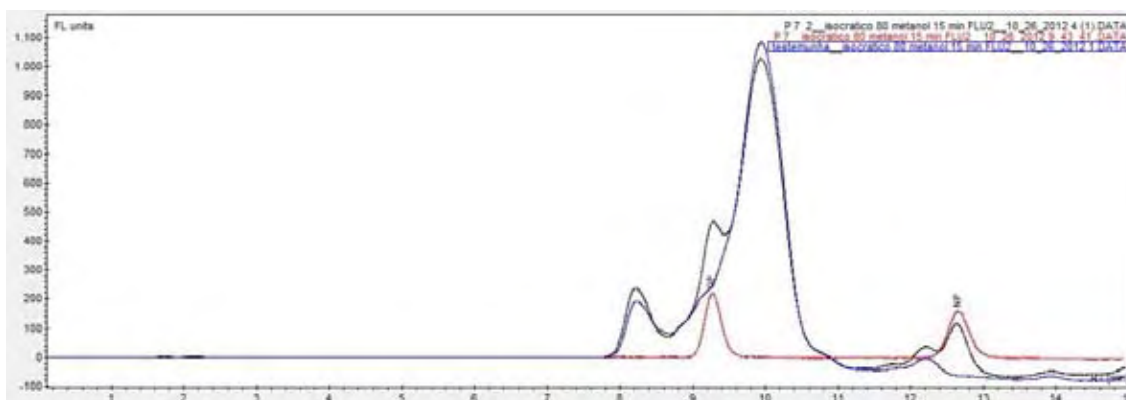


Figura II. 11: Cromatogramas: Testemunha (azul); Ponto na matriz  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (preto); Ponto em solvente  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (vermelho).

Os valores das recuperações obtidas podem ser visualizados na Tabela II. 11.

Tabela II. 11: Valores das recuperações utilizando diferentes solventes de eluição com sistema HPLC-FLD

Eluente na SPE	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
ACN ACE 50:50	104	43	42	124	20	16
ACN MeOH 70:30	42	1	2	90	18	20
ACN MeOH 30:70	29	10	36	90	3	3
ACN ACE MeOH	56	10	18	91	3	3

MeOH = metanol; ACN = acetonitrila; ACE = acetona  
 Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.  
 \*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

O método utilizando Acetonitrila/Acetona (50:50 v/v) não foi satisfatório devido ao CV elevado (42%). Os métodos utilizando Acetonitrila/Metanol (70:30 v/v) e (30:70 v/v) também não foram satisfatórios devido ao elevado CV (20 e 36%) e baixas recuperações para o nonilfenol (42 e 29%). Portanto, o método

escolhido para o procedimento de validação foi o que utiliza a eluição sequencial com metanol, acetonitrila e acetona.

Optou-se por utilizar água do próprio manancial Ribeirão das Cruzes para a validação do método de extração. A validação consistiu na fortificação de amostras de água em três níveis de concentração (800 ng L<sup>-1</sup>, 100 ng L<sup>-1</sup> e 20 ng L<sup>-1</sup>), sendo efetuada a extração e a análise em triplicata. As recuperações podem ser observadas na Tabela II. 12.

Tabela II. 12: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações utilizando acetonitrila, metanol e acetona, sequencialmente, na eluição da SPE. Análise por HPLC-FLD.

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
<b>Nível 1</b> 800 ng L <sup>-1</sup>	13	1	7	45	2	5
<b>Nível 2</b> 100 ng L <sup>-1</sup>	n.r.	-----	-----	90	12	14
<b>Nível 3</b> 20 ng L <sup>-1</sup>	n.r.	-----	-----	85	9	11

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

n.r. = não recuperado

Pode-se observar que para os níveis 2 e 3 não foi possível a identificação do pico do nonilfenol. Optou-se por refazer este estudo, pois o nível 2 foi satisfatório no teste anterior para a seleção do solvente de eluição. Desta maneira, aumentando-se a concentração do nível 3 para que fosse possível a identificação do pico, passando de 20 ng L<sup>-1</sup> para 40 ng L<sup>-1</sup>. As recuperações podem ser observadas na Tabela II.13.

Tabela II. 13: Recuperação obtida em segunda avaliação de método para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações utilizando acetonitrila, metanol e acetona, sequencialmente, na eluição da SPE. Análise por HPLC-FLD.

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
Nível 1 800 ng L <sup>-1</sup>	37	2	5	64	2	3
Nível 2 100 ng L <sup>-1</sup>	44	1	3	82	14	17
Nível 3 40 ng L <sup>-1</sup>	n.r.	-----	-----	85	4	5

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

n.r. = não recuperado

Mais uma vez o terceiro nível, com menor concentração, não foi satisfatório. Não foi possível a visualização do pico do nonilfenol. Já os outros dois níveis de concentração apresentaram recuperações satisfatórias para o octilfenol (64-85%) e não satisfatórias para o nonilfenol (37-44%). Com esses resultados optou-se por testar um nível mediano da curva analítica adicionando ou não ácido na amostra previamente à extração. O efeito do pH das amostras também possui grande relevância, pois o meio ácido evita a ionização dos alquilfenóis, o que soluciona um relevante problema, pois as moléculas em estado não iônico (protonadas) possuem caráter mais apolar o que facilita a retenção dos analitos no sorvente e, quando em estado iônico há uma maior interação com a matéria orgânica presente na água do rio (Cruceu, 2012).

Utilizando água de rio coletada no mesmo ponto anteriormente descrito (sessão 2.3), foram efetuadas em duplicatas de extração, as análises de um branco de solvente (sem a amostra), testemunha (amostra sem fortificação), amostras fortificadas com nível de concentração (400 ng L<sup>-1</sup>) e um ponto matriz (0,4 µg mL<sup>-1</sup>). O tempo de fortificação foi de 2h. Avaliou-se o desempenho das mesmas proporções de solventes: 10 mL de acetonitrila/ acetona (50:50 v/v),

10 mL de acetonitrila/metanol (70:30 v/v), 10 mL de acetonitrila/metanol (30:70 v/v) e 4mL de metanol seguido de 4mL de acetonitrila e 4mL de acetona, adicionando ou não 10mL de ácido acético nas amostras antes do procedimento de extração deixando em contato por 30min prévios às extrações. Os valores de recuperação obtidos podem ser visualizados nas Tabelas II. 14 e II. 15.

Tabela II. 14: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a 400 ng L<sup>-1</sup>, acidificada com ácido acético (2% v/v). Análise por HPLC-FLD.

Eluente na SPE	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
ACN ACE 50 50	38	3	8	92	3	3
ACN MeOH 70 30	32	9	29	105	2	2
ACN MeOH 30 70	28	1	2	86	6	6
ACN ACE MeOH	24	3	11	97	8	9

ACN = acetonitrila, MeOH = metanol, ACE = acetona

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de duas extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 6

Tabela II. 15: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a 400 ng L<sup>-1</sup>, sem acidificação. Análise por HPLC-FLD.

Eluente na SPE	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
ACN ACE 50 50	n.r.	-----	-----	67	9	13
ACN MeOH 70 30	n.r.	-----	-----	65	1	1
ACN MeOH 30 70	n.r.	-----	-----	94	11	12
ACN ACE MeOH	n.r.	-----	-----	70	6	9

ACN = acetonitrila, MeOH = metanol, ACE = acetona

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de duas extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 6

n.r. = não recuperado

Observando-se as Tabelas II.14 e II.15 pode-se avaliar que com a adição de ácido acético houve a protonação do nonilfenol e com isso não ocorreu a interação entre este e a matéria orgânica, interagindo mais com o sorvente do cartucho, aumentando assim os valores de recuperação quando se adiciona ácido acético na amostra previamente ao procedimento de extração. Apesar de se observar uma maior recuperação para especificamente o nonilfenol, optou-se por avaliar outros solventes para que a recuperação atendesse os parâmetros ideais de um método validado. De acordo com Thompson (2002) a recuperação de um método validado deve estar entre 70-120%, com CV abaixo de 20%.

Utilizando água de rio (coletada no mesmo ponto anteriormente descrito) foram efetuadas extrações em triplicata, de um branco de solvente (sem a amostra), testemunha (amostra sem fortificação) e amostras fortificadas com nível de concentração ( $400 \text{ ng L}^{-1}$ ). O tempo de fortificação foi de 2h, sendo adicionados 10mL de ácido acético 30min antes da extração por SPE. Avaliou-se a eluição sequencial com os solventes nas seguintes proporções: 10mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL diclorometano/acetona (1:1 v/v), por possuírem uma maior extractibilidade em relação ao metanol, acetonitrila e acetona. Os valores das recuperações calculados com o ponto na matriz podem ser visualizados na Tabela II. 16.



Tabela II.16: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos a  $400 \text{ ng L}^{-1}$ , não acidificada ou acidificada com ácido acético (2% v/v), utilizando 10mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL diclorometano/acetona (1:1 v/v), sequencialmente, como eluentes na SPE. Análise por HPLC-FLD.

Adição de ácido	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
SIM	81	3	4	98	3	3
NÃO	61	7	11	93	1	1

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

Para OP não houve diferença significativa pela adição de ácido, enquanto que para NP observou-se melhor recuperação e CV quando utilizada a acidificação. Com isso, para o estudo de validação do método empregou-se a fortificação em três níveis de concentração ( $800 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $80 \text{ ng L}^{-1}$  e  $20 \text{ ng L}^{-1}$ ), acidificando-se a amostra antes da extração (10mL de ácido acético), de acordo com a Figura II. 1. O cálculo dos valores das recuperações utilizaram as áreas dos pontos na matriz, e podem ser observados na Tabela II. 17.

Tabela II. .17: Recuperação obtida para amostra de água superficial fortificada com os analitos em três concentrações e acidificada com ácido acético (2% v/v), utilizando 10mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL diclorometano/acetona (1:1 v/v). Análise por HPLC-FLD.

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
<b>Nível 1</b> $800 \text{ ng L}^{-1}$	67	21	32	98	5	5
<b>Nível 2</b> $80 \text{ ng L}^{-1}$	108	7	7	94	3	3
<b>Nível 3</b> $20 \text{ ng L}^{-1}$	105	2	2	89	1	1

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

A recuperação de 67% com CV de 32% para o nonilfenol no primeiro nível ( $800 \text{ ng L}^{-1}$ ) não está dentro do indicado por Thompson (2002) para a validação

do método, mas para amostras ambientais complexas e com constantes mudanças em sua composição, esta recuperação está aceitável neste estudo (Ribani, 2004). Uma explicação para a baixa recuperação em concentrações mais elevadas pode ser a saturação da fase estacionária do cartucho de extração. Dependendo da complexidade da amostra e da quantidade dos analitos, os sítios ativos do sorvente do cartucho ficam saturados, com isso, o “excesso” dos analitos acabam passando sem interagir com o sorvente do cartucho. Neste estudo o método foi considerado validado, pois no ambiente os alquilfenóis estão em baixíssimas concentrações (Bergé, 2012, Ying, 2002), e os outros dois níveis (concentrações da ordem de dezenas de  $\text{ng L}^{-1}$ ) apresentaram resultados satisfatórios.

