



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MAYARA COELHO SÁ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA PARA DETERMINAÇÃO DE FTALATOS EM PLÁSTICOS**

São Luís
2013

MAYARA COELHO SÁ

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA PARA DETERMINAÇÃO DE FALATOS EM PLÁSTICOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

São Luís
2013

Sá, Mayara Coelho

Desenvolvimento de método analítico por cromatografia líquida para determinação de ftalatos em plásticos/ Mayara Coelho Sá. – 2013.

62 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, 2013.

1. Plastificantes. 2. Disruptor endócrino. 3. Cromatografia líquida I. Título

CDU 543.53

MAYARA COELHO SÁ

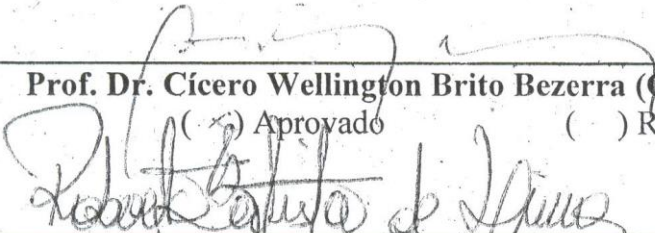
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA PARA DETERMINAÇÃO DE FTALATOS EM PLÁSTICOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra

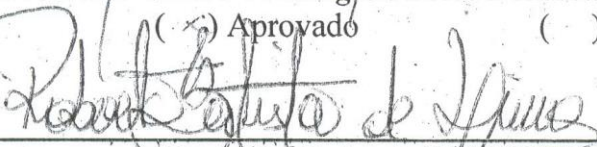
BANCA EXAMINADORA

Aprovada em: ____/____/____


Prof. Dr. Cícero Wellington Brito Bezerra (Orientador UFMA)

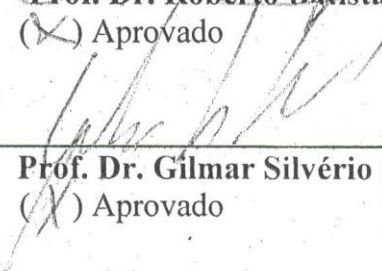
☒ Aprovado

☐ Reprovado


Prof. Dr. Roberto Batista Lima (UFMA)

☒ Aprovado

☐ Reprovado


Prof. Dr. Gilmar Silvério da Silva (IFMA)

☒ Aprovado

☐ Reprovado


Prof. Dr. Natilene Mesquita de Brito (IFMA)

☒ Aprovado

☐ Reprovado

AGRADECIMENTO

Dedico a Deus pela iluminação e dádiva da vida, sem as quais nada seria realizado.

A minha mãe, Maria dos Remédios, pelas orações deste do início desta trajetória, carinho, força, incentivo e torcida para obtenção deste sonho.

Ao meu pai, Militino Sá, pelo carinho e ajuda sempre necessária para a realização de todas as minhas metas pessoais e profissionais.

Ao meu irmão, Marcos e à sua família, Vitalina, Sófia e Maria Eduarda, pelos momentos de alegria.

A minha eterna orientadora, Natilene Mesquita Brito por toda ajuda, compreensão e “loucura” necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa. E sem ela, nada; “nada”, seria possível. Agradecer é pouco a essa mulher, que é linda e muita especial em minha vida. A lição e orientação de vida/profissional, jamais será esquecida.

Ao Professor Ozelito por ter me ajudado muito nessa caminhada e que sem ele, sua sabedoria e inteligência nunca tinha nem se quer um obtido um cromatograma. E com ele aprendi o verdadeiro significado do ser “mestre” que é muito mais que transmissão de informações. Agradeço do fundo do coração pelo aprendizado. Obrigada!

Ao meu orientador, Cícero Bezerra, por sua compreensão e ajuda necessária.

Ao grande amigo, Elias Machado, por entender todos os momentos que passei durante a realização deste projeto. E por sempre embarcar nas mais difíceis aventuras, mesmo sem saber se o mar estava bom ou mal para a navegação. Muito Obrigada!

A uma grande amiga, Karla Caroline, por ter me incentivado, ter sentado na cadeira dura junto comigo, por escutar e escutar todas as minhas dúvidas angústias e resumos dos artigos que lia. Por toda a sua “cascaria” comigo visando sempre o melhor para mim. Obrigada!

Ao Edson Tobias companheiro de muitas horas no laboratório, pelo carinho e muita compreensão durante esses anos de mestrado. Principalmente, quando quis desistir.

Aos amigos, Lúcia Guêzo, Jéssica Castro, Adriana Silva, Pablo, e Lana, Maria de Lourdes por sempre ajudar quando solicitados.

Ao CNPQ pela bolsa concedida.

A todos os componentes dos laboratórios do NARP/UFMA e GEA/IFMA, por receber-me e cooperar nesse projeto.

A PPGQUIM pela oportunidade.

Aos professores e colegas da Pós-graduação.

Ao professor Hilton Rangel por suas opiniões sinceras e importantes.

Enfim, espero não ter me esquecido de ninguém, mas se esqueci agradeço e me desculpo desde já!.

*“O maior de todos os projetos é tomar
uma decisão” (autor desconhecido)*

RESUMO

Os ftalatos são plastificantes utilizados em polímeros para deixá-los mais macios, maleáveis e também são suspeitos de terem propriedades carcinogênicas e estrogênicas. Por este motivo é importante a determinação destes compostos em várias amostras ambientais para avaliar os riscos ambientais que estes podem acarretar. Sendo assim, este estudo tem o objetivo desenvolver uma metodologia analítica para a investigação da presença de ftalatos nas mamadeiras e garrafas de água mineral natural utilizando o CLAE-UV-VIS. Desta forma, o estudo iniciou-se com a otimização das condições cromatográficas para a determinação dos seguintes dos ftalatos: Benzilbutil ftalato (BBP), Dietil ftalato (DEP) e Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) no qual a separação foi feita em modo isocrático e gradiente, fluxo de $1,00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, $\lambda = 225 \text{ nm}$. O método desenvolvido empregou a extração em fase sólida, para a qual foram testados vários adsorventes com a finalidade de obtenção de valores de recuperação dentro dos limites considerados adequados. Sendo assim, somente o DEP apresentou valores de 93-95% de recuperação utilizando o cartucho octadecilsilano (C_{18}). Os valores dos Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) do método para os ensaios com DEP foram $0,270 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (LD) e $1,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (LQ). Por conseguinte, aplicou-se o método desenvolvido para a determinação do DEP em amostras de mamadeiras e garrafas de água natural mineral das marcas mais comercializadas em São Luís – MA. Os resultados demonstraram que, para as amostras analisadas, não foram identificados picos referente ao DEP, mas o método desenvolvido para análise do ftalato apresenta vantagens quanto ao tempo de análise, economia de solvente, além de ser preciso, exato e sensível. Portanto, sugere-se em outro estudo a utilização de detectores mais sensíveis, a fim de quantificar o menor nível do DEP que seja capaz de causar transtornos aos organismos vivos.

Palavras-chave: plastificantes; disruptor endócrino; cromatografia líquida

ABSTRACT

Phthalates are plasticizers used in polymers to make them softer, pliable and are also suspected to have carcinogenic and estrogenic properties. For this reason it is important to determine these compounds in various environmental samples to assess the environmental risks they may entail. Therefore, this study aims to develop an analytical methodology for investigating the presence of phthalates in baby bottles and bottles of natural mineral water using HPLC-UV-VIS. Thus, the study began with the optimization of the chromatographic conditions for determining the phthalate following: Benzyl butyl phthalate (BBP), diethyl phthalate (DEP) and di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in which separation was performed isocratic and gradient mode, flow of 1.00 mL min^{-1} , $\lambda = 225 \text{ nm}$. The method employed the solid phase extraction, for which several adsorbents were tested in order to obtain recovery values within the range considered appropriate. Thus, only the values of DEP showed 93-95% recovery using the cartridge octadecylsilane (C_{18}). The values of Limits of Detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method for testing with DEP were $0.270 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (LOD) and $1.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (LOQ). Therefore, we applied the method developed for determining the DEP samples in bottles and bottles of mineral water natural brands sold in São Luís - MA. The results showed that for samples, no peaks were identified for the DEP, but the method developed for the analysis of phthalate presents advantages regarding the time of analysis, economy solvent, in addition to precise, accurate and sensitive. Therefore, it is suggested in another study using more sensitive detectors in order to quantify the lowest level DEP capable of causing inconvenience to living organisms.

Key-words: Plasticizers; Endocrine Desruptor; Liquid Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Procedimentos realizados na extração EFS: a) condicionamento -A amostra está entre dois filtros; b) percolação da amostra - Adiciona-se o solvente; c) Lavagem - Procede-se a eluição sob pressão; d) Eluição - Obtenção do extrato e; e) Verificação – sistema cromatográfico na quantificação do analito. Fonte: Lanças, 2009.29
- Figura 2 Etapas utilizadas na aplicação do método desenvolvido para extração dos ftalatos presentes nas mamadeiras: a) sistema de banho-maria com mamadeiras. b) método desenvolvido na extração dos ftalatos. c) extratos obtidos do processo de extração e d) análise cromatográficas39
- Figura 3 - Etapas utilizadas na aplicação do método desenvolvido para extração dos ftalatos presentes nas garrafas de água natural mineral a) amostras de garrafas de água mineral analisadas após compra a1, após 10 dias; 20 dias e 30 dias de armazenamento na temperatura ambiente. b) método desenvolvido na extração dos ftalatos. c) extratos obtidos do processo de extração e d) análise cromatográficas40
- Figura 4 Cromatograma dos padrões DEHP (vermelho) e DEP (verde) utilizando na fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.....42
- Figura 5 Cromatograma da solução do padrão DEHP utilizando na fase móvel ACN:H₂O na proporção de 50:50(v:v), comprimento de onda de 225nm, fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.....43
- Figura 6 Cromatograma da solução de padrão BBP utilizando na fase móvel ACN:H₂O na proporção de 70:30(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.....44
- Figura 7 Cromatograma da solução de padrão DEP com condições cromatográficas: fase móvel ACN:H₂O na proporção de 40:60(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL min⁻¹ e coluna CN.44
- Figura 8 Cromatograma da solução-padrão mista dos ftalatos, na concentração 10,0 µg L⁻¹ para cada composto (FM - ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1,00 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, λ = 225 nm)45

Figura 9 Cromatograma da solução-padrão mista dos ftalatos, na concentração 10,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1,00 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 μL , $\lambda = 225 \text{ nm}$)	46
Figura 10 Curvas analíticas para os compostos ftálicos (BBP; DEHP e DEP) para as condições cromatográficas anteriormente citadas, em modo gradiente, fluxo 1,00 mL·min ⁻¹ , volume de injeção de 20 μL , $\lambda = 225\text{nm}$	47
Figura 11 Curva analítica DEP para as condições cromatográficas anteriormente citadas, em modo isocrático , fluxo 1,00 mL·min ⁻¹ , volume de injeção de 20 μL , $\lambda = 225\text{nm}$	48
Figura 12 Comparação da utilização de diferentes adsorventes utilizados na EFS.....	49
Figura 13 Recuperações do DEP nas diferentes concentrações e uso de diferentes adsorventes utilizados na EFS.....	50
Figura 14 Linearidade entre as porcentagens recuperadas e as concentrações fortificadas.	50
Figura 15 – Garrafas de água mineral mais comercializadas na cidade de São Luís- MA	52
Figura 16 Mamadeiras mais comercializadas na cidade de São Luis - MA	53
Figura 17 Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação do DEP nas mamadeiras.....	54
Figura 18 – Análise da mamadeira “b”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.	55
Figura 19 - Análise da mamadeira “g”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.	55
Figura 20 - Análise da mamadeira “h”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cromatografia líquida para análise de ftalato utilizada por alguns autores.	22
Tabela 2 – Cromatografia a gás utilizadas em alguns trabalhos.	24
Tabela 3 - Métodos oficiais utilizando cromatografia gasosa para determinação de ftalatos em diversas amostras.	26
Tabela 4 – Diferentes tipos de extração dos ftalatos versus recuperação encontrada nos trabalhos.	30
Tabela 5 - Especificação dos cromatógrafos empregados no estudo.	33
Tabela 6 - Parâmetros de validação quanto à natureza do método.	34
Tabela 7 - Proporções de fase móveis testadas para análise dos ftalatos utilizando coluna ciano, com FM: Água/ACN.	43
Tabela 8 - Proporções de fase móveis testadas para análise dos ftalato com a coluna Kinetex - C ₁₈ , com FM: Água/ACN.	46
Tabela 9 - Resultados de recuperação, exatidão, precisão obtido para cada ftalato em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5).	51
Tabela 10 – Determinação do DEP nas mamadeiras selecionadas conforme usos dos consumidores das mamadeiras..	54
Tabela 11 – Determinação do DEP em garrafa de água natural mineral após alguns dias de armazenamento a 25°C.	57

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBP	- ftalato de benzilbutila
BMPP	- ácido ftálico bis (4 - base -2 - pentil) éster
BOP	- Butil 2-Etilhexilftalato
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CN	Ciano
DAD	arranjo de fotodiodos
DAP	- dialil ftalatos
DBP	- ftalato de dibutila
DDP	- Ftalato de Didecila
DEHA	- dioctil adipato
DEEP	- Di etoxi etil ftalatos
DEHP	- ftalato de di(2-etilhexila)
DEP	- ftalato de dietila
DHCP	- diclclohexil ftalatos
DHP	- Ftalato de di-n-hexila
DHXP	- Ftalato hexil
DINP	- ftalato de diisononila
DIDP	- ftalato de diisidecila
DMP	- Ftalato de dimetila
DNOP	- ftalato de di-n-octila
DPEP	- Ftalato de dipentila

DPrP	-	Di propil ftalato
DOU	-	Diario Oficial da União
ECD	-	captura de elétrons (ECD)
FID	-	ionização em chama
ETE	-	Estação de Tratamento de Esgoto
EINECS	-	Inventário Europeu das Substâncias Químicas Existentes
INMETRO	-	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
MEP	-	monoetílico ftalato
MeOH	-	metanol
MS	-	espectrométrico de massa
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PAE	-	ésteres de ácido ftálico
pH	-	potencial hidrogeniônico
PVC	-	cloreto de polivinila
UV-VIS	-	ultravioleta- visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OS FTALATOS E A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	18
2	OBJETIVOS	21
2.1	GERAL	21
2.2	ESPECÍFICOS.....	21
3	REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE FTALATOS	22
3.1.1	Técnicas cromatográficas	22
3.1.1.1	Cromatografia gasosa	23
3.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE EM FTALATOS	27
4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.1	PADRÕES, SOLVENTES E SOLUÇÕES	32
4.2	PREPARO E ARMAZENAMENTO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO.	32
4.3	EQUIPAMENTO E SUAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	33
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	33
4.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	33
4.5.1	Curva analítica.....	34
4.5.2	Linearidade e Sensibilidade	34
4.5.3	Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	35
4.5.4	Precisão	36
4.5.5	Exatidão	36
4.5.5.1	Ensaio de Recuperação.....	36
4.6	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NOS PRODUTOS PLÁSTICOS	38
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
5.1	COMPRIMENTO DE ONDA	41

5.2	COLUNA, FASE MÓVEL E FLUXO.....	41
5.2.1	Fase I.....	41
5.2.2	Fase II.....	45
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	47
5.3.1	curva analítica, linearidade e sensibilidade.....	47
5.3.2	Exatidão, Precisão e Recuperação.....	48
5.3.3	Limite de Quantificação (LQ) E Detecção (LD)	51
5.4	ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DO DEP PARA OS PRODUTOS PLÁSTICOS ..	52
5.5	DETERMINAÇÃO DOS FTALATOS EM PLÁSTICOS	53
6	CONCLUSÃO.....	58
	REFERENCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos plásticos teve um crescente aumento nos últimos anos, principalmente nos materiais de utensílio domésticos e brinquedos infantis, bem como utilitários como mamadeiras de crianças e embalagens. Isso, sem dúvida, é reflexo da criação de novas tecnologias a fim de melhorar as propriedades dos plásticos. Dentre as principais melhorias, destacam-se alguns aditivos que são: lubrificantes, plastificantes, estabilizantes, pigmentos e corantes (HALDEN, 2010).

