UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS EM ÁGUAS DE
INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA.**

Heliara Dalva Lopes do Nascimento
Tese de Doutorado

Prof^a. Dr^a. Lílían R. Franco de Carvalho
Orientadora

São Paulo, 05 de dezembro de 2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

N244d Nascimento, Heliara Dalva Lopes do
Desenvolvimento de método para determinação de
nitrosaminas em águas de interesse à saúde pública / Heliara
Dalva Lopes do Nascimento. -- São Paulo, 2003.
122p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Carvalho, Lillian Rothschild Franco de

1. Quimiluminescência : Química analítica 2. Água :
Contaminação : Saúde Pública I. T. II. Carvalho, Lillian
Rothschild Franco de, orientador.

543.0852 CDD

“Desenvolvimento de método para determinação de nitrosaminas em águas de interesse à saúde pública”

HELIARA DALVA LOPES DO NASCIMENTO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Química Analítica.

Aprovada por:

Profa. Dra. LILIAN ROTHSCCHILD FRANCO DE CARVALHO
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ROY EDWARD BRUNS
IQ – USP

Prof. Dr. ROLF ROLAND WEBER
IQ – USP

Profa. Dra. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI SANTIAGO DA SILVA
IQ – UNESP - Araraquara

Profa. Dra. GISELA DE ARAGÃO UMBUZEIRO
CETESB - SP

SÃO PAULO
05 DE DEZEMBRO 2003.

À Deus por tudo...

**Aos meus pais Elvira e Mário,
aos meus irmãos Heliaracy,
Mário César e Maurício pelo
apoio e compreensão.**

**À minha filha Lygia pelo
carinho, dedicação, por toda
ajuda e por ser esta filha
maravilhosa.**

À Prof^a Dr^a Lilian R. F. de Carvalho,
que eu conhecia como profissional e
passei a admirar também como pessoa,
pela orientação, confiança, amizade e
pela oportunidade de realizar
este trabalho.

A todos os amigos que ajudaram
este sonho a se tornar
realidade.

AGRADECIMENTOS

À Oxitenó e à sua direção que permitiram a realização deste trabalho. Aos gerentes de Pesquisa e Desenvolvimento Bruno Concone e Liane Regina Barata que incentivaram a realização deste trabalho e aos amigos Mirna Lia Simas, Paulo Kuniyoshi e Maria Vitória por todo apoio recebido.

Aos amigos do Lema: Alexandre, Célia, Cristina, Denise, Emy, Larisse, Mauricio, Prof^a. Pérola, Prof. Jorge, Dulce e Silvana pelo carinho e amizade e, muito especialmente, à Andrea, ao José Carlos e à Regiane por toda a ajuda que me deram durante muitos finais de semana.

Aos funcionários do Instituto de Química, da USP, por toda ajuda prestada no decorrer deste trabalho. À Adriana Barreiros, excelente profissional e amiga, pela correção nas referências bibliográficas.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa Analítica da Oxitenó pelo apoio e amizade: Adailton, Bira, Celso, Cintia, Evandro, Raquel, Márcio, Maria, Mery, Patricia, Roseli, Sérgio, Vagner e, em especial, à Elvira, Eliane, Gilberto, Silvia, Marília e Mirian pela grande ajuda e apoio.

Aos amigos da Oxitenó, do laboratório Agroquímico: Valter, Eduardo, Gisele, Thiago e Ubiratan, por toda ajuda e pelo uso e “abuso” do refrigerador e do laboratório.

Aos amigos da Oxitenó, do Segmento Cosméticos: Daisy e Ricardo Pedro, pela amizade e pela grande ajuda na revisão do trabalho.

Aos amigos da Oxitenó, da Planta Piloto: Alaor, Dárcio, David, Gilberto, Hilário, Júlio, Marcos, Mauricio, Sérgio, Sidney e Wilson, pela amizade e pela ajuda no acompanhamento das extrações durante a noite e ao Fábio Caraméz, pelos palpites muito bem vindos, no planejamento de experimentos.

À CETESB na pessoa da Dr^a Gisela de Aragão Umbuzeiro pelo grande estímulo e pelas amostras cedidas para este estudo.

À SABESP e funcionários da Unidade Boa Vista pelo apoio e coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

Às amigas do IPT: Prof^a. Dr.^a Clarita Peres e Prof^a. Dr.^a Queenie Hang Chui, pela leitura, pelas sugestões, por toda colaboração e pela amizade.

À amiga Raquel Guilherme da Costa, pela cuidadosa revisão e formatação final do trabalho.

À amiga Cristina Ramalho, pelo empréstimo dos padrões e pela ajuda.

Aos Prof^{os} Roberto Tokoro e Mauro Bertotti, por terem me aberto as portas de seu laboratório e ao amigo José Roberto pelo auxílio prestado nas análises polarográficas, que apesar de não estarem aqui citadas, muito contribuíram para o meu conhecimento.

Ao Prof^o Roy Bruns, minha admiração e meus agradecimentos.

Ao Laboratório Analytical Solutions e, em especial, ao químico André Giglio, por todo apoio prestado e pelos padrões enviados.

À Souza Cruz, em especial, ao químico Waldenir Braga, por haver aberto seu laboratório para a comparação de resultados e por transmitir sua experiência

À ANTEK , em especial, ao Dr Michael King, pelo apoio e pelos ensinamentos.

À PAC, Petroleum Analyser Company, em especial, ao Sr. Henry Montoya por toda atenção e apoio durante minha visita à Antek .

Aos amigos da PENSALAB, em especial, ao Alexandre, Paulo e Marcelo Alves de Oliveira pelo grande auxílio prestado.

Ao Marcelo Calazans de Souza, da Agilent, pela ajuda na instalação e depois pelo grande auxílio na recuperação dos dados quando sofri uma pane na HD.

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	1
1. Água	1
1.1 Água e sua importância.....	1
1.2 Disponibilidade da água.....	2
1.3 Legislação e características.....	4
2. As Nitrosaminas.....	7
2.1 O que são e como se formam.....	7
2.2 Ocorrência das nitrosaminas.....	12
2.3 Toxicidade.....	14
3. Métodos analíticos para determinação de Nitrosaminas em águas	19
CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL.....	24
1. Materiais e Métodos.....	24
1.1 Reagentes, solventes, materiais e equipamentos.....	24
1.1.1 Reagentes e solventes.....	24
1.1.2 Materiais.....	24
1.1.3 Equipamentos.....	25
1.2 Preparo das Soluções.....	29
1.2.1 Preparo das nitrosaminas voláteis.....	29
1.2.2 Preparo das nitrosaminas não voláteis.....	30
1.2.3 Descarte.....	30
1.3 Locais de amostragem e critérios para escolha de amostras.....	30
1.4 Métodos de pré-concentração.....	38
1.4.1 Extração líquido-líquido.....	38
1.4.2 Extração em fase sólida.....	38
1.4.2.1 Escolha da fase sólida.....	38
1.4.2.2 Escolha do solvente de dessorção.....	39
1.4.3 Extração em circuito fechado.....	40
1.5 Métodos de concentração.....	40
1.5.1 Evaporação com N ₂	40
1.5.2 Microextração em fase sólida (SPME).....	40
1.5.3 Concentração em circuito fechado.....	43
1.6 Separação e detecção.....	43
1.6.1 Otimização das condições cromatográficas (GC/TEA).....	43
1.6.1.1 Temperatura e parâmetros do injetor vs velocidade linear vs modo <i>split / splitless</i>	43
1.6.1.2 Avaliação do tempo de <i>splitless</i>	43
1.6.1.3 Influência <i>purge flow</i> e seringa.....	44
1.6.1.4 Estudo dos parâmetros: temperatura do elemento “ <i>peltier</i> ” ou “ <i>cooler</i> ”; fluxo de ozônio; fluxo de oxigênio e temperatura do forno de	

pirólise.....	44
1.6.1.5 Avaliação da seletividade na pirólise.....	44
1.6.1.6 Estudo da linearidade da resposta do detector de quimiluminescência (TEA).....	45
1.6.1.7 Construção das curvas analíticas.....	45
1.6.1.8 Avaliação do limite de detecção do equipamento.....	46
1.6.1.9 Avaliação da precisão e recuperação do procedimento.....	46
1.6.1.10 Monitoramento do desempenho do sistema cromatográfico – cartas de controle.....	47
1.6.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	47
1.6.2.1 Detecção por CG/MS das nitrosaminas voláteis (NDMA, NDEA, NDPA, NMOR, NPIP, NDBA e NPYR).....	47
1.6.2.2 Detecção de nitrosamina não volátil (NDELA).....	48
1.7 Aplicação do método analítico em amostras de águas.....	49
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
1. Métodos de pré-concentração.....	54
1.1 Extração líquido-líquido.....	54
1.2 Extração em fase sólida.....	58
1.2.1 Escolha da fase sólida.....	58
1.2.2 Escolha do solvente de dessorção.....	59
1.3 Extração em circuito fechado.....	61
2. Métodos de concentração.....	61
2.1. Microextração em fase sólida (SPME).....	62
3. Separação e detecção.....	68
3.1 Otimização das condições cromatográficas (GC/TEA).....	68
3.1.1 Temperatura e parâmetros do injetor x velocidade linear x Modo <i>Splitless</i>	68
3.1.2 Avaliação do tempo de <i>splitless</i>	70
3.1.3 Influência do <i>purge flow</i> e seringas.....	71
3.1.4 Estudo dos Parâmetros: temperatura do elemento “ <i>peltier</i> ” ou “ <i>cooler</i> ”; fluxo de ozônio; fluxo de oxigênio e temperatura do forno de pirólise.....	72
3.1.5 Avaliação da seletividade em função da temperatura de pirólise.....	81
3.1.6 Estudo da linearidade da resposta do detector de quimiluminescência (TEA).....	82
3.1.7 Construção das curvas analíticas.....	83
3.1.8 Avaliação do limite de detecção do equipamento.....	91
3.1.9 Avaliação da precisão e recuperação do procedimento.....	93
3.1.10 Monitoramento do desempenho do sistema cromatográfico – cartas de controle.....	93
3.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	94
3.3 Aplicação do método proposto para a análise de nitrosaminas em água.....	99
CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

Índice de Tabelas

Tabela I-1	Níveis máximos admissíveis de nitrosaminas em águas, de acordo com a <i>National Recommended Water Quality Criteria</i>	5
Tabela I-2	Propriedades espectrais das nitrosaminas.....	11
Tabela I-3	Propriedades físico-químicas das nitrosaminas avaliadas.....	12
Tabela I-4	Toxicidade das nitrosaminas expressa como como DL 50 (mg Kg ⁻¹) e D50 (mol Kg ⁻¹).....	17
Tabela I-5	Comparação de detectores para compostos nitrogenados.....	20
Tabela III-1	Resultados obtidos nas amostras analisadas positivas ao teste de Ames (*), cedidas pela CETESB	31
Tabela III-2	Caracterização de água de poço.....	35
Tabela IV-1	Eficiência da extração líquido-líquido (%).....	55
Tabela IV-2	Recuperação de nitrosaminas em XAD4 com diferentes solventes (%) N=5.....	59
Tabela IV-3	Eficiência de recuperação na concentração (%)	62
Tabela IV-4	Matriz de planejamento – Otimização da extração por SPME – Fibra PDMS.....	64
Tabela IV-5	Matriz de planejamento – Otimização da extração por SPME – Fibra Carbowax/DVB.....	66
Tabela IV-6	Matriz de planejamento – Otimização das condições de operação cromatográfica	69
Tabela IV-7	Influência do tempo de <i>splitless</i> e do solvente na resposta do detector (mV/s)	70
Tabela IV-8	Fatores analisados e níveis testados.....	72

Tabela IV-9	Matriz de experimento com valores de A, B, C e D.....	73
Tabela IV-10	Coeficientes de contraste de um planejamento 2^4	74
Tabela IV-11	Efeitos.....	75
Tabela IV-12	Variância, erro padrão do efeito e valor limite para significância.....	76
Tabela IV-13	Efeitos calculados e intervalos de confiança.....	76
Tabela IV-14	ANOVA do modelo fatorial proposto.....	78
Tabela IV-15	Curvas analíticas – respostas obtidas em unidades de área (mV/s) com a mistura padrão em diferentes concentrações de nitrosaminas voláteis.	83
Tabela IV-16	Limites de detecção e quantificação do equipamento GC/TEA.....	91
Tabela IV-17	Resultados obtidos por GC/TEA, dos extratos recebidos.....	100
Tabela IV-18	Resultados obtidos por GC/TEA nas amostras de água coletadas.....	104
Tabela IV-19	Concentrações de NDMA reportadas em águas avaliadas em estudos anteriores.....	106

Índice de Figuras

Figura I-1	Estrutura das nitrosaminas avaliadas.....	8
Figura I-2	Isômeros Z e E formados pela delocalização eletrônica.....	9
Figura I-3	Formação de nitrosaminas.....	9
Figura I-4	Formação de nitrosaminas a partir de aminas primárias, secundárias e terciárias.....	10
Figura I-5	Mecanismo de formação de nitrosaminas em águas cloradas.....	14
Figura I-6	Mecanismo de ação proposto para a atividade carcinogênica e mutagênica.....	15
Figura I-7	Esquema do teste de Ames.....	19
Figura III-1	Equipamento empregado na avaliação de fases sólidas por SPE.....	25
Figura III-2	Equipamento para extração líquido-líquido em circuito fechado (ELLCF).....	25
Figura III-3	Sistema GCTEA, Antek, modelo 7090 NS.....	26
Figura III-4	Células fotomultiplicadoras e câmaras de reação para nitrogênio e enxofre.....	27
Figura III-5	Câmara de reação mostrando filtros seletivos para enxofre e nitrogênio.....	27
Figura III-6	Câmaras de produção de ozônio.....	28
Figura III-7	Controladores mássicos de fluxo.....	28
Figura III-8	Esquema representativo do tratamento da água na RMSP.....	33
Figura III-9	Mapa de localização da cidade de Tremembé.....	34
Figura III-10	Microextração em fase sólida (SPME).....	41

Figura III-11	Fluxograma do procedimento analítico empregado.....	50
Figura IV-1	Água tratada – extração em meio ácido (azul) e extração em meio neutro (vermelho).....	56
Figura IV-2	Água bruta – extração em meio neutro (azul) e extração em meio ácido (vermelho).....	57
Figura IV-3	Avaliação do desempenho das fases sólidas (SPE).....	59
Figura IV-4	Extração por SPME – Escolha da fibra.....	63
Figura IV-5	Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: a) efeito da espessura da fibra e da temperatura de extração; b) efeito da presença do eletrólito e pH.....	65
Figura IV-6	Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: temperatura, pH e tempo na extração das nitrosaminas por SPME a) NDMA, b) NDEA, c) NDBA, d) NDELA.....	67
Figura IV-7	Temperatura e parâmetros do injetor x velocidade linear x modo <i>splitless</i>	69
Figura IV-8	Avaliação do tempo de <i>splitless</i> , usando piridina ou acetona como solvente.....	71
Figura IV-9	Gráfico dos efeitos.....	77
Figura IV-10	Gráfico dos resíduos.....	78
Figura IV-11	Gráfico da superfície de resposta para o oxigênio e temperatura do forno.....	79
Figura IV-12	Gráfico da superfície de resposta para o <i>cooler</i> e ozônio.....	79
Figura IV-13	Gráfico da superfície de resposta para <i>cooler</i> , oxigênio e forno.....	80
Figura IV-14	Cromatograma de mistura padrão de nitrosaminas submetidas à pirólise, a 350° C.....	81

Figura IV-15	Cromatograma de mistura padrão de nitrosaminas submetidas à pirólise, a 600° C.....	81
Figura IV-16	Cromatograma de mistura padrão de nitrosaminas submetidas à pirólise, a 800° C.....	82
Figura IV-17	Curvas analíticas na faixa de 0,5 – 10 µgL ⁻¹ de nitrosaminas voláteis.....	84
Figura IV-18	Curvas analíticas na faixa de 25 a 250 µgL ⁻¹ de nitrosaminas voláteis.....	86
Figura IV-19	Curvas analíticas na faixa de 250 a 1000 µgL ⁻¹ de nitrosaminas voláteis.....	89
Figura IV-20	Cromatograma das nitrosaminas – Mistura Padrão - concentração 0,5 µgL ⁻¹	92
Figura IV-21	Cromatograma das nitrosaminas – Mistura Padrão - concentração 1 µgL ⁻¹	92
Figura IV-22	Carta de controle do período de 21/06 a 03/07/03.....	94
Figura IV-23	Espectos de massas das nitrosaminas avaliadas a) NDMA, b) NDEA, c) NDPA, d) NPIP, e) NDBA, f) NMOR, g) NPYR, h) NDELA....	95
Figura IV-24	Cromatograma do extrato 1H ⁺ proveniente de água tratada de ETA.....	101
Figura IV-25	Cromatograma do extrato 2H ⁺ proveniente de água tratada de ETA.....	101
Figura IV-26	Cromatograma do extrato 3NB proveniente de água tratada de ETA.....	102
Figura IV-27	Cromatograma do extrato 3H ⁺ proveniente de água tratada de ETA.....	