Para a avaliação do efeito matriz foi utilizado o método descrito na Figura II. 1, mas após a secagem em fluxo de nitrogênio, o extrato foi redissolvido com  $500\mu\text{L}$  de cada nível de fortificação em metanol. Um branco (sem amostra), uma testemunha (amostra sem fortificação), e seis níveis de extratos fortificados ( $0,006\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,02\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,06\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,4\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,8\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram preparados para a construção da curva analítica na matriz em triplicata de extração. As curvas podem ser observadas na Figura II. 12, e os parâmetros das curvas na Tabela II. 18.

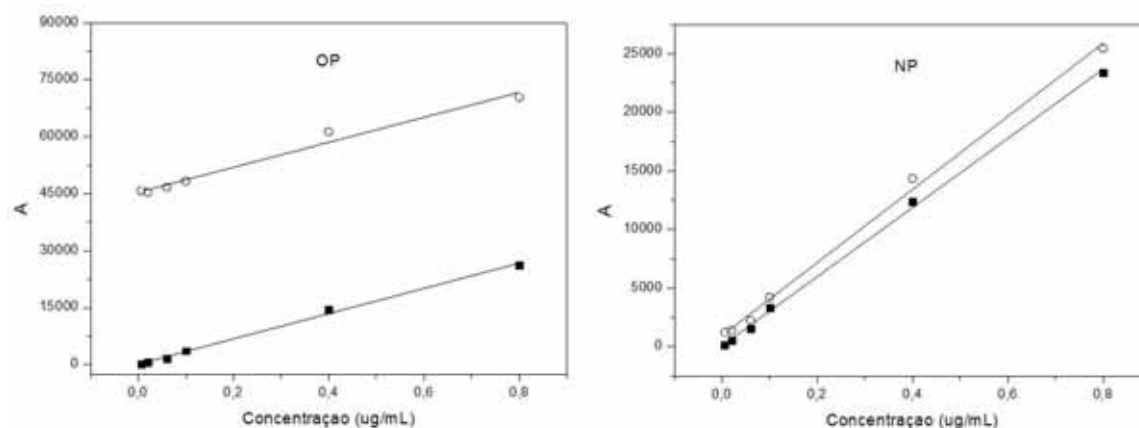


Figura II. 12: Curva analítica referente à matriz água superficial no sistema HPLC-FLD (símbolo vazado : curva no extrato, símbolo cheio: curva em solvente)

Tabela II. 18: Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos de amostras de água superficial com método validado para sistema HPLC-FLD (n=3)

Substâncias	Solvente		Extrato		Efeito Matriz (%)
	Equação da reta	$r^2$	Equação da reta	$r^2$	
NP	$y = 29506,7 x + 73,58$	0,99	$y = 31201,2 x + 937,1$	0,99	6
OP	$y = 33219,8 x + 123,1$	0,99	$y = 32870,2 x + 45370,2$	0,98	1

Através da comparação dos coeficientes angulares das curvas em solvente e em extrato, não é observado efeito matriz para esta amostra. Mas é visualmente evidente que há um aumento da área na curva na matriz em relação à curva no solvente para o octilfenol devido à contribuição de outras substâncias da matriz.

Outro método utilizado para avaliar o efeito matriz foi o que se compara ponto a ponto as curvas através do CV. As concentrações dos níveis podem ser observadas na Tabela II 19.

Tabela II 19: Concentrações dos níveis do teste ponto a ponto utilizando o CV as áreas das curvas analítica e na matriz água superficial. Análise por HPLC-FLD.

<b>Níveis</b>	<b>Concentrações de NP e OP (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>
1	0,006
2	0,02
3	0,06
4	0,1
5	0,4
6	0,8

Dessa forma, apesar de não ter sido observado efeito matriz utilizando o coeficiente angular das curvas geradas, pode-se constatar esse efeito para todas as concentrações estudadas para o octilfenol, e para o nonilfenol esse efeito é observado nas menores concentrações, como mostra a Figura II. 13.

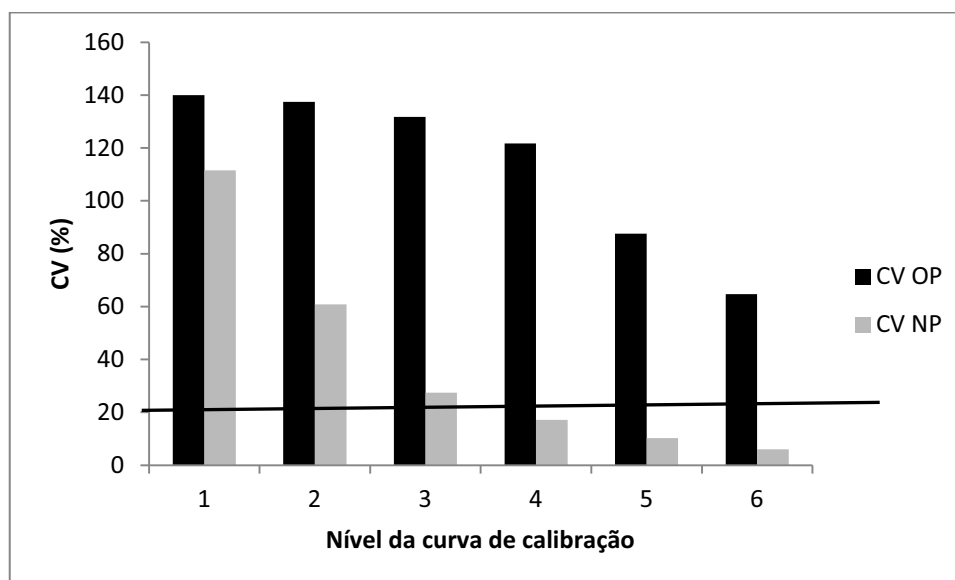


Figura II. 13: Coeficientes de variação (CV) obtidos para análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz água superficial. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

Considerando-se essas informações, a quantificação das amostras foi realizada utilizando a curva na matriz para ambos analitos.

Com o método validado pode-se obter o limite de quantificação do método como citado na sessão 2.8. Além de todos os parâmetros de validação já mencionados, foi possível avaliar também a robustez do método, pois foram realizados diferentes testes alterando os solventes de eluição da SPE, em que não apresentaram diferença significativa. Para ambas as substâncias, NP e OP, o limite de quantificação foi igual a 20 ng L<sup>-1</sup>.

É oportuno citar que alguns artigos da literatura não diferenciam os limites instrumentais dos limites do método. Ao comparar o limite de quantificação do método proposto neste trabalho com trabalhos que citam os limites de quantificação dos métodos, pode-se observar que está abaixo ou bem próximo dos citados na literatura mesmo utilizando HPLC-FLD, sendo que a maioria dos trabalhos utilizam GC-MS. Por exemplo, Micic (2009) obteve limite de quantificação igual a 100 ng L<sup>-1</sup> para NP e OP, Zhang Y. (2009) igual a 26,1 ng L<sup>-1</sup> para NP e 3,6 ng L<sup>-1</sup> para OP e Ribeiro (2009) igual a 39 ng L<sup>-1</sup> para NP e 28 ng L<sup>-1</sup> para OP; sendo água superficial a matriz utilizada para estes estudos.

Já os limites de detecção não foram possíveis de calcular neste trabalho, devido à influência dos interferentes, apresentando um acréscimo nas áreas dos analitos, alterando os resultados dos cálculos.

### ***3.2.1.2 Material particulado em suspensão***

Um primeiro estudo de recuperação com material particulado em suspensão foi baseado em Fernández-Sanjuan (2009), realizado de acordo com o procedimento da Figura II. 2. Foram efetuadas, em triplicata, as

seguintes extrações: a) branco (sem a amostra), b) testemunha (amostra sem fortificação), c) amostra fortificada com  $6,1 \mu\text{g g}^{-1}$ , d) ponto matriz (extrato de amostra não fortificada com ressuspensão com solução padrão em solvente ( $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O tempo de fortificação foi de 2h. A massa média de material particulado em suspensão por filtro foi de 16,32 mg. Os valores das recuperações foram calculados em relação ao ponto matriz, e podem ser observados na Tabela II. 20.

Tabela II. 20: Recuperação obtida para amostra de material particulado fortificado ( $6,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ) com os analitos, utilizando extração sequencial com 10 mL diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10 mL diclorometano/acetona (1:1 v/v) com agitação (vortex) seguida de extração em banho de ultrassom (Figura método.) Análise por HPLC-FLD.

Fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
$6,1 \mu\text{g g}^{-1}$	102	11	11	99	13	13

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

Apesar da boa qualidade destes resultados, optou-se por realizar um teste que pudesse eliminar a utilização de diclorometano. Assim, empregando-se amostras fortificadas com  $5,4 \mu\text{g g}^{-1}$ , utilizou-se a extração com 3 porções de 10mL de acetonitrila/metanol (70:30) e extração sequencial utilizando 10mL de metanol, 10mL de acetonitrila e 10mL de acetona. A massa média de material particulado em suspensão por filtro foi de 18,66 mg. Os valores das recuperações foram calculados em relação ao ponto matriz, e podem ser observados na Tabela II. 21.

Tabela II. 21: Recuperação obtida para amostra de material particulado fortificado ( $5,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) com os analitos, utilizando extração sequencial com metanol, acetonitrila e acetona (10mL de cada) e 3 etapas com 10mL acetonitrila/metanol (70:30%), ambos com agitação (vortex) seguida de extração em banho de ultrassom. Análise por HPLC-FLD.

Solventes de eluição	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
MeOH ACN ACE	59	3	4	104	25	24
ACN MeOH 70 30	74	5	6	66	21	31

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

Os valores das recuperações para o nonilfenol não foram tão satisfatórios utilizando metanol, acetonitrila e acetona, como também o CV ficou elevado para o octilfenol.

O procedimento de validação do método foi realizado utilizando os solventes da Figura II. 2, pois apresentaram os melhores resultados nos testes anteriores. Os resultados das recuperações estão na Tabela II. 22.

Tabela II. 22: Resultados obtidos para as recuperações dos três níveis da curva analítica para análise de material particulado utilizando 10 mL de diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10 mL de diclorometano/acetona (1:1 v/v) como solventes de extração para sistema HPLC-FLD.

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
Nível 1 $464 \mu\text{g g}^{-1}$	85	1	1	91	2	2
Nível 1 $3,1 \mu\text{g g}^{-1}$	65	12	18	110	16	14
Nível 1 $0,63 \mu\text{g g}^{-1}$	106	10	9	112	24	22

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de três extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 9

De acordo com os valores da Tabela II. 22 o método foi validado para material particulado em suspensão com recuperações (65-112%) e CV (1 – 22%) satisfatórios para este estudo.