O uso dos plastificantes permite aumentar a flexibilidade, resistência e maleabilidade dos produtos plásticos. Sendo que as substâncias mais empregadas, são os citratos, adipatos e ftalatos, onde os ftalatos ganham destaque por serem mais acessíveis devido ao baixo custo de comercialização, utilizado desde a década de quarenta em diversos tipos de plásticos (ZINI, 2009).

Os ftalatos apresentam-se em sua maioria como líquidos viscosos, baixa volatilidade e ainda apresentam-se com baixa solubilidade ou totalmente insolúveis em água. As principais aplicações são em tintas, pisos vinílicos, corantes, biocidas, tintas industriais, cosméticos, lubrificantes, retardantes de chama, bolsas de sangue, embalagens, calçados, tubos, fios, cabos e brinquedos; calçados, mangueiras de jardim entre outras utilidades plásticas (LOUREIRO, 2002).

Contudo, os ftalatos com o tempo e uso nos produtos plásticos, desprender-se-ão do sistema polimérico através da volatilização, extração e/ou migração, ocasionando interferência no sistema hormonal dos seres humanos, alterando as funções do sistema endócrino causando efeitos adversos na reprodução do organismo, bem como na diminuição de descendentes ou população de algumas espécies mesmo em concentrações na ordem de micro e nano por litro (SOUZA et al, 2012).

Segundo Bisket e Lester (2003) os principais modos de ação dos disruptores endócrinos (ftalatos) são como mimetizador ou bloqueador dos hormônios endógenos. No primeiro caso, a substância liga-se ao receptor celular produzindo uma resposta chamada de agonista, ou seja, o agente exógeno irá agir em um momento errado ou provocar superprodução da resposta. No segundo caso, resultará em uma resposta menor em relação a resposta natural ou sem resposta, pois o agente exógeno bloqueará a ação do hormônio natural com o seu receptor.

Embora, existam estes tipos de mecanismo de ações dos desruptores endócrinos, ainda não temos um esclarecimento por sua totalidade sobre esses efeitos, pois trata-se de um sistema complexo. Todavia, mecanismos indiretos, como: alterações na produção, transporte e metabolismo dos hormônios e inativação dos sítios receptores tem-se atribuído aos perturbadores endócrinos.

Desta maneira, vários estudos corroboram para interpretação e esclarecimento da ação dos ftalatos, como no trabalho de Jarosava et al (2009) verificaram, a distribuição e acumulação ésteres de ácido ftálico (PAE) nos tecidos de frangos é menor que nos tecidos dos pintos, considerando o somatório de ftalato de dibutila (DBP) e ftalato de di(2-etilhexila) (DEHP) na pele, tecido adiposo e no fígado. Os resultados demonstraram que a acumulação de DEHP foi de 3,2; 2,6 e 2,9 vezes maior do que a de DBP no músculo, tecido adiposo e pele, respectivamente.

Já Colacino et al (2011), caracterizaram a exposição do ftalato em meninas na fase pré-menstrual, na área urbana e rural do Egito, onde foram coletadas a urina para avaliação de 11 metabolitos de ftalatos. Os resultados demonstraram que o monoetilico ftalato (MEP) foi detectado em maior concentração nas meninas da zona urbana ($98,80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) comparada a $43,20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ da área rural. Os autores concluíram que a ingestão alimentar é a principal via de exposição dos ftalatos. Apesar, de existir varias aplicações em bens de consumo que empregam ftalatos em sua estrutura polimérica que estão diariamente em contato com o ser humano.

De acordo com Jonhson, Saikia e Sahu (2010), as crianças apresentam maior suscetibilidade aos efeitos tóxicos dos ftalatos, uma vez que estão em fase de desenvolvimento dos sistemas e órgãos constituinte do corpo humano.

Os estudos de Koch et al (2003) também demonstraram aumento significativo do metabolismo oxidativo nas crianças quando avaliaram a exposição de crianças de dois a seis anos de idade bem como de professores e pais das crianças expostas ao DEHP. Os autores concluíram que tal fato ocorre porque as crianças levam os brinquedos e mordedores à boca, os quais são feitos com maiores quantidades de ftalatos em cloreto de polivinila (PVC).

Nos trabalhos apresentados acima, a maioria empregam a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, por apresentar vantagem de

identificação do composto analisado devido à elevada seletividade do detector empregado.

Contudo alguns empregam a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), pelo fato dessa técnica apresentar menor tempo de análise e custo, e poder determinar plastificantes em matriz aquosa com eficiência, conforme já determinado por outros autores (CAI et al, 2003; JARA et al, 2000; LIANG, XU e LI, 2008; HAURI et al, 2002) quando analisado água de rio e estação de tratamento de esgoto.

Assim, neste estudo procurou-se desenvolver e validar, de forma inovadora, um método analítico usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao UV-VIS a fim de determinar os compostos ftalato de dietila (DEP), DEHP e ftalato de benzilbutila (BBP) em produtos plásticos comercializadas na cidade de São Luís - MA.

1.1 OS FTALATOS E A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

No Brasil os principais órgãos que estabelecem os regulamentos, normas e quantidades dos ftalatos a serem adotados nos mais variados produtos plásticos, são: Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

A Anvisa na Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999, publicada no Diário Oficial da União (DOU) no dia 20/05/1999, apêndice I - Restrições de uso, limites de composição e especificações, estabeleceu que as embalagens com os plastificante não devem conter mais que 1% em peso de ftalato de dibenzila.

Embora o Brasil desse os primeiros passos, no mesmo ano (1999), a União Européia já havia proibido o uso de ftalatos em brinquedos que são levados à boca das crianças abaixo de três anos de idade.

Após um ano, a Portaria nº. 116ª/2000, de 3 de março constatou a existência de riscos para a saúde e segurança dos consumidores, designadamente crianças resultantes da utilização de certos artigos de puericultura e brinquedos fabricados em PVC maleável, em cuja composição se encontram determinados ftalatos.

Dessa forma estabelece:

3º É proibido o fabrico, importação, exportação, trocas intracomunitárias, comercialização ou colocação no mercado a título gratuito ou oneroso dos produtos referidos no n.1., designadamente anéis de dentição, rocas e chupetas de puericultura, quando sejam fabricados em PVC mole e contenham as seguintes substâncias:

DINP — CAS n.º 28553-12-0 EINEC n.º 249-079-5; DEHP — CAS n.º 117-81-7 EINECS n.º 204-211-0; DNOP — CAS n.º 117-84-0 EINECS n.º 204-2144-7; DIDP — CAS n.º 26761-40-0 EINECS n.º 247-977-1; BBP — CAS n.º 85-68-7 EINECS n.º 201-662-7.

Após a publicação desta portaria as indústrias brasileiras de brinquedos e artigos de puericultura, começam a retirar, em 2001, o uso dos plastificantes ftálicos em bichos, bonecos, mordedores, entre muitos outros itens fabricados em PVC flexível e destinados à primeira infância.

Após alguns anos o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) fez novas alterações quanto ao uso dos ftalatos e estes estão dispostos na Portaria 369/2007, como:

Art. 2º Estabelecer os requisitos para aceitação e ensaio de ftalatos em brinquedos.

§ 1º Os seguintes ftalatos: DEHP, DBP, BBP não devem ser utilizados, como substâncias ou componentes de preparações, em concentrações superiores a 0,1 % em massa de material plastificado, em todos os tipos de brinquedos de material vinílico.

§ 2º Os seguintes ftalatos: DEHP; DBP, BBP, DINP, DIDP e DNOP não devem ser utilizados, como substâncias ou componentes de preparações, em concentrações superiores a 0,1 % em massa de material plastificado, em brinquedos de material vinílico destinados a crianças com idade inferior a 3 anos.

Ressalta-se que a principal alteração, desta Portaria está na redução da porcentagem permitida, onde estes compostos não poderão estar presentes em concentração superior a 0,10% sobre a massa do material acabado em brinquedos destinados a crianças menores de três anos. Acima desta idade, apenas três desses plastificantes (DEHP, DBP e BBP) estão sob a regulamentação desta Portaria.

Em 2008, tem-se uma ação mais pontual - Rio de Janeiro - um projeto de lei 1.310/08, o qual defende a proibição dos ftalatos em mordedores para bebês produzidos no Brasil, devido a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmar que os mesmos causam problemas a saúde, incluindo danos ao fígado, aos rins e aos pulmões bem como anormalidade no sistema reprodutivo e no desenvolvimento sexual. Além de ser considerado altamente cancerígeno. Sendo assim, a Assembléia Legislativa do Estado do Rio De Janeiro, resolve:

Art. 1º - Fica proibido o uso da substância “ftalato” na fabricação de brinquedos.

Art. 2º - Os brinquedos de que tratam o artigo anterior abrangem entre outros as borrachas flexíveis em formato de argolas que aliviam as dores provocadas pela dentição em formação.

Art. 3º - O Poder Executivo regulamentará esta lei por ato próprio.

Art. 4º - Esta lei entrará em vigor na data da sua publicação. Plenário Barbosa Lima Sobrinho, 19 de fevereiro de 2008. (PROJETO LEI, 2010).

Portanto, evidenciou-se que a legislação brasileira quanto a proibição do uso de ftalatos ainda é lenta e demorada nas ações, enquanto que em outros países a sua utilização desde 2009 já foi proibida.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para a investigação da presença de ftalatos em plásticos utilizando o HPLC-UV-VIS

2.2 ESPECÍFICOS

- a. Desenvolver um procedimento analítico para detecção dos ftalatos empregando extração em fase sólida com utilização da cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-visível;
- b. Validar o método analítico para atender às exigências analíticas, proporcionando confiabilidade aos resultados.
- c. Analisar mamadeiras e garrafas de água natural mineral mais vendidas nos comércios da cidade de São Luís, MA.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE FTALATOS

3.1.1 Técnicas cromatográficas

As técnicas mais empregadas para análise de ftalatos são: cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrométrico de massa (MS), ou de ionização em chama (FID) ou de captura de elétrons (ECD). Temos também, com restrição a cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector Ultravioleta- Visível (UV-VIS) ou detector por arranjo de fotodiodos (DAD).

Através da Tabela 1 evidencia-se alguns trabalhos que estão relacionados com o estudo em questão, nos quais são empregadas a cromatografia líquida. Ressalta-se que a utilização desta técnica não é bastante empregada em função dos compostos serem voláteis, embora apresente baixo custo quando comparada a cromatografia gasosa.

Fica evidenciado também que os detectores mais empregados são os detectores UV-VIS e o detector por arranjo de fotodiodos. O primeiro, determina a diferença de absorvância na região do ultra violeta ou no visível, sendo, um detector seletivo para moléculas que possuem cromóforos. E o segundo são mais abrangentes, pois fornecem espectros de varredura do analito em toda região do UV-VIS.

Dentre as colunas mais utilizadas, octadecil ligada a sílica - C₁₈ apresenta vantagens porque existe diferença na seletividade resultante da presença dos grupos polares, além de ser bastante utilizada na análise dos estrogênios ambientais (MALDANER et al 2010).

Quanto às fases móveis, apresentam (Tabela 1) metanol: água (MeOH:H₂O) ou acetonitrila:água (ACN:H₂O) com ajuste da força cromatográfica e seletividade da fase móvel até se obter resolução e tempo de análise adequados. Além desses temos a adição de modificadores de ácidos e bases, como os difosfato de sódio e o tetrahidrofurano utilizados com o objetivo de favorecer o processo de ionização dos analitos através do ajuste de pH do meio, melhorando suas interações com a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS e SILVA, 2011).

Tabela 1 – Cromatografia líquida para análise de ftalato utilizada por alguns autores.

Matriz	Tipos de ftalatos	LD	Detector	Coluna e fase móvel
Plástico (PVC) ¹	DEHP	1,00 µg·mL ⁻¹	UV - 250nm	C ₁₈ – (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) Fase móvel: Acetonitrila e NaH ₂ PO ₄ (0,01M; pH=8 ajustado com trimetilamina (15:85, v/v)
Água ²	BBP;DEHP	0,05 BBP e 0,10 DEHP µg·L ⁻¹	UV- 280nm e 235 nm	C ₁₈ (244 mm x 4.0mm x 5 µm) Gradiente: 3 minutos com água, 99% acetonitrila/1% metanol (37,5 + 62,6, v/v) e 10 minutos com 99% de acetonitrila/1% metanol por 8 min.
Brinquedos e artigos para criança ³	DEHP;DBP; BBP;DOP;DINP; DIDP;	0,03 mg·kg ⁻¹ – 5,00 mg·kg ⁻¹	DAD – 225 nm	C ₁₈ , (250 mm x 4.0 mm x 5µm) Fase móvel: 25mL Acetonitrila, 17,5 mL de tetrahidrofurano e 7,5 de água
Água ⁴	DOP;DBP;DHCP	0,18–0,86 ng·mL ⁻¹	DAD – 226 nm	C ₈ (150 mm x 4,6mm x 5µm) Fase móvel: Acetonitrila e água (67:33, v/v)
Água ⁵	DMP; DEP; DBP	DMP - 1,80; DEP - 0, 88 e DBP - 0, 64 ngmL ⁻¹ ,	DAD- 280nm	C ₈ (150 mm x 4,6 mm x 5µm) Fase móvel: Metanol – água (75:25,v/v)
Águas residuais ETE ⁶	DnPP;DEP;DnBP; DEHP;	0,12 – 0,17 µg·L ⁻¹ .	DAD – 226 nm	C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 4 µm) Fase móvel: Acetonitrila água 75:25
Padrão ⁷	DPP; DIBP;DMP;DEP;DBP;BBP;D CHP;DEHP;DNOP;DAP;DHP	-----	UV- 225 nm	fenil (250mm x 4,6 mm x 5µm) Fase móvel: Metanol e água

¹ Faouzi et al, 1995; ² Jara et al 2000; ³ Hauri et al 2002; ⁴ Cai et al, 2003; ⁵ Liang, Xu e Li, 2008; ⁶ Li et al, 2008; ⁷ Wu et al 2008.

Nos trabalhos expostos na Tabela 1 não foram reportados os Limite de Quantificação (LQ). No entanto, os Limites de Detecção (LD) foram calculados através do sinal do branco de uma concentração mínima detectável fazendo em triplicata, ou seja, os resultados encontrados não representam os erros decorrentes nos processos de extração, diluição das amostras e nem mesmo as variações existentes do sinal do branco. Sendo assim, os LD's apresentam-se em $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizada na quantificação dos ftalatos por CLAE.

