

## 1.06.04 Química Analítica

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DA TÉCNICA DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA SUPORTADA COM FIBRA OCA PARA A DETERMINAÇÃO DE NONILFENOL EM ÁGUA COM ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**Deisy S. Lopes<sup>1\*</sup>, Gabriel F. Vieira<sup>2</sup>, Geovanna V. Freire<sup>1</sup>, João B. G. de Souza<sup>3</sup>

1. Estudante do Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INQUI-UFMS)

2. Estudante de Licenciatura em Química do INQUI-UFMS

3. Professor do INQUI-UFMS – Departamento de Química Analítica/Orientador

**Resumo**

A técnica de microextração em fase líquida suportada em fibra oca (HF-LPME) vem se destacando, por ser menos agressiva ao meio ambiente, pois gera poucos resíduos e utiliza uma quantidade mínima de solventes orgânicos. Assim, o presente trabalho buscou otimizar parâmetros dessa técnica para determinar por HPLC-DAD o nonilfenol (NP) como contaminante em águas. Esse é um disruptor endócrino, que por ser um tensoativo não-iônico possui muitas aplicações na indústria, resultando em resíduos que são encontrados em diversas amostras aquosas, incluindo de água potável. Dessa forma, após a otimização dos parâmetros, observou-se que a técnica apresentou altos fatores de enriquecimento, com desvio padrão relativo (DPR) máximo de 14%, utilizando um intervalo de confiança de 95%. A recuperação obtida em amostras reais foi de 14,87% para a água de torneira oriunda de poço (DPR=2,14) e 15,06% para a água de torneira distribuída pela estação de tratamento (DPR=0,25).

**Palavras-chave:** Disruptor Endócrino; HF-LPME; HPLC-DAD.

**Apoio financeiro:** Fundect, CAPES e CNPq.

**Introdução**

A qualidade dos corpos aquáticos tem sido motivo de preocupação para a sociedade,<sup>1</sup> uma vez que neles têm sido encontrados contaminantes orgânicos como os disruptores endócrinos (DEs).<sup>2,3</sup> Eles são compostos hormonalmente ativos, que mesmo em baixas concentrações podem, dentre outros efeitos, mimetizar ou acelerar da síntese e secreção de hormônios naturais e, estimular a formação de mais receptores hormonais. Assim, ocasionam distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e animais, afetando a saúde, o crescimento e a reprodução desses.<sup>4,5</sup>

O nonilfenol (NP) é um DE sintético do grupo alquilfenóis (APs),<sup>6</sup> que possui um elevado potencial econômico com aplicações, principalmente como surfactante na composição de pesticidas e detergentes.<sup>5,6</sup> Suas propriedades físico-químicas sugerem se comportar como um ácido fraco e ser hidrofóbico, possuindo maior afinidade à fase orgânica do solo e nos sedimentos dos rios.<sup>2,6-8</sup> Visto a polaridade e baixa volatilidade desse e demais APs, a cromatografia líquida tem sido a mais utilizada para fazer a determinação pois evita perdas de analitos e erros experimentais gerados em métodos com derivação.

A respeito das microtécnicas de extração, a microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME) tem se mostrado promissora.<sup>9-11</sup> Seus principais componentes são as fases doadora e aceptora, a fibra oca de polipropileno poroso e o solvente orgânico.<sup>10</sup> Podendo ser classificada como duas ou três fases dependendo do tipo de fase aceptora. Para aplicar essa técnica alguns parâmetros como, solvente orgânico, pH, força iônica, agitação e volume da amostra devem ser otimizados.<sup>9,11</sup>

Algumas das vantagens da HF-LPME é por ser compatível com uma vasta variedade de amostras biológicas e não biológicas,<sup>9</sup> evita erros por contaminação cruzada,<sup>12</sup> já que cada membrana de extração é utilizada uma única vez. Possui baixo custo para a utilização da membrana se comparado, a cartuchos de SPE. Além, do consumo reduzido de solvente orgânico, do fácil preparo de amostras e por proporcionar altos fatores de enriquecimento e seletividade.<sup>9</sup>

Diante de tais fatores, buscou-se desenvolver e aplicar uma metodologia com a HF-LPME em duas fases, para a determinar o composto 4-NP em amostras de água com análise por cromatografia líquida.