Para a avaliação do efeito matriz foi utilizado o método descrito na Figura II. 2, mas após a secagem em fluxo de nitrogênio, o extrato foi redissolvido com 500 $\mu$ L, de cada nível de fortificação, em metanol. Um branco (sem amostra), uma testemunha (amostra sem fortificação), e cinco níveis de extratos fortificados (0,04  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 0,08  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 0,2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 0,6  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, 1,0  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) foram preparados para a construção da curva analítica na matriz, em triplicata. A massa média de material particulado em suspensão por filtro foi de 9,77 mg. As curvas podem ser observadas na Figura II. 14, e os parâmetros das curvas na Tabela II. 23.

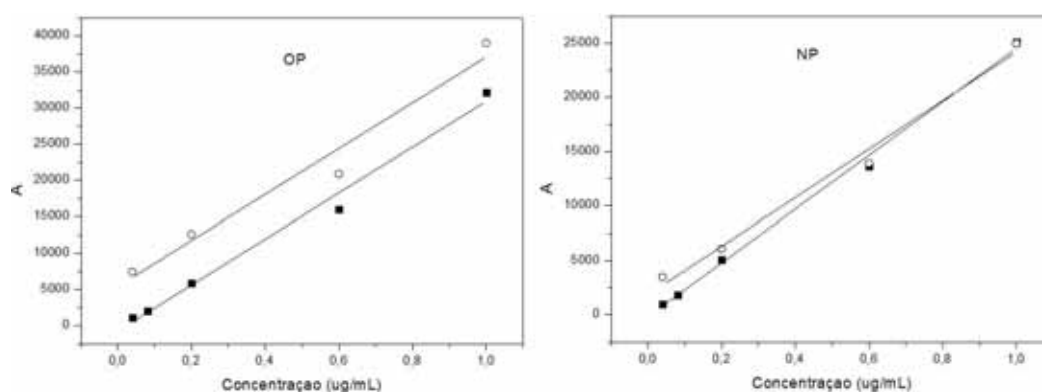


Figura II.14: Curva na matriz para amostra de material particulado em suspensão com sistema HPLC-FLD (símbolo vazado : curva no extrato, símbolo cheio: curva em solvente)

Tabela II. 23: Parâmetros das curvas analíticas construídas em solvente e nos extratos de amostras de material particulado em suspensão para sistema HPLC-FLD (n=3)

Substâncias	Solvente		Extrato		Efeito Matriz (%)
	Equação da reta	r <sup>2</sup>	Equação da reta	r <sup>2</sup>	
NP	y = 24658,7 x - 146,9	0,99	y = 22284,6 x +1857,1	0,98	10
OP	y = 31653,1 x - 730,9	0,99	y = 31630,4 x + 5418,7	0,96	0,07



Através da comparação dos coeficientes angulares das curvas em solvente e em extrato, não é observado efeito matriz. Mas é visualmente evidente que há um aumento da área na curva na matriz em relação à curva no solvente para o octilfenol devido à contribuição de outras substâncias da matriz.

Utilizando o método que realiza a comparação ponto a ponto através do CV, pode-se também avaliar o efeito matriz. As concentrações dos níveis podem ser observadas na Tabela II. 24.

Tabela II. 24: Concentrações dos níveis do teste ponto a ponto utilizando o CV as áreas das curvas analítica e na matriz água superficial. Análise por HPLC-FLD.

<i>Níveis</i>	<i>Concentrações de NP e OP (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</i>
1	0,04
2	0,2
3	0,6
4	1

Dessa forma, apesar de não ter sido observado efeito matriz utilizando o coeficiente angular das curvas geradas, pode-se constatar esse efeito para as menores concentrações estudadas para ambas as substâncias, como mostra a Figura II. 15.

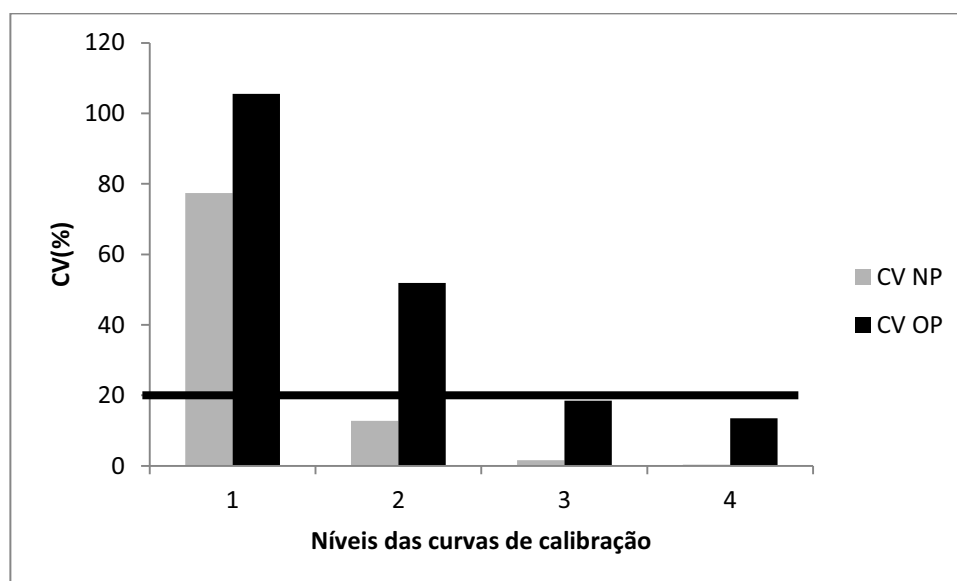


Figura II. 15: Coeficientes de variação (CV) obtidos para análises dos padrões em solvente e no extrato da matriz material particulado em suspensão. Linha em destaque corresponde ao valor de CV igual a 20%.

Considerando-se estes resultados, a quantificação das amostras foi realizada utilizando a curva na matriz para ambos analitos.

Com o método validado pode-se obter o limite de quantificação do método como citado na sessão 2.8. Além de todos os parâmetros de validação já citados, foi possível avaliar também a robustez do método, pois foram analisados testes com diferentes massas de amostra, por exemplo. Para ambas as substâncias, NP e OP, o limite de quantificação foi igual a  $0,63 \mu\text{g g}^{-1}$ .

A comparação dos limites de quantificação dos alquilfenóis encontrados neste estudo com os encontrados por outros autores devem ser interpretados com cautela, devido principalmente aos diferentes procedimentos de amostragem, a quantidade de massa de material particulado analisado, ao número de amostras estudadas e aos diferentes métodos de quantificação (levando a limites de quantificação diferentes); nem sempre descritos nos trabalhos. Com isso, se torna mais interessante a comparação do limite obtido

neste estudo com as concentrações encontradas no ambiente. Por exemplo, Bergé (2012) relata concentrações de até  $8,39 \mu\text{g g}^{-1}$  de NP em amostras de material particulado em suspensão. Loyo-Rosales (2007) apresenta concentrações de NP abaixo de  $7 \mu\text{g g}^{-1}$ .

Já os limites de detecção não foram possíveis de calcular neste trabalho, devido à influência dos interferentes, apresentando um acréscimo nas áreas dos analitos, alterando os resultados dos cálculos.

### **3.2.2 GC-MS**

#### **3.2.2.1 Água de rio**

Várias foram as tentativas de otimização do método quando o equipamento estava operante. Mesmo assim, principalmente com as substâncias etoxiladas, alguns problemas de resolução de picos e detectabilidade ocorreram, impossibilitando a obtenção da área do pico cromatográfico com a confiabilidade analítica necessária. Na Figura II. 16 pode-se observar um caso de diminuição do sinal e má resolução dos picos, sendo que estas soluções foram preparadas previamente às suas injeções, descartando a possibilidade de degradação da substância. Este comportamento ocorreu também para o NP1EO, OP1EO e OP2EO.

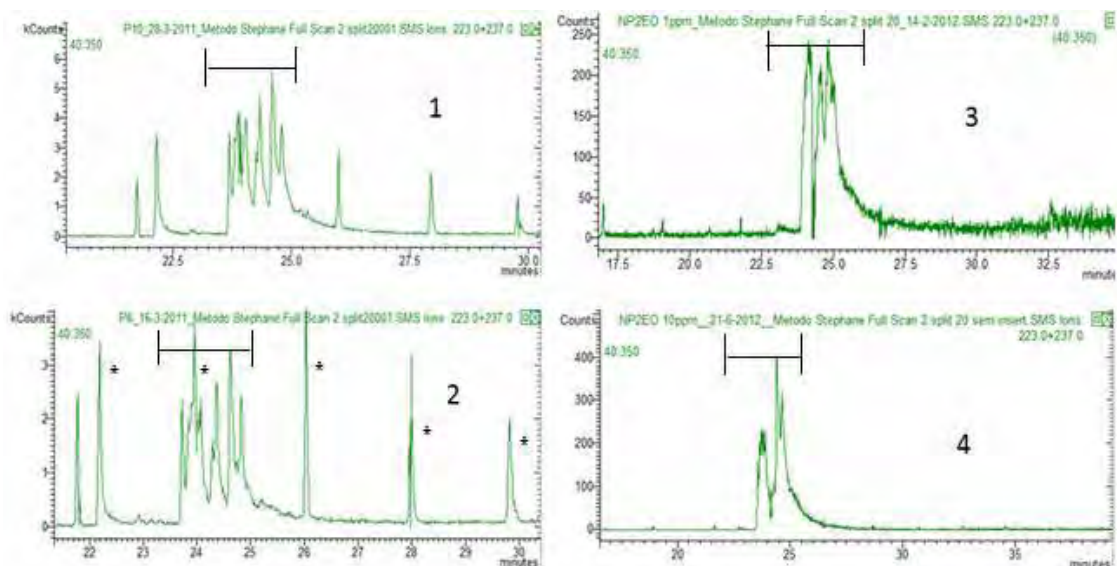


Figura II. 16: Cromatogramas dos íons extraídos ( $m/z = 223+237$ ). 1. Ponto 10 da curva ( NP2EO  $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ) injetado em 28/03/11; 2. Ponto 6 da curva (NP2EO  $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  ) injetado em 16/03/11; 3. Solução de NP2EO ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 14/02/12; 4. Solução de NP2EO ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) injetado em 21/06/12. ( \* picos de sangramento da coluna cromatográfica).

O cromatograma 1 da Figura II. 16 exemplifica uma situação ideal, com picos característicos para o NP2EO, como relata o trabalho de Fernández-Sanjuan (2009). O cromatograma 2 mostra um situação em que picos de sangramento da coluna interferem na obtenção da área do NP2EO. O cromatograma 3 e 4 são situações que ocorreram ao longo do ano de 2012, com má resolução dos picos característicos e alteração da intensidade dos picos, podendo-se observar uma intensidade de 250 Counts para uma solução de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (cromatograma 3 ) e de 400 Counts para um solução de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (cromatograma 4), sendo que, este comportamento seria proporcional (dobro da concentração, dobro da intensidade).