3.1.1.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia a gás é uma técnica bastante utilizada na determinação de ftalatos, uma vez que estes compostos apresentam alta volatilidade fundamental para análise por cromatografia gasosa.

Os trabalhos expostos na Tabela 2 para quantificação dos ftalatos utilizam a cromatografia gasosa acoplada ao detector espectrômetro de massas, pois esta combinação resulta em informações estruturais dos compostos analisados, permite composição da massa molar, composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas e boa seletividade dos compostos analisados (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

De acordo com a Tabela 2, além do detector espectrômetro de massa, temos também o de ionização em chamas (FID) que apresenta desvantagens de coeluição, o qual pode ser ajustado diminuindo-se o tempo de análise.

Temos também, para a determinação dos ftalatos o detector de captura de elétrons (ECD) que são utilizados para detectar baixíssimos níveis requeridos para as análises desses plastificantes. Este tipo de detector é extremamente sensível para tais compostos de grande afinidade eletrônica (sensibilidade reportada de até $10^{-12}\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Todavia, a desvantagem está na resposta quantitativa diferente para cada componente de uma mesma função química, demandando curvas de analíticas individuais nas faixas de trabalho (LOUREIRO, 2002).

Tabela 2 – Cromatografia a gás utilizadas em alguns trabalhos.

Matriz	Tipos de ftalatos	Detector	LD	LQ	Referência
Água (Garrafa)	DEHP;DMP; DEP; DIBP e BBP	MS	0,003 - 0,09 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,05 - 1,17 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Cao, 2008
Bebidas	DBP;DEHP;DNOP e DDP	FID	0,02 - 0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	----	Chen et al 2009
Embalagens (Filme)	DEP; DBP; DEHP;DMP; BBP; DNOP	MS	0,16 - 0,61 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	0,50 - 2,00 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	Guo et al 2010
Brinquedos	DEHP; DMP; DEP; DOP; DIDP e DINP	ECD / MS	1,00 - 5,00 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	0,10 - 3,00 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	Johnson, 2010
Saliva artificial	DMP; DEP; DBP;BBP; DEHP; DNO	MS	1,30 a 5,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	---	Ozer e Güçer, 2011
Água (garrafa)	DMP; DEP; DBP; DNOP; BBP;	MS	30,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	---	Amiridou e Voutsas, 2011
Água (garrafa)	DMP;DEP;BBPe DEHP	MS	0,8 - 1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,50 a 0,70 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Al-Saleh et al 2011.

Os limites de quantificação e detecção reportados nos trabalhos dispostos na Tabela 2 são considerados satisfatórios, uma vez que se apresentam com bons resultados de seletividade, precisão e exatidão. Entretanto estes resultados não levam em consideração os erros embutidos no processo de desenvolvimento da metodologia analítica

Além desses métodos desenvolvidos para análise dos plastificantes, temos ainda alguns métodos oficiais que regulamentam a verificação dos ftalatos em algumas matrizes, como se verifica na Tabela 3.

Tabela 3 - Métodos oficiais utilizando cromatografia gasosa para determinação de ftalatos em diversas amostras.

MATRIZ	MÉTODO	TIPOS DE FTALATOS	DETECTOR
Água	US/EPA – 806 ¹	BBP; DEHP; DnOP; DEP; DMP; DBP	ECD
Água	US/EPA – 506 ²	DEHP; BBP; DBP; DEP; DMP; DEHP; DOP	FID
Água	US/EPA – 525.1 ³	DBP; DEP; DMP;DEHP	MS
Água	US/EPA - 525.2 ⁴	DEP; DEHP; DMP	MS
Água residuais	US/EPA – 606 ⁵	DEHP; BBP; DBP; DEP; DMP; DOP	ECD
Aquosas e sólidas, incluindo as águas subterrâneas, o chorume, o solo de lodo e sedimentos.	IRMM- JRC ⁶	DMP;DEP;DBP;DPrP; DIBP;DPeP;DHXP;DN OP;DNP;DIOP;DNP;DI DP;DAP;DEHP;BBP;D HCP;BMPP;DMEP	ECD

¹ EPA, 1996; ² EPA, 1995; ³ EPA, 1991; ⁴ EPA, 1995a; ⁵ EPA, 1990; ⁶ IRMM-JRC, 2009.

3.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE EM FTALATOS

Dentre as técnicas de extração normalmente utilizadas para concentrar analitos de interesse - ftalatos, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (EFS) e, mais recentemente, a micro extração em fase sólida (SPME). Nesta temática, vários são os fatores para a escolha do modo de extração, devendo ser considerado a natureza da matriz e os tipos de substâncias a serem analisadas, a concentração dos analitos e, principalmente, a hipótese de isolar o analito ou a matriz de interesse. Sendo assim, estão dispostos na Tabela 4, alguns métodos de extração de ftalatos na água.

De acordo com a Tabela 4 – observa-se que as extrações de alguns ftalatos foram obtidas através das extrações líquido-líquido, micro extração em fase sólida e extração em fase sólida.

Os autores Johnson, Saikia e Sahu (2011), Rastogi (1998), usaram a extração líquido-líquido contínua, soxhlet, que apresenta como principal vantagem boa extração de pequenas concentrações dos analitos na matriz. Todavia, esse processo é bastante demorado, em média 16 horas e com utilização de grandes quantidades de solventes. No caso, da extração dos ftalatos o solvente empregado foi o diclorometano que tem alta volatilidade, além da capacidade para dissolver grandes variedades de ftalatos, tornando-o um solvente ideal para muitos processos químicos. No entanto, existem preocupações sobre os seus efeitos em relação a saúde.

Na extração líquido – líquido observou-se que a utilização de hexano apresenta baixos ensaios de recuperação, média de 20 a 40%, uma vez que este solvente é apenas formado por carbono e hidrogênio proporcionando pouca força de eluição (MOSKOVKIN, 2002). Já o éter etílico utilizado por Gonzáles-Castro et al, (2011) tem característica um pouco mais polar devido a presença de oxigênio em sua cadeia, que apresenta ser mais eletronegativo em relação aos demais ligantes (carbono e hidrogênio). Dessa forma, os compostos orgânicos que possuem um heteroátomo apresentam maior força de solubilização, mas as recuperações foram as mesmas do hexano, ou seja, baixos para os limites aceitáveis (BRITO et al, 2003).

O diclorometano (EARLS, AXFORD E BRAYBROOK, 2003; AMIRIDOU VOUTSA, 2011) e o clorofórmio (GONZÁLES-CASTRO et al, 2011) apresentam

recuperação acima de 70%, logo, dentro dos limites permitidos. A explicação dos bons resultados dar-se devido uma quebra de simetria nas suas estruturas apresentando características polares. No entanto, a legislação brasileira permite a presença do clorofórmio de até 0,10 mg L⁻¹, acima disso a água é considerada como não potável, sendo assim deve-se evitar o uso deste solvente, uma vez que sua presença em água é um grande fator de poluição, mesmo que em pequenas quantidades (CONAMA, 2012).

Dessa forma, nota-se que a extração líquido-líquido é uma técnica simples no manuseio, economicamente viável quanto a instrumentalização, mas a utilização desse método para extração dos ftalatos, ainda não é o mais aconselhável para o ambiente, uma vez que é utilizado grandes quantidades de solventes tóxicos, como também prejudica a saúde do operador que se expõe aos vapores dos solventes por um longo período de extração para uma boa separação do analito de interesse.

Em relação à microextração em fase sólida, constata-se que no trabalho de Prokupkova et al, (2002), os resultados das recuperações não foram satisfatórios quando utilizados as fibras polidimetil siloxano (PDMS) e poliacrilato (PA), uma vez que a primeira não é seletiva e bastante apolar, o que dificulta a extração dos compostos polares. Já a segunda mencionada, apresenta baixa estabilidade.

As fibras polidimetil siloxano/divinil benzeno (PDMS/DVB); carbowax/divinil benzeno (CW/DVB), utilizada por Chen et al (2009) apresentaram bons ensaios de recuperação, devido a boa estabilidade das fibras utilizadas principalmente quando utiliza-se uma temperatura elevada para extração de analitos voláteis, como é o caso dos ftalatos.

A Extração sortiva em barras de agitação apresenta boa vantagem, visto que os analitos são extraídos com a utilização de pequenas quantidades de solventes, mas as recuperações só foram satisfatórias para dois ftalatos (DBP e BBP) do total de cinco ftalatos (DMP;DEP; DEHA; DEHP; DOP); selecionados no estudo.

A extração em fase sólida – EFS - tem sido um dos procedimentos mais empregados para extração e/ou pré-concentração de analitos em nível de traços em matrizes complexas ou não. Principalmente, por apresentar valores aceitáveis de recuperações, conforme os trabalhos de Jara (2000) e Weimar,stuurman (2010)

O modo de funcionamento da EFS emprega adsorventes empacotados em cartuchos, pelos quais a amostra é percolada, então os analitos de interesse são

pré-concentrados e, posteriormente, eluídos para serem analisados, conforme demonstra a Figura 1.

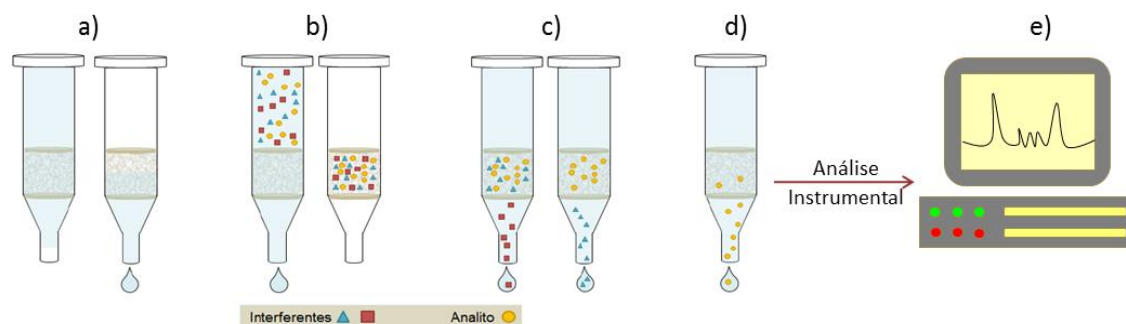


Figura 1 Procedimentos realizados na extração EFS: a) condicionamento -A amostra está entre dois filtros; b) percolação da amostra - Adiciona-se o solvente; c) Lavagem - Procede-se a eluição sob pressão; d) Eluição - Obtenção do extrato e; e) Verificação – sistema cromatográfico na quantificação do analito. Fonte: Lanças, 2009.

Observa-se através da Figura 1a, que no condicionamento do cartucho, ocorre a ativação dos sítios disponíveis do adsorvente; Na Figura 1b, observa-se a Introdução da amostra, ou seja, passagem da amostra pelo cartucho. No caso de matriz complexa pode ocorrer a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; Na Figura 1c, tem-se a limpeza ou lavagem da coluna (fase estacionária) para retirada dos interferentes menos retidos que o analito; Na Figura 1d, observa-se a Eluição do analito e na figura 1e, ocorre a análise cromatográfica.

Ressalta-se que a EFS ocorre em várias etapas e qualquer erro em uma delas pode ocasionar perda da amostra. Portanto, o analista deve conhecer as características do analito para que possa escolher qual o solvente, cartucho, volume e eluentes necessários para uma boa extração do analito na matriz.

De acordo com o que se observa na Tabela 4, o cartucho mais utilizado é o C₁₈ (octadecil), por possuir vasta aplicabilidade, permitindo extração de compostos com características diferenciadas tais, como: não polares, hidrofóbicos, ácidos ou bases fracas de soluções aquosas ou soluções em solventes polares.

A extração em fase sólida vem sendo cada vez mais aplicada como uma técnica seletiva de preparação de amostra, a qual apresenta vantagem de reduzir o nível de interferentes; minimizar o volume final de amostra de forma a maximizar a sensibilidade; fornecer a fração de analito em solvente compatível com as peculiaridades da técnica instrumental a vir a ser empregada, além de servir como filtro, removendo particulados da matriz.

Tabela 4 – Diferentes tipos de extração dos ftalatos versus recuperação encontrada nos trabalhos.

Extração	Tipos de ftalatos	Recuperação (%)
Soxhlet ¹	DEHP; DBP; DEP e BBP	85-93%
Soxhlet ²	DEHP; DBP; DINP; DIDP; BBP e DNOP	-----
Líquido-líquido ³	DEP; DBP;BBP;DEHP;DNOP	70-94%
Líquido-líquido ⁴	DEP; DBP; DEHP; DOP	-----
Líquido – líquido ⁵	DOP; DBP e DEP	75-95% Cloroformio; Hexano 21-30%; hexano com etil éter 30-40%
Líquido- Líquido ⁶	DINP; DEHP; DIDP; DBP; BBP; DnOP;	Laboratório 1: DINP 89; DIDP e DEHP -88 Laboratorio 2: DINP – 90;DIDP – 87; DEHP – 86,4
Cartucho C ₁₈ ⁷	BBP; DEHP;	DBP- 85-97,8; BBP – 97-99; DEHP 19-100,5; DnOP-24-99
Cartucho C ₁₈ ⁸	DMP; DEP; BBP; DBP; DNOP.	91-103%
Microextração em fase sólida ⁹	DMP; DEP; DBP; BBP; DEHP; DOP; DNP	-----
Microextração em fase solida e Líquido- Líquido ¹⁰	DMP; DEP; DnBP; BBP;DEHP;DnOP	SPME (%); 0-DMP; 32-DEP;115-DnBP; 116-BBP; 111-DEHP e 109 DnOP
Microextração em fase sólida ¹¹	DMP; DEP; DBP;BBP;DEHA; DEHP;BOP	-----
Microextração em fase sólida ¹²	DBP; DAP; DnOP; DEHP; DNP e DDP	DBP -91; DAP – 103,5; DEHP – 104,3; DnOP – 87,9; DNP – 108,3; DDP 98,14
Extração sortiva em barras de agitação ¹³	DMP; DEP; DBP;BBP;DEHA; DEHP;BOP	DMP- 5,1; DEP- 28,8; DBP – 93,6; BBP -98,5; DEHA 51,1; DEHP 64,3; DOP – 46,3

¹ Rastogi, 1998; ²Johnson, Saikia e Sahu (2011); ³ Amiridou; Voutsas, 2011; ⁴ Maskovkin, 2002; ⁵ Gonzáles-Castro et al, 2011; ⁶ Earls, Axford,Braybrook, 2003; ⁷ Jara, 2000; ⁸Weimar,stuurman,2010;

⁹LuKs-Betlej, 2001; ¹⁰Prokupkova et al, 2002; ¹¹ Stiles et al, 2008; ¹² Chen et al, 2009; ¹³ Seradio e Nogueira,2006

A EFS descrita anteriormente é uma técnica bastante vantajosa, quando comparada com outros métodos clássicos, como extração líquido-líquido e Soxhlet, principalmente, pela economia de tempo e solvente. No entanto, apresenta alguns problemas como a variabilidade na qualidade do adsorvente entre fabricantes, que requer adaptações para cada metodologia empregada e emprego de volumes razoáveis de solventes.

Se comparada com a extração sortiva em barras de agitação que requer um equipamento especial para dessorção do analito e com a microextração em fase sólida que possui alto custo das fibras utilizadas, é economicamente viável. Todavia, estas técnicas apresentam vantagens, pois utilizam pequenas quantidades de amostras, produz baixas quantidades de resíduos além da reutilização das fibras e barras de agitação empregadas, diferentemente da EFS onde o cartucho é utilizado de maneira única (LANÇAS, 2009).

