

## PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE NITROSAMINAS A PARTIR DE AMOSTRAS AQUOSAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOLOGRAFIA CAPILAR ELETROCINÉTICA MICELAR

**Pedro José Sanches Filho**

Centro Federal de Educação Tecnológica do Rio Grande do Sul, Praça Vinte de Setembro, 455, 96015-000 Pelotas - RS

**Kelen Daiane Zanin e Elina Bastos Caramão\***

Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-960 Porto Alegre - RS

**Ronaldo Caramão Garcia**

Departamento de Saúde Ocupacional, Prefeitura Municipal de Pelotas, Rua Quinze de Novembro, 607, 96015-000 Pelotas - RS

**Angel Rios e Miguel Valcárcel**

Departamento de Química Analítica e Ecologia, Campus Rabanales Edifício Anexo C3, Universidade de Córdoba E-1407 - Espanha

Recebido em 13/3/02; aceito em 1/10/02

PRE-CONCENTRATION OF NITROSAMINES FROM AQUEOUS SAMPLES BY SPE AND MEKC. This paper describes the development of a methodology for solid phase extraction (SPE) and pre-concentration of nitrosamines from aqueous samples using granular activated charcoal as stationary phase. Micelar Electrokinetic Capillary Chromatography (MEKC) was used for the separation and identification of the nitrosamines in the extracts. Using a sample with  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  of each nitrosamines standards (dimethylnitrosamine, DMN; diethylnitrosamine, DEN; N-nitrosopyrrolidine, NPYR; N-nitrosopiperidine, NPIP; N-nitrosomorpholine, NMOR), the methodology showed a range of recuperation from 29 to 107% with a linear zone between 10 and  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . The developed methodology can be applicable to the determination of these analytes in different aqueous samples.

Keywords: nitrosamines; SPE; active charcoal.

### INTRODUÇÃO

O termo nitrosaminas reúne uma grande variedade de tipos estruturais de compostos de diferentes pesos moleculares, que surgem como produtos da reação de aminas ou aminoderivados com agentes nitrosantes. A característica estrutural comum<sup>1-3</sup> é a presença do grupo funcional N-NO, incluindo nitrosaminas e nitrosamidas. Esta classe de compostos, muitos dos quais carcinogênicos, foi estudada em vários materiais<sup>3-14</sup>, como gêneros alimentícios, produtos farmacêuticos, amostras ambientais (água, solo, ar etc.), pesticidas, herbicidas, borracha, cosméticos etc. Em função do potencial mutagênico e carcinogênico destes compostos em animais, estima-se que o nível de exposição tolerável pelo homem para as nitrosaminas mais voláteis encontra-se na faixa de  $5$  a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , por esta razão o limite de detecção mínimo de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  é geralmente aceito<sup>1-3</sup>.

A determinação de contaminantes traços tais como as nitrosaminas requer o isolamento e subsequente concentração do analito a partir da matriz, a fim atingir limites de detecção mais baixos<sup>1,2</sup>. A extração em fase sólida (EFS), uma técnica bastante atual, é adequada para muitas amostras com contaminantes em nível de traços, requer aparelhagem simples e proporciona um "clean up" superior à extração líquido-líquido, reduz substancialmente o consumo de solvente e o tempo requerido para o preparo da amostra para análise. O custo do material em EFS, por amostra, é igual e, em muitos casos, mais baixo que a correspondente extração líquido-líquido<sup>14,15</sup>.

Neste trabalho utilizou-se a EFS, tendo como fase sólida o carvão ativo granular. O carvão ativo, o mais popular dos adsorventes, é tradicionalmente utilizado para remoção de odores, sabores e cor, causados por contaminantes traços. Sua alta capacidade adsorviva e versatilidade permitiram expandir sua aplicação ao tratamento de

numerosos resíduos industriais. Em geral compostos orgânicos com pesos moleculares maiores que  $45 \text{ g mol}^{-1}$  são bons adsorbatos em carvão ativo<sup>15-17</sup>.