### **Teste 1. Utilizando diferentes solventes de eluição**

Baseando-se nos bons resultados dos testes com diferentes solventes para o nonil e octilfenol utilizando HPLC-FLD para a análise, testou-se o

mesmo procedimento da Figura II. 1, utilizando como solventes de eluição as seguintes proporções: 10 mL de Acetonitrila/ Acetona (50:50 v/v), 10 mL de Acetonitrila/Metanol (70:30 v/v), 10 mL de Acetonitrila/Metanol (30:70 v/v) e 4mL de Metanol seguido de 4mL de Acetonitrila e 4mL de Acetona, apenas modificando o solvente de ressuspensão para solução de heptilfenol ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetato de etila). As concentrações utilizadas para este teste de fortificação foram NP =  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , NP1EO =  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , NP2EO =  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , OP =  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . OP1EO e OP2EO não foram analisados, pois não estavam disponíveis naquele momento no laboratório. As análises foram efetuadas em duplicata de cartucho e triplicata de injeção. Os valores das recuperações foram calculados por pontos na matriz e podem ser visualizados na Tabela II. 25.

Tabela II. 25: Valores das recuperações utilizando diferentes solventes de eluição com análise por GC-MS

Eluentes na SPE	NP			NP1EO			NP2EO			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
<b>ACN ACE 50 50</b>	54	5	9	104	15	14	109	13	12	73	3	4
<b>ACN MeOH 70 30</b>	49	4	7	112	9	8	130	16	12	73	2	3
<b>ACN MeOH 30 70</b>	48	2	4	108	22	21	117	19	17	62	2	4
<b>ACN ACE MeOH</b>	48	3	6	102	1	1	107	6	6	58	1	1

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de duas extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 6

Mesmo utilizando um ponto na matriz para o cálculo do valor da recuperação, os valores para os etoxilados se mostraram um pouco elevados (102 a 130%), e coeficientes de variação entre 1 e 21 %. O teste utilizando a eluição sequencial com MeOH, ACN e Ace foi o que demonstrou melhor

desempenho para os etoxilados. Para o nonil e octilfenol foi observado praticamente o mesmo desempenho quando analisado por HPLC-FLD. O teste com adição de ácido acético não foi possível ser realizado como foi para o HPLC-FLD, pois o equipamento estava inoperante. Provavelmente as recuperações das substâncias seriam mais satisfatórias.

### **Teste 2. Utilizando metodologia validada para HPLC-FLD**

Foi aplicado o método validado em amostras de água de rio (Figura II. 1), agora com análise por GC-MS, apenas modificando o solvente de ressuspensão para solução de heptilfenol ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em acetato de etila). As concentrações utilizadas para este teste de fortificação foram as mesmas para o nonil e octilfenol ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Optou-se trabalhar apenas com o nonilfenol e octilfenol devido à má resolução das substâncias etoxiladas. Os valores das recuperações foram calculados através dos pontos na matriz, e podem ser visualizados na Tabela II. 26.

Tabela II. 26: Resultados obtidos para as recuperações das amostras de água superficial utilizando diclorometano, hexano e acetona como solventes de eluição para sistema GC-MS

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	s	CV(%)
<b>Nível 1</b> <b><math>1 \mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	54	1	1	64	1	2
<b>Nível 2</b> <b><math>0,6 \mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	53	4	8	72	2	3
<b>Nível 3</b> <b><math>0,2 \mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	58	14	25	80	17	21

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de duas extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 6

Os valores das recuperações não foram tão satisfatórios (53 – 80%) como quando realizados por HPLC-FLD. Um motivo levantado para este fato foi o solvente de ressuspensão; única troca no método, que passou de metanol para

acetato de etila. Provavelmente o solvente não conseguiu retirar todo o analito seco na parede do frasco.

### **Teste 3. Substituição do solvente de ressuspensão**

Foi proposta a troca do solvente de ressuspensão do método, visto que as recuperações não foram satisfatórias para o teste anterior. O mesmo método da Figura II. 1 foi utilizado, apenas alterando o solvente de ressuspensão para metanol/ heptilfenol (em acetato de etila,  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (4:1 v/v). A injeção utilizando metanol como solvente não afeta o detector, pois além do solvente ser volatilizado no liner e não adentrar a coluna, é também utilizado um procedimento chamado *solvent delay*, que consiste da fonte de íons não estar ativa quando o solvente passar por ela, ou seja, somente depois que o solvente passa pela fonte de íons é que ela é ligada para a detecção dos analitos. Os valores dos níveis de fortificação foram os mesmos do teste anterior, em duplicata.

Neste teste, não foi possível a obtenção da área do nonilfenol, mesmo se utilizando da ferramenta do software “íon extraído”, pois houve a co-eluição com ftalatos, cujo íon característico no fragmentograma é o 149 m/z, ao se procurar e comparar pela biblioteca NIST. Os valores das recuperações para o octilfenol variaram entre 66 a 78%, com CV máximo de 4%.

#### **3.2.2.2 Material particulado em suspensão**

Neste teste para análise de material particulado em suspensão com análise por GC-MS foi aplicado o método já otimizado para a técnica HPLC-FLD (Figura II. 2). Apenas o solvente de ressuspensão foi alterado para

solução de heptilfenol em acetato de etila (  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As concentrações utilizadas para este teste de fortificação foram as mesmas para nonil e octilfenol ( $192 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $31 \mu\text{g g}^{-1}$  e  $8 \mu\text{g g}^{-1}$ ). A massa média de material particulado em suspensão por filtro foi de 6,1 mg, e as análises foram realizadas em triplicata. Os valores das recuperações foram calculados em relação ao ponto matriz, e podem ser observados na Tabela II. 27.

Tabela II. 27: Resultados obtidos para as recuperações dos três níveis da curva analítica para análise de material particulado utilizando diclorometano, hexano e acetona como solventes de eluição para sistema GC-MS (n=3).

Níveis de fortificação	NP			OP		
	Rec (%)*	s	CV(%)	Rec (%)*	S	CV(%)
<b>Nível 1</b> <b>192 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>	87	2	2	88	1	1
<b>Nível 2</b> <b>31 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>	138	1	1	92	3	3
<b>Nível 3</b> <b>8 <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>	126	14	11	87	13	15

Rec = Recuperação, s = desvio padrão da média, CV = coeficiente de variação.

\*média de duas extrações, injeção dos extratos em triplicata, n = 6

De acordo com os valores da Tabela II. 27 o método foi validado para material particulado em suspensão com recuperações (87-138%) e CV (1 – 15%) satisfatórios para este estudo.

Com o método otimizado para análise de material particulado em suspensão utilizando GC-MS, pode-se obter o limite de quantificação do método. Para ambas as substâncias, NP e OP, o limite de quantificação foi igual a  $8,0 \mu\text{g g}^{-1}$ , sendo superior ao obtido com o sistema HPLC-FLD ( $0,63 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Como discutido na sessão 3.2.1.2, o limite de quantificação elevado obtido para o sistema GC-MS não se enquadra nas concentrações ambientalmente encontradas, sendo estas na faixa de décimos de  $\mu\text{g g}^{-1}$ .



#### 4. Considerações finais

Nos estudos efetuados neste trabalho foi possível concluir que a análise dos alquilfenóis não etoxilados (NP e OP) pode ser efetuada por GC-MS/MS e HPLC-FLD, sendo que o limite de quantificação para HPLC-FLD é cerca de 100 vezes melhor para o OP e cerca de 375 vezes melhor para o NP. Como os alquilfenóis etoxilados não fluorescem, somente poderiam ser analisados por GC-MS/MS que, por sua vez, mostrou-se cerca de 100 vezes melhor na detecção e quantificação destes compostos, quando comparada à GC-MS.

Quanto ao método de extração dos alquilfenóis das matrizes de interesse (água superficial e material particulado em suspensão), o método otimizado e validado para água superficial inclui a acidificação da amostra (2% v/v de ácido acético), SPE com fase polimérica (Strata X) e eluição sequencial com 10mL de diclorometano/hexano (1:1 v/v) e 10mL de diclorometano/acetona (1:1 v/v). Já para o material particulado a extração em banho de ultrassom, utilizando diclorometano, acetona e hexano, apresentou os melhores resultados. Foi possível a validação de ambos os métodos, sendo estabelecidos os limites de quantificação, a exatidão (expresso como % recuperação), a precisão (expresso como CV das replicatas) e a robustez destes métodos.

Considerando-se os diversos problemas ocorridos com o sistema GC-MS, durante o desenvolvimento deste trabalho, optou-se por prosseguir o estudo ambiental utilizando o sistema HPLC-FLD e, assim, excluindo os compostos etoxilados do estudo ambiental.

Capítulo III – Aplicação de método para  
análise de alquilfenóis em água superficial e  
material particulado ao longo do Ribeirão  
das Cruzes (Araraquara-SP)

---

## 1. Introdução

Muitos são os trabalhos referentes a substâncias alteradoras endócrinas, bioacumulativas e cancerígenas em água superficiais (Ying, 2006; Lintelmann, 2003). Mesmo algumas sendo legisladas ou não, há o interesse em conhecer a situação dos mananciais nos quais é realizada a captação da água para que, após um devido tratamento, esta possa ser consumida.

Especificamente para os alquilfenóis, na UGRHI-13 existe apenas um estudo (Moura, 2009) no qual o objetivo era avaliar a eficiência do tratamento de esgoto na remoção de algumas substâncias estrogênicas. Neste estudo as concentrações de nonilfenol na saída da ETE-Araraquara, cujo manancial receptor é o Ribeirão das Cruzes, chegaram a centenas de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Assim sendo, na parte ambiental desta tese optou-se por estudar a ocorrência de alquilfenóis no Ribeirão das Cruzes, principal fonte de água para a população de Araraquara.

Neste Capítulo serão abordados aspectos da UGRHI-13, especificamente do município de Araraquara, caracterizando assim os pontos de amostragem. Também serão discutidos os valores de nonilfenol e octilfenol encontrados nas matrizes água superficial e material particulado ao longo do Ribeirão das Cruzes e córregos que deságuam neste rio principal.

As análises foram efetuadas utilizando os métodos otimizados para água superficial e material particulado discutidos no Capítulo II deste trabalho.

## 2. Caracterização da área de estudo (UGRHI-13)

A região escolhida para este estudo é a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 13 (UGRHI-13), região central do estado de São Paulo, pois não há dados na literatura sobre os aquíferos e dos aquíferos etoxilados nesta região ao longo do Ribeirão das Cruzes, situado no município de Araraquara (SP).

A Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré definida como UGRHI-13 possui uma área total de 15.808 km<sup>2</sup>, sendo a sétima UGRHI em área no Estado de São Paulo, limitando-se a leste e a sudeste com a UGRHI-5 (Piracicaba/Capivari/Jundiaí), a nordeste com a UGRHI-9 (Mogi-Guaçu), a norte e a oeste com a UGRHI-16 (Tietê/Batalha) e a sul com as UGRHI-10 e 17 (Tietê/Sorocaba e Médio Paranapanema, respectivamente), como mostra a Figura III. 1.