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

As etapas de desenvolvimento, otimização e validação da metodologia para detecção dos ftalatos foram realizadas no Instituto Federal de Educação Tecnológica do Maranhão (IFMA - Campus Monte Castelo), no Laboratório 4, Grupo de Estudos Ambientais (GEA), bem como, na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.1 PADRÕES, SOLVENTES E SOLUÇÕES

Os padrões obtidos da Sigma-Aldrich, foram: **DEHP** – CAS: 117-81-7; 99,90%; **DEP** - CAS: 84-66-2; 99,20%; **BBP** – CAS: 85-68-7; 98,00%.

Os solventes metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) empregados foram de grau cromatográfico, LiChrosolv® Merck®, e a água deionizada foi obtida pelos sistemas Milli-Q da Millipore®.

As limpezas de todos os materiais utilizados na análise foram realizadas com a utilização do detergente Extran® por 24h seguidas com lavagem de água deionizada.

4.2 PREPARO E ARMAZENAMENTO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO.

Inicialmente foram preparadas soluções-estoque para cada substância (DEHP; BBP e DEP), na concentração de 100,00 mg L⁻¹. e, a partir destas, as soluções de trabalho, tanto individuais quanto mistas, contendo todos os três padrões, em diferentes concentrações.

As soluções foram preparadas através da diluição dos padrões (DEP; BBP e DEHP) em ACN com diluições sucessivas em MeOH e ACN, as quais foram armazenadas e estocadas em -4°C, analisadas por CLAE-UV com a utilização da coluna ciano.

Posteriormente, os padrões (DEHP, BBP e DEP) foram diluídos em ACN (grau cromatográfico) com diluição no mesmo solvente. Estas soluções foram armazenadas e estocadas em -4°C, sendo analisadas por CLAE-UV com uso da coluna C₁₈- Kinetex.

4.3 EQUIPAMENTO E SUAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Na Tabela 5 têm-se as especificações dos CLAE-UV utilizados durante a pesquisa. Os cromatógrafos pertencem aos laboratórios do GEA e da Central Analítica.

Tabela 5 - Especificação dos cromatógrafos empregados no estudo.

	GEA	Central Analítica
Modelo	LC20AT	LC20AT
Marca	Shimadzu	Shimadzu
detector	SPD20A	SPD20A
Coluna	Coluna CIANO Shimadzu, com 150 mm de comprimento, 2,50 mm de diâmetro interno, com partículas de 4,60 μm .	coluna Kinetex C-18, da phenomenex, com 50 mm de comprimento, 2,10 mm de diâmetro interno, com partículas de 2,60 μm .
Pré-coluna	CN x 3,0 mm	C ₁₈ x 5,0 mm

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Nesta etapa, a fim de otimizar as condições cromatográficas para análise dos ftalatos testou-se alguns parâmetros como: comprimentos de onda, coluna, fluxo, fase móvel e suas proporções para a separação cromatográfica dos analitos de interesse. Desta forma, foram analisadas as soluções de trabalho individuais dos ftalatos (DEP; BBP e DEHP) na concentração de 0,1 mg·L⁻¹.

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O objetivo de validar um procedimento analítico é demonstrar que o mesmo está adequado ao que se propõe (ICH, 1996). Conforme Lanças (2009) a validação do método consiste em oferecer resultados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas.

A validação total deve ser desenvolvida quando é implementado um método novo. Contudo a validação parcial pode ser aplicada em casos onde o

método originalmente validado foi modificado. Tais modificações podem incluir, entre outras: transferências entre laboratórios, mudanças de equipamento ou software bem como mudanças na matriz em que será analisado o analito (SHAH et al., 2000).

Segundo Brito et al (2003), os critérios a serem aplicados para validação de determinado método dependem da sua natureza e propósito(Tabela 6). Um método para um determinado analito requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente do método desenvolvido para outro analito.

Tabela 6 - Parâmetros de validação quanto à natureza do método.

Método	Precisão	Exatidão	LD	LQ	Linearidade	Especificidade
Novo	▲	▲	▲	●	●	▲
Padrão	▲	▲	▲	●	●	■
Modificado	▲	▲	▲	●	■	■

LD: Limite de Detecção, LQ: Limite de Quantificação.

▲ Sempre, ● Se relevante, ■ Não necessário.

Assim, conforme recomendação de Brito et al (2003), a proposta deste trabalho é nova quanto a validação da natureza do método. Os parâmetros analisados foram: linearidade, curva analítica, limite de detecção e limite de quantificação, precisão e exatidão.

4.5.1 Curva analítica

As curvas analíticas foram construídas a partir das análises das soluções mistas de ftalatos (DEP, BBP e DEHP) no sistema cromatográfico CLAE-UV com utilização da coluna Kinetex C₁₈, na faixa de concentração 0,50 – 10,00 µg·L⁻¹, fazendo as análises em triplicata para cada concentração, onde foram calculadas as médias e os desvios-padrão das injeções de cada concentração.

4.5.2 Linearidade e Sensibilidade

A linearidade do método foi obtida pelo coeficiente de determinação (R^2), obtido através da construção da curva analítica, e a sensibilidade foi medida segundo Brito et al (2003) e Lanças (2009), pelo coeficiente angular da equação da reta. O aplicativo Microsoft Excel® 2007 foi utilizado para a construção dos gráficos.

4.5.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação instrumental (LDI e LQI) foram estabelecidos a partir do branco da matriz. O LDI e LQI podem ser determinados mediante o sinal/ruído, o desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular da equação da reta obtida na curva de calibração (BRITO et al, 2003). O desvio padrão foi obtido injetando-se no mínimo sete vezes o branco da amostra para posterior aplicação nas Equações (1 e 2) correspondentes ao LDI e LQI, respectivamente.

$$LDI = \frac{3 \times s}{S} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$LQI = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde s = desvio padrão do branco e S = coeficiente angular da curva analítica.

Todavia, existe um interesse em se desenvolver, criteriosamente, um método com os menores valores LD e LQ, pois baixas concentrações de ftalatos podem causar desregulação endócrina no organismo. Sendo assim, os valores estimados para LQ foram a partir de dados do valor do menor nível de fortificação e LD pode ser calculada, conforme Equação (3) (BRITO et al, 2003)

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times S_{Com}}{S} \quad \text{Eq. (3)}$$

Nas quais o $t_{n,95\%}$ é o valor tabelado em função de n (número de análises); S = é o coeficiente angular da curva analítica; S_{com} = desvio padrão combinado das recuperações e desvio padrão do menor nível de fortificação, calculado através da Equação 4 (BRITO et al, 2003),

$$S_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)S_A^2 + (n-1)S_B^2}{m+n-2}} \quad \text{Eq. (4)}$$

Na qual, m= número de determinações do menor nível de fortificação; n= número de determinações do branco; S_A = desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação; S_B = desvio-padrão do branco.

4.5.4 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é estimativa através do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculada de acordo com a Equação 5:

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

Onde: S é o desvio padrão e $\bar{x}$ é a média aritmética das determinações.

4.5.5 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

De acordo com Ribani et al (2004) os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão.

Neste estudo, foi avaliado através dos ensaios de extração, o qual foi verificado usando-se amostras da matriz fortificadas em três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de concentração da curva analítica, com cinco repetições para cada nível. É importante salientar que os valores de respostas devem estar dentro dos limites aceitáveis de 70 a 120%.

4.5.5.1 Ensaios de Recuperação

Devido a recuperação está relacionada diretamente com a exatidão (BRITO et al, 2003), uma vez que esta associada a eficiência da metodologia analítica quanto ao processo de isolamento dos analitos da amostra (LANÇAS, 2009).

Para a extração do analito na matriz empregaram-se os cartuchos (500 mg, 6mL) da Phenomenex®, o octadecilsilano (C₁₈), Florisil® (Mg₂SiO₃) e Strata-X® (polímero de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada). Como também os

cartuchos PET (polímero poli - tereftalato de Etileno) Sigma-aldrich e ciano (CN/SiOH) da marca Chromabond®.

Os cartuchos testados foram acoplados a um conjunto para múltiplas extrações (Manifold) da Phenomenex® com 12 canais, com fluxo de $1,00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, utilizando 2mL de MeOH ou ACN e 2mL de água no acondicionamento seguido de eluição com 2mL de MeOH ou ACN.

Durante a execução desta etapa, usou-se água deionizada com características similares à matriz e seguramente isenta dos analitos de interesse. Desta forma, fortificou-se água deionizada com solução padrão mista de ftalatos, obtendo-se uma solução com concentração final de $10,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A partir desta, fez-se diluições sucessivas até se obter as concentrações de 0,50; 5,00 e $10,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Em outro momento, foram escolhidos e realizados outros níveis de fortificação para o composto DEP nas concentrações de 1,00; 4,00 e $8,00 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

O parâmetro para comparação dos procedimentos de extração em fase sólida foi avaliado em relação aos percentuais de recuperação dos ftalatos e calculados por meio da Equação 7 (BRITO et al, 2003):

$$t = \frac{(Rec-100)}{\frac{S_{rec}}{\sqrt{n-1}}} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde: Rec = média das recuperações obtidas para n repetições; 100 = a recuperação percentual desejada; n = número de determinações; S_{rec} = desvio padrão das recuperações.

Uma das maiores dificuldades na análise de plastificantes é a contaminação das diversas matrizes por compostos que se encontram disseminados no ambiente, além de poderem ser encontrados em materiais de laboratórios analíticos, como ponteiros, cartuchos de extração, reagentes e recipientes (SOUZA et al, 2012). Dessa forma, foram realizadas análises de brancos para controle da contaminação, como também foram substituídos materiais plásticos por materiais em vidros.

4.6 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO NOS PRODUTOS PLÁSTICOS

Após a validação, aplicou-se a metodologia analítica para a determinação do ftalato DEP em diferentes produtos plásticos de mamadeiras e garrafa de água natural mineral, comercializadas na cidade de São Luís-MA.

Para a seleção desses produtos plásticos, mamadeiras e água mineral, foi realizada uma investigação das marcas mais comercializadas através da consulta do controle de vendas dos estabelecimentos de cada estabelecimento especializados na venda destes produtos na cidade de São Luís – MA. No caso das mamadeiras, as investigações foram feitas nas lojas “bebe bonito”, “baby shop” e “Nana Baby” localizadas no centro da cidade e para as garrafas de água mineral natural a investigação foi feita no supermercado Matheus localizado no Monte Castelo.

Antes do início da aplicação do método analítico desenvolvido, aplicou-se algumas recomendações contida na embalagem das mamadeiras, as quais conforme determinação dos fabricantes deverão ser seguidas para utilização do produto, tais como:

- a) Lave a mamadeira, o bico e o anel até remover todos os resíduos;
- b) Mergulhe os utensílios e deixe ferver durante de 3 a 5 minutos;
- c) Assim que acabar a esterilização, não deixe as mamadeiras paradas no local onde foram esterilizadas. Elas devem ser retiradas da água, secadas e guardadas em local limpo para posterior utilização;
- d) Depois da mamada ou sempre que ela for utilizada com outros líquidos, como sucos e etc, o mesmo procedimento deve ser realizado.

Nas mamadeiras selecionadas, adicionou-se água deionizada e em seguida elas foram submetidas a aquecimento em banho-maria até a temperatura de 80°C. A água que estava dentro da mamadeira foi utilizada para a investigação do analito. Este procedimento foi realizado em triplicata, obtendo-se três amostras de água, com o intuito de correlacionar a liberação de ftalatos pelo polímero constituinte da mamadeira para matriz aquosa em relação ao desgaste (uso) da mesma. A Figura 2 resume a aplicação do método desenvolvido.

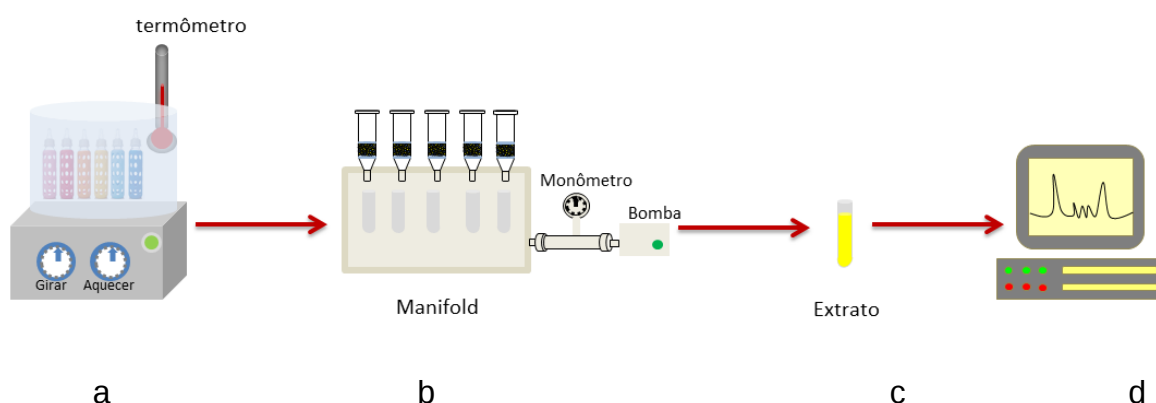


Figura 2 Etapas utilizadas na aplicação do método desenvolvido para extração dos ftalatos presentes nas mamadeiras: a) sistema de banho-maria com mamadeiras. b) método desenvolvido na extração dos ftalatos. c) extratos obtidos do processo de extração e d) análise cromatográficas

De acordo com a Figura 2, a etapa “a” demonstra o sistema de aquecimento das mamadeiras com a utilização do termômetro para monitoramento da temperatura de 80°C. Em seguida, a etapa “b” refere-se ao procedimento desenvolvido de extração em fase sólida sendo realizado com a água resfriada da mamadeira, do qual, foi obtido o extrato “c” sendo analisado por CLAE-UV (etapa “d”), para identificação do analito nas mamadeiras utilizadas pela população Ludovicense.

Em relação à investigação da presença do ftalatos nas garrafas de água mineral, no primeiro momento foi feita uma seleção das garrafas conforme data de fabricação contida em cada garrafa em seguida foi selecionada três garrafas de água da mesma marca para análise após 10, 20 e 30 dias de armazenamento, de acordo com Figura 3.