		102
Figura IV-28	Cromatograma do extrato 4 da água bruta coletada em rio (Jan)...	103
Figura IV-29	Cromatograma do extrato da água bruta coletada em rio (Jun).....	103
Figura IV-30	Cromatograma de amostra da água bruta coletada no rio Paraíba..	105
Figura IV-31	Cromatograma de amostra da água bruta, coletada em poço.....	105

Siglas

AED	Detector de Emissão Atômica;
CERCLA	Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act;
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental;
CLND	Chemiluminescent Nitrogen Detector;
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente;
CWA	Clean Water Act;
CW/DVB	Carbowax / Divinilbenzeno;
ELCD	Detector de Condutividade Eletrolítica;
ELL	Extração líquido-líquido;
ELLCF	Extração líquido-líquido em circuito fechado;
EPA	Environmental Protection Agency;
ETA	Estação de Tratamento de Água;
EUA	Estados Unidos da América;
GCMS	Gas Chromatograph Mass Spectrometry;
GPS	Global Position System;
GCTEA	Gas Chromatograph Thermo Energy Analyser;
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy;
IRIS	Integrated Risk Information System;
KD	Kuderna Danish;

LAMIN	Laboratório de Análises Minerais;
LD	Limite de Detecção;
LQ	Limite de Quantificação;
MOE	Ministry of the Environment;
NDBA	N-nitrosodibutilamina;
NDEA	N-nitrosodietilamina;
NDELA	N-nitrosodietanolamina;
NDMA	N-nitrosodimetilamina;
NDPA	N-nitrosodipropilamina;
NDPhA	N-nitrosodifenilamina;
NIST	National Institute of Standards and Technology;
NMOR	N-nitrosomorfolina;
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector;
NPIP	N-nitrosopiperidina;
NPYR	N-nitrosopirrolidina;
NTP	National Toxicology Program;
ONU	Organização das Nações Unidas;
PA	Poliacrilato;
PCI MS	Positive Chemical Ionization Mass Spectroscopy;
PDMS	Polidimetilsiloxano;
PFPD	Pulsed Flame Photometer Detector;

PSL	Pulsed Splitless;
PTFE	Politetrafluoroetileno;
RCRA	Resource Conservation and Recovery Act;
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo;
SABESP	Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo;
SIM	Single Ion Monitoring;
SL	Splitless;
SPE	Solid Phase Extraction;
SPME	Solid Phase Microextraction;
SPTD	Short Path Thermal Desorption;
TEA	Thermo Energy Analyser;
TSCA	Toxic Substances Control Act;
WHO	World Health Organization.

Entre os compostos orgânicos tóxicos possíveis de serem encontrados em águas de consumo humano, estão as nitrosaminas, substâncias nitrogenadas originárias da reação de aminas com compostos nitrosantes e de difícil detecção pelos métodos convencionais.

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de rotina alternativa para a determinação de nitrosaminas em águas e a aplicação deste procedimento em algumas amostras de interesse à Saúde Pública.

Um minucioso estudo e otimização dos parâmetros envolvidos na detecção e separação cromatográfica empregando o detector de quimiluminescência induzida por ozônio ou *Thermo Energy Analyser* (TEA), permitiram melhorar em 10 vezes a sensibilidade deste equipamento, permitindo assim a análise de traços de nitrosaminas, com o auxílio de uma pré-concentração da amostra e sem a necessidade do dessorvedor térmico.

Comparativamente a outros detectores, o uso do GC/TEA elimina as várias etapas necessárias para a descontaminação de material, requisitadas no uso do NPD e apresenta sensibilidade compatível com as técnicas de espectrometria de massas empregadas (*High Resolution Mass Spectroscopy* (HRMS) e *Positive Chemical Ionization Mass Spectroscopy* (PCI MS)), com a vantagem de uma operação mais simples e de menor custo.

Para o alcance do objetivo, a utilização do planejamento de experimentos foi uma ferramenta fundamental. Por intermédio dela, os parâmetros críticos, como o fluxo de gases, temperatura de pirólise, etc. das principais etapas envolvidas no processo analítico, puderam ser estudados e otimizados.

A metodologia proposta para a análise de traços de nitrosaminas em águas empregando GC/TEA mostrou boa especificidade, linearidade e precisão adequada com coeficientes de variação, na análise cromatográfica, na faixa entre 6 a 12% para as nitrosaminas voláteis analisadas. Considerando o propósito das análises, os limites de detecção alcançados foram adequados, como por exemplo, 0,2 ngL⁻¹ para a N-nitrosopiperidina e 2,0 ngL⁻¹ para a N-nitrosopropilamina levando em conta a recuperação obtida na etapa de pré-concentração.

O método foi aplicado em amostras de água tratada, água bruta de reservatório e de rio, água de poço artesiano e extratos orgânicos provenientes de amostras de águas

bruta e tratada. Algumas nitrosaminas voláteis de interesse toxicológico foram detectadas, como por exemplo, a N-nitrosodimetilamina (NDMA), que foi encontrada, dependendo da amostra, em concentrações menores que $0,3 \text{ ngL}^{-1}$, limite de detecção, até $5,0 \text{ ngL}^{-1}$.

Among the poisonous organic compounds liable to be found in waters of human consumption, are the nitrosamines, nitrogenous substances originated from amine reaction with nitrous compounds, and of difficult detection by the conventional methods.

The scope of this study was to develop an alternative routine methodology for the nitrosamine determination in waters and the application of this procedure in some samples of interest to the Public Health.

A meticulous study and optimization of the parameters involved in the detection and chromatographic separation using a chemiluminescence detector induced by ozone or Thermo Energy Analyser (TEA), allowed a 10 times improvement in the sensibility of this equipment, allowing trace analysis of nitrosamines, with the aid of a pre-concentration of the sample and without the need of the thermal desorber.

Comparing to other detectors, the use of GC/TEA eliminates several necessary stages for material decontamination, required in the use of NPD and it comparable presents sensibility with such Mass Spectrometric techniques as High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS) and Positive Chemical Ionization Mass Spectroscopy (PCI MS), with the advantage of simpler operation at lower cost.

To achieve the objective, the use of statistical of experimental design was a fundamental tool. By means of it, the critical parameters, such as the gas flow rate, pyrolysis temperature, among others involved in the analytical process, could be studied and optimized.

The methodology proposed for the analysis of nitrosamine traces in waters using GC/TEA showed good specificity, linearity and appropriate precision with a coefficient variation, in the chromatographic analysis, in the range between 6 and 12% for the analyzed volatile nitrosamines. Considering the purpose of the analyses, the detection limits reached were appropriate, as for instance, $0,2 \text{ ngL}^{-1}$ for N-nitrosopyperidine and $2,0 \text{ ngL}^{-1}$ for N-nitrosopropylamine taking into account the recovery obtained in the pre-concentration stage.

The method was applied to samples of treated water, raw water of reservoirs and rivers, water of artesian wells and organic extracts coming from samples of treated and raw waters. Some volatile nitrosamines of toxicological interest were detected, as for

instance, N-nitrosodimethylamine (NDMA), that was found, depending on the sample, in concentrations below the $0,3 \text{ ngL}^{-1}$ (detection limit) till up to $5,0 \text{ ngL}^{-1}$.

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE NITROSAMINAS EM ÁGUAS DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. Água

1.1 Água e sua importância

O uso crescente de água doce e a garantia de sua qualidade continuam sendo um grande desafio global. No último século, o aproveitamento humano dos recursos hídricos foi multiplicado por seis, mais que o dobro da taxa de crescimento populacional do período. Na média global, cerca de 90 % dessa água serve à irrigação, mas a análise regional mostra grande disparidade nos países industrializados, nos quais o uso industrial dos recursos hídricos chega a se equiparar ao agrícola (MACEDO, 2000).

O maior consumo *per capita*, acima de 1500 m³/ano, é dos países industrializados e o menor, menos de 200m³/ano, é da África. A América Latina está numa posição intermediária, com aproximadamente 600 m³/ano por habitante (MONTAIGNE, 2002).

Em relação à qualidade da água, há sérios problemas como a falta de informação à população e necessidade de mais esforços públicos na prevenção de doenças. Em um único dia, 9300 pessoas morrem de diarreia, cólera, esquistossomose e outras doenças disseminadas pela água contaminada. Em um ano, são 3,4 milhões de mortos, a maior parte na Ásia e na África e a maioria são crianças com menos de 5 anos de idade. Mesmo os países industrializados não estão imunes à falta de água (MONTAIGNE, 2002).

Preocupante também é a contaminação dos lençóis freáticos, principal fonte de água potável para quase um terço da população do planeta. Os Estados Unidos precisarão gastar 1,5 bilhão de dólares por ano durante 20 anos para remover as substâncias que contaminam seus lençóis freáticos. Ao contrário dos rios que se renovam mais ou menos a cada 20 dias, os lençóis subterrâneos podem demorar milhares de anos para se reciclar (MONTAIGNE, 2002).

Os contaminantes químicos, pertencentes a diversas classes como pesticidas, metais, compostos nitrogenados, organoclorados, e vários outros, além de microrganismos, podem estar presentes nos corpos de água e muitos deles nunca foram avaliados.

A contribuição deste trabalho está na avaliação da presença de nitrosaminas, compostos mutagênicos, classificados no grupo 2B (prováveis carcinogênicos), em águas de abastecimento à população urbana (EPA, 2002).

1.2 Disponibilidade da água

No mundo ainda persiste a idéia de abundância de água, recurso que sendo considerado, até poucos anos, como inesgotável, levou muitas pessoas a se referirem ao planeta como “O Planeta Água”. Sabe-se, porém, que aproximadamente de 95,1 a 97,5% da água do planeta é salgada, sendo imprópria para o consumo humano. Dos 4,9% que sobram, 4,7 % estão em forma de geleiras ou regiões subterrâneas de difícil acesso e somente os 0,2 % restantes estão aptos para o consumo, em lagos, nascentes e lençóis subterrâneos (MACEDO, 2000).

Em média, o continente com maior disponibilidade de água é a Oceania, com $252 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$, seguido da América do Sul, com $108 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$, América do Norte com $53 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$, África, com $19 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$, Europa, com $18 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$ e Ásia, com $13 \text{ m}^3 / \text{habitante.dia}$. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), a média de consumo *per capita* de água hoje, nos países desenvolvidos é de 274 L/dia e, em meio século estima-se que mais de 4 bilhões de pessoas terão disponíveis menos de 50 L/dia, quando a média recomendável é de 150 L/dia (NOVAES, 2002).

Numa perspectiva para os próximos vinte anos vemos que se os 80 % dos habitantes, excluindo-se os países industrializados, continuarem usando o que usam hoje, o consumo total de água chegará a 70 % da disponibilidade e se usarem o recurso como é utilizado nas nações mais ricas, em 2025 estaremos consumindo 90 % da água disponível. Exemplos disso são o rio Amarelo (China), o Amu Darya (Turquia) e o Colorado (EUA), que hoje já não chegam ao mar em boa parte do ano, pois se esgotam antes, por excesso de consumo. Nos Estados Unidos, 25 milhões de pessoas se abastecem das águas do Colorado (NOVAES, 2002).

No Brasil, tomando como exemplo a situação da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), temos o consumo de 400 L/dia.pessoa sendo a média nacional, segundo dados divulgados pelo governo, de 150 L/dia.pessoa (CARARO, 2002). Ainda assim, o país apresenta um potencial de abastecimento público muito grande pela localização, em boa parte de seu território, do maior aquífero do mundo, o Guarani. As suas águas, de modo geral, são de ótima qualidade e podem ser extraídas a vazões bastante elevadas. A porção brasileira do aquífero Guarani, que corresponde a maior parte de sua área (840 mil km²), integra o território de oito Estados: Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Goiás, Minas Gerais, Santa Catarina e Mato Grosso (CARARO, 2002).

A vantagem das águas subterrâneas é que alia qualidade a custo, que se torna 20 % do custo do uso da água superficial, pois só é necessário o tratamento por conta da distribuição. Na Europa, 75 % da população é abastecida com águas subterrâneas (MELLONI, 2002).

O principal município abastecido pelo Guarani, atualmente, é Ribeirão Preto, em São Paulo, com cerca de 400 mil habitantes. Além destes, são importantes mananciais nas regiões sul e sudeste do país, os aquíferos do grupo Bauru, no interior de São Paulo, o Caiuá, que abastece várias cidades na região noroeste do Paraná e no Mato Grosso do Sul (CARARO, 2002).

A falta de preservação dos mananciais aliada ao gasto excessivo são os pontos negativos da situação de recursos hídricos no Brasil. No Estado de São Paulo, entre 1989 e 1996, a Bacia do Guarapiranga, de onde é captada grande parte da água superficial que serve a região metropolitana, perdeu 15 % de sua cobertura vegetal com o aumento de 50 % da expansão urbana em suas margens, a despeito dos investimentos da SABESP em produção e distribuição, que permitiu o acesso de 100 % dos moradores da região ao fornecimento de água (FALTA, 2002).

Portanto, em contraposição à abundância da água de aquíferos vem a preocupação com a escassez da água dos mananciais que servem várias populações urbanas e que devido a uma urbanização desordenada, vem comprometendo sua qualidade.

Em decorrência disto, o consumo de água mineral no país, principalmente nas grandes cidades, vem crescendo a cada ano, devido à preocupação da população com a

qualidade da água potável que recebe. Além disso, a qualidade da água engarrafada como mineral, que parte da população consome, impulsionada com a divulgação pela mídia dos inúmeros componentes com potencial tóxico, que podem estar sendo ingeridos com águas de baixa qualidade, nem sempre é fiscalizada e realmente garantida (NASCIMENTO *et al*, 1998).

Faz-se necessário, então, um aumento de esforços e incentivos aos Órgãos de Saúde Pública para implementação de Programas de Pesquisa para ampliar os estudos de monitoramento de contaminantes na água.

Cientes e preocupados com esta necessidade, este trabalho foi realizado com a colaboração da CETESB e SABESP que cederam as amostras utilizadas neste estudo.

1.3 Legislação e características

Apesar das primeiras tentativas de se estabelecer padrões para a água potável estarem registradas em documentos encontrados com idade estimada de cerca de 4000 anos, até 1980 os países europeus seguiam diretivas com o estabelecimento de padrões considerando apenas 24 parâmetros (BAKER, 1981).

Em 1980 foi publicado o *EC Drinking Water Directive*, visando controlar os requisitos da água potável para a comunidade europeia considerando 62 parâmetros, e em 1984 a *World Health Organization (WHO)* publicou seu guia sobre qualidade de água (BAKER, 1981).

Nos Estados Unidos, a Lei Pública *Safe Drinking Water Act* passou a vigorar tornando-se a *Environmental Protection Agency (EPA)* o órgão responsável pelo estabelecimento dos padrões, com revisão a cada 3 anos. Na relação do EPA, somente a partir de 2000 as nitrosaminas passaram a fazer parte da lista de compostos que devem ser monitorados em águas (BAKER, 1981).

Os países que estão procurando atualmente monitorar a presença de nitrosaminas são os Estados Unidos, por meio da *Environmental Protection Agency (EPA)*, com programas de ação principalmente no Estado da Califórnia, e o Canadá, através do *Canadian Ministry of the Environment (MOE)*.

A *EPA* controla os teores de nitrosaminas, por meio do *Resource Conservation and Recovery Act (RCRA)*, como substância tóxica e de despejo controlado com obrigatoriedade de relato.

Quantidades máximas, a partir das quais devem ser relatadas, estão indicadas no *Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act (CERCLA)*.

Nos Estados Unidos, o *Clean Water Act (CWA)* controla os níveis de contaminação por derramamentos, publicados no *Water Quality Criteria*. Esta publicação é periodicamente atualizada e contém os níveis admissíveis para os cerca de 158 poluentes relacionados. Esse documento tem a finalidade de guiar os estados e órgãos americanos autorizados, para promulgarem, então, os níveis aceitáveis em legislação.

Os níveis máximos admissíveis para nitrosaminas em águas do meio-ambiente, relacionados no *National Recommended Water Quality Criteria 2002* do EPA, baseiam-se no risco à saúde humana por câncer, devido à exposição a poluentes tóxicos expressos em 1 por um milhão de habitantes e estão apresentados na tabela I-1 a seguir.

Tabela I-1: Níveis máximos admissíveis de nitrosaminas em águas, de acordo com *National Recommended Water Quality Criteria* (EPA, 2002).