Figura III. 1: Localização da Bacia Hidrográfica do Tietê/Jacaré entre as 22 UGRHIs do Estado (IPT, 2000).

## 2.1 Clima

Na UGRHI-13 existem dois tipos de clima característicos. O clima quente e úmido, com inverno seco que predomina na região, apresentando no mês mais seco totais de chuvas inferiores a 30 mm; temperaturas médias superiores a 22°C no mês mais quente, e temperaturas menores que 18°C no mês mais frio. O outro clima que também é característico da região, mas com pequenas ocorrências é o clima temperado úmido com estação seca, que possui as mesmas características do primeiro clima citado, apenas diferindo as temperaturas médias serem inferiores a 22°C no mês mais quente (Teodoro, 2008)

Assim, na UGRHI-13, as temperaturas médias anuais variam de 21 a 23°C; sendo que as médias máximas em janeiro situam-se entre 29 e 32°C; e a média das mínimas em julho de 11 a 13°C (Macedo, 2007).

Araraquara, especificamente, possui um clima “Tropical de Altitude”, caracterizado por duas estações bem definidas: verão de temperaturas altas (média de 31° C) e pluviosidade elevada, e inverno de temperaturas amenas e pluviosidade reduzida (Macedo, 2007).

Para a bacia Tietê/Jacaré são identificados três comportamentos pluviométricos. O primeiro com chuvas médias anuais superiores a 2.000 mm; o segundo com médias anuais entre 1.500 e 2.000 mm; e o terceiro com chuvas anuais entre 1.100 e 1.500 mm. Araraquara encontra-se localizada na região correspondente ao terceiro conjunto, com média anual de 1.300 mm de chuva. Na sub-bacia do Ribeirão das Cruzes, como na maior parte do estado, o período chuvoso ocorre de outubro a março, com o trimestre mais chuvoso de

dezembro a fevereiro, e o período mais seco ocorre de abril a setembro, sendo os meses de junho, julho e agosto os mais secos (Teodoro, 2008).

## **2.2 Economia**

A UGRHI-13 apresenta uma economia bastante diversificada, com destaque para o setor sucro-alcooleiro, com o plantio e processamento de cítricos, com predominância do cultivo da laranja e cana de açúcar, concentrando-se nas imediações dos municípios de São Carlos e Araraquara, sendo que este último destaca-se no processamento de cítricos. Outros setores estão presentes em Araraquara, tais como bebidas, papel, setores de química fina, bioquímica e alimentos (Macedo, 2007).

Araraquara é um importante centro de negócios e escoamento de mercadorias. Situa-se num entroncamento rodoferroviário, sendo constituída pela malha ferroviária da Ferroban (antiga Fepasa) e pela via Washington Luiz.

O município possui indústrias de base tecnológica e sete distritos industriais instalados, com mais de 70 empresas, entre as quais se destacam: Sucocítrico Cutrale Ltda., Lupo S/A, Usina Zanin Açúcar e Álcool Ltda., Usina Maringá Ind. e Com. Ltda., Nigro Alumínio Ltda., Nestlé Brasil Ltda., Cervejarias HEINEKEN Brasil Ltda., Phillip Morris Brasil S/A, Distribuidora de Medicamentos Santa Cruz, Alumínio Ramos Ind. e Com., Comercial Carlton Ltda. (Macedo, 2007).

### **2.3. Uso e ocupação do solo**

Por toda a região de Araraquara encontram-se porções de vegetação nativa, praticamente cercada por culturas de cana-de-açúcar como um dos resultados da expansão agrícola do Estado de São Paulo (Macedo, 2007). Com características agrícolas voltadas a monocultura, principalmente as culturas de cana-de-açúcar e laranja, esta região vem se tornando muito promissora em vários outros segmentos agroindustriais, como na cultura de soja, milho, tangerina e limão.

### **2.4 Captação e tratamento de água em Araraquara**

Atualmente a cidade de Araraquara dispõe de 14 poços de captação subterrânea e 3 pontos de captação de águas superficiais (Cruzes, Anhumas e Paiol). A água bruta captada das represas das Cruzes e do Ribeirão Anhumas são enviadas por meio de uma estação elevatória até a Estação de tratamento de água (ETA) Fonte, e a água do Córrego do Paiol é encaminhada a ETA Paiol, totalizando 50% do abastecimento. Os outros 50% são oriundos de água subterrânea. Em ambas ETA, o processo de tratamento utilizado é similar.

O Ribeirão das Cruzes tem sua nascente dentro da área urbana de Araraquara, cortando todo o município até a sua foz no rio Jacaré-Guaçú (Figura III. 2).

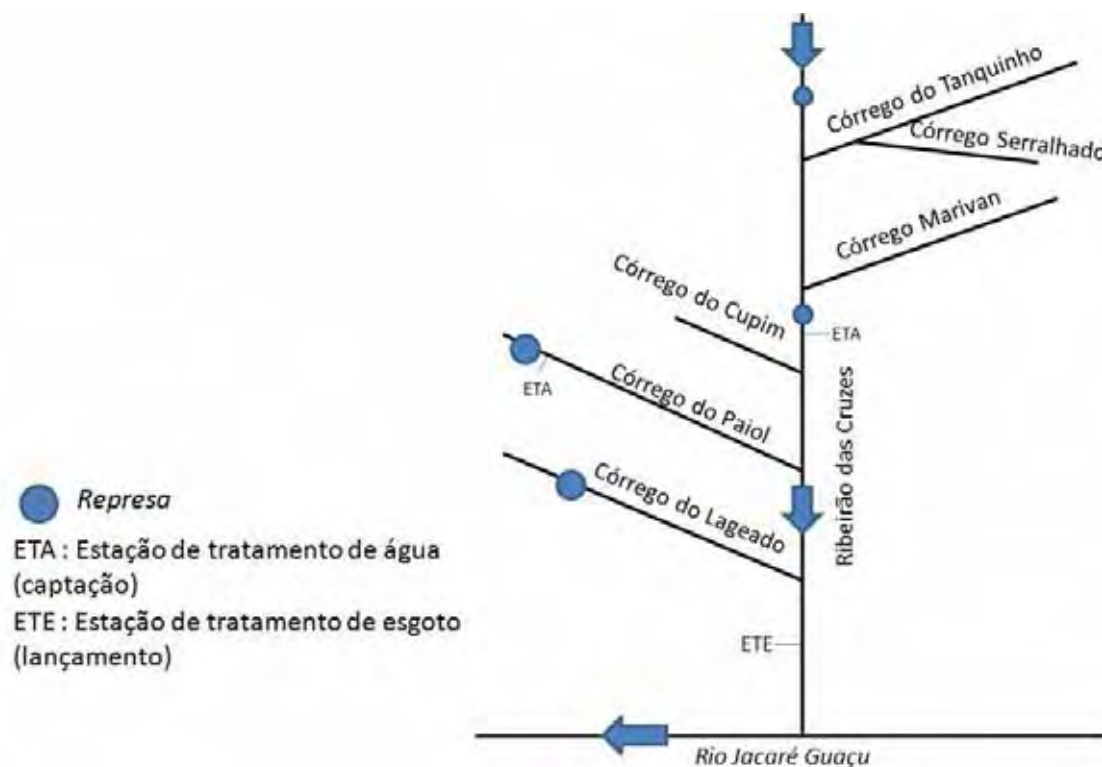


Figura III. 2: Diagrama unifilar do Ribeirão das Cruzes

O Ribeirão das Cruzes, à jusante da captação de água de abastecimento do Município de Araraquara até a confluência com o Rio Jacaré-Guaçu, situado também no município de Araraquara, se classifica como um corpo de água pertencente à Classe 4, sendo esta classe destinada à navegação, à harmonia paisagística e aos usos menos exigentes (Macedo, 2007; Brasil, 2013b).



### **3. Amostragem**

#### **3.1. Caracterização dos pontos de amostragem**

Os pontos selecionados para realizar a amostragem deste trabalho estão situados ao longo do município de Araraquara (SP) e foram baseados na acessibilidade ao local, procurando obter um panorama geral do município de Araraquara, sendo que o Ribeirão das Cruzes atravessa o município de ponta a ponta, passando por áreas urbanas, industriais e rurais. Na Figura III. 3 vê-se um mapa com a localização dos mananciais hídricos inseridos neste estudo, enquanto que na Figura III. 4 apresenta-se o digrama unifilar com os pontos de amostragem.



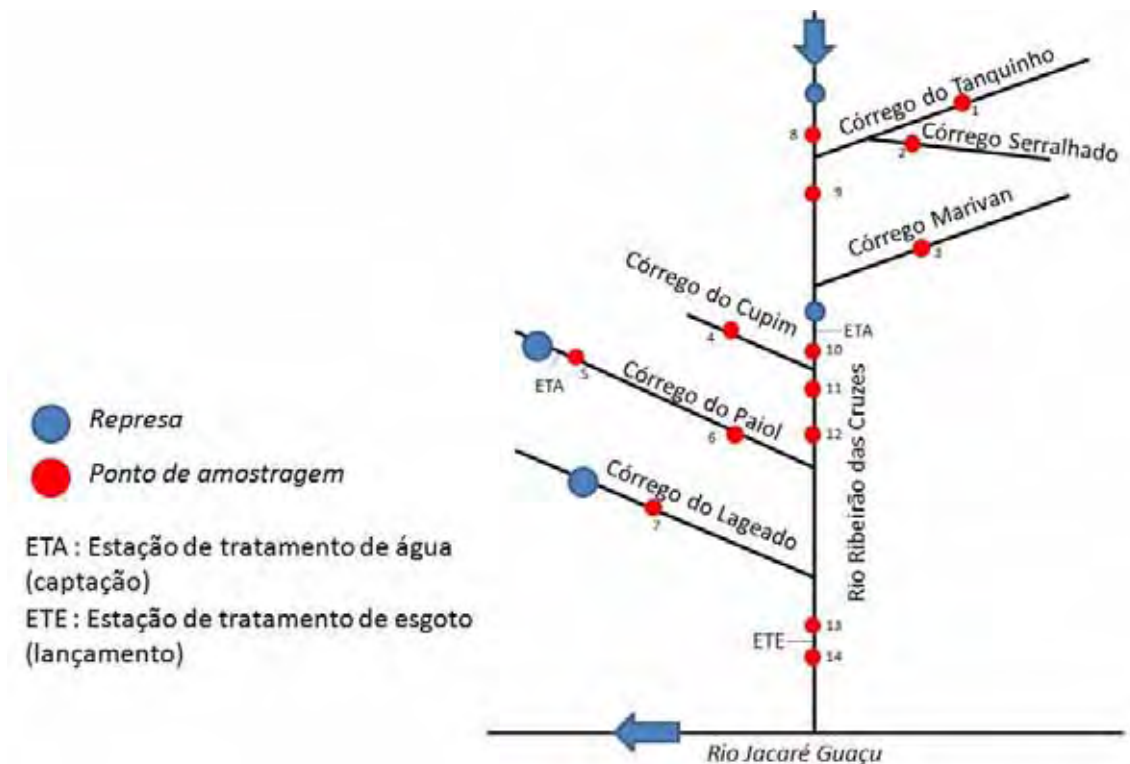


Figura III. 4: Diagrama unifilar referente ao Ribeirão das Cruzes no município de Araraquara – SP, contendo os pontos de amostragem (Fonte: elaborada pela autora)