As nitrosaminas são normalmente analisadas por cromatografia gasosa com detectores específicos. O TEA ("Thermal Energy Analyser") é indicado na literatura como o detector de escolha para análise de nitrosaminas, em função da sua elevada especificidade. Entretanto, para operar continuamente, esta técnica tem alto custo inicial, requer o uso de "traps" resfriados para remoção do eluente e co-produtos formados durante a pirólise<sup>1,14</sup>, possui uso restrito e é suscetível a muitas interferências<sup>1</sup>. Em função disto busca-se métodos mais simples e mais baratos. A cromatografia capilar eletrocínica micelar (CCEM) tem se mostrado altamente eficiente, rápida e flexível como técnica de separação analítica. Sua alta eficiência permite o emprego em muitas aplicações tais como análise de proteínas, compostos farmacêuticos e poluentes ambientais<sup>18,19</sup>.

No presente trabalho desenvolveu-se uma metodologia para extração, pré-concentração e análise de nitrosaminas em matrizes aquosas usando a combinação da EFS com carvão ativo e CCEM, ampliando assim as aplicações da eletroforese capilar como técnica de análise, utilizando equipamentos comerciais e capilares de sílica.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, ou superior. Ácido clorídrico, hidróxido de sódio (utilizados no acondicionamento do capilar), diidrogenofosfato de sódio, tetraborato de sódio, ácido fosfórico,  $\gamma$ -ciclodextrina, lauril sulfato de sódio - LSS (utilizados na otimização do tampão), assim como os padrões de nitrosaminas (99,99% de pureza) dimetilnitrosamina - DMN, dietilnitrosamina - DEN, N-nitrosopirrolidina - NPIP, N-

\*e-mail: elina@vortex.ufrgs.br

nitrosomorfolina – NMOR, N-nitrosopiperidina – NPPIP foram adquiridos da Fluka e Sigma, assim como os solventes acetona e diclorometano, ambos grau HPLC, utilizados na EFS. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos padrões utilizados.

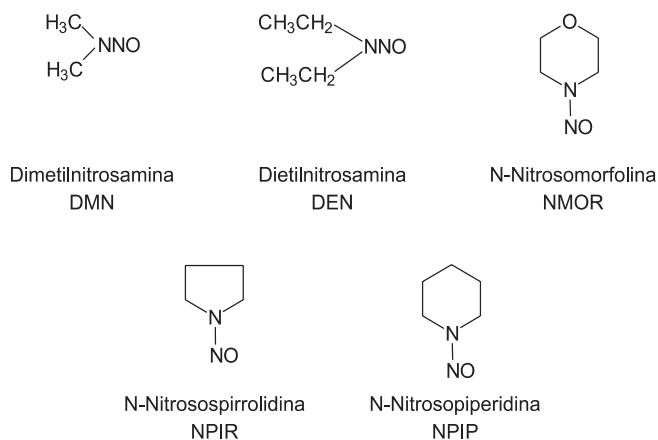


Figura 1. Fórmula estrutural das nitrosaminas estudadas neste trabalho

Carvão ativo granular 8-20 mesh foi purificado por extração em soxhlet com diclorometano (DCM), por 24 h, e seco em estufa a 105 °C, por 4 h. Soluções estoque foram preparadas a partir de cada padrão de nitrosamina a 1000 mg mL<sup>-1</sup> em metanol.

Soluções de trabalho: foram usadas soluções aquosas de padrões de nitrosaminas (10 a 1200 µg L<sup>-1</sup>), preparadas a partir de diluições da solução estoque com água ultrapura (Mili Q- System Millipore, Bedford, MA).

## Equipamentos

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de eletroforese capilar Beckman P/ACE 5500 CE Instruments com detector de arranjo de diodos UV-Vis e um capilar de sílica fundida (50 cm X 75 µm - Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) foi usado para separação e quantificação dos analitos. O sistema compreende uma fonte geradora de tensão 0 – 30 kV e o software PACE para processamento e registro dos dados.

## Procedimentos

### Extração em Fase Sólida (EFS)

Baseado em dados da literatura e também nos resultados obtidos para o carvão em pó<sup>20</sup>, foi utilizado 1 g de massa de adsorvente e 200 mL de amostra. Otimizou-se o fluxo da amostra aquosa através do leito de carvão ativo, no processo de adsorção, utilizando uma amostra sintética aquosa (mistura de padrões), em diferentes concentrações. Esta mesma mistura foi submetida a todo o processo de extração e análise após todas as variáveis terem sido otimizadas, para avaliar a exatidão do mesmo.