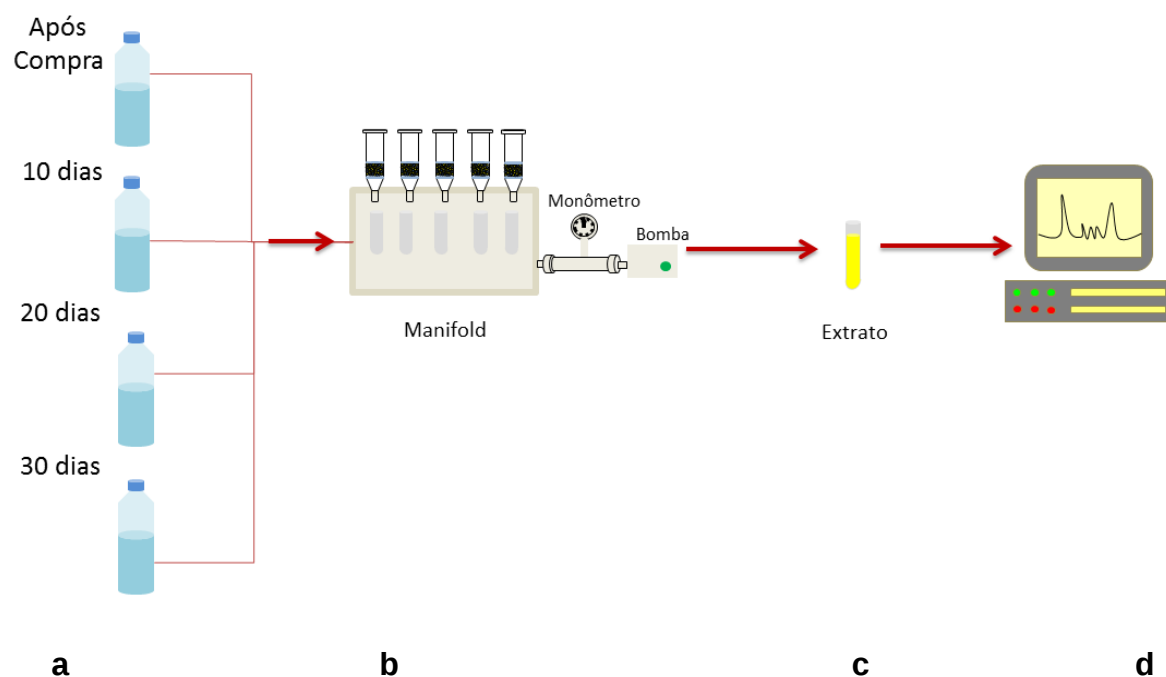


Figura 3 - Etapas utilizadas na aplicação do método desenvolvido para extração dos ftalatos presentes nas garrafas de água natural mineral a) amostras de garrafas de água mineral analisadas após compra a1, após 10 dias; 20 dias e 30 dias de armazenamento na temperatura ambiente. b) método desenvolvido na extração dos ftalatos. c) extratos obtidos do processo de extração e d) análise cromatográficas

De acordo com a Figura 3, a etapa “a” demonstra as garrafas de água natural mineral após a compra e após 10, 20 e 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente (25°C). Em seguida, conforme anteriormente explicado no Figura 2 os procedimento de extração “b”; extrato “c” e análise “d”.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Serão discutidos a seguir os resultados das condições cromatográficas desenvolvidas que compreendem: comprimento de onda, coluna, fluxo, fase móvel e suas proporções para a separação cromatográfica.

5.1 COMPRIMENTO DE ONDA

Os comprimentos de onda testados foram: 225; 250 e 280 nm, conforme reportados na Tabela 1. Todavia, o comprimento 225 nm foi selecionado devido a maior valor de absorção, uma vez que região espectral (225nm) escolhida é caracterizada através das transições de elétrons do estado fundamental (π) para o estado excitado (π^*), típicas dos cromóforos ($C=C-C=O$), ou seja, grupamentos aromáticos e carbonílicos presentes nos compostos ftálicos. Quanto aos comprimentos de onda 250 e 280nm, que apresentam cromóforos ($-C=C$); ($C=O$) apresentaram baixa absorção ou nenhuma absorção nesta região espectral desejada.

5.2 COLUNA, FASE MÓVEL E FLUXO

Para melhor compreensão dos procedimentos de otimização cromatográficas em relação a colunas, fase móvel e fluxo dividiu-se esta etapa em duas fases, conforme os tipos de colunas testadas. A fase I refere-se a testes realizados com a coluna ciano Shimadzu e a fase II aos testes realizados com a coluna Kinetex C₁₈ Phenomenex®.

5.2.1 Fase I

De acordo com Borges et al (2012), o uso de coluna ciano resulta em seletividades distintas daquelas obtidas com fases estacionárias C₁₈, devido à existência de interações π - π além das interações hidrofóbicas presentes em ligantes alquílicos. O princípio de separação com a coluna ciano são as interações dipolares fracas e interações por forças de van der Waals.

Inicialmente, os testes de fase móvel para análise dos ftalatos com a coluna ciano foram realizados individualmente para cada analito a fim de verificar a

resolução dos analitos frente as diferentes proporções dos solventes selecionados (ACN ou MeOH/ Água).

Os testes utilizando MeOH não apresentaram boas separações dos ftalatos analisados, conforme ilustra Figura 4.

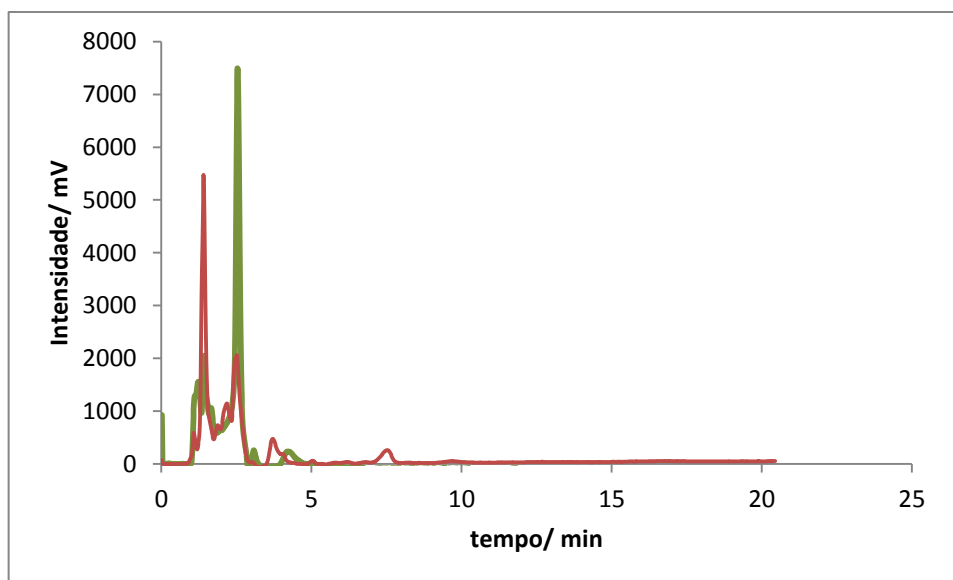


Figura 4 Cromatograma dos padrões DEHP (vermelho) e DEP (verde) utilizando na fase móvel MeOH:H₂O na proporção de 50:50(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.

Foram testados outras proporções da fase móvel, porém não foram obtidos resultados satisfatórios para as separações dos compostos analisados. Em relação ao BBP este ficou retido na coluna mesmo usando diferentes proporções de fase móvel.

Desta forma, trocou-se o solvente por ACN obtendo-se os seguintes resultados, conforme evidenciado na Tabela 7.

Tabela 7 - Proporções de fase móveis testadas para análise dos ftalatos utilizando coluna ciano, com FM: Água/ACN.

Ftalatos	Proporção (ÁGUA/ACN)	Tempo de retenção
DEHP	20:80	3,00 min
	10:90	2,00 min
	50:50	3,70 min
BBP	40:60	3,00 min
	50:50	4,00 min
	30:70	4,70 min
DEP	10:90	8,00 min
	50:50	4,50 min
	40:60	5,30 min

A proporção de Água/ACN 50:50 v/v para o ftalato DEHP (Figura 5); 30:70 v/v para o BBP (Figura 6) e DEP (Figura 7) 40:60 v/v apresentaram melhores resoluções do pico. As demais proporções apresentaram baixa resolução dos picos gerados.

Na Figura 5 e 6 observa-se que os picos obtidos entre os intervalos de 1,00 – 2,00 min são característicos dos solventes utilizados para estocagem (ACN) e diluição (MeOH) do analito.

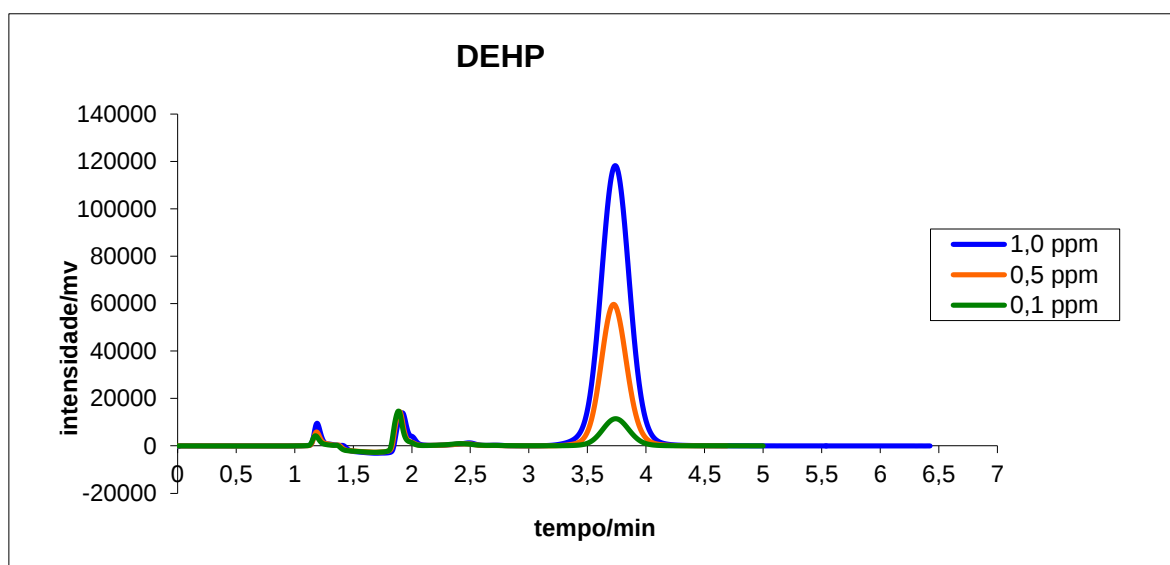


Figura 5 Cromatograma da solução do padrão DEHP utilizando na fase móvel ACN:H₂O na proporção de 50:50(v:v), comprimento de onda de 225nm, fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.

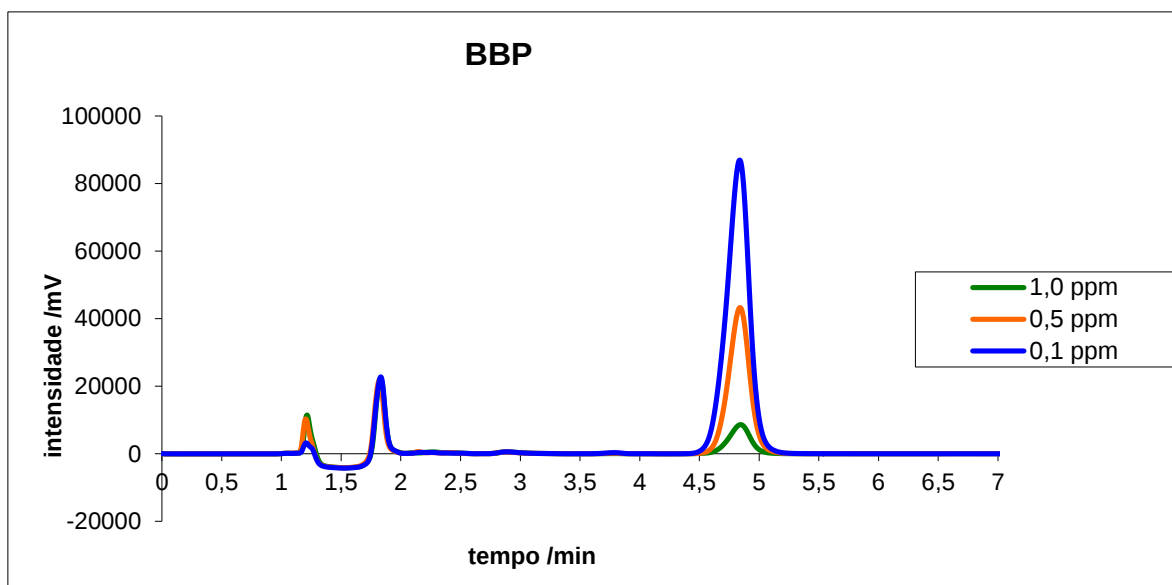


Figura 6 Cromatograma da solução de padrão BBP utilizando na fase móvel ACN:H₂O na proporção de 70:30(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL·min⁻¹ e coluna CN.

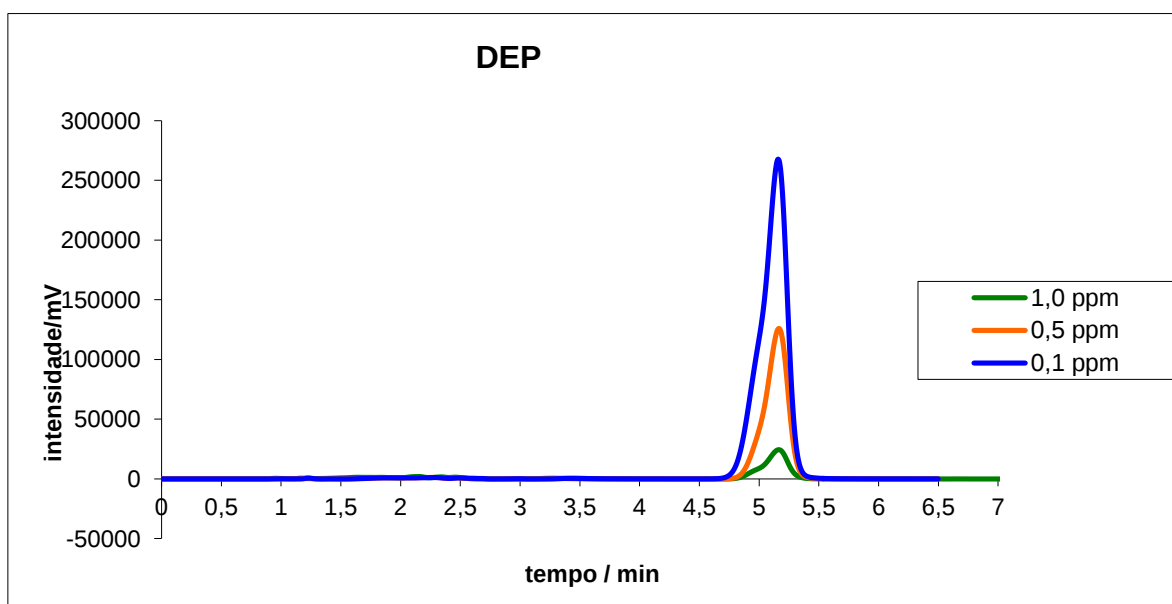


Figura 7 Cromatograma da solução de padrão DEP com condições cromatográficas: fase móvel ACN:H₂O na proporção de 40:60(v:v), comprimento de onda de 225nm e fluxo 1,00 mL min⁻¹ e coluna CN.

Após determinação individual de cada ftalato partiu-se para a otimização da programação em gradiente dos ftalatos a serem estudados. Desse modo, preparou-se uma solução mista com concentração de 10,00 µg·L⁻¹, onde foram realizadas várias programações para separação dos compostos na fase móvel ACN/Água, conforme evidenciado na Figura 8.