Para melhor compreensão e discussão dos resultados obtidos, considerou-se importante caracterizar cada ponto incluído neste estudo, ressaltando que a escolha dos pontos amostrais teve como parâmetro o acesso aos pontos e procurou-se distribuí-los ao longo do Ribeirão das Cruzes, como mostra a Figura III. 5

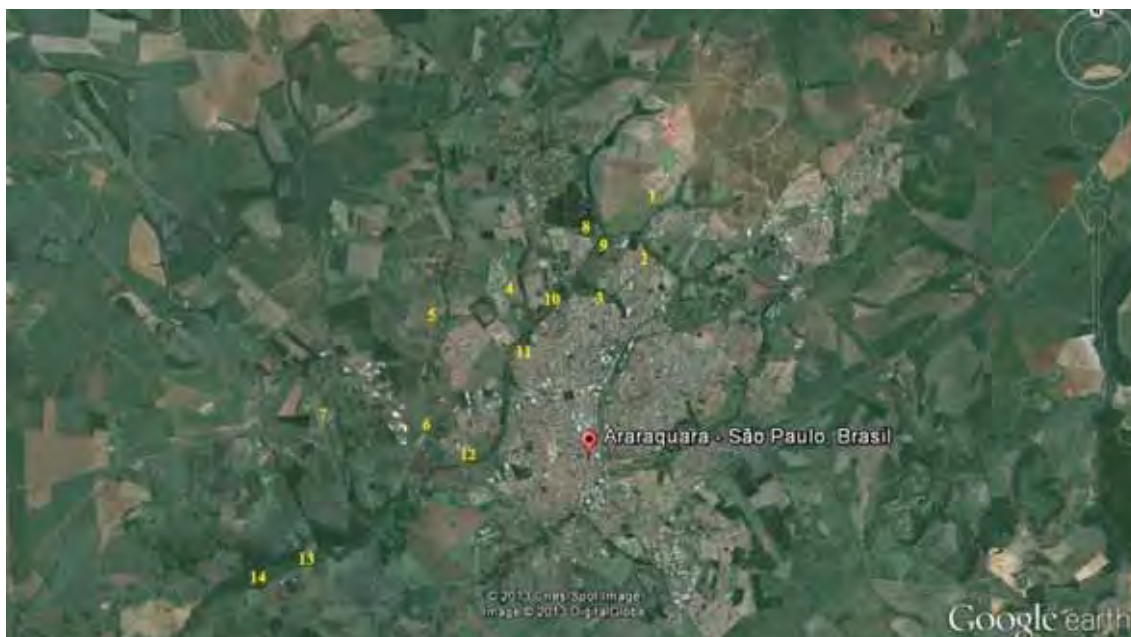


Figura III. 5: Localização dos córregos e do Ribeirão das Cruzes no município de Araraquara (SP). 1. Córrego do Tanquinho, 2. Córrego do Serralhado, 3. Córrego Marivan, 4. Córrego do Cupim, 5. Córrego do Paiol, 6. Córrego do Paiol, 7. Córrego do Lageado, 8. Ribeirão das Cruzes, 9. Ribeirão das Cruzes, 10. Ribeirão das Cruzes, 11. Ribeirão das Cruzes, 12. Ribeirão das Cruzes, 13. Ribeirão das Cruzes, 14. Ribeirão das Cruzes.

### 3.2. Coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas no dia 14 de dezembro de 2012 em frascos âmbar de 4 L previamente lavados (item 2.2) e ambientados com as amostras, levados imediatamente ao laboratório, dando início à filtração.

As amostras de material particulado em suspensão foram obtidas a partir dos filtros das amostras de água. Estes filtros foram embalados individualmente em papel alumínio, etiquetados, e armazenados em freezer à  $-4^{\circ}\text{C}$ , sendo analisados em duas semanas.

### 3.3 Córrego do Tanquinho (ponto 1)

Localizado na Avenida Pablo Picasso, o córrego do tanquinho sofre influência antrópica, pois está canalizado abaixo desta avenida. O ponto de amostragem possui coordenadas 21°44'19.87''S 48°09'16.51''O.



Figura III. 6: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Tanquinho (ponto 1)  
(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.4 Córrego do Serralhado (ponto 2)

Localizado na Avenida Maurício Galli, este córrego está canalizado apresentando pouca mata ciliar, possui coordenadas  $21^{\circ}44'49.99''\text{S}$   $48^{\circ}09'39.40''\text{O}$ .



Figura III. 7: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Serralhado (ponto 2)  
(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.5 Córrego Marivan ( ponto 3)

Este córrego, com coordenadas  $21^{\circ}45'31.75''S$   $48^{\circ}10'17.14''O$ , apresenta alta densidade de mata ciliar e também trechos canalizados.



Figura III. 8: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego Marivan (ponto 3).

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.6 Córrego do Cupim (ponto 4)

Localizado na Avenida Dom Carlos Carmelo (coordenadas 21°45'15.57"S 48°11'29.71"O), este ponto apresenta uma grande quantidade de areia, e lançamento direto de efluente, apresentando mau cheiro no local.



Figura III. 9. Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Cupim (ponto 4)

(Fonte: elaborada pela autora)



### 3.7 Córrego do Paiol ( ponto 5)

Localizado na Avenida Augusto Bernardi ( coordenadas  $21^{\circ}45'44.81''S$   $48^{\circ}12'34.22''O$ ), este ponto está sob alta influência antrópica, sendo que a montante do ponto de amostragem há uma represa devido a canalização do corpo d'água na área da captação da ETA.



Figura III. 10: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Paiol ( ponto 5)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.8 Córrego do Paiol (Ponto 6)

Este ponto (coordenadas  $21^{\circ}47'36.47''S$   $48^{\circ}12'42.98''O$  ) está sob a ponte da Rodovia Washington Luiz (SP-310). Este trecho apresenta alta densidade de mata ciliar.



Figura III. 11: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Paiol (ponto 6)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.9 Córrego do Lageado (ponto 7)

O ponto (coordenadas 21°47'08.10"S 48°14'12.24"O) de melhor acesso foi antes da canalização do córrego, mas um ponto posterior a represa. Esta represa situa-se próximo a via de acesso entre Araraquara/Gavião Peixoto. O córrego encontra-se canalizado no local que corta a via de acesso, sendo cercado com plantação de cana de açúcar. No local pode-se observar a presença de plantas aquáticas no leito do córrego.



Figura III. 12: Imagens referentes ao ponto de amostragem no córrego do Lageado (ponto 7)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.10 Ribeirão das Cruzes (Ponto 8)

O ponto (coordenadas 21°44'39.81"S 40°10'15.85"O) mais próximo da nascente do Ribeirão das Cruzes situa-se à jusante do pesque-pague Três irmãos. Este trecho foi represado e a jusante do ponto de amostragem há um trecho canalizado.



Figura III. 13: Imagens referentes ao ponto de amostragem no rio Ribeirão das Cruzes (Ponto 8) (Fonte: elaborada pela autora)

### 3.11 Ribeirão das Cruzes (Ponto 9)

Situado a 200m do ponto 8 (coordenadas 21°44'46.34''S 48°10'15.53''O), este trecho do Ribeirão das Cruzes possui grande volume de mata ciliar, com presença de erosão. Nesse ponto já há a influencia dos córregos do Tanquinho e do Serralhado.



Figura III. 14: Imagens referentes ao ponto de amostragem no rio Ribeirão das Cruzes (Ponto 9) (Fonte: elaborada pela autora)

### 3.12 Ribeirão das Cruzes (Ponto 10)

Este ponto (coordenadas 21°45'40.85"S 48°10'54.49"O) situa-se a jusante da represa da captação de água para a estação de tratamento de água da Fonte Luminosa. Este ponto de amostragem possui barrancos que apresentavam erosão.



Figura III. 15: Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 10)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.13 Ribeirão das Cruzes (Ponto 11)

A jusante do antigo matadouro municipal encontra-se o ponto 11, onde suas margens sofrem com constantes erosões principalmente em períodos de alto índice pluviométrico. Situa-se na rua Armando Salles de Oliveira (coordenadas 21°46'13.39"S 48°11'29.55"O).



Figura III. 16: Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 11)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.14 Ribeirão das Cruzes (Ponto 12)

Situado na Rodovia Washington Luiz (SP-310) (coordenadas 21°47'54.58''S 48°12'20.37''O), este ponto sofre alta influencia antrópica, devido ao tráfego de veículos no local.



Figura III. 17: Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 12)

(Fonte: elaborada pela autora)



### 3.15 Ribeirão das Cruzes (Ponto 13)

Ponto a montante do lançamento de efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) (coordenadas 21°49'21.98"S 48°15'09.79"O). Pode-se observar que há uma grande quantidade de espuma que se forma durante o lançamento do efluente.



Figura III. 18: Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 13)

(Fonte: elaborada pela autora)

### 3.16 Ribeirão das Cruzes (Ponto 14)

Localizado a jusante do lançamento de efluente da ETE (coordenadas 21°49'22.80"S 48°15'12.33"O), este ponto possui grande contribuição de substâncias provenientes dos efluentes da ETE. Sua margem direita é constituída de mata ciliar e a margem esquerda predominantemente de pastagem.



Figura III. 19: Imagens referentes ao ponto de amostragem no Ribeirão das Cruzes (Ponto 14)

(Fonte: elaborada pela autora)

#### **4. Resultados e discussão**

As análises dos alquilfenóis nas matrizes de material particulado e água superficial foram realizadas segundo os procedimentos descritos no Capítulo II deste trabalho.

Os resultados obtidos nas análises das amostras foram variáveis, visto que a complexidade da distribuição destes contaminantes resultantes da variabilidade ambiental de um ponto a outro e hidrodinâmica distintas.

Na Tabela III.1, são apresentados os resultados obtidos na análise do material particulado e água superficial.

Tabela III.1. Resultados obtidos na análise dos alquilfenóis em material particulado e água superficial (n=3)

<b>Amostra</b>	<b>Material particulado (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b>		<b>Água superficial (<math>\text{ng L}^{-1}</math>)</b>	
	<b>NP</b>	<b>OP</b>	<b>NP</b>	<b>OP</b>
Ponto 1 (Tanquinho)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 2 (Serralhado)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 3 (Marivan)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 4 (Cupim)	1,34	0,78	n.a.	n.a.
Ponto 5 (Paíol)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 6 (Paíol)	< 0,63	< 0,63	< 20	1470
Ponto 7 (Lageado)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 8 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 9 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 10 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 11 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	< 20	< 20
Ponto 12 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	< 20	318
Ponto 13 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	< 0,63	35,3	< 20
Ponto 14 (Ribeirão das Cruzes)	< 0,63	1,23	n.a.	n.a.