Nitrosaminas	Risco à Saúde Humana	
	Água + Organismos ^(*)	Organismos ^(*)
	(μgL^{-1})	(μgL^{-1})
Poluentes Prioritários		
N-N-nitrosodimetilamina (NDMA)	0,00069	3,0
N-nitrosodipropilamina (NDPA)	0,0050	0,51
N-nitrosodifenilamina(NDPhA)	3,3	6,0
Poluentes Não Prioritários		
N-nitrosodibutilamina (NDBA)	0,0063	0,22
N-nitrosodietilamina (NDEA)	0,0008	1,24
N-nitrosopirrolidina (NPYR)	0,016	34

(*) Organismos aquáticos (peixes, moluscos, etc...)

Para cada critério a EPA dispõe de informações detalhadas dispostas na *EPA Review and Approval of State and Tribal Water Quality Standards* e no *Integrated Risk Information System (IRIS)*, com acesso respectivamente em www.epa.gov/OST e em www.epa.gov/iris (EPA, 2002).

Baseado nestes dados e na toxicidade da N-nitrosodimetilamina (NDMA), o Estado da Califórnia estabeleceu um nível inicial de ação para água potável de 2 ngL^{-1} , quando inicialmente se pensava que NDMA era originário de contaminação. Quando estudos, a partir de 1998, mostraram ser a NDMA subproduto de tratamento de águas, e na ausência de padrões referenciais em água potável para este contaminante, este nível subiu para 20 ngL^{-1} devido a dificuldades analíticas (EATON; BRIGGS, 2000).

Outras agências reguladoras americanas, como a *Food and Drug Administration* (FDA), por meio do *Toxic Substances Control Act* (TSCA) controlam os níveis passíveis de serem admissíveis em produtos alimentícios e medicamentos. FDA estabeleceu um nível de 10 ppb máximo para o teor total de nitrosaminas em chupetas.

No Canadá, o *Ontario Ministry of the Environment* (MOE), vem monitorando as estações de tratamento de água em programa iniciado em 1996 e estabeleceu uma concentração máxima aceitável (MAC) para NDMA de 9 ngL^{-1} (MOE, 1998).

No Brasil, os mananciais são classificados segundo a Resolução nº 20, do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), onde em seu Artigo 1º classificam-se os recursos hídricos do território nacional, segundo seu uso, em águas doces, salobras e salinas.

Em São Paulo, a CETESB monitora a qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, utilizando alguns parâmetros dessa Resolução (CONAMA 20, 1986) e complementa essa avaliação com testes ecotoxicológicos e testes de mutagenicidade (CETESB, 2002).

A Portaria 1469, do Ministério da Saúde, de 29 de dezembro de 2000, apresenta as normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano.

Os parâmetros monitorados por meio dessa portaria, entre outros, são:

- Cátions e ânions: Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Cl^- , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , PO_4^{3-} , Sb^{2+} , As^{3-} , F^- ;

- Substâncias químicas orgânicas: acrilamida, benzeno, benzopireno, cloreto de vinila, 1,2-dicloroetano, tetracloreto de carbono, pesticidas clorados, por exemplo Aldrin, fosforados, por exemplo Glifosato;
- Demanda química e bioquímica de oxigênio;
- Propriedades físico-químicas: condutividade, pH, temperatura;
- Propriedades organolépticas: cor; turbidez; sabor;
- Desinfetantes: cloro livre; monocloramina, 2, 4, 6 tri-clorofenol;
- Parâmetros microbiológicos;
- Nitrogênio amoniacal.

Apesar de algumas nitrosaminas serem extremamente tóxicas, não existe um monitoramento dessa classe de compostos em águas de interesse à saúde pública no Brasil.

2. As Nitrosaminas

2.1 O que são e como se formam

Nitrosaminas são compostos que se caracterizam por apresentarem um grupo NNO. O termo nitrosamina representa uma vasta faixa de compostos, já que há poucas restrições aos grupos que podem se ligar às duas valências remanescentes do nitrogênio da função NNO.

Conseqüentemente, são então classificadas como nitrosaminas uma grande variedade de estruturas com diferentes polaridades e massas moleculares.

A fórmula genérica é $RR'N-N=O$ onde RR' pode ser alquil, aril, e ainda, R' pode ser XCH_2 , onde X pode ser: H, OH, alquil, aril, halogênio, alcóxi, etc. (FINE, 1980).

As propriedades físico-químicas das nitrosaminas são conferidas, principalmente, pelo grupo NNO que as caracteriza e pela cadeia ligada a este grupo, que pode torná-las polares, apolares, voláteis ou não voláteis, interferindo em sua estabilidade. Como mostrado no item toxicidade, podem ainda aumentar ou diminuir o potencial carcinogênico ou mutagênico, relacionados ao tamanho da cadeia alifática ou presença de estruturas cíclicas e/ou aromáticas, dentro do grupo de nitrosaminas (ARAKI et al, 1984).

Por conveniência são classificadas em 4 grandes grupos: voláteis, não voláteis, de baixa polaridade, de alta polaridade (iônicas e não iônicas) (FINE, 1980).

Dentro do grupo das nitrosaminas voláteis estão a N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodipropilamina (NDPA) e N-nitrosodibutilamina (NDBA), que têm em comum o fato de possuírem cadeia alifática e serem líquidos de cor amarela com baixa viscosidade. As nitrosoaminas N-nitrosopiperidina (NPIP) e N-nitrosopirrolidina (NPYR) são compostos de cadeia cíclica com aparência de um líquido amarelo. A N-nitrosomorfolina (NMOR) também é um composto considerado volátil, apresentando-se como um sólido amarelo (NML, 2000).

No grupo das nitrosaminas não voláteis de alta polaridade e não iônicas, encontra-se a N-nitrosodietanolamina (NDELA) estudada neste trabalho, e no grupo das nitrosaminas não voláteis de alta polaridade e iônicas incluem-se os derivados nitrosos de aminoácidos e seus sais (FINE, 1980).

As nitrosaminas, tipicamente, apresentam-se como óleos ou sólidos voláteis de cor amarelada, devido à absorção de luz na região do visível pelo grupo NNO. Têm em comum o fato de serem sensíveis à luz, especialmente luz ultravioleta, sofrendo rápida degradação fotolítica. São combustíveis e quando aquecidas emitem fumos de NO. São incompatíveis com oxidantes, podendo ser oxidadas à nitramina correspondente, ou reduzidas a hidrazina ou amina (NML, 2000). As estruturas das nitrosaminas estudadas neste trabalho estão apresentadas na Figura I-1.

Figura I-1: Estrutura das nitrosaminas avaliadas

A delocalização eletrônica na função NNO confere caráter de dupla ligação, de forma que isômeros E e Z resultantes de substituições não simétricas, mostrados na Figura I-2, que podem ser separados (ISSAQ *et al*, 1986).

Figura I-2: Isômeros Z e E formados pela delocalização eletrônica (ISSAQ *et al*, 1986)

A N-nitrosação se dá pelo deslocamento de um hidrogênio ligado a um nitrogênio por um agente nitrosante, como mostrado na Figura I-3.

Figura I-3: Formação de nitrosaminas (ISSAQ *et al*, 1986)

O doador do grupo nitroso, “agente nitrosante”, pode tomar várias formas, assim como o nitrogênio receptor. O grupo nitroso resultante pode ser estável (N-nitrosaminas secundárias) ou pode sofrer decomposição (como no caso da N-nitrosação de amins primárias aromáticas resultando no gás de diazônio).

A Figura I-4 mostra a formação das nitrosaminas a partir de amins primárias, secundárias e terciárias.

A amina primária reage com o ácido nitroso para formar o carbocation RCH_2^+ , o qual pode reagir com outra amina primária formando uma amina secundária que

reage, por sua vez, com o ácido nitroso formando a nitrosamina (WARTHESEN *et al*, 1975).

As aminas terciárias também reagem, mas de forma mais complexa, dificultando assim, a formação de nitrosaminas a partir desta fonte. Para a nitrosação das aminas terciárias com o ácido nitroso, primeiramente se forma uma espécie nitrosoamônio (R_3N^+-NO), que elimina rapidamente um grupo nitroxil (NO^- , instável), levando a formação da espécie *imonium* ($R_2N^+=CHR$), que se hidrolisa formando aldeído e amina secundária. Esta amina secundária assim formada, reage com o ácido nitroso para formar a nitrosamina (HABICH; GROB, 1984).

Figura I-4: Formação de nitrosaminas a partir de aminas primárias, secundárias e terciárias (HABICH; GROB, 1984; WARTHESEN *et al*, 1975)

Alguns compostos orgânicos, particularmente os que contêm enxofre, ou ainda aldeídos, aumentam a reação de N-nitrosação. Apesar da formação de nitrosaminas ser

favorecida em pH ácido, aldeídos podem catalisar a reação independentemente do pH (DOUGLAS *et al*, 1978).

Fenóis e compostos polifenólicos podem, dependendo de sua estrutura, aumentar ou inibir a reação de N nitrosação (DOUGLAS *et al*, 1978).

O íon azida (N_3^-) é um inibidor da reação de nitrosação em reações que levam à redução do composto NNOX para nitrogênio ou outros compostos, como, por exemplo, em amônia, aminas primárias, hidrazina, uréia, e hidroxilamina (DOUGLAS *et al*, 1978).

A inibição de nitrosação pela vitamina C ou ácido ascórbico foi bastante estudada por Douglas *et al* (1978), e Oshima e Bartsch (1981) que estudaram a eficiência de vitamina C em reduzir o grupo NNOX para NO numa larga faixa de pH.

Na Tabela I-2 são mostradas algumas características espectrais das nitrosaminas, que podem ser utilizadas na sua identificação.

Tabela I-2: Propriedades espectrais das nitrosaminas (WISHNOK, 1981).

Propriedade	Ligações Envolvidas	Valor
UV-VIS	N-N=O	λ Max 230-235
(nm)		330-315
Infra Vermelho	N-N estiramento	1040-1160
(cm^{-1})	N-O estiramento	1430-1550
EM fragmentação	Molécula toda	$M/e = M$ (M-17)
(m/z)		(M-30) (M-31)
		(CCl_4) 5,8-5,9
RMN	αCH (E)	C_6H_6 6,1-6,3
(ppm)	αCH (Z)	6,3-6,6
		6,6-6,15

A Tabela I-3 mostra as principais propriedades físico-químicas disponíveis para as nitrosaminas avaliadas, onde observam-se as diferenças entre pesos moleculares e pontos de ebulição.

Tabela I-3 – Propriedades físico-químicas das nitrosaminas avaliadas.

Nitrosamina	Ponto ebulição (°C)	Densidade g/cm ³	Massa molecular (g.mol ⁻¹)
NDMA	154	1,0059	74,08
NPIP	215	1,06	114,17
NDEA	177	0,9422	102,14
NMOR	225	nd	116,12
NDPA	206	0,9136	130,19
NPYR	216	1,094	100,00
NDBA	116	0,9	158,28
NDELA	277	0,94	134,16

(SPECTRUM LABORATORIES, 2000).

2.2 Ocorrência das nitrosaminas

Nitrosaminas podem ser encontradas em todo o ambiente: ar, água, solo e plantas (Fine *et al*, 1977) e como subprodutos de reação em produtos manufaturados de vários segmentos de mercado, como cosméticos, couros, borracha, alimentos.

A utilização de nitrosaminas como matéria-prima industrial ocorreu entre a metade dos anos 50 até 1976. Nesse período foi utilizada como produto intermediário na produção de 1,1-dimetilhidrazina, empregada como combustível para foguetes, que continha cerca de 0,1 % de NDMA como impureza e ainda como solvente na indústria de plásticos, como plastificante em polímeros e como aditivo em lubrificantes, até que foi comprovada sua toxicidade e proibida sua utilização (NAS, 1978).

A concentração esperada de nitrosaminas em água é baixa devido a fotodegradação e a metabolização por alguns microrganismos (nanogramas a microgramas por L) (NAS, 1978).

Até 2000, a ocorrência de nitrosaminas em águas era atribuída somente à ação de precursores, que por ação antropogênica, ou naturalmente, podiam contaminar os rios, lagos ou mesmo os lençóis freáticos.

Como exemplo disso cita-se a revisão de Hartmetz e Slemnova (1980) onde os teores encontrados de nitrosaminas (35 à 940 ngL⁻¹) na região de Baltimore, Estados

Unidos, foram atribuídos à proximidade de uma planta industrial para síntese de dimetilhidrazina, porém os dados obtidos por Fine, 1977, em águas de efluentes nos Estados Unidos de 3 a 4 μgL^{-1} não puderam ser associados a uma causa específica.

Cheng-Guang Fu e Hong-Da Xu (1995), analisaram as águas subterrâneas do aquífero da província de Heber na China, encontrando NDPA e NDEA em teores próximos, respectivamente, a 6,97 – 44,99 e 3,37 – 54,45 μgL^{-1} , que também foram atribuídos a contaminações por prováveis precursores (NAS, 1978).

Child (1998), focou seus estudos na formação de NDMA por intermédio da reação entre cloro e polieletrólitos a base de aminas utilizados no sistema de tratamento de água. Os resultados mostraram que altas concentrações de NDMA foram formadas quando concentrações altas de polieletrólito (0,5 % p/p) foram deixadas em contato com concentrações elevadas de cloro livre (0,5 % p/v).

N-nitrosodimetilamina foi detectada em água deionizada em concentrações de 0,012 a 0,34 μgL^{-1} . Em águas de poços com alto teor de nitrato, concentrações de nitrosaminas menores que 0,01 μgL^{-1} foram encontradas (NAS, 1978).

Em 1999, o *California Department of Health Service (DHS)* adotou um nível de ação para a presença de NDMA em águas de 20 ngL^{-1} . No período de 1999 a 2000 várias agências de água da Califórnia participaram de um trabalho para avaliação dos níveis de NDMA presentes na água. Os resultados mostraram que muitos sistemas de distribuição e efluentes continham NDMA, mas raramente excediam 10 ngL^{-1} (NAJM; TRUSSEL, 2000).

Entre 1986 e 1997, o *MOE*, no Canadá, conduziu um amplo programa que envolveu cerca de 145 estações de tratamento de água. Esse programa enfocou especialmente a presença de NDMA e mostrou que várias estações entre 1994 e 1997 excediam a concentração máxima aceitável de 9 ngL^{-1} , mas que a maioria das estações apresentavam teores de até 5 ngL^{-1} (NAJM; TRUSSEL, 2000).

A presença de NDPA na água e em sedimentos, material em suspensão e na biota também foi reportada em alguns trabalhos que avaliaram efluentes industriais de fábricas encontrando teores de 0,12 a 2,8 μgL^{-1} . Efluentes originários de indústrias têxteis mostraram concentrações entre 2 a 20 μgL^{-1} (NAJM, TRUSSEL, 2000).

A ocorrência de NDMA em estações de tratamento de água foi reportada por alguns autores, como Kimoto *et al*, 1980; Graham *et al*, 1995 e Child *et al*, 1998. Em 2000, Najm e Trussel, avaliando a formação de NDMA durante o tratamento de água, mostraram que sua formação é influenciada pela presença de cloro combinado e que o nitrogênio e carbono orgânico não interferem. A NDMA, portanto, foi considerada um subproduto da cloração de águas.

A Figura I-5 mostra o provável mecanismo de formação de N-nitrosodimetilamina durante o tratamento da água. O mecanismo proposto sugere que ocorre a formação lenta de uma hidrazina intermediária a partir da reação da dimetilamina com cloro combinado, na forma de cloramina. A hidrazina formada é rapidamente oxidada a nitrosamina correspondente, conforme mostrado na Figura I-5 (CHOI; VALENTINE, 2002).

Figura I-5: Mecanismo de formação de nitrosaminas em águas cloradas
(CHOI; VALENTINE, 2002)

2.3 Toxicidade

Em 1956, Magee e Barnes publicaram o primeiro estudo no qual se relacionava e se comprovava que a administração a ratos no laboratório de N-nitrosodimetilamina (NDMA) em pequenas doses diárias (50 ppm misturados com a alimentação) provocava o aparecimento de tumores no fígado no período máximo de 1 ano. Este fato adicionou-se a relatos de envenenamento de trabalhadores expostos a NDMA em laboratórios industriais. Em ratos de laboratório uma dose única de 25 mg/kg de NDMA tomada oralmente ou por via intravenosa era responsável pela necrose do fígado, acompanhada de hemorragias no fígado e rins, levando à morte em 2 a 4 dias. Uma única dose de NDMA inferior à dose letal, embora não provocasse inicialmente quaisquer danos visíveis nos rins, levava ao aparecimento, em médio prazo, de tumores neste órgão (ARAÚJO, 2000).