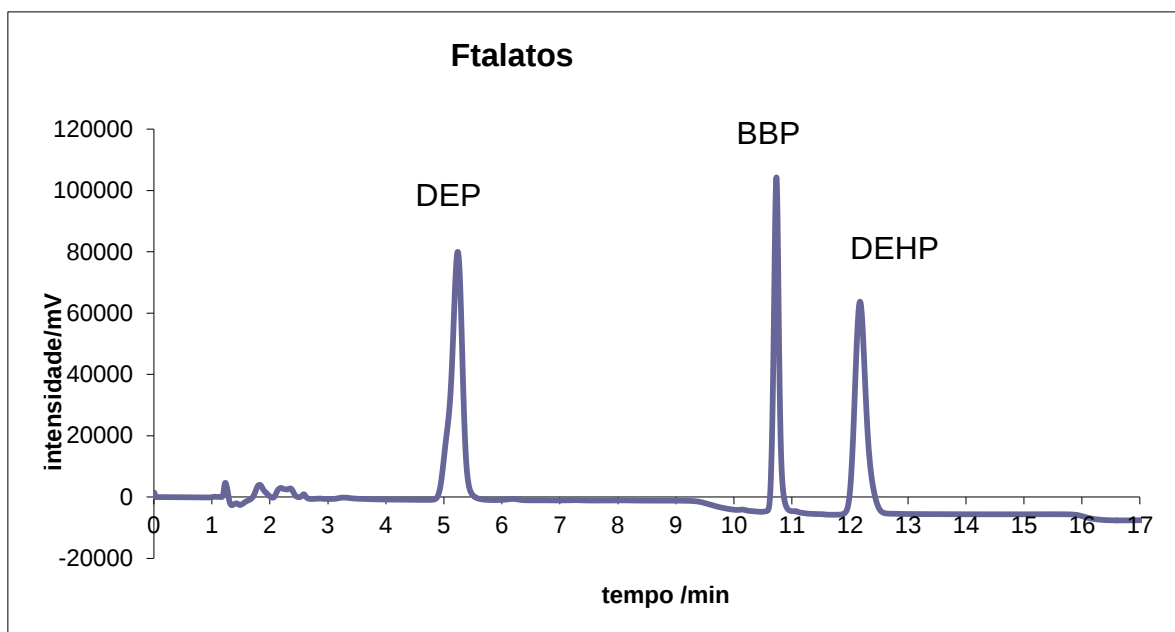


Figura 8 Cromatograma da solução-padrão mista dos ftalatos, na concentração $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM - ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda = 225 \text{ nm}$)

A Figura 8 demonstra a melhor separação alcançada dos ftalatos estudados. A programação em gradiente foi iniciada com a proporção de 40:60 v/v até 6,5 min, depois 80:20 (v/v) até 11,5 min e 90:10 (v/v) até 16,5 min, finalizando com a composição inicial de 40:60 (v/v).

Entretando, não se deu prosseguimento aos testes devido não haver repetitividade e nem reprodutibilidade nas otimizações.

5.2.2 Fase II

Nessa fase utilizou-se a Kinetex C₁₈ com fase móvel ACN/Água, com fluxo de $1,00 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ em diferentes proporções, cujo resultado expõe-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Proporções de fase móveis testadas para análise dos ftalatos com a coluna Kinetex - C₁₈, com FM: Água/ACN.

Ftalatos	Proporção (Água/ACN)	Tempo de retenção
DEP	40:60	1,00 min
	60:40	1,50 min
DEHP	50:50	4,00 min
	10:90	3,00 min
BBP	50:50	4,50 min
	10:90	4,00 min

A proporção de Água/ACN 60:40 v/v para o ftalato DEP, 10:90 v/v para o DEHP e 10:90 v/v para o BBP foram as que apresentaram melhores resoluções do pico.

Para análise utilizando a solução mista dos ftalatos, através de programação em gradiente, fase móvel ACN/Água, fluxo 1,00 mL·min⁻¹, a programação inicial foi de 50:50 (v/v) por 3,00 min e depois 90:10 (v/v) por 7,00 min, finalizando com a composição inicial de 50:50 (v/v), ilustrado na Figura 9.

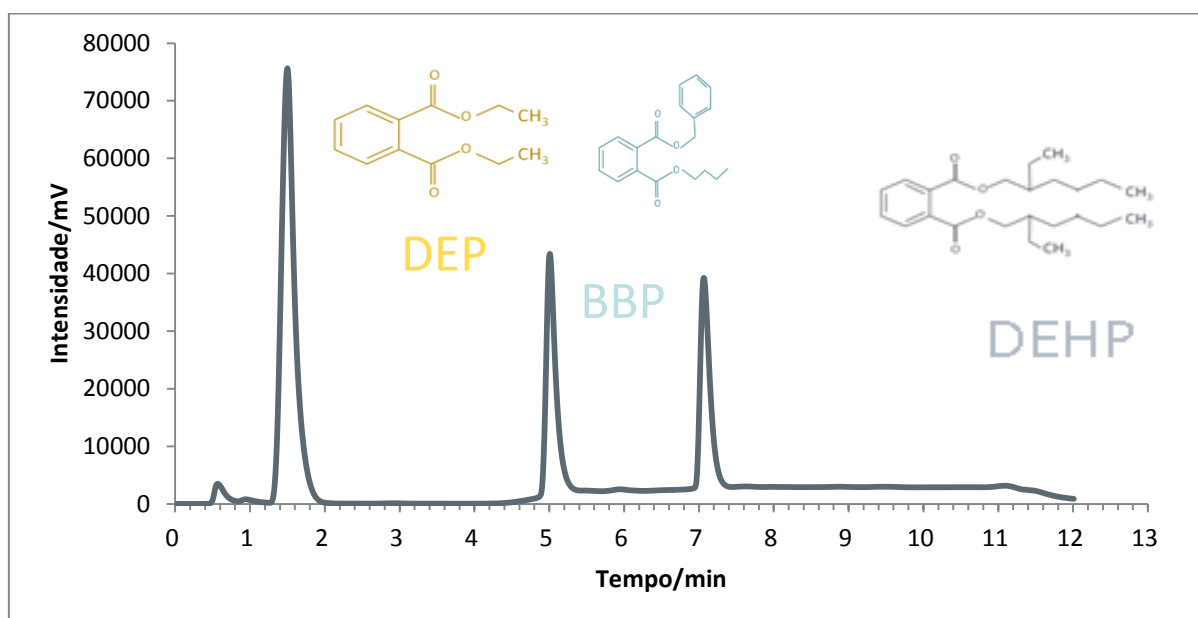


Figura 9 Cromatograma da solução-padrão mista dos ftalatos, na concentração 10,00 µg L⁻¹ para cada composto (FM ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1,00 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, λ = 225 nm)

De acordo com a Figura 8, observa-se que foi possível uma boa separação dos picos analíticos não havendo co-eluição das espécies. Ressalta-se que os testes de otimização das condições cromatográficas utilizando a coluna Kinetex C₁₈, apresentaram vantagens quando houve diminuição do tempo de análise, consequentemente foi reduzido o volume gasto com solvente. Além desses fatores, apresentou boa repetitividade e resolução dos picos. Sendo assim a coluna Kinetex C₁₈ foi escolhida para as análises cromatográficas do método a ser desenvolvido.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.3.1 curva analítica, linearidade e sensibilidade

A curvas de analíticas compreendem a faixa de concentrações de 0,50 – 10,00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em modo gradiente e isocrático, expostos nas Figura 10 e 11, respectivamente.

Ressalta-se que os órgãos governamentais da Filipinas, Estados Unidos, União Europeia, Alemanha e Canadá definem a quantidade máxima de ftalatos em água em torno de 6,00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

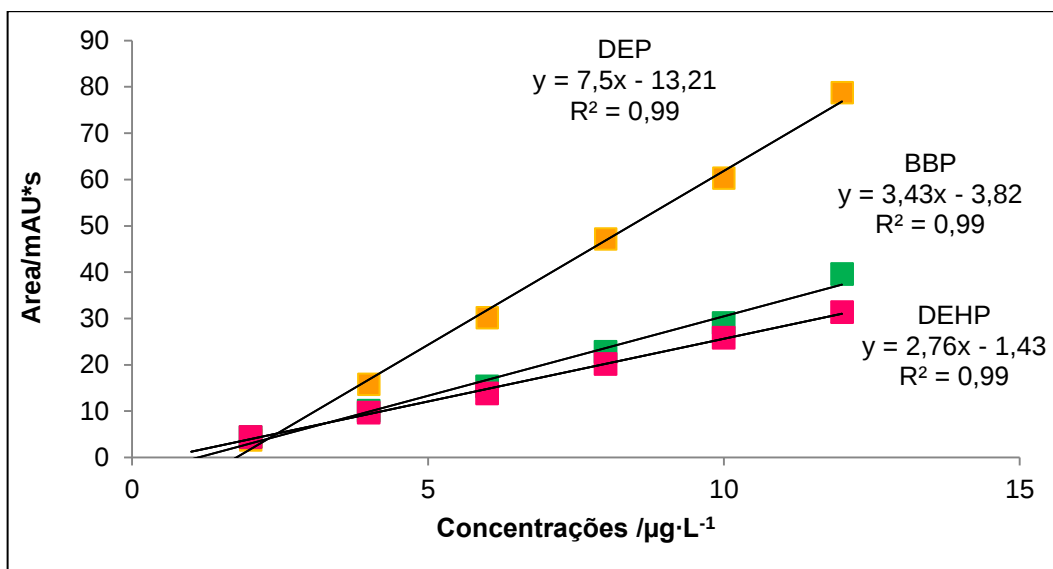


Figura 10 Curvas analíticas para os compostos ftálicos (BBP; DEHP e DEP) para as condições cromatográficas anteriormente citadas, em modo gradiente, fluxo 1,00 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de injeção de 20 μL , $\lambda = 225\text{nm}$

De acordo, com os dados obtidos das curvas analíticas foi possível perceber que os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,99, julgando ser de correlação fortíssima, sendo satisfatório para linearidade do método.

Em relação à sensibilidade, o DEP foi o que apresentou maior, uma vez que o coeficiente angular foi de 7,50 em relação aos ftalatos BBP e DEHP que apresentaram resultados 2,70 e 3,10, respectivamente. E quando se construiu uma nova curva, utilizando o modo isocrático observou-se que o DEP apresentou sensibilidade maior ainda (21,75) e maior (R^2), ilustrados na Figura 11.

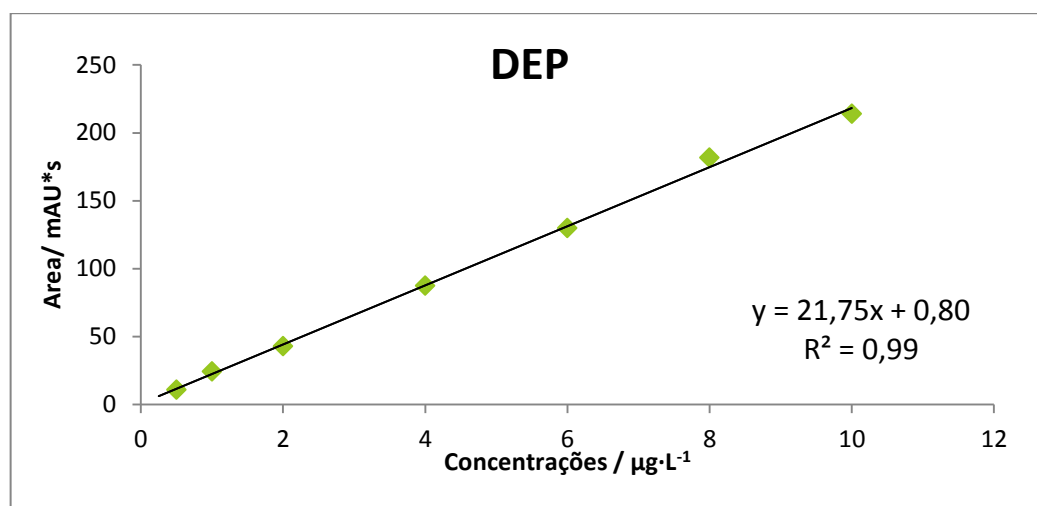


Figura 11 Curva analítica DEP para as condições cromatográficas anteriormente citadas, em modo isocrático, fluxo 1,00 mL·min⁻¹, volume de injeção de 20µL, λ = 225nm.

5.3.2 Exatidão, Precisão e Recuperação

Inicialmente, foram testados o procedimento de extração usando os solventes ACN e MeOH, onde somente o DEP apresentou bons resultados com porcentagens de recuperação dentro dos limites aceitáveis com o solvente metanol. Todavia, para os compostos BBP e DEHP as recuperações não foram satisfatórias.

A fim de melhorar as recuperações do BBP e DEHP, foram utilizados cinco tipos de adsorventes: Strata- X; Florisil; C₁₈; CN e PET, utilizando metanol como solvente de eluição com volume de 2 mL. Como se observa na Figura 12, os adsorventes strata X, C₁₈ e PET apresentaram boas recuperações para DEP e BBP.

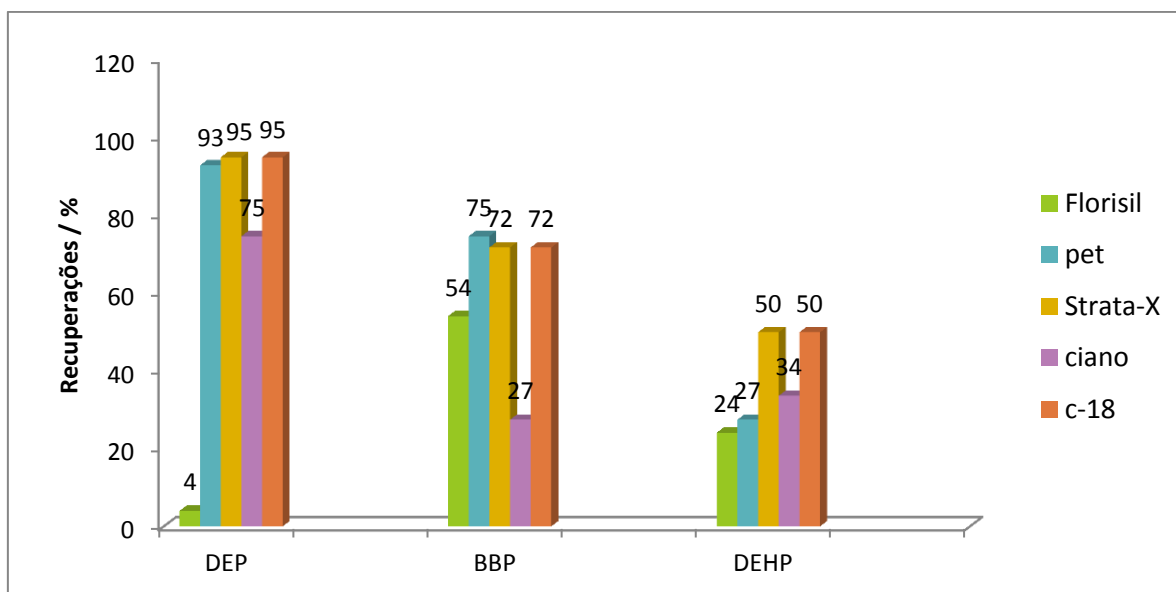


Figura 12 Comparação da utilização de diferentes adsorventes utilizados na EFS.

De acordo com a Figura 12, observa-se que com a utilização dos adsorventes ciano e florisil não foram possíveis atingir os limites aceitáveis. A explicação para baixas recuperações pode está associada a adsorção irreversível na superfície do cartucho fazendo com que o analito de interesse não seja removido com o eluente metanol (LANÇAS, 2009).