**Metodologia**

Os reagentes utilizados foram: Ácido Fórmico (85%), Hidróxido de Sódio P.A. (98%), Vetec; Cloreto de Sódio, Cloreto de Potássio, ambos P.A. (99%), Dinâmica; 1-dodecanol (98%), Metanol (grau HPLC/UV, 99%), 4-Nonylphenol (grau CG-MS, 92,7%) e 1-Octanol (99%), Sigma Aldrich. As soluções padrão de 4-NP foram preparadas em metanol a partir da solução padrão de 100 mg L<sup>-1</sup>. Demais soluções foram preparadas utilizando água de osmose reversa (sistema purificador de água Osmose Reversa, OS-50-LX, GEHAKA, < 0,001 m Ω).

Os principais materiais utilizados foram: agitador magnético modelo 752A, Fisatom; membrana de fibra oca de polipropileno, Accurel Q3/2 (600 µm I.D., 200 µm de espessura de parede e 0,2 µm de tamanho dos poros); seringas de 50 e 100 µL Hamilton com precisão de 1%.

Utilizou-se para a análise cromatográfica um HPLC modelo Prominence, Shimadzu, com bomba quaternária, amostrador e injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD). Fase móvel de metanol/ácido

fórmico 1%, utilizando o método isocrático de 95:05 (v/v), com tempo total de análise de 5 minutos, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, com injeção automática de 15 µL, comprimento de onda em 280 nm, com coluna C18, 5 µm, (15×4,6 mm I.D), pré-coluna XDB-C18, 5 µm (4.6×12,5 mm), Agilent Technologies.

Antes de ser utilizada, a membrana de fibra oca passou por um processo de limpeza, na qual, após ser cortada em tamanhos definidos, foi submersa em acetona em banho com ultrassom por 1 minuto, em seguida colocada sobre um papel toalha para retirar o excesso de acetona e secar.

Inicialmente, um método preliminar de extração do 4-NP foi definido: fibra oca de 10 cm, com fase receptora de 70 µL de 1-octanol, com retirada do excesso do solvente do lado externo da fibra. Em seguida, as duas extremidades da fibra foram conectadas a duas microseringas (configuração em “U”) e a fibra foi então colocada na amostra de 40 mL de uma solução aquosa de 0,0875 mg L<sup>-1</sup> do padrão do analito, com pH 7 e sem a adição de sal. Esse conjunto foi submetido a agitação a 1100 rpm durante 30 minutos. Após, a fibra foi retirada do contato da amostra e coletou-se do lúmen 15 µL de fase acceptora, que foi transferida para um vial contendo 475 µL de metanol, agitada no vortex por 15 segundos e seguiu para análise no HPLC.

Em seguida, começou a ser realizada a otimização dos parâmetros, fazendo variações separadamente, de cada fator do método predefinido, sendo elas: tamanho da fibra em 10 cm e 20 cm, os solventes orgânicos (fase acceptora) 1-octanol e o 1-dodecanol, configuração em “U” e em “haste”, efeito da adição dos sais NaCl e KCl (separadamente) na fase doadora (amostra aquosa com o analito), nas concentrações de 0,5 e 1,0 mol L<sup>-1</sup>, e também sem a adição de sal. O pH da fase doadora para os valores nos intervalos de 1-3, 7, 9-12, corrigido através da adição de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio. O volume da amostra de 10 mL e 40 mL, e a agitação da fase doadora para as condições de 800 rpm, 1100 rpm e 1450 rpm.