Procedimento: 1 g de carvão ativo granular foi agitado por 10 min com 20 mL de água MiliQ e empacotado em uma coluna de vidro (20 cm X 11 mm). O excesso de água foi retirado. Através desta coluna diferentes volumes (25, 100, 200 mL) de soluções de trabalho aquosas, em um intervalo de concentração entre 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>, foram percoladas. A dessorção dos compostos do adsorvente foi feita por eluições sucessivas com 10 mL de acetona, 10 mL de DCM e um volume adicional de 10 mL de DCM.

As frações foram concentradas sob fluxo de nitrogênio em banho de gelo, para minimizar as perdas dos analitos mais leves. Os volumes foram corrigidos para 5 mL em balão volumétrico com água MiliQ, para análise por CCEM. Todas as análises foram conduzidas em triplicata.

### Análises por CCEM

A separação por CCEM foi conduzida em um capilar de sílica a 20 °C. O tampão utilizado para a separação (eletrólito) foi uma solução 50 mmol L<sup>-1</sup> fosfato/borato e 80 mmol L<sup>-1</sup> de LSS cujo pH foi corrigido a 6,6 com uma solução de ácido fosfórico 0,1 mol L<sup>-1</sup>. A voltagem de 10 kV foi utilizada gerando uma corrente média de 80 µA. As amostras foram injetadas usando o modo de injeção eletrocínético aplicando uma voltagem de 10 kV por 10 s. Os eletroferogramas foram registrados a 236 nm. As separações foram conduzidas do anodo para catodo.

Para ativação dos grupos silanóis, o capilar de sílica fundida recém preparado foi submetido a um ciclo de lavagens padrão, de acordo com o seguinte procedimento: solução aquosa de HCl 1 Mol L<sup>-1</sup> foi passada através do capilar durante 5 min seguida de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (10 min) e água MiliQ (5 min). Para a manutenção do capilar em boas condições de trabalho, sua superfície foi regenerada uma vez ao dia por lavagens consecutivas com água MiliQ (5 min) seguida por NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> recentemente preparado (5 min), água MiliQ (5 min) e tampão recentemente preparado (20 min).

O pico de cada analito foi identificado através da comparação dos tempos de migração, obtidos a partir da análise dos padrões.

### Método EFS-CCEM

Para avaliar o método eletroforético combinado com o processo de pré-concentração otimizado, foram construídas curvas de calibração no intervalo de 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>. Cada ponto da curva corresponde ao valor médio obtido a partir de, pelo menos, três medidas independentes de áreas. O limite de detecção (LD) foi calculado pelo uso de três vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular, enquanto que o limite de quantificação foi calculado pelo uso de 10 vezes o desvio padrão do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular<sup>21</sup>.

A exatidão do processo de pré – concentração foi estudada através da análise de uma solução aquosa padrão. Estudos de recuperação foram desenvolvidos a partir de soluções de trabalho aquosas em intervalos de 10 a 1000 µg L<sup>-1</sup>. A análise de 200 mL de uma amostra contendo 50 µg L<sup>-1</sup> de DMN, DEN, NPIR, NMOR e NPPIP foi repetida 11 vezes para o cálculo do desvio padrão relativo percentual (% DPR).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### EFS

O estudo da EFS usando carvão ativo em pó já foi testado em nosso laboratório<sup>20</sup>, apresentando bons resultados para o isolamento de nitrosaminas em amostras aquosas. Entretanto, este processo implica na utilização da metodologia em batelada devido à impossibilidade de operação em coluna, causada pela pequena granulometria (100 a 400 mesh) a qual dificulta a eluição, resultando em separações extremamente demoradas. Este procedimento de EFS é, também, muito trabalhoso, lento e expõe o processo a maiores riscos de contaminação. Por outro lado, o uso do carvão granular permite trabalhar no processo de leito fixo (em coluna), minimizando as dificuldades e contaminações associadas ao processo em batelada.