NP: nonilfenol, OP: octilfenol, LQ: limite de quantificação,  
n.a. : não analisado.

Pode-se observar na Tabela III.1 que para a maioria dos pontos analisados as concentrações de NP e OP estão abaixo dos limites de quantificação dos métodos.

As amostras de água superficial do Córrego do Cupim (ponto 4) e ponto 14 do Ribeirão das Cruzes foram preparadas, mas não foi possível a análise pelo sistema HPLC-FLD, sendo que para estas amostras o equipamento apresentava algum erro operacional, provavelmente sendo o excesso de matéria orgânica dissolvida nas amostras de água superficial que travava o equipamento.

Os únicos pontos que apresentaram concentrações acima do LQ dos métodos foram: Córrego do Cupim (ponto 4), Paiol (ponto 6), Ribeirão das Cruzes (ponto 12), Ribeirão das Cruzes (ponto 13) e Ribeirão das Cruzes (ponto 14).

O Córrego do Cupim (ponto 4) recebe despejo de efluente doméstico *in natura*, conforme descrito na caracterização dos pontos de amostragem. As amostras de água superficial não puderam ser analisadas, mas as amostras de material particulado apresentaram concentrações de  $1,34 \mu\text{g g}^{-1}$  para NP e  $0,78 \mu\text{g g}^{-1}$  para o OP. Já o ponto 14 do Ribeirão das Cruzes refere-se ao ponto à jusante do lançamento do efluente da ETE de Araraquara, em que apresentou concentração de  $1,23 \mu\text{g g}^{-1}$  para o OP e abaixo do LQ para o NP. Sendo que o esperado fosse encontrar concentrações mais elevadas para o NP do que para o OP neste ponto jusante ao lançamento de efluente da ETE, pois há um maior consumo de NP do que OP (Ying, 2002), infere-se que o NP estaria presente na amostra de água superficial e não na amostra de material particulado, decorrente a uma introdução recente ao ambiente, não havendo tempo de

equilíbrio entre água e material particulado, pois a tendência é que estas substâncias se agreguem ao material particulado devido o alto  $K_{ow}$  (aproximadamente 4,0); mas estas amostras também não puderam ser analisadas. Fernández-Sanjuan *et al.* (2009) apresentam concentrações que variam entre 4,8 a 199  $\mu\text{g g}^{-1}$  para NP em lodo de esgoto da Espanha, ou seja, neste tipo de amostra há uma maior tendência de que estas substâncias permaneçam nesta fase do que no efluente e consigam alcançar o material particulado da coluna d'água. Em outro trabalho (Lacorte *et al.*, 2006) analisaram sedimento do rio Ebro (Espanha), encontrando concentrações entre 0,089 a 2,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  para NP e para o OP concentrações entre 0,03 e 0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Já Gong *et al.* (2012) apresentaram concentrações entre 0,3 e 12  $\mu\text{g g}^{-1}$  para NP e entre 0,004 e 0,4  $\mu\text{g g}^{-1}$  para OP em material particulado de um rio no sul da China.

Os pontos Paiol (ponto 6) e Ribeirão das Cruzes (ponto 12) apresentaram concentrações relativamente elevadas de OP ( 1470  $\text{ng L}^{-1}$  e 318  $\text{ng L}^{-1}$ , respectivamente); e o ponto 13 do Ribeirão das Cruzes apresentou concentração de 35,3  $\text{ng L}^{-1}$  para NP. Os dois primeiros pontos situam-se na Rodovia Washington Luiz (SP-310). Visto que os alquilfenóis são utilizados como aditivos em combustíveis e lubrificantes, pneus, revestimentos e borracha de alta densidade (Fernandes, 2012), é coerente que se encontre elevadas concentrações perto de rodovias. O ponto 13 do Ribeirão das Cruzes refere-se ao ponto à montante do lançamento do efluente da ETE. Infere-se então, que uma possível fonte de contaminação por alquilfenol seja a utilização destes como dispersante em pesticidas utilizados nas culturas de cana de açúcar nas áreas ao redor do ponto de amostragem. Raimundo (2007)

apresentou concentrações em água do rio Jundiaí de 1029 ng L<sup>-1</sup> para OP e 218 ng L<sup>-1</sup> para NP. Já Ying (2002) em uma revisão da literatura apresenta diversos trabalhos com concentrações máximas de 180 ng L<sup>-1</sup> para OP e 644 µg L<sup>-1</sup> para NP em água de rio de diversas localidades. Outros dois trabalhos que analisam água superficial na China (Zhang Y., 2009; Zhao, 2009) apresentaram concentrações entre 28,1 e 8890 ng L<sup>-1</sup> para NP e entre 1,0 e 2470 ng L<sup>-1</sup> para OP. Visto que estas concentrações apresentam uma grande variabilidade devido às características das amostras, distância das fontes de contaminação, e outros fatores, os dados apresentados neste trabalho são coerentes com os encontrados na literatura.

## Conclusões gerais e perspectivas futuras

---

Do ponto de vista analítico, os métodos propostos para análise de nonilfenol e octilfenol em água superficial e material particulado foram avaliados quanto aos parâmetros de confiabilidade analítica, demonstrando que são adequados ao estudo desenvolvido. Este método é equiparável à alguns relatados na literatura para alquilfenóis, mas supera os já publicados pelo uso de HPLC-FLD, técnica esta mais barata do que a LC-MS/MS ou GC-MS/MS, que são mais frequentemente utilizadas e pelo estudo de validação desenvolvido, ausente para a maioria dos trabalhos já publicados.

Do ponto de vista ambiental, foi possível realizar uma primeira avaliação destas substâncias no município de Araraquara (SP) ao longo do Ribeirão das Cruzes, que passa por toda a cidade. Os únicos pontos que apresentaram concentrações acima do LQ dos métodos foram: Córrego do Cupim (ponto 4), Paiol (ponto 6) (localizado na Rodovia Washington Luiz) , Ribeirão das Cruzes (ponto 12) (localizado na Rodovia Washington Luiz), Ribeirão das Cruzes (ponto 13) (montante à ETE) e Ribeirão das Cruzes (ponto 14) (jusante à ETE). Ou seja, há a introdução destas substâncias no ambiente através do despejo de efluentes domésticos in natura e após tratamento em ETE, e também através de produtos automotivos, como combustível e pneu, por exemplo.

Pode-se inferir através deste estudo que é possível que exista um risco ecotoxicológico para a biota presente, mas que existe a necessidade de se realizar um estudo para melhor avaliação do risco e/ou impacto ambiental envolvido. A partir desses resultados, acredita-se na necessidade de estudos mais detalhados envolvendo estes compostos, considerando-se os diversos



níveis tróficos envolvidos e as diferentes rotas de exposição a esses contaminantes, mesmo em regiões distantes das principais fontes, uma vez que o transporte é possível através do material particulado em suspensão. Também se torna interessante o monitoramento sazonal nesta região, pois neste trabalho a coleta foi realizada em uma época chuvosa, ou seja, pode-se considerar que as substâncias estão diluídas no volume de água do Ribeirão das Cruzes. Já em uma época seca, o volume de água não seria tão elevado, aumentando assim a concentração dos analitos no ambiente, acarretando uma maior exposição da biota aquática a estas substâncias.

## Referências

---

- ASIMAKOPOULOS, A. G.; NIKOLAOS, S. T.; KOUPPARIS, M. A. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. **Toxicology Letters**, v. 210, p. 141-154, 2012.
- BALABANIC, D.; RUPNIK, M.; KLEMENCIC, A. K. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 403-416, 2011.
- BARLAS, N.; AYDOGAN, M. Histopathologic effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on liver, kidney and spleen of rats at adulthood. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 341-349, 2009.
- BECHI, N.; IETTA, F.; ROMAGNOLI, R.; JANTRA, S.; CENCINI, M.; GALASSI, G.; SERCHI, T.; CORSI, I.; FOCARDI, S.; PAULESU, L. Environmental levels of para-nonylphenol are able to affect cytokine secretion in human placenta. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 3, p. 427-431, 2010.
- BERGÉ, A.; CLADIÈRE, M.; GASPERI, J.; COURSIMAULT, A.; TASSIN, B.; MOILLERON, R. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols – a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 3798–3819, 2012.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton; Lewis, 2003, 295 p.
- BIZKARGUENAGA, E.; ROS, O.; IPARRAGUIRRE, A.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; USOBIAGA, A.; ZULOAGA, O. Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p. 104-117, 2012.
- BONO-BLAY, F.; GUART, A.; FUENTE, B.; PEDEMONTE, M.; PASTOR, M, C.; BORRELL, A.; LACORTE, S. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19 p. 3339-3349, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 2914 de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Disponível em:  
<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.htm](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.htm)>  
Acesso em: 12 jan. 2013a.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 357 de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. n. 53, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>, Acesso em: 12 jan. 2013b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 430 de 13 de Maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 mar. 2005. n. 92, p. 89. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>, Acesso em: 12 jan. 2013c.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria 518 de 25 de Março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004. n. 59. p. 266-270. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>, Acesso em: 12 jan. 2013d.

CACHO, J. I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of alkylphenols and phthalate esters in vegetable and migration studies from their packages by means of stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1241, p. 21-27, 2012.

CARDOSO, M. H. W. M.; NOBREGA, A. W.; ABRANTES, S. Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. **Revista Analytica**, n. 34, p. 48-55, 2008.

CHEN, B.; DUAN, J. C.; MAI, B.X.; LUO, X. J.; YANG, Q. S.; SHENG, G. Y.; FU, J. M. Distribution of alkylphenols in the Pearl River Delta and adjacent northern south China sea, China. **Chemosphere**, n. 63, p. 652-661, 2006.

CHEN, G.; DING, W.; KU, H.; CHAO, H.; CHEN, H.; HUANG, M.; WANG, S. Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. **Food and chemical toxicology**, v. 48, p. 1939-1944, 2010.

CHEN, W.; WANG, G.; GWO, J.; CHEN, C. Ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of feminizing chemicals in river water, sediment and tissue pretreated using disk-type solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion. **Talanta**, v. 89, p. 237-245, 2012.

CRUCERU, I.; IANCU, V.; PETRE, J.; BADEA, I. A.; VLADESCU, L. HPLC-FLD determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in surface water samples. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 184, p. 2783-2795, 2012.

DAMSTRA T.; BARLOW S.; BERGMAN A.; KAVLOCK R.; VAN DER KRAAK G. (Ed.). **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. Geneva: World Health Organization, 2002. (International Programme on Chemical Safety). Disponível em: <<http://infohouse.p2ric.org/ref/50/49405.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2012.