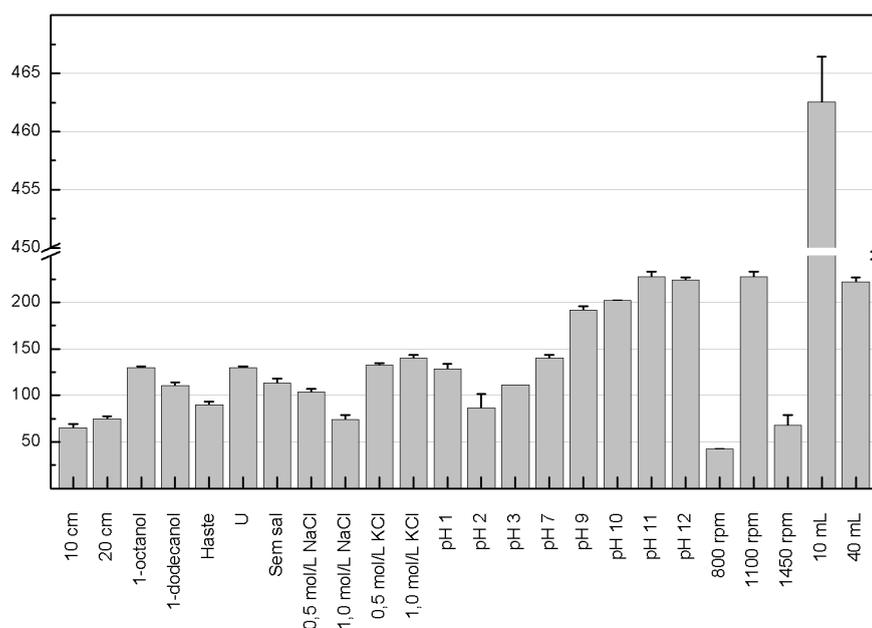
Posteriormente definidos os parâmetros de otimização, realizou-se a aplicação do método otimizado em duas amostras reais de água de torneira fortificadas e não fortificadas com o padrão de 4-NP, (uma oriunda diretamente de um poço e outra distribuída pela central de abastecimento de água do município) coletadas no município de Campo Grande/MS e analisadas em até 3 horas após terem sido coletadas.

Os resultados foram avaliados com base no fator de enriquecimento ( $E_f$ ), recuperação (R), coeficientes de partição do analito ( $K_{org/d}$ ) e desvio padrão relativo (DPR), além da aplicação do teste de t Student com o intervalo de confiança de 95% (t 95%).

## Resultados e Discussão

A figura 1 apresenta um gráfico com os valores médios de  $E_f$  e DPR obtidos nas etapas de otimizações dos parâmetros da técnica de extração. Primeiro, foi investigado se dobrar o tamanho da fibra, aumentaria proporcionalmente a extração do analito (fase acceptora), devido a maior área de superfície da fibra. Embora tenha tido uma diferença significativa (p-valor de 0,7%) entre os  $E_f$  obtidos, essa não foi proporcional ao dobro do tamanho da fibra, conforme observado na figura 1. Assim, visando a economia dos materiais, optou-se por utilizar a fibra de 10 cm para as demais análises.

**Figura 1** – Valores de fator de enriquecimento e desvio padrão relativo dos parâmetros analisados



Fonte: Os autores, 2019

Os dois solventes apresentaram alto  $E_f$ , acima de 110 (figura 1), com p-valor de 0,5%, o que evidencia que há uma diferença significativa entre essas extrações. O log Kow do 1-dodecanol (4,57) indica que ele é mais imiscível com a água do que o 1-octanol (log Kow 3,00), entretanto, sua viscosidade também é maior, 14,1 mPas versus 7,28 mPas do 1-octanol, prejudicando desse modo a mobilidade do analito na extração. Dessa forma, o 1-octanol que se apresentou como melhor solvente extrator, foi o utilizado para os demais experimentos.

Conforme observado na figura 1, a configuração em U apresentou maior  $E_f$ , 129,60. Estima-se que seja

devido a maior estabilidade da fibra nessa configuração e/ou também, porque a selagem com solda quente (para a configuração de haste) gera um vácuo interno ao tentar retirar o conteúdo de seu interior (fase acceptora), fazendo assim com que fosse necessário cortar a extremidade que foi vedada. Esse processo pode ter causado perdas do analito. Portanto, a configuração em U passou a ser utilizada a partir de então.

Não se encontrou nas pesquisas realizadas de revisão de literatura, relatos que comparem os valores de  $E_f$  entre os modos de configuração da mesma forma que foi observado e descrito neste estudo. Esse resultado implica que a forma como a fibra fica na amostra (U ou haste) influencia diretamente na extração e por isso deve ser analisado.