A Figura 2 apresenta os dados relativos à variação da recuperação obtida para o método usando todo o conjunto de nitrosaminas, em função da vazão da amostra através da coluna. Observou-se que o fluxo de 2,5 mL min<sup>-1</sup> proporciona melhores recuperações. Quando o processo é conduzido com a máxima vazão, 5,0 mL min<sup>-1</sup> (torneira totalmente aberta), ocorre redução significativa nas áreas dos compostos NPIP, NPIR, DEN, indicando a necessidade de tempo de contato um pouco maior.

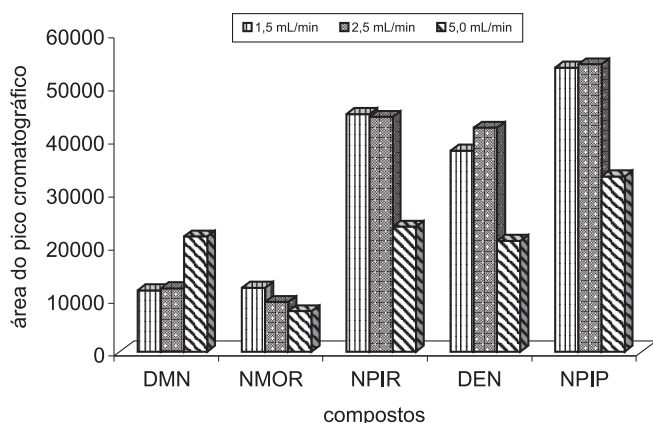


Figura 2. Influência da vazão sobre a EFS das nitrosaminas usando 1 g de carvão ativo granular

#### Estudo das recuperações para carvão granular e saturação da fase

A Tabela 1 apresenta as variações de recuperação obtidas variando-se o volume e a concentração das amostras sintéticas. Os valores

de recuperações encontram-se dentro da faixa obtida pelo método oficial EPA 8070A<sup>22</sup>, recomendado para análise de nitrosaminas em amostras aquosas. Observa-se, nesta tabela, que análise direta por CCEM das amostras após o processo EFS (águas residuais) permitiu a detecção dos compostos DMN e NMOR, a partir de 25 mL de uma amostra sintética contendo 20 µg de cada nitrosamina, indicando que as mesmas não foram totalmente retidas na coluna. Isto foi confirmado no estudo de amostras sintéticas, onde a massa de cada nitrosamina foi aumentada cerca de 100 vezes (200 mL da solução 200 µg L<sup>-1</sup>). A percentagem de recuperação neste caso é reduzida à medida em que a percentagem de compostos que permanecem junto à água residual sofre um incremento.

O aumento do volume de amostra a ser percolada de 25 para 200 mL favoreceu o estudo de faixas de concentração mais baixas, porém o composto DMN (menor massa molecular e maior polaridade) parece sofrer um lixiviamento indicado pela queda na percentagem de recuperação quando se passa de 25 para 200 mL de amostra.

As baixas recuperações apresentadas pelos compostos DMN, NPIR e NMOR explicam-se por sucessivas perdas durante os processos de troca de solvente e redução de volume e, principalmente, durante a adsorção a partir do extrato aquoso, em função da elevada polaridade.

#### Caraterização do método

A Tabela 2 apresenta as equações resultantes da regressão linear e os principais parâmetros para caracterização do método EFS analisado por CCEM, obtidos a partir da construção de curvas de calibração por pré-concentração de 200 mL de misturas sintéticas, utilizando carvão ativo granular. Os limites de detecção, linearidade e reprodutibilidade da metodologia são aceitáveis para a variedade de analitos estudados na faixa de concentração de 10 a 500 µg L<sup>-1</sup>.