Os cartuchos Strata-X® e PET que são polímeros de estireno divinilbenzendo com superfície modificada apresentaram valores aceitáveis para DEP (95% e 93%, respectivamente) e para BBP (75% e 72%, respectivamente), uma vez que estas superfícies permitem vários mecanismos de retenção, incluindo interações hidrofóbicas, ligações hidrogênio e $\pi - \pi$, proporcionando seletividade para compostos analisados. No entanto, para o DEHP houve melhora quando comparada aos outros adsorventes, mas com limites abaixo dos aceitáveis.

Também foi testado o adsorvente mais popular para extração que é o octadecil ligado a sílica – C₁₈, cujo mecanismo de retenção dar-se por partição, devido as interações apolares entre as ligações C-H do grupo C₁₈ e C-H do analito, o qual apresentou boas recuperações somente para DEP (95%) e BBP (72%).

Devido a dificuldade de obtenção de recuperações aceitáveis para o DEHP utilizou-se apenas os compostos BBP e DEP, fazendo-se novos testes utilizando-se cartuchos C₁₈, pet e Strata X, com resultados expostos na Figura 13.

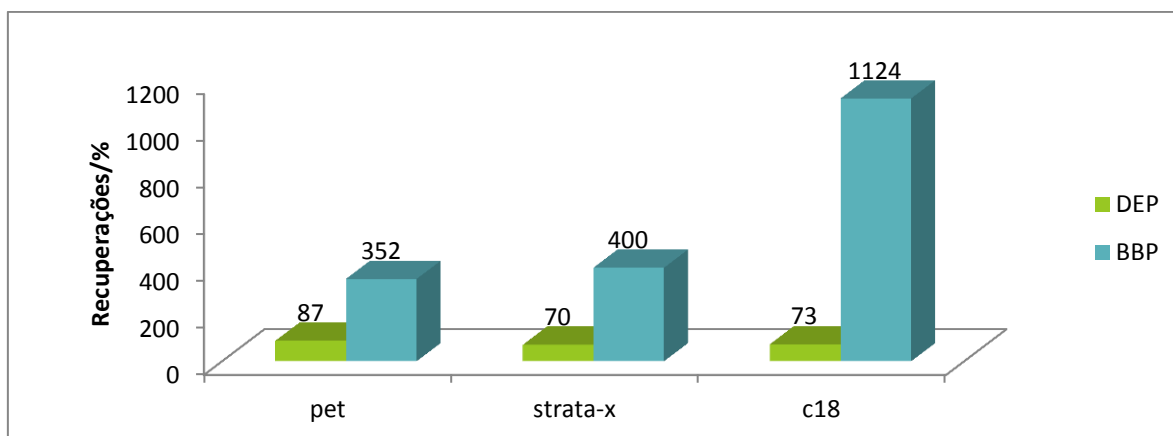


Figura 13 Recuperações do DEP nas diferentes concentrações e uso de diferentes adsorventes utilizados na EFS.

De acordo com a Figura 13, os valores de recuperação para o BBP resultaram em efeito matriz, uma vez que para os três tipos de adsorbente obtiveram-se elevados valores de recuperação nos ensaios. Já o DEP apresentou eficiência para os três adsorventes utilizados, mas devido a acessibilidade ao cartucho C₁₈ optou-se em continuar com o estudo. Dessa forma, seguiu-se o estudo analisando apenas o DEP, ilustrando os resultados das recuperações através da Figura 14.

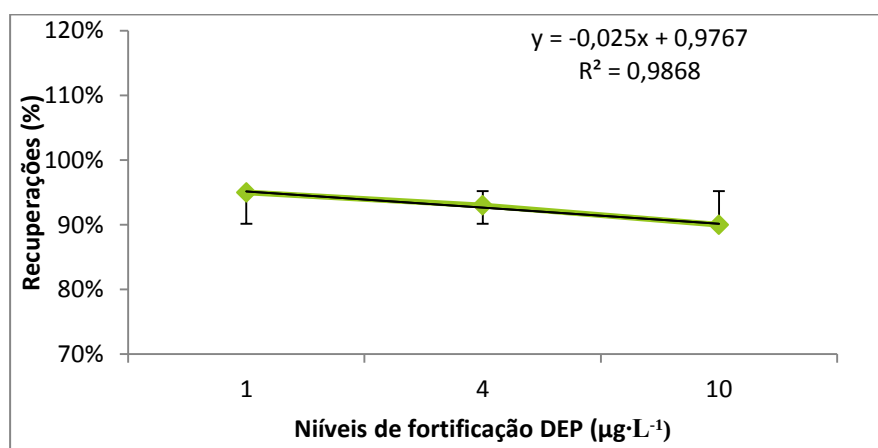


Figura 14 Linearidade entre as porcentagens recuperadas e as concentrações fortificadas.

A Figura 14 demonstra bons resultados de recuperação, uma vez que as porcentagens recuperadas foram numericamente iguais às concentrações de fortificação. Além de apresentar bons resultados de correlação (R^2) de 0,98,

coeficiente linear (0,97) e o coeficiente angular (-0,025) (BRITO et al, 2003; RIBANI et al, 2004)

A fim de avaliar a abrangência do estudo quanto à precisão e exatidão do método, a Tabela 9, mostra os resultados estatísticos.

Tabela 9 - Resultados de recuperação, exatidão, precisão obtido para cada ftalato em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5).

Níveis de fortificação ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação	Desvio padrão (S)	n	Coeficiente de variação	$t_{\text{calculado}}$
1,00	95%	0,50	5	2,40	-13,30
4,00	93%	3,90	5	4,80	-9,00
10,00	90%	0,90	5	0,50	-21,50

Foi empregado o teste de significância “t” de Student, que resultou em valor de $t_{\text{calculado}} = -13,30$; $-9,00$ e $-21,50$ para os níveis 1,00 ; 4,00 e 10,00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente dentro da faixa de aceitação sendo $t_{\text{tabelado}} = 2,70$ considerando 95% de significância e 4 graus de liberdade. Sendo assim, os valores de $t_{\text{calculado}}$ são satisfatórios, uma vez os valores de $t_{\text{calculado}}$ são menores que os valores de t_{tabelado} , logo o método proposto pode ser considerado exato.

Quanto ao estudo de precisão do método observa-se que os valores de Coeficiente de Variação (CV) encontram-se no intervalo de 0,50 a 4,80 satisfazendo os limites recomendados (20%), demonstrando que o método pode ser considerado preciso (BRITO et al 2003; RIBANI et al, 2004)

5.3.3 Limite de Quantificação (LQ) E Detecção (LD)

Os limites de quantificação e detecção foram obtidos através das fórmulas mencionadas nos procedimentos experimentais, onde os valores foram de 0,30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o LD e 1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o LQ. Já os LDI e LQI temos 1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Nos trabalhos de Ozer e Gucer (2011); Al-Saleh et al (2011) os valores de LD foram 1,30 – 5,10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 0,80 a 1,30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, Logo, o valor obtido em nossa pesquisa foi menor que os valores dos trabalhos supracitados.

Em contrapartida o valor de LQ obtido apresenta-se maior que os valores encontrados por Al-Saleh et al (2011) $0,50 - 0,70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (LQ). É importante salientar que nos processos estatísticos adotados foram levados em considerações todos os efeitos que o método está sujeito, como variações do branco e variações das amostras fortificadas do menor nível (BRITO et al, 2003).

5.4 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO DO DEP PARA OS PRODUTOS PLÁSTICOS

Aplicou-se a metodologia desenvolvida em garrafas de água natural mineral e mamadeiras para verificar a migração do DEP para os produtos plásticos mais comercializados na cidade de São Luís.

Em relação às marcas mais comercializadas de água natural mineral temos, a Figura 15 que ilustra as principais marcas.

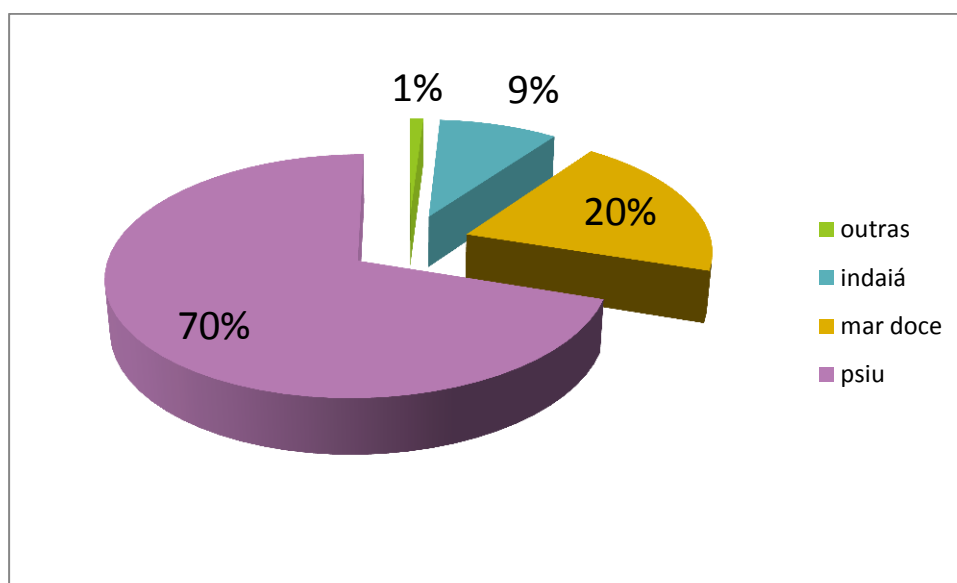


Figura 15 – Garrafas de água mineral mais comercializadas na cidade de São Luís- MA

Os resultados (Figura 15) demonstram que as garrafas de água da marca Psiu (70%) são as mais comercializadas uma vez que o produto comercializado apresenta baixo custo, ganhando destaque nos comércios da cidade de São Luís.

As garrafas de água natural mineral mar doce (20%) e indaiá (9%) eram líderes de vendas, mas a divulgação através dos meios de comunicação dos problemas de proliferação de algas e contaminação dos lençóis freáticos diminuíram a qualidade do produto e consequentemente as vendas. Porém, ainda continuam no ranking das garrafas mais comercializadas.

A Figura 16 expõe os resultados da investigação das marcas das mamadeiras mais vendidas na cidade de São Luís – MA.

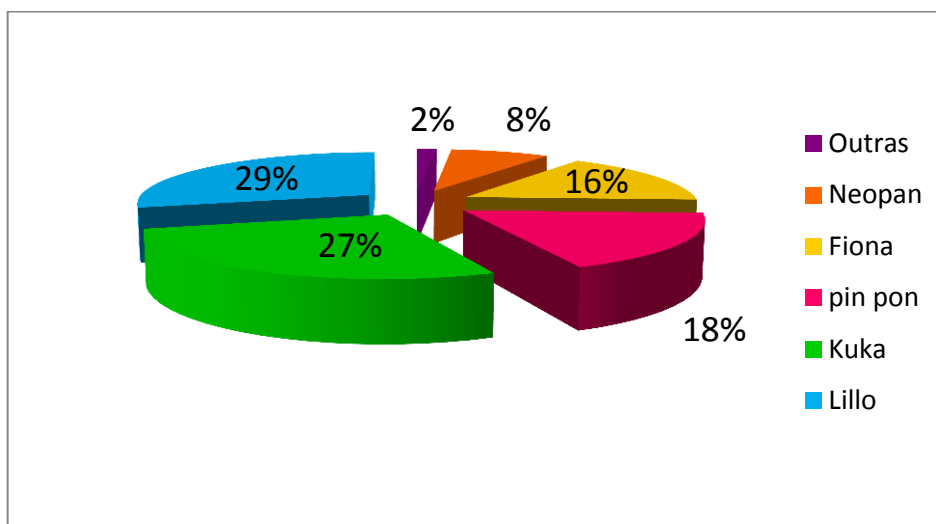


Figura 16 Mamadeiras mais comercializadas na cidade de São Luis - MA

Os resultados demonstraram que as marcas Lillo (29%) e Kuka (27%) são as mais utilizadas devido ao preço baixo e também apresentarem o bico com formato do seio materno fazendo com que o bebê não engula ar e mame como se estivesse no seio materno (TOMA e REA, 1997). As marcas pin pon (18%) e fiona (16%) também apresentam boa aceitação no mercado, devido à forma anatômica, alças que garantem segurança na alimentação, serem coloridas e possuírem desenhos na embalagem. A marca neopan (8%) é uma das marcas mais antigas no mercado, no entanto não é muito vendida devido ao alto custo. Por fim, com 2% estão as marcas: sem identificação, cefisa e kit star que são menos consumidas pela população ludovicense.

As mamadeiras, Lillo, kuka, pin pon, fiona, kit star e neopan trazem nos rótulos a identificação de que são produtos isentos da substância Bisfenol-A, conforme requisito estabelecido pela ANVISA que proibiu a fabricação de BPA e a venda de produtos no Brasil a partir de janeiro de 2012.

5.5 DETERMINAÇÃO DOS FTALATOS EM PLÁSTICOS

Após todas as etapas desenvolvidas, a Figura 17, resume o método otimizado para a determinação do ftalato nos produtos plásticos.

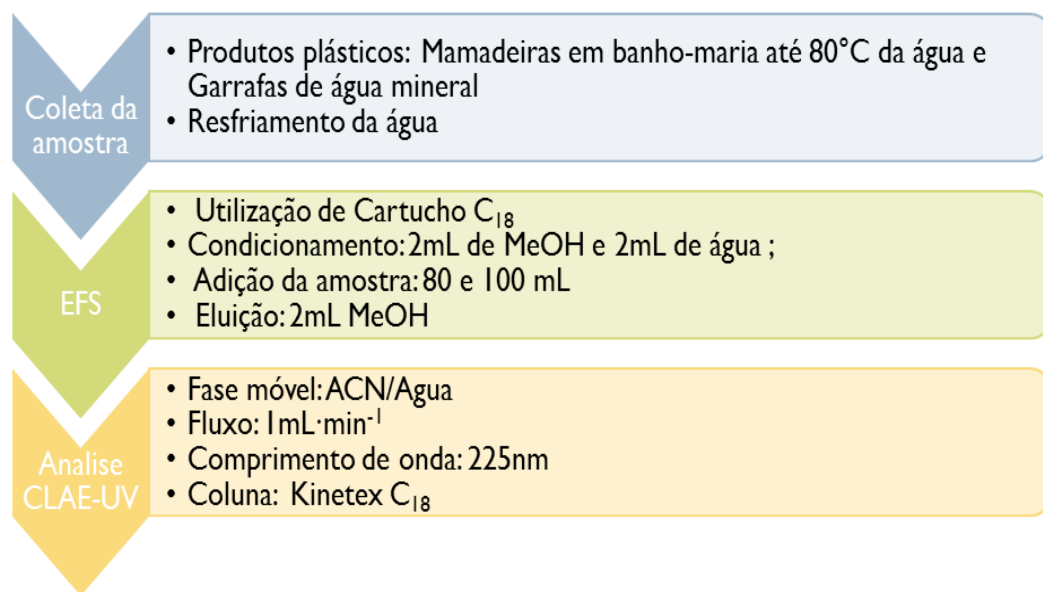


Figura 17 Fluxograma do método analítico desenvolvido para determinação do DEP nas mamadeiras.

Aplicou-se o método para detecção e quantificação da presença do DEP nas mamadeiras, cujo resultado encontra-se exposto na Tabela 10.