Em vista disto, nem todas as N-nitrosoaminas são cancerígenas, verificando-se que N-nitrosometil-terc-butilamina, a N-nitroso-etil-terc-butilamina e a N-nitrosodibenzilamina, entre outras, não têm a capacidade de induzir tumores, o que é explicado pela ausência do hidrogênio α (ARAÚJO, 2000).

As N-nitrosoaminas e N-nitrosoamidas são responsáveis pelo aparecimento de carcinomas em diversos órgãos, variando o órgão afetado com o composto administrado. Comparando as estruturas e atividades cancerígenas conhecidas de vários compostos N-nitrosados, observa-se que as N-nitrosodialquilaminas não produzem tumores na zona de aplicação, mas sim em órgãos distantes, órgãos esses onde possivelmente existe capacidade de promover a hidroxilação no carbono α do composto nitrosado; as N-nitrosoamidas produzem apenas tumores no local de aplicação (LOW, 1974; ARAÚJO, 2000).

Este último fato é atribuído à menor solubilidade das N-nitrosoamidas em meio aquoso, o que faz com que estes compostos não sejam transportados para longe do local de aplicação e, portanto, os diazoalcanos responsáveis pela carcinogênese sejam produzidos nesse mesmo local (ARAÚJO, 2000).

Wishnok, 1981, mostrou que a carcinogenicidade está relacionada com a estrutura das nitrosaminas e mais especificamente que é inversamente proporcional ao número de átomos de carbono das dialquilnitrosaminas acíclicas. Lijinsky, 1982 mostrou que o oposto é verdadeiro para nitrosaminas cíclicas, onde as moléculas maiores são mais potentes, e atacam diferentes órgãos alvo, dependendo do tamanho do anel.

Cerca de 80 % das nitrosaminas conhecidas apresentam carcinogenicidade, cuja potência varia de acordo com sua estrutura. Estão classificadas pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) nos grupos 2A (suspeitos como cancerígenos em humanos) e 2B (provavelmente cancerígenos) (DOUGLAS, 1978).

A Tabela I-4 mostra os dados toxicológicos expressos como DL 50 (dose letal média em mg kg^{-1} para 50 % da população de ratos) e D50 (dose carcinogênica média em mol kg^{-1} peso para produzir tumor em 50 % da população) (IARC, 1971; DOUGLAS, 1978).

Tabela I-4: Toxicidade das nitrosaminas expressa como DL 50 (mg kg^{-1}) e D50 (mol kg^{-1}).

Nitrosaminas	Dados toxicológicos		
	LD 50 ⁽¹⁾ mg kg^{-1}	D50 ⁽²⁾ mol kg^{-1}	Atividade ⁽²⁾ $\log (1/50)$
NDMA	40	0,0054	2,3
NDEA	280	0,00063	3,2
NDPA	480	0,0088	2,1
NDBA	1200	0,025	1,6
NPIP	-	0,025	1,4
NNOR	320	0,039	1,9
NPYR	-	0,039	1,4
NDELA		0,89	0,05

(1) IARC, 1971.

(2) DOUGLAS, 1978.

A Atividade, expressa em $\log (1/50)$, é uma forma de medida do potencial carcinogênico, onde as nitrosaminas com valores de atividade maiores que 3 são consideradas muito carcinogênicas; de 2 a 3, carcinogênicas; de 1 a 2, com carcinogenicidade moderada e menores que 1, de baixa carcinogenicidade.

O grande número e diversidade de compostos e a necessidade de se estabelecer critérios e limites de exposição a eles, indicando uma prioridade de investigação, fez com que os testes de toxicidade se tornassem cada vez mais indispensáveis (MEIER, 1988).

O uso de testes toxicológicos em animais é deficiente na avaliação de substâncias nocivas ao meio ambiente, pois requer prazos longos e grande número de animais. Há a necessidade, então, de testes rápidos e de custo acessível que possam ser usados não somente na identificação de substâncias nocivas, mas também em termos comparativos.

Nas investigações de mutagenicidade o teste comumente utilizado é o de mutagenicidade com *Salmonella*, conhecido como teste de Ames.

O teste de Ames, desenvolvido no início da década de 70, é um teste “in vitro”, realizado com cepas mutantes da bactéria *Salmonella typhimurium* que não crescem em meio deficiente em histidina.

O princípio do teste é que compostos mutagênicos podem induzir mutações que habilitam as cepas a crescerem em meio com deficiência em histidina. O teste pode ser realizado na presença ou ausência da fração microsomal S-9 de fígado de rato, que permite transformação metabólica dos precursores mutagênicos para ativar sua ação, imitando assim as reações metabólicas que ocorrem em organismos de mamíferos (ARAÚJO, 2000).

As vantagens do teste de Ames consistem na sua rapidez de resposta e a possibilidade de permitir comparação entre amostras, o que é feito em termos de número de revertentes por litro.

Claxton, Ashby, Tennant e colaboradores *apud* Méier, 1988, mostraram que a extensão desta correlação é dependente da classe química e de mecanismos do metabolismo e da mutação. Algumas cepas podem ser especialmente selecionadas para determinados objetivos, por exemplo, algumas cepas disponíveis têm a habilidade de reduzir ou aumentar sua resposta a nitroarenos.

As linhagens de *S. typhimurium* mais utilizadas são a TA98 e a TA100, pois elas têm se mostrado muito eficiente na detecção de grande número de mutágenos (MEIER, 1988). Segundo Mortelmans e Zeiger, 2000, o uso dessas duas linhagens na presença e ausência de ativação metabólica é suficiente para detectar 90 % dos mutagênicos pertencentes aos 35 % de compostos químicos mutagênicos conhecidos.

Compostos que dão resposta mutagênica sem a adição de metabólitos de mamíferos são chamados de mutágenos diretos. Compostos que requerem adição de um sistema enzimático de mamíferos (S9) são chamados mutágenos indiretos.

O teste de Ames (Figura I-7) torna-se mais efetivo e capaz de detectar mutágenos indiretos, quando bioativados pela adição de células da fração microsomal do fígado dos mamíferos. Este sistema é denominado mistura S9, que é o sobrenadante do homogeneizado de fígado de animais de laboratório (MARON & AMES, 1983).

Figura I-7: Esquema do Teste de Ames (PORTER, 2003)

Um composto é considerado mutagênico caso induza um aumento no número de mutantes revertentes de, pelo menos, 1,5 a 2 vezes o número de espontâneas, observando-se simultaneamente um efeito dose – resposta (ARAÚJO, 2000).

Segundo dados do NTP (*National Toxicology Program*), a concentração de 50µL/placa para NDMA e 650µL/placa para NDPA respondem ao teste com *Salmonella* (NTP, 2003).

3. Métodos analíticos para determinação de Nitrosaminas em águas

Várias são as técnicas analíticas utilizadas para análise de nitrosaminas. Inicialmente, nas décadas de 60 e 70, técnicas como a polarografia (Heyns; Koch, 1970 e McGlahan; Walters; McLean, 1968) e a cromatografia de camada delgada (Neurath, 1974) foram empregadas mas devido sua falta de especificidade tais técnicas mostraram-se inviáveis para a análise de nitrosaminas.

Entre as técnicas utilizadas, a cromatografia se destaca pela versatilidade e possibilidade de conferir especificidade quando associada a detectores seletivos para nitrogênio como os detectores termoiônicos (*Nitrogen Phosphorus detector*, NPD) (Thakkar; Kondawar, 1988; EPA, 1980) e os detectores de quimiluminescência

induzidos por ozônio ou TEA (*Thermo Energy Analyser*) que confere especificidade para análise de nitrosaminas.

A complexidade da matriz e as baixas concentrações requeridas na determinação de nitrosaminas em águas exigem técnicas de separação e detecção com elevada sensibilidade e seletividade.

A Tabela I-5, baseada no trabalho publicado por Yan, 1999, compara a seletividade e sensibilidade dos principais sistemas de detecção utilizados para análise de compostos nitrogenados acoplados a cromatografia líquida ou a gás.

Tabela I-5: Comparação de detectores para compostos nitrogenados.

Detector	TEA	NPD	PFPD	AED	HALL
Sensibilidade(N)					
gN/s	10^{-12}	10^{-13}	10^{-13}	10^{-12}	10^{-11}
Seletividade					
(N/C)	10^7	10^4 - 10^5	10^5 - 10^6	10^4 - 10^5	10^5

A sensibilidade do detector termoiônico (TSD) para nitrogênio o torna bastante utilizado, e seu custo é menor que os demais detectores. Todavia, apresenta pouca seletividade, sofre interferências e requer muito tempo para estabilização. É o detector utilizado no método 607 da EPA, que traz um extenso protocolo para contornar as interferências.

O detector *Pulsed Flame Photometer Detector* (PFPD) desenvolvido por Cheskis, 1993 *apud* Yan, 1999, emprega uma chama pulsante com emissão em tempo controlado, que permite aumentar a detecção de um elemento específico e a seletividade sobre os hidrocarbonetos. A seletividade para nitrogênio e enxofre, entretanto, é muito menor que a do detector de quimiluminescência (YAN, 1999).

O detector de Emissão Atômica (AED) é uma outra alternativa para detecção de nitrogenados. A resposta deste detector é linear e equimolecular, entretanto sua sensibilidade ao nitrogênio é equivalente, com custo maior e operação mais complexa, requerendo bastante experiência do operador. Na análise de amostra de compostos nitrogenados, não tem seletividade exclusiva para nitrosaminas.

O detector de Condutividade Eletrolítica (ELCD), também conhecido como detector de Hall, apesar de apresentar uma sensibilidade razoável, tem uma seletividade muito menor, operação mais complexa e necessidade de maior rotina de manutenção.

Como pode ser visto, a seletividade sobre hidrocarbonetos é a grande vantagem da detecção por GC/TEA (*Thermo Energy Analyser*) que utiliza a quimiluminescência induzida por ozônio, quando comparada com outros detectores (YAN, 1999).

Entretanto, apesar das características de sensibilidade e seletividade dos sistemas de detecção disponíveis, para alcançar os níveis requeridos em análise de águas, uma etapa de pré-concentração da amostra é necessária.

Os métodos existentes na literatura para a análise de nitrosaminas utilizam extração líquido-líquido (Norin; Renber, 1980; Reding, 1986); geralmente com diclorometano (Fine, 1977) ou em fase sólida (XAD4; Florisil; Sílica gel) (NIKAIDO *et al*, 1977), (EISENBRAND; BLANKART, 1991).

Com a evolução da tecnologia analítica, particularmente a espectrometria de massas de alta resolução, a detecção de nitrosaminas em níveis de traços, tornou-se possível embora a necessidade de pré-concentração da amostra continue sendo requerida.

Tomkins, 1995, utilizou cromatografia a gás e detector de quimiluminescência para avaliar águas potáveis e subterrâneas no Canadá obtendo limite de detecção de 2 ngL^{-1} de NDMA, quando utilizado o SPTD (*Short Path Thermal Desorption*), com ou sem acessórios para o injetor. A faixa encontrada em água potável foi de 3,0 a $9,7 \text{ ngL}^{-1}$. Em águas subterrâneas foi de 41 a 7000 ngL^{-1} .

Segundo Tomkins, 1995; o *Chemiluminescent Nitrogen Detector* (CLND) exibe uma seletividade maior que o Hall e uma excelente sensibilidade (20 pg de nitrogênio correspondente a 106 pg de NDMA), porém mesmo com o CLND “*on line*” o limite de $0,7 \text{ ngL}^{-1}$ de NDMA não é conseguido em condições típicas com extração de 1 litro de amostra com um extrato final de diclorometano de 1 ml. Empregando o SPTD (*Short Path Thermal Desorption*) um volume 100 vezes maior que o injetado pode ser alcançado.

Entre os compostos que não interferem na determinação de nitrosaminas, conforme estudado por Fine 1975, estão: ácido acético; acetona; acetonitrila; alizarina; amônia (gás); benzeno; benzisalicilaldeído; 2-butoxi etanol; dióxido de carbono;

dissulfeto de carbono; monóxido de carbono; tetracloreto de carbono; clorohidrato; ciclohexano; ciclopentano; 1,2-dicloroetano; gasolina; glicerol; o-nitrotolueno; fenilhidrazina; D, L, fenilalanina; p-fenilazoanilina; piridina; ácido sulfanílico; uréia e ácido úrico (YAN, 1999).

Os detectores de quimiluminescência exibem uma resposta linear proporcional a quantidade de nitrogênio presente na amostra. Frequentemente, desvios da linearidade são devido à saturação da fotomultiplicadora ou do amplificador eletrônico, quando as condições de operação não são colocadas adequadamente. A faixa de linearidade reportada é da ordem de 10^3 e $10^5 \mu\text{gL}^{-1}$ (YAN, 1999).

Provavelmente, a mais importante característica da detecção por quimiluminescência é a resposta equimolar ao nitrogênio. A combustão converte todos os analitos para espécies quimiluminescentes que contém um único átomo de nitrogênio. A equimolaridade significa que a resposta de quimiluminescência para o mesmo número de átomos de nitrogênio é a mesma, não importando a estrutura molecular dos analitos ou da matriz. Na realidade, entretanto, muitos outros fatores, entre eles a coleta de amostras, introduzem discriminantes que podem interferir na resposta do detector, para desviar da equimolaridade (YAN, 1999).

Neste trabalho foi desenvolvido um método alternativo com alta sensibilidade e especificidade para a determinação de nitrosaminas em água. Várias técnicas de pré-concentração e análise foram avaliadas de forma a obter as melhores condições analíticas para esses poluentes em amostras de água.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Considerando-se a possibilidade de presença de nitrosaminas em água de uso humano, e a sua genotoxicidade, os objetivos básicos deste trabalho foram:

- Desenvolver metodologia para análise de rotina de nitrosaminas em amostras de águas;
- Aplicar o método estabelecido em algumas amostras de água de interesse à Saúde Pública.

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiais e Métodos

1.1 Reagentes, solventes, materiais e equipamentos

1.1.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados foram grau pesticida de procedência Mallinckrodt e grau PA de fabricação Merck.

Os reagentes utilizados foram de grau PA marca Merck, Sigma ou Aldrich.

Os gases utilizados foram de grau Cromatografia 99,99 % pureza e no caso do Oxigênio 99,999% pureza.

Os padrões de nitrosaminas utilizadas foram: N-nitrosodimetilamina (NDMA) CAS 62-75-9; N-nitrosodietilamina (NDEA) CAS 55-18-5; N-nitrosodipropilamina (NDPA) CAS 621-64-7; N-nitrosodibutilamina (NDBA) CAS 924-16-3; N-nitrosopiperidina (NPIP) CAS 100-75-4; N-nitrosopirrolidina (NPYR) CAS 930-55-2; N-nitrosomorfolina (NMOR) CAS 59-89-2; da marca Sigma na concentração de 2 µg/µL em isopropanol. N-nitrosodietanolamina (NDELA) CAS 1116-54-7; N-nitrosodifenilamina (NDPhA) CAS da marca Sigma com validade de 12 meses. Os padrões foram mantidos sob refrigeração em temperaturas menores que 4° C.

1.1.2 Materiais

As vidrarias utilizadas foram de marca Pyrex e as vidrarias volumétricas de marca Pyrex classe A e papel de filtro marca Whatmam.

Foram utilizadas as fases sólidas: Carvão ativo (carbono-C) 60-80 mesh, da Alltech; Florisil (silicato de magnésio –MgSiO₃) 100-200 mesh, da Supelco; Tenax (polímero poroso a base de óxido do 2,6-difenil-*p*-fenileno) da Alltech; Tenax Carbotrap (óxido do 2,6-difenil-*p*-fenileno contendo 23% de carvão ativo) da Alltech; C18 (octadecilsilano (Si (CH₂)₁₇CH₃)), 80-100 mesh da Waters; XAD 4 (metacrilato de metila – (CH₃CH₂C₂O₂CH₃)), 20-60 mesh da Supelco; XAD 8 (estireno divinilbenzeno – (CH₂CH)₃C₆H₅C₆H₄) , 20-60 mesh, da Supelco.

Para os demais materiais, tais como: tubos de Teflon, colunas de aço inoxidável (2,5cm x 12mm), presilhas, frascos não volumétricos, etc., foram utilizadas diversas marcas de fornecedores cadastrados.

1.1.3 Equipamentos

Na etapa de pré-concentração, para o estudo de fases sólidas empregou-se bomba peristáltica marca Milton Roy mod 9A, mostrado na Figura III-1

Figura III-1: Equipamento empregado na avaliação de fases sólidas por SPE

O aparelho de extração em circuito fechado, de marca Supelco, está esquematizado na Figura III-2.

Figura III-2: Equipamento para extração líquido-líquido em circuito fechado (ELLCF)

Na etapa de concentração as fibras de microextração em fase sólida utilizadas foram: (Carboxen PDMS; Polyacrilate 85; Carbowax DVB; PDMS / DVB 65; PDMS 100; PDMS 30; PDMS 7) e as seringas suporte da marca Supelco.