Tabela 1. Estudo das recuperações para EFS utilizando carvão granular

	20 µg de cada analito 25 mL de amostra (800 µg L <sup>-1</sup> )		Análise direta		10 µg g de cada analito 200 mL de amostra (50 µg L <sup>-1</sup> )		200 µg de cada analito 200 mL de amostra (1000 µg L <sup>-1</sup> )		Análise direta	
	% Rec.	%DP	% - Água residual	% DP	% Rec.	%DP	% Rec.	%DP	% - Água residual	% DP
DMN	71,2	3,1	29,2	1,0	29,3	5,6	19,3	6,4	50,2	4,2
NMOR	37,1	2,8	10,0	9,0	51,6	13,6	21,6	2,62	58,7	2,1
NPIR	66,8	2,3	Nd*		58,0	10,0	42,0	1,18	13,1*	2,4
DEN	78,3	2,0	nd		81,8	11,4	39,6	0,00	nd	
NPIP	103,6	4,0	nd		107,6	12,8	39,2	1,64	nd	

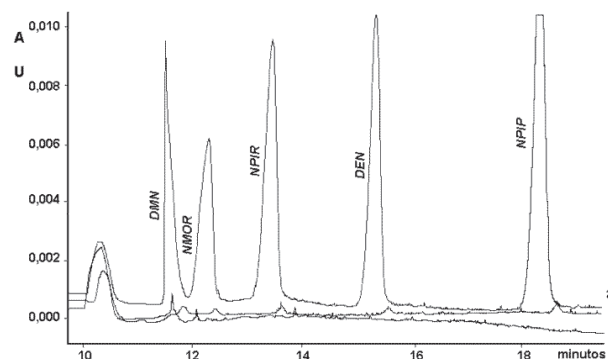
\* nd: não detectado; Rec.: Recuperação; DP: Desvio padrão

Tabela 2. Caracterização do método EFS/CCEM (Volume de amostra = 200,0 mL)

Analitos	equação Y = a + bx	r	R <sup>2</sup>	S y/x	LOD	LOQ	RSD %
DMN	a = 101,59 ± 150,4 b = 47,9 ± 1,32	0,996	99,2	332,60	9,4	31,3	5,6
NMOR	a = 1173,35 ± 79,1 b = 69,7 ± 0,69	0,999	99,9	174,9	3,4	11,34	13,6
NPIR	a = 1769,1 ± 304,9 b = 94,09 ± 2,68	0,993	99,2	517,16	9,6	32,4	10,0
DEN	a = 1565,9 ± 303,4 b = 96,01 ± 2,69	0,996	99,2	671,17	9,5	31,6	11,4
NPIP	a = 1411,6 ± 224,8 b = 146,0 ± 1,98	0,999	99,8	497,19	4,6	15,4	12,8

a: coeficiente de correlação linear; b: coeficiente angular; S y/x: desvio padrão dos resíduos; r: coeficiente de correlação linear; R<sup>2</sup>: coeficiente de semelhança (%) obtido pela análise da variância (ANOVA) para validação do método; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação (LD e LQ em µg L<sup>-1</sup>)

Observa-se que os limites de detecção variaram entre 9,6 - 3,4  $\mu\text{g L}^{-1}$ , estando de acordo com o exigido como pré-requisito para análise de nitrosaminas<sup>1-3</sup>. Como os limites de detecção foram calculados a partir do desvio padrão do coeficiente linear, uma maior concordância dos resultados implica em menores valores de LD e LQ. Os valores de %DPR entre 5,6 e 13,6, considerados baixos para a faixa de concentração analisada, demonstram repetibilidade aceitável do método, como consequência principal da facilidade de dessorção dos analitos, pelos solventes utilizados. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 3, a qual apresenta a comparação dos eletroferogramas dos eluatos de acetona, diclorometano e água residual (amostra após passagem através da coluna de carvão ativo).



**Figura 3.** Eletroferogramas resultantes da análise de 200 mL de uma amostra sintética ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) fracionada por EFS: (a) eluato com acetona, (b) eluato com diclorometano e (c) água residual analisada diretamente

Mesmo sendo obtidos partir da pré-concentração de 200 mL de uma amostra sintética a  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , observa-se que quase a totalidade dos analitos foram dessorvidos pela acetona. A Tabela 2 também evidencia, através dos valores dos coeficientes angulares, que o método é mais sensível para os compostos DEN, NPIR, NPIP, como consequência direta de seus elevados teores de recuperação e resposta na detecção espectrofotométrica utilizada no CCEM. De modo geral, os coeficientes de semelhança ( $R^2$ ) indicam que as equações encontradas se ajustam em mais de 99,2% para explicar a relação entre área e concentração para os analitos estudados. Os valores de  $S_{yx}$ , por sua vez, indicam baixa incerteza no dado obtido.