Tabela 10 – Determinação do DEP nas mamadeiras selecionadas conforme usos dos consumidores das mamadeiras..

Ftalato	Mamadeiras	Usos		
		1° uso	2° uso	3° uso
DEP	A	ND	ND	ND
	B	ND	ND	ND
	C	ND	ND	ND
	D	ND	ND	ND
	E	ND	ND	ND
	F	ND	ND	ND
	G	ND	ND	ND
	H	ND	ND	ND
	8	ND	ND	ND

De acordo com a Tabela 10, após a realização dos ensaios não foi possível detectar picos característico do ftalato avaliado. Entretanto, outros picos foram obtidos os quais podem estar associados a outros aditivos adicionados aos plásticos, conforme a Figura 18, Figura 19, Figura 20.

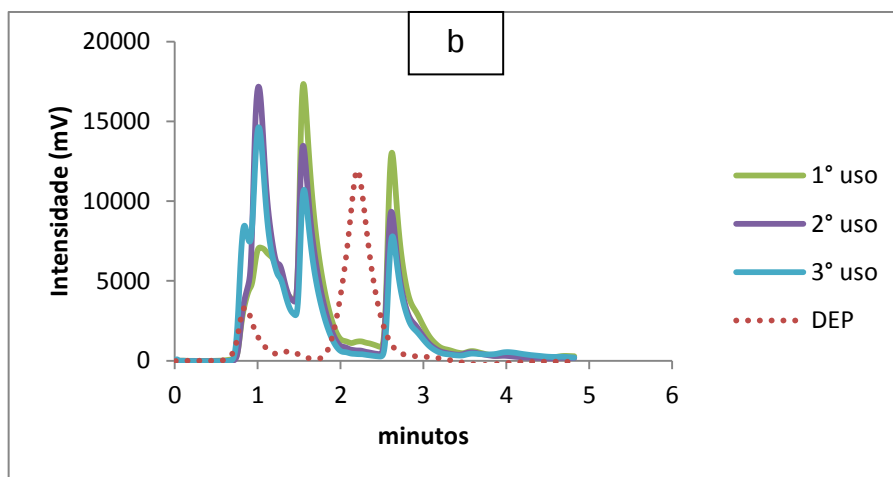


Figura 18 – Análise da mamadeira “b”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.

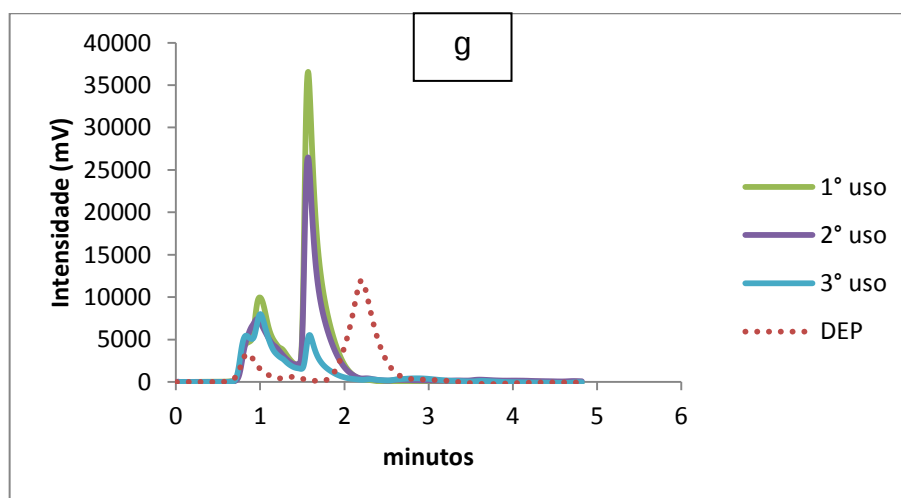


Figura 19 - Análise da mamadeira “g”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.

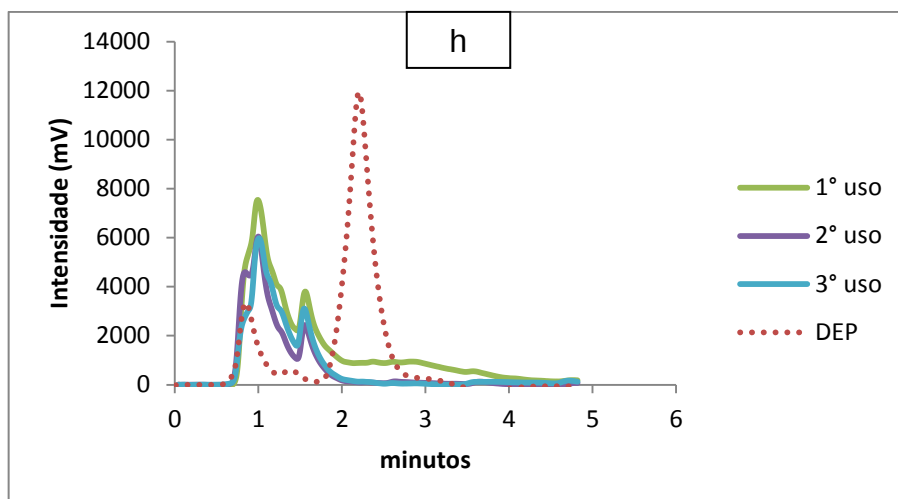


Figura 20 - Análise da mamadeira “h”; de acordo com os usos e comparação com o DEP.

De acordo com a Figura 18, Figura 19 e Figura 20 observa-se que não foi possível detectar pico de ftalatos analisado nas amostras das mamadeiras. Entretanto, nas mamadeiras “b”, “g” e “h” houve a presença de alguns componentes que apresentaram picos próximos ao tempo de retenção do DEP, mas não foram confirmados mediante a comparação do padrão do analito.

Em relação aos componentes obtidos estes podem estar relacionados a outros aditivos adicionados aos plastificantes. E para ter uma avaliação mais criteriosa fazem-se necessários outros estudos para análises utilizando o detector de massa para identificação dos componentes obtidos.

Além desses fatores, o LD e LQ podem não ter sido baixo suficientes a fim de detectar a presença do ftalatos na matriz analisada, uma vez que existem detectores mais sensíveis que permitem identificação dos ftalatos em concentrações na ordem de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Em relação a presença do DEP nas garrafas de água natural mineral o resultado encontra-se exposto na Tabela 11.

Tabela 11 – Determinação do DEP em garrafa de água natural mineral após alguns dias de armazenamento a 25°C.

Garrafa de água natural mineral (marca)	Tempo			
	0 dias ¹	10 dias	20 dias	30 dias
X	ND	ND	ND	ND
Z	ND	ND	ND	ND
W	ND	ND	ND	ND

¹ zero dias corresponde a realização da análise após compra da garrafa de água natural mineral.

De acordo com a Tabela 11, analisaram-se três marcas mais comercializadas na cidade de São Luís, as quais foram armazenadas durante as análises em temperatura de 25°C a fim de verificar a migração do ftalatos de acordo com o tempo de armazenamento, fazendo em triplicata todos os ensaios.

Os resultados demonstraram que não foi possível detectar pico de ftalato analisado nas amostras das garrafas de água mineral, uma vez o limite de detecção podem não ser baixo o suficiente para a determinação nesta amostra, conforme reportam outros trabalhos que analisaram a migração do ftalatos para a água de garrafa mineral (CAO, 2008; CHEN ET AL, 2009; GUO ET AL, 201; JONHSON 2010).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível determinar ftalatos (DEP; DEHP e BBP) utilizando a cromatografia líquida acoplada ao uv-vis, mostrando ser uma técnica adequada para separação e quantificação desses plastificantes.

A validação como parte importante e essencial no desenvolvimento de um novo método foi avaliada através dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, limites de quantificação e detecção para análises em níveis traço. Sendo assim, o método desenvolvido pode ser considerado linear, preciso e exato para o preparo da amostra e condições cromatográficas otimizadas. Em relação a confiabilidade do método, a mesma foi comprovada pelas análises dos resultados estatísticos adotados.

Na extração em fase sólida o cartucho C₁₈ apresentou melhor resultado de recuperação para o ftalatos (DEP) analisado, uma vez que está dentro da faixa recomendada (70-120%), demonstrando que pode ser aplicado com segurança no controle da contaminação por estes compostos nas matrizes consideradas.

Durante a aplicação foi verificado que não houve migração dos plastificantes para a amostra, talvez porque encontravam-se em concentrações mais baixas que os limites do método proposto.

Contudo, os limites de detecção e de quantificação precisam ser diminuídos ao nível de ng·L⁻¹, para garantir que o menor nível capaz de causar transtornos aos organismos seja identificado. Para tanto, faz-se necessária a utilização de detectores mais sensíveis, como o espectrofotômetro de massas.

REFERENCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Resolução n. 105/99. Dispões sobre os aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos, 1999.

_____. Portaria n; 116. Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos, 2000.

AL-SALEH, I. et al. Phthalates residues in plastic bottled waters. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 36, n.4, p. 469-478, 2011.

AMIRIDOU, D.; VOUTSA, D. Alkylphenols and phthalates in bottled water. **Journal of Hazzarddous materials**, v. 185, p. 281-286, 2011.

BORGES, E. M.; CORAIEB, K.; COLLINS, C.H. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso:Algumas alternativas para melhorar as separações, **Quim. Nova**, v.35, n.5, p. 993-1003. 2012.

BRITO, N.M, et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p.129-146, jan./dez.2003.

CAI, Ya-QI et al. Multi-walled carbon nanotubes packed cartridge for the solid-phase extraction of several phthalate esters from water samples and their determination by high performance liquid chromatography, **Analytica Chimica Acta**, v.494, p. 149–156, 2003.

CAO, X. Determination of phthalates and adipate in bottled water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1178, p. 231–238, 2008.

CHEN, H. et al. Determination of Phthalates in Beverages by Headspace SPME-GC Using Calix[6]arene Fiber, **Chromatographia**, v. 70, p. 883 – 890, 2009

COLACINO, J. A et al. Exposure to phthalates among premenstrual girls from rural and urban Gharbiah, Egypt: A pilot exposure assessment study, **Environmental Health**, v.10, n.40, 2011.

COLLINS, H. C; BRAGA, L. G; BONATO, S. P. **Fundamentos de Cromatografia**. 6. ed.,Campinas: Ed. Unicamp, 2006

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2002. Resolução Conama N. 307. Disponível em:< www.mma.conama.gov.br/conama> Acesso em 08/06/2012.

EARLS, A.O. AXFORD, I.P; BRAYBROOK,J.H. Gas chromatography–mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. **Journal of Chromatography A**, v.983, p.237–246, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater, method 606, 1990

_____. Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry, method 525.1, 1991.

_____. Determination of organic compounds in drinking water by liquid-solid extraction and capillary column gas chromatography/mass spectrometry, method, 525.2,1995a.

_____.Determination of phthalate and adipate esters in drinking water by liquid-liquid extraction or liquid-solid extraction and gas chromatography with photoionization detection, method 506, 1995b..

_____. phthalate esters by gas chromatography with electron capture detection (gc/ecd), method 806, 1996.

FAOUZI, M. E.A. et al. Stability, compatibility and plasticizer extraction of miconazole injection added to infusion solutions and stored in PVC containers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.13, p. 1363 -1372, 1995.

GONZÁLES-CASTRO, M.I. et al. Phthalates and Bisphenols Migration in Mexican Food Cans and Plastic Food Containers. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.86, p.627–631, 2011.

GUO, Z. et al. Development and application of a method for analysis of phthalates in ham sausages by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, **Meat Science**, v.84, p. 484-490, 2010.

HAURI et al. Determination of Phthalates in Toys and Childcare Articles Made of PVC with HPLC and HPTLC. **Mitt. Lebensm. Hyg.** v.93,n. 179, p.179–185, 2002.79

HALDEN. P. Plastics and health risks. **Annu. Rev. Public Health** , v.31, p.179–94, 2010.

ICH (International Conference on Harmonisation). **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. IFPMA: Geneva, 1996.

INSTITUTE FOR REFERENCE MATERIALS AND MEASUREMENTS, EUROPEAN COMMISSION – IRMM-JRC. Methods for the determination of phthalates in food. Luxembourg: European Communities, 2009

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO. Portaria n.º 369. 2007.

JARA, S. et al. Determination of phthalates in water samples using polystyrene solid-phase extraction and liquid chromatography quantification. **Analytica Chimica Acta** v. 407, p. 165–171, 2000.

JAROSAVA, A. et al. The distribution and accumulation of phthalates in the organs and tissues of chicks after the administration of feedstuffs with different phthalate concentrations. **Veterinarni Medicina**, v.54,n.9, p. 427–434, 2009.

JOHNSON, S. SAIKIA, N.; SAHU, R. Phthalates in Toys Available in Indian Market. **Bull Environ Contam Toxicol**, v.86, p. 621–626, 2011

KOCH HM, et al. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates – determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. **Environ Res**, n.93, p.177-185, 2003.

LANÇAS, F. M., **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**, 1ª ed., Campinas: Átomo, 2009.

LIANG, P.;XU,J.;LI, Q. Application of dispersive liquid–liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples, **analytica chimica acta**, v.609, p. 53-58, 2008.

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

LUKS-BETLEJ, K. et al. Solid-phase microextraction of phthalates from water. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p.93-101, 2001.

MALDANER, L.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1559-1568, 2010

MOSKOVKIN, A, S. Chromatographic–Mass-Spectrometric Determination of Toxic Substances Liberated from Polymeric Materials. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 507–512, 2002.

ÖZER, E.T.; GÜÇER, S. Determination of some phthalate acid esters in artificial saliva by gas chromatography–mass spectrometry after activated carbon enrichment, **Talanta**, v. 84, p. 362-367, 2011.

PROJETO LEI. Disponível em: < <http://www.jusbrasil.com.br/noticias/1067754/Projeto-proibe-uso-de-ftalato-em-brinquedos>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

PROKUPKOVÁ, G. et al. Development of a solid-phase microextraction method for the determination of phthalic acid esters in water, **Analytica Chimica Acta**, v.457, p. 211–223, 2002.

RASTOGI, S.C. Gas Chromatographic Analysis of Phthalate Esters in Plastic Toys. **Chromatographia**, v.47, n. 784, p. 724-726, 1998.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

SHAH, P. V. et. al. Bioanalytical methods validation: a revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**., v.17, n. 12, p. 1551-1557, 2000.

SILVA, C. G. A; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 34, n. 4, 2011.

SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J.M.F. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water, **water research**, v.40, p. 2572 – 2582, 2006.

STILES, R. et al. Measurement of Drinking Water Contaminants by Solid Phase Microextraction Initially Quantified in Source Water Samples by the USGS. **Environ. Sci. Technol**, v.42,p. 2976–2981, 2008.

TOMA, T. S.; REA, M. F. Rotulos de alimentos infantis: alguns aspectos das práticas de marketing no Brasil, **R. Nutr. PUCCAMP**, Campinas, v.10, n.2, p. 127-135, 1997.

WEIMAR, D. I.; STUURMAN, H.W.Determination of plasticizers (phthalic acid ester by HPLC and GC. Shimadzu, 2010.

WU S. et al. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression. **Int J Toxicol**. v.29, n.2, p.193–200, 2008.

ZINI et al. Estudo de metais e de substancias toxicas em brinquedos. **Química Nova**, São Paulo. v. 32, n. 4. p. 833-838, 2009.