Para análise das nitrosaminas foram utilizados os equipamentos:

Sistema GC/TEA - Constituído por cromatógrafo a gás HP 6890, e um detector de quimiluminescência, induzido por ozônio ou TEA (*Thermo Energy Analyser*) marca Antek, modelo NS 7090, Figura III-3.

O detector de quimiluminescência é um equipamento composto basicamente por: forno de pirólise; controladores mássicos do fluxo de gases; câmaras geradoras de ozônio; bomba de vácuo; elemento *peltier* para resfriamento; câmara de reação; filtro óptico para nitrogênio e célula fotomultiplicadora.

Assim que cada componente elui da coluna é transferido para um forno de pirólise, onde é oxidado pelo oxigênio em temperaturas que variam de 350°C a 1000°C, formando compostos de oxidação e o radical NO, além de CO₂, H₂O; SO₂ e vários outros óxidos.

O radical NO[•] reage com o ozônio produzido pelas câmaras geradoras de ozônio para formar o NO₂^{*} (dióxido de nitrogênio no estado excitado). Esta espécie excitada passa para o estado fundamental emitindo um quantum de luz que é detectado e ampliado pela fotomultiplicadora. A corrente de gás passa também por uma série de *cold-traps* e filtros para remover outros materiais que possam interferir.

Figura III-3: Sistema GC/TEA, Antek, modelo 7090 NS

A parte principal de um sistema de detecção induzido por ozônio é a câmara de reação estreita (Figura III-5), onde ozônio e espécies quimiluminescentes se misturam para produzir uma espécie metaestável que produz quimiluminescência. A emissão é detectada por um dispositivo fotossensível, um tubofotomultiplicador (Figura III-4). Usualmente um filtro óptico é colocado entre a câmara de reação e o tubo fotomultiplicador para aumentar a seletividade para o sinal desejado de quimiluminescência contra emissões não desejáveis de luz de outras regiões espectrais emitidas por compostos da amostra (Figura III-5) (YAN, 1999).

Figura III-4: Células fotomultiplicadoras e câmaras de reação para nitrogênio e enxofre

Figura III-5: Câmara de reação mostrando filtros seletivos para enxofre e nitrogênio

O ozônio é gerado numa câmara (Figura III-6), onde passa um fluxo de oxigênio exposto a alta voltagem. Controladores mássicos controlam os fluxos de ozônio e oxigênio (Figura III-7).

O vácuo é aplicado na saída da câmara de reação para aumentar a luminescência, pois esta é inversamente proporcional a pressão da câmara. O vácuo também tem a

função de manter o vapor de água abaixo do ponto de orvalho, prevenindo condensação na câmara ou linhas de transferência (YAN, 1999).

Figura III-6: Câmaras de produção de ozônio

Figura III-7: Controladores mássicos de fluxo

- **Sistema CG/MS** (cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas):

HP modelo 6890 e MS modelo 5973.

Shimatzu 17A com MS QP 5050 e MS QP 5000.

- **Colunas utilizadas:**

Coluna 1: Chrompack n° 7770, Cpsil (polidimetilsiloxana) 50 m; filme 1,2 μm ; diâmetro 0,32 mm;

Coluna 2: HP1 (metilsilicone) 30m x 0,32 mm x 0,25 μm espessura de filme com velocidade linear de 40 cmseg^{-1} .

O gás de arraste utilizado foi o Hélio.

- **Liners:**

HP 5062 35 87 capacidade 900 μL ;

HP 2-6375.05 *injection sleeve* 0,75 mm diâmetro interno, para injeção com SPME (*Solid Phase Microextraction*).

- **Seringas:**

Hamilton capacidade 10 e 5 μL .

- **Micropipetas:**

Eppendorf de 10; 25; 50; 100; 250; 500 μL .

- **Software:**

Para o estudo de delineamento de experimento foi utilizado o *software Design Expert*.

- **Equipamentos de proteção:**

Máscaras Drager com filtro EN141; luvas de acrilonitrila, durante a manipulação das soluções.

1.2 Preparo das Soluções

1.2.1 Preparo das nitrosaminas voláteis

As nitrosaminas voláteis: N-nitrosodimetilamina (NDMA); N-nitrosodietilamina (NDEA); N-nitrosodipropilamina (NDPA); N-nitrosodibutilamina (NDBA); N-nitrosopiperidina (NPIP); N-nitrosopirrolidina (NPYR) e N-nitrosomorfolina (NMOR) foram preparadas a partir de uma solução estoque.

Para o preparo da solução estoque de nitrosaminas voláteis foi retirado o padrão do *freezer* (solução 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) deixando-o em capela com sucção adequada, em caixa de isopor.

Estipulou-se um tempo de ambientação, que foi seguido para as demais preparações, no caso, até aproximadamente de 10 ± 1 min se a solução estiver abaixo de 0°C e imediato se estiver entre 0 e 4°C . Na prática foi observado que tempos superiores a estes acarretam perda dos analitos e falta de reprodutibilidade.

Com auxílio de uma micropipeta transferiu-se 20 μL para balão volumétrico de 10 mL, completou-se volume com metanol ou acetona e agitou-se para homogeneização. Desta solução transferiu-se com micropipeta 250 μL para um balão volumétrico de 10 mL. Esta solução foi denominada solução de trabalho I e correspondia a 50 ppm.

As demais soluções foram feitas a partir da solução de trabalho, obtendo-se soluções de 1000; 200; 100; 50; 20; 10; 5 e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a partir destas as soluções de 20 e 10 ng L^{-1} . As soluções são estáveis durante seis meses se mantidas em temperatura menor que 4°C , sem contato com luz e material de borracha (IRPTC, 1984).

1.2.2 Preparo das nitrosaminas não voláteis

O padrão de N-nitrosodietanolamina (NDELA) foi preparado em acetona grau análise de pesticidas na concentração de 0,5 % p/v e armazenado em frasco âmbar, sendo mantido a temperatura menor que 4° C.

1.2.3 Descarte

Os padrões de nitrosaminas e as amostras foram diluídas em solvente (acetona ou diclorometano) e enviadas para incineração. Como são sensíveis à luz, as soluções descartadas foram mantidas em frasco claro antes do envio para incineração.

1.3 Locais de amostragem e critérios para escolha de amostras

A escolha das amostras para análise de nitrosaminas em águas considerou alguns fatores que poderiam favorecer sua formação ou ser indicativo de sua presença, tais como: resposta positiva ao teste de Ames, natureza eutrófica do local de coleta, presença de altos teores de nitrogênio amoniacal ou localização em região de histórico agrícola.

- **Amostras positivas ao teste de Ames** – estas amostras foram cedidas pela CETESB e armazenadas em *freezer*.

Foram oito extratos obtidos de 5 amostras de águas de diferentes origens, que foram extraídas em resina XAD4 em pH neutro e pH ácido, e eluídas respectivamente com mistura diclorometano/metanol (fração neutra) e acetato de etila (fração ácida) (KUMMROW, 2001). Suas características estão apresentadas na Tabela III-1.

Tabela III-1 Resultados obtidos nas amostras analisadas, positivas ao teste de Ames (*), cedidas pela CETESB.

			Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> utilizadas						Fator Concentração da amostra
			TA98		TA100		Y61042		
Código	Tipo de água	Origem	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
1 NB	Tratada/ fração NB	Reservatório RMSP	-	-	-	-			2*10 ⁴
1 H ⁺	Tratata/ fração H ⁺	Reservatório RMSP	80	30	350	200	-	-	10 ⁴
2 NB	Tratada/ fração NB	Reservatório RMSP	-	-	-	-			10 ⁴
2 H ⁺	Tratada/ fração H ⁺	Reservatório RMSP	30	0	240	0			10 ⁴
3 NB	Tratada/ fração NB	Reservatório RMSP	-	-	-	-			10 ⁴
3 H ⁺	Tratata/ fração H ⁺	Reservatório RMSP	50	16	330	0			5*10 ³
4	Bruta NBH ⁱ	Rio	1900	980	-	-	3300	2200	10 ⁴
5	Bruta NBH ⁺	Rio	680	1200	-	-	3000	3100	10 ³

Onde (-) não apresentou resposta nas condições do teste

(*) expressos em n° de revertentes /L de água equivalente

As demais amostras analisadas foram coletadas nos seguintes locais:

- **Represa Guarapiranga** – este local foi escolhido devido sua natureza eutrófica e sua importância no abastecimento de água da Grande São Paulo.

O Sistema Guarapiranga faz parte do sistema de tratamento e abastecimento de água da RMSP (Região Metropolitana de São Paulo), que é operado pela SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo), atendendo 36 municípios da região e fornecendo um volume total, aproximado, de 62 mil litros de água por segundo (SABESP, 2002).

Embora desde a década de 70, exista na RMSP uma legislação de proteção aos mananciais, o crescimento desordenado e explosivo da metrópole com a presença do maior parque industrial da América Latina e a formação sempre crescente de uma rede urbana que se estende da região de Campinas até a baixada Santista, resultam em grandes problemas de poluição para os recursos hídricos como despejos de grandes quantidades de material orgânico que tornaram a represa de Guarapiranga altamente eutrofizada (MARTINS *et al*, 1997).

O Sistema Guarapiranga é o segundo maior reservatório da RMSP e está localizado próximo à Serra do Mar. A água é proveniente da reversão das cabeceiras do Rio Capivari e retirada da represa Guarapiranga. Essa água é bombeada até as ETA(s) Alto da Boa Vista e Theodoro Ramos, que produzem 15 mil litros de água por segundo e abastecem 3,2 milhões de pessoas da zona sul e sudoeste da capital.

As principais etapas de captação de água dos mananciais no tratamento realizado nas ETAS , estão apresentadas na Figura III-8 e compreendem os processos de desinfecção, coagulação, floculação, decantação, filtração, correção do pH e fluoretação.

Os produtos químicos rotineiramente utilizados nesses tratamentos são:

1. Coagulantes: sulfato de alumínio, cloreto férrico;
2. Desinfetantes: cloro gasoso, hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio;
3. Correção de pH: hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, carbonato de sódio;
4. Fluoretação: flúor silicato de sódio;
5. Algicidas: sulfato de cobre;
6. Seqüestrantes: ortopolifosfatos;
7. Controle de odor e sabor: carvão ativado;
8. Auxiliares de coagulação, floculação, decantação e filtração: polímeros a base de amina.

Todas as aplicações de produtos são precedidas de testes laboratoriais, realizados pelo menos uma vez ao dia, que determinam as dosagens dos produtos químicos a serem aplicados no volume de água que chega à ETA.

Figura III-8: Esquema representativo do tratamento da água na RMSP (SABESP, 2002)

De acordo com a SABESP, que juntamente com a CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental) fazem o monitoramento dessas águas, o Sistema Cantareira apresenta a melhor qualidade das águas, enquanto que os Sistemas Guarapiranga, Alto e Baixo Cotia, possuem as águas mais poluídas da região.

Dadas essas características e a importância da ETA de Guarapiranga em termos de número de pessoas servidas escolheu-se essa estação de tratamento para avaliação da presença de nitrosaminas.

As amostras foram coletadas em frascos escuros, previamente lavados de acordo com procedimento CETESB,2003, para coleta. Na coleta os frascos foram cheios e esvaziados de 3 a 5 vezes e então preenchidos totalmente e mantidos fechados e refrigerados até o momento de extração (máximo 7 dias após a coleta).

- **Poço artesiano da região do Vale do Paraíba:** foi escolhido um poço artesiano da região de Taubaté, do qual já se tinha conhecimento de sua composição química com alto teor de nitrogênio amoniacal, que segundo Najm e Trussel 2000, favorece a formação de nitrosamina pela presença de nitrogênio combinado (cloraminas) e cloro livre.

O Brasil apresentou nos últimos anos um aumento significativo da utilização das reservas de água subterrânea. Atualmente, o Estado de São Paulo se destaca como o maior usuário das reservas hídricas brasileiras. Para confirmar tal afirmação, basta salientar que grande parte das unidades da SABESP no interior paulista são abastecidas a partir de poços.

Usualmente, depois de captada, a água proveniente dos poços é levada para um reservatório apropriado e recebe o tratamento, geralmente à base de cloro e flúor.

O poço amostrado encontra-se na região do vale do Paraíba, na cidade de Tremembé (Figura III-9) em Latitude - $22^{\circ} 57' 45''$ e Longitude - $45^{\circ} 33' 17''$. Tremembé é uma das 33 cidades abastecidas pelo Rio Paraíba e apresenta um histórico de cidade com economia predominantemente agrícola e pecuária, com poucas indústrias, instaladas a partir da década de 70.

Figura III-9: Mapa de localização da cidade de Tremembé

O poço em questão é produtor de uma água de alta mineralização, classificada como água mineral alcalino bicarbonatada, fluoretada, litinada, de acordo com o código de Águas Minerais e foi escolhido devido sua caracterização físico-química. Após o tratamento com cloro, apresenta grande quantidade de cloro combinado, devido a presença de nitrogênio amoniacal. Para caracterização, amostra da água do poço *in natura* e também amostras clorada e deionizada foram enviadas ao laboratório LAMIN (Laboratório de Análises Minerais) no Rio de Janeiro onde foram analisadas. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela III - 2, a seguir:

Tabela III – 2: Caracterização da água de poço (LAMIN,2001).

Análise	Amostra <i>in natura</i>	Amostra deionizada	Amostra clorada
Aspecto Natural	turvo	límpido	límpido
Odor a frio	inodoro	detectado	detectado
Sólidos em Suspensão (mgL ⁻¹)	< 5	< 5	< 5
Aspecto após fervura	turvo	límpido	límpido
Odor a quente	inodoro	detectado	detectado
Cor (unidade Hazen)	5	5	5
pH	8,23	6,21	8,30
Condutividade á 25° C (mhos/cm)	9,24 x 10 ⁻⁴	6,86 x 10 ⁻⁵	9,88 x 10 ⁻⁴
Oxigênio consumido	1,00	0,10	2,10
Meio ácido (mgL ⁻¹)			
Oxigênio consumido	1,20	0,50	4,00
Meio alcalino (mgL ⁻¹)			
Nitrogênio Amoniacal (mgL ⁻¹)	7,146	0,255	4,846
Nitrogênio Albuminóide (mgL ⁻¹)	0,117	0,050	0,232
Nitritos (mgL ⁻¹)	< 0,005	< 0,005	0,012
Nitratos (mgL ⁻¹)	< 0,02	0,14	0,20
Fluoretos (mgL ⁻¹)	6,82	0,198	5,65
Brometos (mgL ⁻¹)	0,14	0,05	1,82
Sulfatos (mgL ⁻¹)	0,14	0,04	0,12
Cloretos (mgL ⁻¹)	31,61	7,21	49,14
Fosfatos (mgL ⁻¹)	< 0,02	0,07	0,06
Carbonatos (mgL ⁻¹)	18,97	0,00	21,50
Bicarbonatos (mgL ⁻¹)	536,85	28,00	541,35
Alumínio (mgL ⁻¹)	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Bário (mgL ⁻¹)	0,095	0,003	0,098
Boro (mgL ⁻¹)	0,265	1,033	0,277
Cádmio (mgL ⁻¹)	< 0,001	0,001	0,052
Ferro Total (mgL ⁻¹)	0,023	< 0,002	0,011
Lítio (mgL ⁻¹)	0,051	0,001	0,052
Magnésio (mgL ⁻¹)	1,06	< 0,01	1,12
Manganês (mgL ⁻¹)	0,005	0,002	0,003
Molibdênio (mgL ⁻¹)	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Níquel (mgL ⁻¹)	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Cálcio (mgL ⁻¹)	3,13	0,03	3,11
Chumbo (mgL ⁻¹)	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Cobalto (mgL ⁻¹)	< 0,002	< 0,002	< 0,002
Cobre (mgL ⁻¹)	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Cromo (mgL ⁻¹)	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Estanho (mgL ⁻¹)	< 0,01	0,01	< 0,01
Estrôncio (mgL ⁻¹)	0,093	< 0,001	0,095
Potássio (mgL ⁻¹)	3,67	0,17	3,81
Silício (mgL ⁻¹)	8,57	22,77	8,32
Sódio (mgL ⁻¹)	215,00	17,65	230,00
Zinco (mgL ⁻¹)	< 0,001	0,004	0,002

A amostra foi coletada em galão de 20 L de polipropileno cor leitosa para impedir passagem de luz. Para coleta o galão foi lavado várias vezes com a própria

amostra e a seguir preenchido totalmente com a água coletada e mantido sob refrigeração até o momento da análise.