## CONCLUSÃO

O método desenvolvido permitiu a extração, pré-concentração e análise das nitrosaminas em níveis de  $\mu\text{g L}^{-1}$  em amostras aquosas. A aplicação da metodologia a amostra sintética apresentada na Tabela 3 permitiu a determinação dos analitos com um erro relativo variando entre 1,6 a 8%, conforme pode ser observado. O maior erro encontrado corresponde ao composto DMN que na mistura está em menor concentração e também está sujeito a maiores perdas durante o processo.

O tempo total de análise e a eficiência do método usado encontram-se dentro de valores aceitáveis para a análise de amostras aquosas como as aqui propostas. Embora apresente alta eficiência, e sensibilidade para separação dos compostos, a detecção espectrofotométrica carece da especificidade necessária à análise de nitrosaminas. Isto poderá ser superado em equipamentos acoplados com detectores de massas.

**Tabela 3.** Estudo da exatidão do método para amostras sintéticas

analito	Quantidade adicionada ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Quantidade encontrada ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%DPR	% Recuperação	Erro (%)
DMN	0,050	0,046	5,3	92,0	-8,0
NMOR	0,100	0,098	7,8	98,0	-2,0
NPIR	0,250	0,246	5,0	98,4	-1,6
DEN	0,300	0,293	4,0	97,7	-2,3
NPIP	0,200	0,206	9,0	97,0	+3,0

DPR = desvio padrão relativo

## REFERÊNCIAS

- Ikeda, K.; Migliorese, K. G.; *J. Soc. Cosmetic. Chem.* **1990**, *41*, 283.
- Sen, N. P. Em *Toxic Constituents of Animal Foodstuffs*; Liener, I. E., ed.; Academic Press: New York, 1974, p. 132.
- Charpentier, S.; *The Ecologist* **2001**, *Abril*, 54.
- You, J.; Fan, X.; Lao, W.; Ou, Q.; Zhu, Q.; *Talanta* **1999**, *48*, 437.
- Zwickenpflug, W.; Ritcher, E.; *J. Chromatogr. Sci.* **1987**, *25*, 506.
- Oliveira, C. P.; Glória, M. B. A.; Barbuor, J. F.; Scalan, R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 967.
- Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Baddoo, P. A.; Weber, D.; *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 731.
- Maxwell, R. J.; Pensabene, J. W.; Fiddler, W.; *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, *31*, 212.
- Tomkins, B. A.; Griest, W. H.; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2533.
- Fine, H. D.; Ross, R.; Rounbehler, D. P.; Silvergleid, A.; Song, L.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 1069.
- Sen, N. P.; Seaman, S. W.; Page, B. D.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *788*, 131.
- Glória, M. B. A.; Barbour, J. F.; Scalan R. A.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 814.
- Stephany, R. W.; Freudenthal, J.; Egmond, E.; Gramberg, L.; Schuller, P. L.; *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 536.
- Fu, C.; Xu, H.; *Analyst* **1995**, *120*, 1147.
- Noll, K. E.; Gounaris, V.; Hou, W-S.; *Adsorption Technology for Air and Water Pollution Control*, Lewis Publishers Inc.: Michigan, 1992, p. 1.
- Martin, R. J.; Shackleton, R. C.; *Water Res.* **1990**, *24*, 477.
- Borghesani, G.; Locatelli, V. L.; *Ann. Chim.* **1983**, *73*, 137.
- Altria, K. D.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 443.
- Dabek - Zlotorzynska, E.; *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2453.
- Sanches Filho, P. J.; Caramão, E. B.; Zanin, K. D.; *Resumos do VIII Congresso Latinoamericano de Cromatografia (COLACRO)*, Buenos Aires, Argentina, 2000.
- Arce, L.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Córdoba, Espanha, 1998.
- <http://www.epa.gov/epahome/index/nameindx3.htm>, acessada em Março 2002.