DODSON, R. E.; NISHIOKA, M.; STANDLEY, L. J.; PEROVICH, L. P.; BRODY, J. G.; RUDEL, R. A. Endocrine disruptors and Asthma-Associated chemicals in consumer products. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, p. 935-943, 2012.

DUONG, C. N.; SCHLENK, D.; CHANG, N. I.; KIM, S. D. The effect of particle size on the bioavailability of estrogenic chemicals from sediments. **Chemosphere**, n. 76, p. 395-401, 2009.

EECKHAUT, A. V.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2198-2207, 2009.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. (Ed.). Determinando a incerteza na medição analítica. **EURACHEM GUIDE**, 2002. p. 166. Disponível em: <[www.farmacia.ufmg.br/lato/GuiaEurachemQUAM2002VerBras.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/GuiaEurachemQUAM2002VerBras.pdf)>. Acesso em : 16 dez. 2012.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs)**, action plan. Disponível em: <[http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/RIN2070-ZA09\\_NP-NPEs%20Action%20Plan\\_Final\\_2010-08-09.pdf](http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/RIN2070-ZA09_NP-NPEs%20Action%20Plan_Final_2010-08-09.pdf)>. Acesso em: 27 jun. 2012.

EURACHEM WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods**. Teddington, 1998. (Eurachem Guide). Disponível em: <<http://www.eurachem.nl/images/eurachem/Fitnessforpurpose.pdf>>. Acesso em: 16 dez. 2012.

FASANO, E.; BONO-BLAY, F.; CIRILLO, T.; MONTUORI, P.; LACORTE, S. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl) adipate from food packaging. **Food Control**, v. 27, p. 132–138, 2012.

FERNANDES, T. J. M. **Contribuição para o estudo da presença de disruptores endócrinos em lamas de ETAR**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

FERNANDEZ-SANJUAN, M.; RIGOL, A.; SAHUQUILLO, A.; RODRIGUEZ-CRUZ, S.; LACORTE, S. Determination of alkylphenols na alkylphenols ethoxylates in sewage sludge: effects of sample pre-treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 1525-1533, 2009.

FIEDLER, S.; FOERSTER, M.; GLASER, B.; ZECH, W. Alkylphenols in sediment of the Atlantic Rainforest south-west of São Paulo, Brazil,. **Chemosphere**, v. 66, p. 212-218, 2007.

FREITAS, S. S.; LANÇAS, F. M. Matrix effects observed during pesticides residue analysis in fruits by GC. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3698-3705, 2009.

FULLER, B. B. **Caracterização espaço – temporal dos recursos hídricos superficiais da sub-bacia do Ribeirão do Ouro, Araraquara, SP**. 2008. 159 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2008.

GASPERI, J.; GARNAUD, S.; ROCHER, V.; MOILLERON, R. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanized area: cause study of Paris (France). **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2900-2908, 2009.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GILBERT, S.; GASPERI, J.; ROCHER, V.; LORGEUX, C.; CHEBBO, G. Removal of alkylphenols and polybromodiphenylethers by a biofiltration treatment plant during dry and wet-weather periods. **Water Science & Technology**, v. 65, p. 1591-1598, 2012.

GONG, J.; RAN, Y.; CHEN, D.; YANG, Y.; ZENG, E. Y. Association of endocrine-disrupting chemicals with total organic carbon in riverine water and suspended particulate matter from the pearl river, China. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 2456-2464, 2012.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVÁ, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNÝ, M. Matriz-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HERBERT, C. G.; JOHNSTONE, R. A. W. **Mass spectrometry basics**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. 474 p.

HIBBERD, A.; MASKAOUI, K.; ZHANG, Z.; ZHOU, J. L. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. **Talanta**, n. 77, p. 1315-1321, 2009.

INSA, S.; BESALU, E.; SALVADO, V.; ANTICO, E. Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 722-730, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. 2003. Disponível em: <[www.farmacia.ufmg.br/lato/download/validacao\\_inmetro.pdf](http://www.farmacia.ufmg.br/lato/download/validacao_inmetro.pdf) > . Acesso em: 16 dez. 2012.

IPARRAGUIRRE, A.; NAVARRO, P.; PREITO, A.; RODIL, R.; OLIVARES, M.; FERNÁNDEZ, L.; ZULOAGA, O. Membrane-assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of a variety of endocrine disrupting compounds in environmental water samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2897-2907, 2012.

KOLVENBACH, B. A.; CORVINI, P. F-X. The degradation of alkylphenols by *Sphingomonas* sp. Strain TTNP3 – a review on seven years of research. **New Biotechnology**, v. 30 p. 88-95, 2012.

LIN, W. C.; WANG, S. L.; CHENG, C. Y.; DING, W. H. Determination of alkylphenol residues in breast and commercial milk by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 114, p. 753-757, 2009.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A.; Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, n. 5, p. 631-681, 2003.

LOYO-ROSALES, J. E.; RICE, C. R.; TORRENTS, A. Octyl and nonylphenol ethoxylates and carboxylates in wastewater and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, n. 68, p. 2118-2127, 2007.

LOZANO, N.; RICE, C. P.; PAGANO, J.; ZINTEK, L.; BARBER, L. B.; MURPHY, E. W.; NETTESHEIM, T.; MINARIK, T.; SCHOENFUSS, H. L. Concentration of organic contaminants in fish and their biological effects in a wastewater-dominated urban stream. **Science of the Total Environment**, v. 420, p. 191-201, 2012.

LYE, C. M.; FRID, C. L. J.; GILL, M. E.; COOPER, D. W.; JONES, D. M. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments and waters from the UK Tyne and Tees estuaries. **Environmental Science & Technology**, n. 33, p. 1009-1014, 1999.

- MACEDO, M. F. **Avaliação do sistema de monitoramento de recursos hídricos e da viabilidade técnica, legal e econômica da aplicação da resolução conama 357/2005 para a sub-bacia do ribeirão das cruzeiras (Araraquara-SP)**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2007
- McADAM, E. J.; BAGNALL, J. P.; SOARES, A.; KOH, Y. K. K. ; CHIU, T. Y.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N.; CARTMELL, E. Fate of Alkylphenolic compounds during activated sludge treatment: Impact of loading and organic composition. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 248-254, 2011.
- MICIC, V.; HOFMANN, T. Occurrence and behavior of selected hydrophobic alkylphenolic compounds in the Danube River. **Environmental Pollution**, n. 157, p. 2759-2768, 2009.
- MORALES, T. V.; PADRÓN, M. E. T.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Determination of alkylphenol ethoxylates and their degradation products in liquid and solid samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1186-1200, 2009.
- MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto – ETE e estações de tratamento de água - ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré (UGRHI 13)**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- NAVARRO, A.; ENDO, S.; GOCHT, T.; BARTH, J. A. C.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D.; GRATHWOHL, P. Sorption of alkylphenols on Ebro River sediments: comparing isotherms with field observations in river water and sediments. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 698-703, 2009.
- NGUYEN, H. P.; LI, L.; NETHRAPALLI, I. S.; GUO, N.; DOMINIQUE, C.; ALLERAND, T.; HARRISON, D. E.; ASTLE, C. M.; SCHUG, K. A. Evaluation of matrix effects in analysis of estrogen using liquid chromatography- tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, n. 34, p.1781-1787, 2011.
- OUR STOLEN FUTURE . **The Basics o four stolen futures**. Disponível em: <<http://www.ourstolenfuture.org/Basics/bookbasics.htm>>. Acesso em : 16 jan. 2013.
- POOLE, C. F. Matrix induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 241-250, 2007.
- RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos. **Química Nova**, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 56, p. 1-11, 2009a.

RIBEIRO, C.; PARDAL, M. A.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; MARGALHO, R. M.; ROCHA, M. J. Sapatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 159, p. 415-427, 2009b.

RIVA, C.; PORTE, C.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 152, p. 175-181, 2010.

RODGERS-GRAY, T. P.; JOBLING, S.; KELLY, C.; MORRIS, S.; BRIGHTY, G.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C. R. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. **Environmental Science & Technology**, n. 35, p. 462-470, 2001.

RODGERS-GRAY, T. P.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C. KIRBY, S.; JANBAKSH, A.; HARRIES, J. E.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C. R. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. **Environmental Science & Technology**, n. 34, p. 1521-1528, 2000.

SÁNCHEZ-AVILA, J.; BONET, J.; VELASCO, G.; LACORTE, S. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal wastewater treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 4157-4167, 2009.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticides residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, p.51-61, 2000.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v. 34, p. 1033-1049, 2008.

SPEHAR, R. L.; BROOKE, L. T.; MARKEE, T. P.; KAHL, M. D. Comparative toxicity and bioconcentration of nonylphenol in freshwater organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 2104-2111, 2010.



STOCKHOLM CONVENTION . **Protecting human health and the environment from persistent organic pollutants**. Disponível em: <<http://www.pops.int>>. Acesso em : 16 jan. 2013.

TEODORO, V. L. I. **A caracterização ambiental, socioeconômica e da percepção da população de uma microbacia hidrográfica urbana**: córrego marivan, Araraquara, SP. 2008. 164 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2008

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. p. 433.

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

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: < <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/article1.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGI0YXRpdmEtcG9yLWNyYb21hdG9ncmFmaWE=>>. Acesso em: 11 dez. 2012.

VLACHOS, P.; KAMPIOTI, A.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Matrix effect during the application of a rapid methods using HS-SPME followed by GC-ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and cork soaks. **Food Chemistry**, v.105, p. 681-690, 2007.

WRITER, J. H.; BARBER, L. B.; BROWN, G. K.; TAYLOR, H. E.; KIESLING, R. L.; FERREY, M. L.; JAHNS, N. D.; BARTELL, S. E.; SCHOENFUSS, H. L. Anthropogenic tracers, endocrine disrupting chemicals, and endocrine disruption in Minnesota lakes. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 100-111, 2010.

YING, G-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment - a review. **Environment International**, v. 32, p. 417-431, 2006.

YING, G-G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. **Environment International**, v. 28, p. 215-226, 2002.

ZHANG, X.; LI, Q.; LI, G.; WANG, Z.; YAN, C. Levels os estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Marine Pollution Bulletin**, n. 58, p. 1210-1216, 2009.

ZHANG, X.; OAKES, K. D.; LUONG, D.; METCALFE, C. D.; SERVOS, M. R. Solid-phase microextraction coupled to LC-ESI-MS/MS: evaluation and correction for matrix induced ionization suppression/ enhancement for pharmaceutical analysis in biological and environmental samples. **Analytical Chemistry**, n. 83, p. 6532-6538, 2011.

ZHANG, Y. Z.; TANG, C. Y.; SONG, X. F.; LI, F. D. Behavior and fate of alkylphenols in surface water of the Jialu River, Henan Province, China. **Chemosphere**, n. 77, p. 559-656, 2009.

ZHAO, J. L.; YING, G. G.; WANG, L.; YANG, J. F.; YANG, X. B.; YANG, L. H.; LI, X. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in south China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 962-974, 2009.

---