- **Rio Paraíba do Sul**

O trabalho de Coelho, 1995, mostrou dados sobre a resposta mutagênica de amostras originárias do Rio Paraíba. Como esse rio encontra-se numa região de histórico agrícola, foi coletada uma amostra para avaliação dessa matriz, objetivando obter seu perfil cromatográfico quanto a presença de compostos nitrosos.

O Rio Paraíba do Sul localiza-se entre a Serra do Mar e da Mantiqueira, no vale do Paraíba. É o principal recurso hídrico desta região, atravessando 33 cidades e abastecendo cerca de 1,6 milhão de pessoas.

O rio nasce na serra do Mar e passa por dois reservatórios (Paraibuna e Santa Branca) mantendo uma vazão mínima de 93 m³/s, atravessando a seguir inúmeras cidades recebendo afluentes em seus 330 km de extensão. Desemboca na represa do Funil no Estado do Rio de Janeiro, com uma vazão de 140 m³/s e posteriormente deságua no Oceano Atlântico, na bacia de Campos, no Estado do Rio de Janeiro. Sua área de drenagem é de 14230 km² e muito de seus afluentes percorrem centros urbanos onde fazem parte da rede de macro drenagem das cidades (PENTEADO, 2000).

As cargas poluidoras de origem doméstica dos municípios da bacia do rio Paraíba do Sul são lançadas “in natura” no rio, por cerca de 24 cidades que não possuem qualquer tipo de tratamento de esgoto (CETESB, 1995 In PENTEADO, 2000).

Cerca de 3.000 indústrias, dos mais diversos setores, tais como de papel e celulose, eletrônica, alimentícia, química, petroquímica e automobilística, entre outras, estão instaladas nas proximidades do rio. No entanto apenas 19 indústrias são responsáveis por 90% da carga orgânica lançada e se localizam nos primeiros 100 km do rio (PENTEADO, 2000).

Outra fonte poluidora a ser considerada é a disposição inadequada de resíduos sólidos domésticos (cerca de 783 ton./dia), geralmente muito próximos aos cursos da água. São, ao todo, 25 cidades que não possuem local adequado para destinar o seu lixo, podendo ser carregado por enxurradas, contaminando os lençóis freáticos.

Além disto, a rede superficial da bacia do rio Paraíba do Sul não está preparada para conduzir o excedente dos volumes precipitados (chuvas), mesmo com a utilização

dos reservatórios reguladores de Santa Branca e Paraibuna. Não é possível evitar a inundação das 29 cidades vizinhas ao rio Paraíba do Sul e seus afluentes, tornando-se assim um alvo de receptação de poluentes (PENTEADO, 2000).

Interferem também outras fontes poluidoras, tais como: “*run off*”; (despejo carregado pelas chuvas); uso de fertilizantes e agrotóxicos em geral; acidentes na malha viária; despejo de resíduos de animais provenientes da zona rural.

O local de coleta da amostra para este trabalho, foi realizado no ponto com as coordenadas em *Global Position System* (GPS) de 22° 57' 84,1" na cidade de Taubaté.

A amostra foi coletada em frasco de 5 L cor âmbar para impedir passagem de luz. Para coleta o frasco foi lavado várias vezes com a própria amostra e a seguir preenchido totalmente com a água coletada e mantido sob refrigeração até o momento da análise.

Procedimentos:

De forma a atingir o nível de detecção exigido, neste trabalho foram estudadas técnicas de:

Pré-concentração: Empregando extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração em circuito fechado;

Concentração: Utilizando evaporação com concentrador a vácuo, evaporação com aparelho de Kuderna Danish em circuito fechado, evaporação com nitrogênio e SPME (*solid phase micro-extraction*);

Separação e Detecção: Cromatografia a gás acoplada a detector de quimiluminescência e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.

1.4 Métodos de pré-concentração

1.4.1 Extração líquido-líquido

Foi utilizada solução padrão contendo as nitrosaminas: NDMA; NDEA e NDBA. Do padrão concentrado ($2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) tomou-se $10 \mu\text{L}$ para adição a 100 mL de água resfriada ($10 - 15^\circ \text{C}$) correspondendo a 200 ppb ou $200 \mu\text{gL}^{-1}$. A solução foi transferida para funil de separação e em seguida extraída com 4 porções de diclorometano (DCM).

Ao diclorometano recuperado das extrações foi adicionado cerca de 1 a 2 gramas de Na_2SO_4 anidro. O extrato foi então filtrado em papel de filtro Whatman 42 e evaporado sob leve fluxo de nitrogênio até aproximadamente $0,5 \text{ mL}$ deixando o frasco em recipiente com gelo.

Para avaliação do efeito da força iônica no rendimento da extração, adicionou-se NaCl na proporção de 5 gL^{-1} na água fortificada. A influência do pH foi avaliada através da acidificação com HCl ou H_2SO_4 até pH 2, ou alcalinização com NaOH , acertando o pH para 8.

1.4.2 Extração em fase sólida

1.4.2.1 Escolha da fase sólida

Estudos preliminares com um número restrito de nitrosaminas foram realizados, para selecionar os adsorventes adequados para reter esta família de compostos.

As fases sólidas testadas foram: Tenax; Tenax Carbotrap; Carvão; C18; XAD4; XAD8 e Florisil. A pré-ativação do Florisil foi feita à 300°C por 4 horas e para o carvão à 400°C por 8 horas. Na estufa a 110°C foram pré-ativadas a fase Tenax (máx. 350°C) e as resinas XAD4 e XAD 8. A C18 utilizada foi ativada com o próprio solvente.

Colunas de aço de cerca de 15 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro, foram preenchidas com cerca de $0,2 \text{ g}$ de fase a ser testada e vedadas nas extremidades com lã de vidro. As colunas de aço inoxidável foram submetidas a tratamento prévio com lavagem em acetona e secagem na mufla a 300°C . As fases foram ativadas através do contato com solvente, antes de seu uso.

A água deionizada utilizada para teste foi colocada no recipiente de 10 litros e eluída através do sistema mostrado na Figura III-1, com fluxo de 1,2 L/h passando através da coluna empacotada com cerca de 0,2 g da fase a ser testada.

Após eluição do volume de 2 L medidos com um balão volumétrico que recebia o eluente, a coluna foi desconectada do sistema e realizada extração manual, com auxílio de uma seringa, usando 100 mL de acetona ou solvente a ser testado.

O solvente foi então evaporado com uma corrente suave de nitrogênio e, após atingir o volume de 1 mL, injetado no CG/TEA.

O procedimento foi repetido para todas as fases e os testes de repetibilidade foram realizados apenas com as fases que deram as maiores áreas (carvão e XAD 4).

1.4.2.2 Escolha do solvente de dessorção

Com o resultado obtido através do procedimento 1.4.2.1, verificou-se que a resina XAD4 apresentava o melhor desempenho. Com esta resina então, foram realizados testes para obtenção da % de recuperação de nitrosaminas com o uso de XAD4 para a escolha do melhor solvente para eluição.

Neste procedimento foi utilizada solução padrão na concentração $200 \mu\text{gL}^{-1}$ das nitrosaminas: NDMA; NDEA; NDBA e NDELA obtida a partir da diluição de 1 mL da solução de trabalho de 50 mgL^{-1} para 250 mL de água, de onde foram tomadas alíquotas de 10 mL que foram eluídas com ajuda de uma seringa de vidro tipo *luer lock* através das colunas preenchidas com cerca de 0,2 g de resina XAD4.

Foram preparadas 21 colunas, das quais 5 foram eluídas com 2 mL de acetona, 5 eluídas com diclorometano e 5 foram tratadas com amostra acidificada a pH 2 e posteriormente eluídas com acetato de etila. Para cada tratamento foram utilizadas duas outras colunas para provas em branco.

Os extratos obtidos foram cromatografados em CG/MS e CG/TEA, nas seguintes condições: gás de arraste: Hélio; Coluna 1 (CP sil 5CB 50m x 0,32 mm x 1,2 μm); programação de temperatura: 40°C / 3min / $10^\circ \text{C}/\text{min}$ / 290°C / 2 min; temperatura do injetor: 180°C ; modo de injeção: *Pulsed Splitless*; *Injection Pulse* 30 psi; temperatura da interface: 290°C ; temperatura de pirólise: 600°C ; velocidade linear = 28 cm/s; fluxo: 1 mL/min de O_2 .

1.4.3 Extração em circuito fechado

O equipamento utilizado está esquematizado na Figura III-2. Em balão volumétrico de 1000 mL colocou-se a amostra a ser analisada e adicionou-se a cada preparação 10 μL (correspondendo então a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) da solução padrão 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dos padrões NDMA; NDBA e NDPhA e 0,5 g de ácido sulfâmico ou ascórbico.

Após montagem do sistema, colocou-se 500 mL de diclorometano e 1 L de água, abrindo-se então a válvula de comunicação e a água do condensador. Aqueceu-se o sistema e extraiu-se pelo tempo pré-fixado de 10 horas; após este período a torneira de comunicação foi fechada e o solvente concentrado até 1 mL. Os extratos foram mantidos em *freezer* a -15°C até o momento da análise cromatográfica.

Provas em branco foram feitas com a água bruta e a água deionizada.

1.5 Métodos de concentração

1.5.1 Evaporação com N_2

Os extratos procedentes dos vários tratamentos foram colocados em frascos cônicos e evaporados com leve fluxo de ar (cerca de 1 ml/min) .

Para avaliar a % de recuperação, adicionou-se padrão correspondendo a 20 ppb a 1 mL de diclorometano. Injetou-se a solução no GC/TEA e as áreas foram comparadas.

1.5.2 Microextração em fase sólida (SPME)

Nos procedimentos de *Solid Phase Micro Extraction* (SPME), o suporte, seringa da Supelco, apresentado na Figura III-10 a seguir, foi utilizado com fibras recobertas com as fases estacionárias disponíveis comercialmente (Supelco), a saber: Polidimetilsiloxano (PDMS) com espessuras de filme de 100, 30 e 7 μm ; Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB); Carboxen/polidimetilsiloxano (Carboxen/PDMS), Carbowax / Divinilbenzeno (CW/DVB) e Poliacrilato (PA).

Figura III-10: Microextração em fase sólida (SPME) (REZEMINI, 2002)

Todas as fibras foram previamente condicionadas utilizando temperatura. Nesta etapa, a agulha, presa à seringa, é inserida no injetor do cromatógrafo e a fibra fica exposta para sua ativação térmica.

Os tempos de ativação utilizados para as fibras foram: PDMS (1 a 4 h a 320° C); PDMS/DVB (30 min a 260° C); Carboxen/PDMS (30 min a 280° C); CW/DVB (30 min a 250° C); PA (2 h a 300° C).

As fibras foram testadas em dois modos de extração por SPME: *headspace* e direto. No modo *headspace*, cerca de 1 mL de solvente contendo a mistura padrão de nitrosaminas foi colocado em frasco de 4 mL (âmbar) com tampa de polipropileno e septo de silicone-PTFE (politetrafluoroetileno).

A agulha do SPME foi inserida no frasco, ficando a fibra exposta na parte gasosa (*headspace*) acima do solvente, nos intervalos de tempo de 20, 40, 60 e 120 min, com agitação (agitador magnético).

No modo direto, foram utilizados frascos de 2 e 4 mL contendo 1 ou 2 mL do solvente com os padrões NDMA, NDEA, NDBA e NDELA na concentração de 0,5 mgL⁻¹. A comparação entre as fibras foi realizada com tempo de adsorção de 10 min.

No modo direto foram avaliados os efeitos do pH 2,0 e 9,0, utilizando-se HCl 1 M para acerto do pH na faixa ácida e butil amina ou NaOH para acerto do pH na faixa

alcalina; adição de eletrólito (NaCl 9 g/L) e espessura da fibra (7 e 100 μm) através de um planejamento de experimento (fatorial completo 2^4).

Extrações no modo direto com a fibra Carbowax/DVB foram feitas com cinco concentrações diferentes das nitrosaminas NDMA, NDPA, NDBA e NDELA, para avaliar o limite de detecção do espectrômetro de massas utilizado.

Após cada corrida cromatográfica, foi realizada uma corrida em branco nas mesmas condições para verificar se a dessorção do analito que estava na fibra havia sido completa, efeito chamado de *carryover*.

As condições cromatográficas utilizadas para análise de NDELA; NDMA; NDEA e NDBA empregando SPME foram:

Injetor: temperatura variando de 200 a 240° C;

Razão de divisão 1:50;

Coluna CPSIL 5 CB 50 m x 0,32 mm x 1,2 μm , com programação 170° C (4 min) à 20° C/min até 220° C (2 min);

Interface: 290° C;

Espectrômetro de massas: modo *Single Ion Monitoring* (SIM);

Íons monitorados:

NDMA: (74); NDEA: (56; 57; 102); NDBA: (57; 84; 99; 116; 141; 158); NDELA: (31; 42; 45; 56; 72; 91);

SPME: com agitação e tempos de adsorção de 10 min e de dessorção de 5 min;

Fibras avaliadas: Carboxen/PDMS; 75 μm ; PDMS 100; 30 e 7 μm ; poliacrilato 85 μm ; PDMS/DVB 65 μm ; Carbowax/DVB 65 μm .

Neste procedimento, a fibra foi colocada em contato com 10 mL de solução padrão na concentração de 0,5 mgL^{-1} em acetona, pelo tempo estipulado em teste de 10 minutos. Após este tempo a fibra foi colocada no injetor para dessorção em tempo estabelecido de 5 min.

1.5.3 Concentração em circuito fechado

Após a extração utilizando o equipamento mostrado na Figura III-2, as válvulas de comunicação eram fechadas e o solvente evaporado através do sistema de Kuderna Danish, integrante do equipamento, até o volume de 1 mL.

1.6 Separação e detecção

1.6.1 Otimização das condições cromatográficas (GC/TEA)

1.6.1.1 Temperatura e parâmetros do injetor vs velocidade linear vs modo *split* / *splitless*

Utilizando-se a solução padrão de 50 ppm de NDEA, foram testadas diferentes condições para escolha da temperatura do injetor; velocidade linear e modo *splitless* ou *pulsed splitless*.

As condições cromatográficas usadas foram: coluna 1 (Cpsil 50 m); temperatura coluna 170° C (1 min), 30° C/min até 290° C; injetor (testadas as temperaturas de 180°; 200° e 220° C); temperatura da base do detector 290° C; temperatura pirólise 600° C; *cooler*: -10°C.

1.6.1.2 Avaliação do tempo de *splitless*

Foi estudada a influência do tempo de *splitless* no perfil das nitrosaminas avaliadas (NDMA; NDPA). As condições cromatográficas foram as mesmas indicadas no item anterior avaliando-se os tempos de *splitless* de 0,5; 1; 2; e 3 min.

1.6.1.3 Influência *purge flow* e seringa

Utilizando-se as mesmas condições cromatográficas de 1.6.1.1, foi verificada a influência do *purge* na área obtida. Testou-se as vazões de *purge* de 30 e 100 mL/min com duas diferentes seringas da marca Hamilton com capacidade de 10 µL.

1.6.1.4 Estudo dos parâmetros: temperatura do elemento “*peltier*” ou “*cooler*”; fluxo de ozônio; fluxo de oxigênio e temperatura do forno de pirólise

Para este estudo foi realizado um planejamento fatorial completo de 2^4 , para avaliar a influência dos 4 fatores na resposta cromatográfica, em unidades de área.

Os experimentos foram realizados em duplicata, com 3 repetições no ponto central, a fim de se obter uma estimativa melhor do erro. Cabe esclarecer que poderia ser apenas uma repetição com a triplicata somente no ponto central.

Foi utilizado o *software Design Expert* para construção da matriz de experimentos.

Para cálculo dos efeitos, os sinais algébricos foram calculados multiplicando-se elemento a elemento as colunas da matriz de planejamento. Elas foram multiplicadas 2 a 2; 3 a 3 e também foi obtido o produto das 4 colunas.

Transformando a tabela de coeficientes de contrastes numa matriz X de elementos $+1$ e -1 , pode-se calcular todos os efeitos, fazendo o produto $X^t y$, onde X^t é a matriz transposta de X , e y é a média das replicatas. O divisor para média é 16 e para os efeitos é 8.

Como o experimento foi realizado em duplicata, pode-se calcular a estimativa do erro e intervalo de confiança, conseguindo a estimativa conjunta da variância através da fórmula:

$$S^2 = (d_i)^2 / 2n, \text{ onde: } d_i = \text{diferença entre as duplicatas e } N = \text{número de ensaios.}$$

1.6.1.5 Avaliação da seletividade na pirólise

Para avaliação da melhor temperatura do forno, para garantir uma seletividade, foi utilizada uma solução de 1000 ppb(s) contendo as nitrosaminas: NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR, NMOR e NDPhA.

As temperaturas do forno testadas foram: 350, 600 e 800° C.