Obsevou-se que o aumento da concentração do KCl no meio afetou a força iônica. Isso em virtude do efeito salting-out, onde a solubilidade do analito diminuiu e aumentou a eficiência de extração.<sup>9,12</sup> No entanto, o contrário ocorreu quando se adicionou NaCl (figura 1). Houve um decréscimo da eficiência na extração conforme aumentou sua concentração. Resultados semelhantes da avaliação da adição desse sal foram relatados por outros autores.<sup>13-17</sup> Estima-se que ao se aumentar a concentração de NaCl na amostra, reduziu-se a difusão do analito para a fase extratora devido ao aumento da viscosidade da matriz, o que reduziu a mobilidade dos analitos, prejudicando assim a extração.<sup>12,16</sup>

Constatou-se, através dos resultados expressos (figura 1), que para os valores de pH abaixo do valor do pKa do NP (10,7), principalmente nas amostras ácidas analisadas, a eficiência de extração foi relativamente baixa devido à protonação do hidróxido de fenol.<sup>16</sup> Já no pH acima do pKa, o composto se desprotona, e dessa forma, sugere-se que o nonilfenol esteja fazendo uma forte interação com o 1-octanol, e assim obtendo melhor extração nos pH 11 e 12. Um maior valor de fator de enriquecimento e melhor extração de nonilfenóis também já foram relatados por outros autores para as amostras com pH alcalino na fase doadora.<sup>17</sup>

O p-valor obtido de 0,28% entre o valor de pH 7 e 9, indica que há diferença na extração do 4-NP entre amostras com pH neutro e básico. Entre os pH 10-11 e 11-12 não há diferença significativa (p-valor de 6,32% e 65,36%, respectivamente). Dessa forma, o pH das demais amostras foram ajustados para 11.

A agitação da amostra é comumente aplicada para acelerar a cinética de extração.<sup>9</sup> Assim, pode-se utilizar altas taxas de rotações na solução doadora pois a estabilidade do solvente dentro da fibra (fase acceptora) permaneceu protegida. O teste t reafirmou a visível diferença entre os efeitos da agitação, com o p-valor máximo entre as agitações de 0,13%, assumindo que a melhor extração ocorreu com 1100 rpm.

A respeito do volume da fase doadora, o  $E_f$  foi muito maior para a amostra de 10 mL, conforme observado na figura 1. Dessa forma, as análises em amostras reais foram realizadas com esse volume.

A seletividade, especificidade, precisão e linearidade do método cromatográfico e da técnica de extração otimizada foram verificadas. Os valores de RSD se encontraram inferiores a 20%, sendo considerados aceitáveis para a análise de concentrações traços.<sup>18</sup> O  $R^2$  (coeficiente de determinação) da curva para as soluções do padrão do 4-NP obtido foi de 0,9975. A equação da reta obtida foi  $y = 11104x - 423,83$ . A partir dessa, os limites de detecção (LD) de 0,022 mg L<sup>-1</sup> e quantificação (LQ) de 0,065 mg L<sup>-1</sup> foram obtidos através da relação entre o desvio padrão do sinal do coeficiente linear da equação, em função da inclinação da reta da respectiva curva analítica.

O maior valor de R obtido entre todos os experimentos foi de 17,34%, quando  $K_{org/d}$  foi de 139,93. Um valor de R semelhante utilizando a fibra oca em duas fases, foi relatado para extração de padrão de t-nonilfenóis solubilizados em água, onde R foi de aproximadamente 20%.<sup>17</sup>

Embora esses valores de R sejam relativamente baixos, eles se encontram dentro do estimado para a técnica HF-LPME de duas fases descrito na literatura, visto o valor de  $K_{org/d}$  obtido. Para que os valores de recuperação fossem superiores a 47%, o valor de  $K_{org/d}$  teria que ser maior que 500.<sup>12,19</sup>

Na aplicação do método otimizado em amostras reais de água, não se detectou a presença do 4-NP, estando esse em níveis abaixo do LD do método proposto. Estima-se que o teor de oxigênio dissolvido e a presença de constituintes comuns na água como Fe (III), NO<sup>3-</sup> ou HCO<sup>3-</sup> aumentem a taxa de degradação de NPs.<sup>20</sup>

Avaliou-se então as amostras enriquecidas com padrão na concentração de 0,0875 mg L<sup>-1</sup> de 4-NP. As recuperações obtidas para essas foram, 17,34% para água de osmose reversa (DPR=3,93), 14,87 para a água de torneira oriunda de poço (DPR=2,14) e 15,06% para amostra de água de torneira distribuída pela estação de tratamento (DPR=0,25). O teste t indicou que não há diferença estatística significativa entre as amostras de torneiras, pois o p-valor foi de 40%. No entanto, essas duas amostras apresentaram diferença estatística comparando-se com a amostra de água de osmose reversa, sendo os valores de p-valor obtidos de 1,1% e 2,8%.