1.6.1.6 Estudo da linearidade da resposta do detector de quimiluminescência (TEA)

A linearidade foi determinada por meio da análise de soluções padrão em diferentes concentrações, nas condições cromatográficas já otimizadas.

1.6.1.7 Construção das curvas analíticas

As curvas analíticas foram obtidas analisando-se em quadruplicata as soluções padrão.

Foram construídas curvas analíticas, para cada nitrosamina, nas faixas de 0,5 a 10, 25 a 250 e 250 a 1000 μgL^{-1} .

Para um processo ideal, isento de erros experimentais, a quantidade encontrada do analito (y) é a mesma apresentada como X em todos os níveis de concentração. Experimentalmente porém, vemos que a relação faz-se pela equação :

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

Onde β_0 e β_1 serão exatamente iguais a zero (0) e um (1), respectivamente, apenas quando o processo não apresentar tendência (*bias*) constante ou proporcional. Como o erro experimental dificilmente é igual a zero, tem-se o termo ε_i no modelo matemático (WERNIMONT, 1993).

Utilizou-se então a equação $Y = b_0 + b_1X$ para avaliar os resultados obtidos, onde b_0 e b_1 são estimadores de β_0 e β_1 e Y é o valor estimado do sinal analítico.

Também calculou-se $s_{y,x}$, o desvio padrão dos valores de Y a um X constante, como uma estimativa do desvio padrão do erro experimental $\sigma_{y, x}$, assumindo-se que seja o mesmo em todos os níveis de X. O $s_{y, x}$ foi usado para testar se o modelo é linear, a fim de estimar um intervalo de confiança para β_0 e β_1 e, ainda, prever a variabilidade de futuros resultados.

A magnitude do intervalo de confiança poderia ter sido reduzida: i) aumentando o número de replicatas independentes, ii) aumentando o número dos pontos de calibração ou iii) aumentando-se a faixa de concentração entre os pontos de calibração (WERNIMONT, 1993).

1.6.1.8 Avaliação do limite de detecção do equipamento

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos através das equações:

$$LD = b + (3 \cdot dDPy/x)$$

$$LQ = b + (10 \cdot dDPy/x)$$

Onde: b= intersecção da curva da regressão linear ($y=ax+b$), entendido como sinal analítico do branco.

DPy/x = desvio padrão dos valores de y em x em relação ao desvio padrão obtido para os valores da prova em branco (WERNIMONT, 1993).

1.6.1.9 Avaliação da precisão e recuperação do procedimento

A precisão e recuperação do método foram obtidas através de amostras de água destilada e água bruta fortificadas com quantidades conhecidas de nitrosaminas.

No uso da água deionizada, esta foi fervida antes da fortificação para prevenir eventual presença de nitrosodimetilamina formada por contato com resinas de troca iônica empregadas na deionização da água (KIMOTO; DOOLEY; FIDLER, 1980).

Para obtenção da precisão do método para as nitrosaminas leves, empregou-se água destilada fortificada com 20 ngL^{-1} de nitrosaminas e executou-se o procedimento em duplicata em quatro diferentes ocasiões. O cálculo da precisão foi realizado utilizando-se análise de variância (Gardiner, 1997), com auxílio da planilha *Excel*, através das fórmulas:

$$\text{Repetibilidade} = t_{(v, 0,025)} \cdot \sqrt{2} \cdot S_E$$

Onde 2 corresponde a duas repetições por ocasião e S_E , ao desvio padrão estimado entre repetições no mesmo dia.

$$\text{Reprodutibilidade} = t_{(v, 0,025)} \cdot \sqrt{2} \cdot S_R$$

Onde S_R corresponde a composição da variação dentro e entre ocasiões (período ou dias).

Para avaliar a recuperação na presença da matriz, amostra de Água bruta foi contaminada com 20 ngL^{-1} das nitrosaminas NDMA e NDBA e extraída conforme o procedimento ilustrado no Fluxograma (Figura III-11).

1.6.1.10 Monitoramento do desempenho do sistema cromatográfico – cartas de controle

Para monitoramento da adequação do sistema cromatográfico CG/TEA foram utilizadas soluções de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$; 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 50 mg L^{-1} que foram lançados em gráficos de carta de controle para indicação de alterações significativas no sistema.

O acompanhamento foi feito com auxílio de planilha *Excel* ou software *Statistics for Windows*.

A carta de Controle ou diagrama de Shewart é um gráfico no qual se representa consecutivamente o valor das médias amostrais de maneira que as variações do processo analítico vão sendo registradas, podendo-se assim tomar qualquer ação corretiva o mais breve possível.

O valor da média amostral é representado no gráfico em função do tempo. Quando o processo está sob controle, os valores das médias se distribuem normalmente em torno da linha representativa da média das médias (μ_0) do período analisado. Dois pares de linhas horizontais e paralelos à linha da média das médias são colocados.

Estas linhas representam as linhas de alerta situadas em $\bar{u}_0 \pm 2\delta/\sqrt{n}$ e as linhas de ação em $\bar{u}_0 \pm 3\delta/\sqrt{n}$, onde μ_0 é a média das médias, e δ é o desvio padrão.

A probabilidade dos valores caírem fora desta região é de 5 % para os limites de alerta e 3 % para os limites de ação, indicando portanto que o processo analítico pode ter sofrido alguma interferência fora da variação normal esperada para o processo em estudo.

1.6.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

1.6.2.1 Detecção por CG/MS das nitrosaminas voláteis (NDMA, NDEA, NDPA, NMOR, NPIP, NDBA e NPYR)

As condições utilizadas foram:

Modo Injeção Direta; 1 e 5 μL de injeção.

Coluna: CP SIL 5CB, 50 m, 0,32 mm, 1,2 μm ;

MODO: *Single Ion Monitoring*: (SIM);

Temperatura Injetor: 260° C;

Interface: 290° C;

Íons monitorados: **NDMA** : 74 **NDPA**: 43, 70, 101, 130
NDEA: 56, 57, 102 **NMOR**: 41, 56, 86, 116
NDBA: 57, 84, 99, 116, 141, 158 **NPIP**: 42, 55, 84, 114
NPyR: 43, 70, 101, 130

1.6.2.2 Detecção de nitrosamina não volátil (NDELA)

Amostra *in natura*:

Técnica de injeção: injeção *splitless*;

Coluna 2: HP1 (metilsilicone) 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm espessura filme com velocidade linear de 40 cm/seg;

Injetor: 260° C;

Interface: 280° C; programação da coluna 90° C a 10° C/min até 160° C (1min);

Volume de injeção: 2 µL;

Condições de aquisição do MS; modo SIM (íons 42; 72; 91) *dwelltime*: 10 msec; *solvent delay*: 3 min; temperatura da fonte: 230° C; temperatura do quadrupolo: 150° C.

Amostra sililada:

Técnica: injeção direta com *splitless* e purga de 2 min;

Coluna 2 : HP1 programação 120° C a 5° C/min até 160° C (1min);

Injetor: temperatura 260° C com *insert* de lã de vidro sililada;

Interface: 280°C; Volume de injeção: 2 µL;

Condições de aquisição do MS: modo SIM (íons 73; 103; 116; 130; 147; 263) *dwelltime* 10 msec; *solvent delay*: 3 min; Temperatura da fonte: 230° C; temperatura do quadrupolo: 150° C.

Preparo do padrão:

Solução 1: 0,0061 g de NDELA. Adicionou-se com micropipeta 0,3 mL de Bis-silil-trimetil-trifluoroacetamida (BSTFA) e 0,7 mL de acetona PA Merck.

Solução 2: Tomou-se com micropipeta 5 µL da solução 1 e completou-se para 1 mL com acetona.

Solução 3: Tomou-se com micropipeta 1 μL da solução 1 e completou-se para 1 mL com acetona.

Passivação do sistema: Para evitar a adsorção da NDELA no sistema e falta de repetibilidade/reprodutibilidade passivou-se o sistema injetando-se 0,5 μL da solução 1 e, a seguir, 5 injeções consecutivas de acetona para limpeza do excesso.

Para a análise de NDELA foram injetados padrões em concentrações decrescentes; 180, 36, 18 e 9 μgL^{-1} .

Amostra Sililada por SPME:

As condições cromatográficas utilizadas são as mesmas descritas no item acima para a amostra sililada, com as seguintes alterações:

Injetor: temperatura 260° C com insert especial para SPME e sem lã de vidro sililada;

Fibras testadas: Carboxen/PDMS; 75 μm ; PDMS 100; 30 e 7 μm ; poliacrilato 85 μm ; PDMS/DVB 65 μm ; Carbowax/DVB 65 μm .

Utilizando-se a seringa manual, as fibras foram ativadas na temperatura e tempo indicados no item 1.5.2 e, a seguir, expostas na solução por 10 min, tempo de adsorção, e dessorvidas no injetor por 5 min.

1.7 Aplicação do método analítico em amostras de águas

Após estudo de todos os parâmetros abordados, algumas amostras foram coletadas e analisadas para se avaliar a aplicação do método.

As condições estabelecidas para análise das amostras estão esquematizadas no fluxograma apresentado na Figura III-11.

Figura III–11: Fluxograma do procedimento analítico empregado.

O procedimento foi então utilizado para análise das amostras coletadas de água da represa Guarapiranga; água de poço artesiano da cidade de Tremembé e água do rio Paraíba.

A amostra de água foi acidificada com 2 mL de H_2SO_4 1 N para pH em torno de 2 e transferida para balão volumétrico de 1 L. A seguir, a esta solução foram adicionados 5 g de NaCl, completando-se o volume e transferindo a solução para funil de separação de 2 L.

A solução acidificada foi então extraída com quatro porções de 20 mL de diclorometano (DCM), recolhendo-se os extratos orgânicos em um *erlenmeyer*.

Sulfato de sódio anidro (cerca de 2 g) foi adicionado ao extrato filtrando-se o solvente em papel de filtro Whatman 42 e recolhendo o filtrado em frasco de fundo cônico, adequado para ser evaporado com nitrogênio. Em procedimento alternativo recolheu-se o solvente com pipeta Pasteur, transferindo-se para o frasco de evaporação e lavando o *erlenmeyer* com diclorometano para garantir a transferência quantitativa.

Os filtrados orgânicos obtidos foram evaporados sob nitrogênio até volume de 1 mL e conservados sob refrigeração em temperaturas menores que 4° C.

Para a análise cromatográfica, injeções prévias dos extratos orgânicos concentrados foram feitas de forma a obter contagem de área dentro da curva analítica.

O mesmo procedimento foi repetido, porém sem acidificar a amostra, com o objetivo de verificar se a extração ácida foi seletiva para algum componente nitrogenado.

Adição com padrão de NDBA foi utilizada na amostra de água bruta para eliminar o efeito matriz no cálculo dos resultados.

Após a extração, as amostras coletadas e os extratos recebidos da CETESB foram avaliados por CG/TEA e CG/MS nas seguintes condições:

- **CG/TEA:**

Modo Injeção Direta

Programação Coluna: 80° C (2 min), rampa 5° C/min até 180° C (1 min), rampa 20° C/min até 250° C (1 min);

Temperatura Injetor: 180° C;

Temperatura Detector: 280° C.

Modo *splitless* (2 min);
Purge Flow: 100 mL/min após 2,5 min;
 Velocidade Linear: 64 cm/min; (Hélio)
 Fluxo O₂: 3 mL/min e O₃: 25 mL/min;
Cooler: 5° C;
 Pirólise: 350° C.

Modo SPME

Programação Coluna 1: 179° C(4min), rampa 40° C/min até 290°C (5 min);
 Temperatura Injetor: 260° C;
 Temperatura Detector: 290° C;
 Modo *splitless* (2 min);
Purge Flow: 100 mL/min após 2,5 min;
 Velocidade Linear: 30 cm/min;
 Fluxo O₂: 3 mL/min e O₃: 25 mL/min;
 Pirólise: 800° C;
Cooler: 4° C;
 Fluxos: O₂ e O₃= 1 mL/min;
 Tempo de adsorção: 10 min;
 Tempo de dessorção: 5 min.

• CG/MS:

Modo Injeção Direta (*SIM e SCAN*)

Coluna: CP SIL 5CB, 50 m, 0,32 mm, 1,2 µm;
 Programação Coluna: 80° C (2 min), rampa 5° C/min até 180° C (1 min), rampa 20° C/min até 250° C (1 min);
 Velocidade Linear: 40 cm/min;
 Temperatura Injetor: 260° C;
 Interface: 290° C;
 Íons monitorados: **NDMA** : 74 **NDPA**: 43, 70, 101, 130
NDEA: 56, 57, 102 **NMOR**: 28, 41, 56, 86, 116
NDBA: 57, 84, 99, 116, 141, 158 **NPIP**: 28, 42, 55, 84, 114
NPyR: 27, 43, 70, 101, 130

Modo SPME

Coluna: CP SIL 5CB, 50 m, 0,32 mm, 1,2 μm ;

Programação Coluna: 179° C(4min), rampa 40° C/min até 290°C (5 min);

SPME com agitação;

Tempo de adsorção: 10 min;

Tempo de dessorção: 5 min;

Fibra SPME: Carbowax /Divinil benzeno 65;

MODO: *Single Ion Monitoring*: (SIM);

Temperatura Injetor: 260° C;

Interface: 290° C;

Íons monitorados: os mesmos indicados no Modo Injeção direta.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Métodos de pré-concentração

1.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido é uma técnica largamente utilizada para extrair analitos orgânicos de água. A seletividade da extração depende da escolha do solvente e da natureza da amostra. Fatores como pH, força iônica, entre outros, podem interferir no rendimento da extração e ainda na estabilidade do analito (LEENHEER, 1984).

A escolha do diclorometano como solvente de extração deve-se à sua polaridade, pouca miscibilidade em água, seu bom poder solvente e o ponto de ebulição baixo, o suficiente para evitar eventual degradação das nitrosaminas durante a fase de evaporação do solvente (EPA 607; FINE, 1977).

A extração líquido-líquido com diclorometano é a técnica de pré-concentração adotada pela norma EPA 607, 1980, para extração de nitrosaminas e de acordo com Fine, 1975; Fine, 1977 e Richardson, 1980, o diclorometano é o melhor solvente para extração de nitrosaminas.

O método EPA 607 utiliza o detector NPD (*Nitrogen Phosphorus detector*), onde, para injeção, o diclorometano utilizado na extração precisa ser substituído por outro solvente que não interfira com a detecção, como o isooctano, hexano, ou mesmo etanol (EPA 607). Na detecção por meio do TEA (Thermo Energy Analyser) não houve necessidade de substituição de solvente.

Os resultados obtidos na otimização de metodologia empregando como pré-concentração a extração líquido-líquido estão mostrados na Tabela IV-1.

Tabela IV-1: Eficiência de extração líquido-líquido (%)

Nitrosamina	Água deionizada (mV/s)		pH 2 (mV/s)		pH 7 - 8 (mV/s)	
	+ NaCl 5g/L		+ NaCl 5g/L		+ NaCl 5g/L	
NDMA	30 ± 4	40 ± 2	15 ± 2	25 ± 2	25 ± 2	40 ± 2
NDEA	60 ± 7	80 ± 2	60 ± 2	70 ± 5	80 ± 7	80 ± 2
NDBA	90 ± 2	90 ± 3	90 ± 5	95 ± 2	90 ± 2	90 ± 4
NDPA	-	-	-	-	-	80 ± 4
NDELA	-	-	-	-	-	90 ± 4

N=2 (-) não realizado

Observa-se que a adição de um eletrólito, no caso NaCl, favorece a extração de todas as nitrosaminas avaliadas, sejam polares (NDELA) ou apolares (LAGGETT; JENKINS; MIYARES, 1990).

A adição de eletrólito nos solventes para melhor extração de analitos orgânicos polares favorece sua extração mesmo quando se emprega solventes mais solúveis em água que o diclorometano, tais como, acetonitrila, isopropanol e tetrahidrofurano, pois favorece a formação de duas fases e desloca o analito para a fase orgânica (LAGGETT; JENKINS; MIYARES, 1990).

O ajuste de pH é um outro parâmetro importante para otimização em extrações líquido-líquido. Nikaido *et al*, 1977 e Hartmetz; Slemnova, 1980, recomendam um pH básico para extração de nitrosaminas, a fim de evitar a formação de nitrosaminas por catálise ácida a partir de seus precursores (aminas secundárias e nitritos), potencialmente presentes na água, durante a análise.

Contrariamente, o método EPA 607, 1984 e Richardson; Webb e Gough, 1980, recomendam um meio ácido para eliminar interferências como, por exemplo, aminas presentes na água.

Outro parâmetro importante e que está relacionado ao pH é a estabilidade do analito. Em análises quantitativas automatizadas, soluções padrões e amostras devem ser estáveis por algumas horas, de forma a serem mantidas no carrossel do injetor automático.