Constatou-se que a amostra advinda do poço, que tem a tendência de apresentar a maior proporção de constituintes comuns na água, é a que apresenta menor taxa de recuperação, podendo assim ser estimado que possíveis íons que compõem essa amostra podem ter afetado a recuperação do 4-NP.

## Conclusões

As investigações revelam o potencial de extração de fibra oca como uma ferramenta de alto fator de enriquecimento para a análise de nonilfenol em água. Ademais, ainda pode ser investigada a possibilidade de automação da técnica e o aumento do limite de detecção para a faixa de ng L<sup>-1</sup> utilizando detectores de massas ou fluorescência.

A técnica de microextração em fase líquida suportada com fibra oca de duas fases apresentou-se vantajosa frente a técnicas miniaturizadas e não miniaturizadas, como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE), principalmente, devido a pequena quantidade de solvente orgânico utilizado no processo de extração, por não terem sido necessárias as etapas de pré-concentração ou limpeza das amostras. Além, do

custo muito mais baixo para etapa de extração, comparando a essas e outras técnicas, contando também, com boa reprodutibilidade e o curto tempo de extração.

### Referências bibliográficas

1. LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 3. Ed. Campinas: Editora Átomo, 2010.
2. ARAUJO, F. G. **Determinação de nonilfenol em águas superficiais da bacia hidrográfica do rio Guandu por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta**. 2015. 73 f. Dissertação (mestrado em Química). Instituto De Ciências Exatas, Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.
3. FRANCO, S. **Alquilfenóis em água superficial: estudo analítico e determinação no Ribeirão das Cruzes (Araraquara, SP)**. 2013. 146 f. Tese de doutorado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, araraquara – SP, 2013.
4. ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. **Caderno de Saúde Pública: Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças**. Rio de Janeiro, v. 23, n. 5, 2007.
5. BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N.; **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment process**. 1. ed. USA: CRC Press, 2003.
6. BERALDO, D. A. S.; Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP. 2012. 79 p. Dissertação (mestrado em Química), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.
7. 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: Review article. **Environment International**, v. 34, p. 1033-1049, 2008.
8. ANTUNES, M. G. **Contributo para a Avaliação do Balanço Associado à Degradação de Compostos Disruptores Endócrinos em Águas Residuais Domésticas**. 2008. 82 f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, nov., 2008.
9. MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 4, p. 249-262, 2013.
10. SHARIFI, V.; ABBASI, A.; NOSRATI, A. Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, p. 264-276, 2016.
11. MAGALHÃES, I. R. S.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; PIERINA SUELI BONATO. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 4, 2009.
12. DE OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.
13. FABREGAT-CABELLO, N.; SANCHO, J. V.; VIDAL, A.; GONZÁLEZ, F. V. ROIG-NAVARRO, A. F. Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution. **Journal of Chromatography A**, v. 1328, p. 43-51, 2014.
14. YIANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLA, K.; KALOGERAKIS, N. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, n. 80, p. 2057-2062, 2010.
15. LIU, J.; HU, X.; PENG, J.; JONSSON, J. A.; MAYER, P.; JIANG, G. Equilibrium Sampling of Freely Dissolved Alkylphenols into a Thin Film of 1-Octanol Supported on a Hollow Fiber Membrane. **Analytical Chemistry**, n. 78, p. 8526-8534, 2006.
16. CAI, Y.; JIANG, G.; LIU, J.; LIANG, X.; YAO, Z.; LIU, J. LIU, J. ZHOU, Q. Solid-Phase Microextraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography-Fluorimetric Detection for the Determination of Bisphenol A, 4-n-Nonylphenol, and 4-tert-Octylphenol in Environmental Water Samples. **Analytical Letters**, v. 37, p. 739-753, 2004.
17. MÜLLER, S.; MÖDER, M.; SCHRADER, S.; POPP, P. Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 99-106, 2003.
18. RIBANI, M; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
19. HO, T. S.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction Comparison with conventional liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 3-17, 2002.
20. LI, Y.; DUAN, X.; LI, X.; ZHANG, D. Photodegradation of nonylphenol by simulated sunlight. **Marine Pollution Bulletin**, v. 66, p. 47-52, 2013.