Quanto à estabilidade, temos que: NDELA é estável em temperatura ambiente por, pelo menos, 14 dias em soluções alcalinas e neutras, se mantida no escuro. As soluções são ligeiramente menos estáveis em soluções ácidas (SAX, 1986).

NDMA e as demais nitrosaminas voláteis devem ser mantidas em temperaturas abaixo de 4° C, já que se volatilizam rapidamente em temperaturas superiores a esta. Se mantidas dentro destas condições, soluções aquosas se mantêm estáveis por períodos superiores a 90 dias (IRPTC, 1984).

Há compostos nitrosos, no entanto, como a N-nitroso-N-metilurea, cuja estabilidade é pH dependente, com meia vida reportada em torno de 125 horas em pH 4, a cerca de 2 minutos em pH 9 (EHP,2003).

Para as nitrosaminas avaliadas, viu-se que o melhor rendimento era obtido em soluções com pH maiores que 6 e na presença do eletrólito. Considerando-se, porém, que as amostras poderiam apresentar nitrosaminas diferentes das disponíveis como padrão, foram realizadas também extrações ácidas com as amostras coletadas (Figuras IV-1 e IV-2).

Figura IV-1: Água tratada - extração em meio ácido (azul) e extração em meio neutro (vermelho) – CG-TEA

Figura IV-2 - Água bruta – Extração em meio neutro (azul) e extração em meio ácido (vermelho) – CG-TEA

Ainda em relação ao pH, é interessante notar que os extratos obtidos para o teste de Ames realizados em pH neutro, raramente fornecem resposta positiva ao teste, ao passo que os extratos em solução ácida freqüentemente dão resposta positiva.

Segundo Méier, 1988, a importância do método de concentração de amostra para a realização dos testes de Ames, é evidenciada à medida que se observa maior freqüência de respostas positivas nos extratos ácidos.

Esta resposta tem sido associada à presença de substâncias húmicas que reagindo com o cloro, formam compostos como o 3-cloro-4(diclorometil)-5-hydroxy-2-(5H)-furanona, também conhecido como MX. Certamente devem existir muitos outros componentes nas amostras positivas ao teste que ainda não puderam ser identificados e que podem, eventualmente, estar contribuindo para a atividade mutagênica (REZEMINI, 2002).

Observando os cromatogramas obtidos na extração ácida (Figura IV-1), foi verificado um maior número de picos na amostra de água tratada, comparativamente às amostras de água bruta, sugerindo assim, a formação de subprodutos durante o processo de tratamento.

Como os tempos de retenção dos padrões disponíveis não coincidiam com os tempos de retenção dos picos observados, não foi possível a confirmação de identidade

mesmo empregando espectrometria de massas por impacto de elétrons, devido às baixas concentrações e falta de seletividade no espectrômetro de massas.

Os trabalhos de Eaton, 2000 e Najm, 2000, demonstraram a formação de NDMA como subproduto do tratamento de águas a partir da oxidação das cloraminas eventualmente formadas no processo de tratamento. Observa-se, porém, pelos cromatogramas, picos que respondem ao detector de quimiluminescência nas condições estabelecidas evidenciando a presença de outros componentes nitrosos além da NDMA, durante o tratamento.

1.2 Extração em fase sólida

1.2.1 Escolha da fase sólida

A extração em fase sólida é uma ferramenta útil no preparo de amostras, pois pode atuar quer eliminando interferente, quer concentrando o próprio analito. É empregada para contornar problemas associados a extração líquido-líquido, tais como separação incompleta devido formação de emulsões, consumo elevado de solventes e tem ainda a possibilidade de automação. A escolha da fase sólida mais seletiva para o analito alvo, assim como a relação adsorvente/quantidade de amostra é um passo importante para o desenvolvimento do método.

A Figura IV-3 mostra os resultados obtidos em unidades de área/segundo na avaliação de desempenho de adsorção pelas fases sólidas utilizadas no gráfico. Utilizou-se para o teste a nitrosamina NDEA.

Observa-se que o melhor desempenho coube à resina XAD4, seguida pelo carvão ativado.

A quantidade de fase sólida empregada levou em consideração a relação fase sólida/quantidade de amostra empregada para a realização do teste de Ames, pois um dos objetivos pretendidos, é a verificação da presença de nitrosaminas nos concentrados das amostras submetidas a este teste. Entre as fases sólidas testadas, duas delas XAD4 e XAD8 são as mais freqüentemente empregadas para a concentração de amostra para o teste de mutagenicidade (MEIER, 1988).

Figura IV-3: Avaliação do desempenho das fases sólidas (SPE)

1.2.2 Escolha do solvente de dessorção

Após a verificação que a XAD-4 foi a melhor fase sólida, com melhor performance na retenção da nitrosamina testada, avaliou-se a repetibilidade de extração e o poder de dessorção dos solventes: acetona, diclorometano e acetato de etila, este último em meio ácido.

Os resultados obtidos para escolha do solvente de dessorção estão colocados na Tabela IV-2 a seguir.

Tabela IV-2: Recuperação de nitrosaminas em XAD4 com diferentes solventes (%)

N=5.

Área mV/s	ACETONA			DICLOROMETANO			ACETATO ETILA		
	NDMA	NDEA	NDBA	NDMA	NDEA	NDBA	NDMA	NDEA	NDBA
Média	37±7	115±59	230±58	86±40	145±70	173±45	48±34	82±34	100±79
Média Esperada	1554	1045	513	1495	999	484	1495	999	484
Recuperação %	2	11	45	5	14	34	3	8	21

Os solventes testados, diclorometano e acetato de etila foram escolhidos por serem utilizados no teste de Ames. A acetona foi selecionada devido seu índice de polaridade, que a torna um dos solventes de escolha para dessorção de analitos polares

Pelos resultados obtidos, Tabela IV-2, observa-se que tanto a repetibilidade como a recuperação são baixas. A recuperação obtida na extração líquido-líquido foi bem maior para todas as 4 nitrosaminas testadas.

A N-nitrosodietanolamina, também testada neste experimento, sequer conseguiu ser detectada, permanecendo adsorvida na fase ou não conseguindo ser retida. Por extração líquido-líquido a recuperação de NDELA é da ordem de 86 a 94 %, Tabela IV-1.

A concentração com resina XAD4 seguida por eluição com solvente orgânico, é o método empregado para realização do teste de Ames (CETESB, 2003).

A importância do método de concentração para o teste de Ames foi notada a partir da observação de que as frações ácidas, no caso a fração extraída com acetato de etila, eram as responsáveis pela maior frequência de respostas positivas ao teste em águas potáveis (Meier, 1988).

Segundo Meier, 1988, esta resposta positiva das frações ácidas ocorre quer na extração em resina ou com extração líquido-líquido. Compostos ácidos estão ionizados em pH neutro a ligeiramente alcalino, pH típico da maior parte das águas potáveis, e não são adsorvidos pelas resinas XAD, que são constituídas de compostos de baixa polaridade (XAD 2 e XAD 4) ou intermediária (XAD 7 e XAD 8) à menos que o pH da água seja diminuído para suprimir a ionização. Em contraste, a adsorção de compostos neutros à resina XAD deve ocorrer independente do pH. Considerações similares aplica-se a extração de compostos ácidos e neutros da água, usando solventes orgânicos, onde a polaridade do solvente também é um fator importante (Méier, 1988).

Inicialmente pensou-se que a causa para estes resultados discrepantes teria sua origem na forma de extração, por exemplo velocidade do fluxo, que neste trabalho, por ser manual, estava sujeita a variações. Pela literatura, porém, temos as observações de Wilcox e Williamson, 1986, que notaram a larga variedade nas condições utilizadas nos processos de extração. Por exemplo, o fluxo de água por meio das colunas variou até 300 vezes nos diferentes estudos para concentração de amostra para Teste de Ames. Outra causa pode ter origem na natureza eletrofílica das nitrosaminas conferida pelos

elétrons desemparelhados do grupo NNO, que faz com que a competição pelo solvente ou pela resina não seja tão repetitiva.

Uma alternativa para melhoria seria a utilização de eletrólitos, também no uso de fases sólidas, pois como colocado por Nikaido e colaboradores, 1977, o aumento da força iônica da água diminui a solubilidade das nitrosaminas no meio facilitando a adsorção em resinas tipo XAD. Nikaido recomenda colocar K_2CO_3 na concentração de 400 g/L para 2 L de água percoladas em colunas XAD (45 cm comprimento por 2,5 cm de diâmetro). Segundo Nikaido isto poderá aumentar o rendimento da extração até 90 %. Para a dessorção Nikaido utilizou 200 mL de diclorometano.

Neste estudo não foi avaliado o desempenho do eletrólito no caso de recuperação com resinas XAD, devido a comparação com o método utilizado para Ames e também porque os resultados com a adição de eletrólito apresentados na tabela IV-1 não mostraram um aumento muito significativo em relação aos testes feitos sem o eletrólito.

Na repetibilidade da fase sólida o carvão mostrou ser muito melhor, encontrando-se para as triplicatas uma média nas unidades de área obtidas no valor de 13927, com desvio padrão de 219,1 embora a adsorção seja menor que a apresentada pela XAD 4 .

1.3 Extração em circuito fechado

Utilizando-se o equipamento de circuito fechado Supelco modelo 64784 U, recuperou-se 40% para a NDMA (tabela IV-3). Foram feitos apenas testes com a água bruta, destilada e a água clorada neste equipamento, pois o princípio é o mesmo do Kuderna Danish já testado e esperava-se o mesmo nível de recuperação (por volta de 45%). Os resultados foram um pouco mais baixos, mas estão compatíveis com o reportado pelo método EPA 607 de recuperação esperada de 10 a 40%.

2. Métodos de concentração

Todos os métodos de concentração empregados causam uma perda das nitrosaminas mais leves, particularmente a NDMA. Para as mais pesadas, como a

NDBA, os métodos de extração e concentração não afetam tão acentuadamente a recuperação.

Segundo Fine, 1975, as demais nitrosaminas, NPIP, NMOR e NPYR também não sofrem perdas consideráveis como a NDMA, e possuem comportamento semelhante ao da NDBA.

Apesar do rendimento baixo, as extrações são reprodutíveis e permitem uma determinação das nitrosaminas testadas. Os resultados obtidos estão compatíveis com os reportados na EPA 607.

Os resultados comparativos estão na Tabela IV-3.

Tabela IV-3 : Eficiência de recuperação na concentração (%)

Nitrosamina	N ₂ (a)	KD (b)	Circ (c)	Vácuo (a)
NDMA	30 ± 4	49 ± 4	40 ± 1	-
NDEA	60 ± 7	75 ± 8	-	-
NDBA	90 ± 9	85 ± 8	-	-
NDELA	90 ± 4	-	-	-
NDPhA	99 ± 6	-	-	99

a) n=3 b) n=2 c) n=2 (KD) Kuderna Danish (Circ) Circuito Fechado
(-) não avaliado

2.1. Microextração em fase sólida (SPME)

Nos testes iniciais, utilizando-se a técnica de SPME, as amostragens foram feitas no modo *headspace*, pois desta forma se prolongaria a vida útil da fibra além de minimizar as interferências (DEAN, 1998). O modo *headspace*, entretanto, não favoreceu a detecção das nitrosaminas, assim como uma adsorção reprodutível e adequada não foi observada, devido, provavelmente, à grande diferença entre volatilidade e pressão de vapor entre elas.

Foi estudado então o modo de inserção direta da fibra. Os resultados obtidos encontram-se na Figura IV-4.

Área (mV/s)

Figura IV-4: Extração por SPME – Escolha da fibra

Observamos comportamentos diferentes para cada fibra, dependendo do analito. Por exemplo, a fibra de poliacrilato (Polyacrilate 85) mostra uma maior eficácia na adsorção de NDMA, mas baixa eficiência na retenção de NDBA.

As fibras Carboxen/PDMS e PDMS/DVB são bipolares (Wercinski, 1999), porém ainda assim a NDELA apresentou pouca afinidade com estas fibras.

A natureza mais polar da fibra Carbowax/DVB devido aos grupos hidroxila do polietilenoglicol, proporcionou uma melhor adsorção para a NDELA, assim como para as demais nitrosaminas, que apesar de apolares são favorecidas pela natureza polar do grupo NNO, elegendo-se esta fibra então para a continuidade dos testes.

A fibra de PDMS tem natureza apolar, o que não facilita a adsorção da NDELA com natureza polar.

De modo a verificar se as condições poderiam ser otimizadas para a fibra PDMS, mesmo que isto implicasse em utilizar diferentes fibras para a avaliação das nitrosaminas apolares e polares, foram avaliados no modo direto os efeitos do pH 2,0 (HCL 1 M) e pH 9,0 (butil amina e NaOH), adição de eletrólito (NaCl 9 g/L) e espessura da fibra (7 e 100 μm) por meio de um planejamento de experimento (fatorial completo 2^4), utilizando uma das nitrosaminas apolares, a NDEA.

Os resultados obtidos estão na Tabela IV-4 a seguir, que mostra a matriz de planejamento, com as respostas em unidades de área (mV/s) obtidas para cada diferente situação das combinações possíveis.

Tabela IV-4: Matriz de Planejamento - Otimização da Extração por SPME – Fibra PDMS

Experimento	Temp: 25/50	pH 4 - 9	Eletrólito (+/-)	Fibra espess.	Área mV/s
1	1	1	1	1	1530
2	1	1	1	-1	440
3	1	1	-1	1	2222
4	1	1	-1	-1	664
5	1	-1	1	1	2306
6	1	-1	1	-1	1586
7	1	-1	-1	1	2650
8	1	-1	-1	-1	618
9	-1	1	1	1	5176
10	-1	1	1	-1	2047
11	-1	1	-1	1	6983
12	-1	1	-1	-1	1918
13	-1	-1	1	1	4234
14	-1	-1	1	-1	1504
15	-1	-1	-1	1	5802
16	-1	-1	-1	-1	1868

Calculou-se os efeitos usando o produto $X^t y$, onde X^t é a matriz transposta e y a média das replicatas (BRUNS; BARROS; SCARMINI, 2001).

Os resultados obtidos, podem ser melhor visualizados por intermédio do gráfico de superfície de resposta, onde vemos que o aumento de temperatura leva a uma diminuição da resposta em unidades de área, e que a espessura da fibra contribui para um aumento na área obtida. Viu-se também que a adição de eletrólito neste caso não contribui para a melhoria de resposta.

a)

b)

Figura IV-5: Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: a) efeito da espessura da fibra e da temperatura de extração; b) efeito da presença do eletrólito e pH.

Para otimização das condições utilizando a fibra Carbowax/DVB foi também realizado um planejamento de experimento, observando as respostas de nitrosaminas apolares e polares em função dos parâmetros: tempo de extração (10 e 20 minutos); pH (5 e 9); temperatura de extração (25 e 50°C) e tempo de desorção (2 e 5 minutos).

Os resultados obtidos estão na Tabela IV-5 a seguir, que mostra a matriz de planejamento, com as respostas em unidades de área (mV/s) obtidas para cada diferente situação das combinações possíveis.

Tabela IV-5: Matriz de Planejamento - Otimização da extração por SPME - Fibra
Carbowax / DVB

código	Tempo min.	pH	Temperatura Extração °C	Tempo de desorção	NDMA	NDEA	NDBA	NDELA
1	-1	-1	-1	-1	218969	232300	283710	140877
2	1	-1	-1	-1	169631	228546	197428	119671
3	-1	1	-1	-1	130544	298575	219952	152619
4	1	1	-1	-1	175204	285891	242632	134495
5	-1	-1	1	-1	46973	25231	184547	69877
6	1	-1	1	-1	46892	161427	113969	63520
7	-1	1	1	-1	83343	148415	141247	103441
8	1	1	1	-1	50642	0	141847	0
9	-1	-1	-1	1	175373	312487	255369	164236
10	1	-1	-1	1	132298	312840	216853	190045
11	-1	1	-1	1	134895	198959	271789	184899
12	1	1	-1	1	188786	270605	260364	194646
13	-1	-1	1	1	32492	0	192253	0
14	1	-1	1	1	68416	0	250239	0
15	-1	1	1	1	77304	0	205230	0
16	1	1	1	1	60082	77976	116561	0

N=2

A influência dos fatores estudados para cada uma das nitrosaminas avaliadas, pode ser visualizado na Figura IV-6.

Figura IV-6: Superfície de resposta mostrando a influência dos fatores: temperatura, pH e tempo na extração das nitrosaminas por SPME
a) NDMA, b) NDEA, c) NDBA, d) NDELA.

Pelos resultados obtidos, vê-se que a temperatura ambiente e maior tempo de dessorção otimizam a área. O tempo de adsorção apesar de muito importante, precisa ser o menor possível, pois deve-se levar em conta a volatilidade dos analitos. O pH apesar de ser importante na formação das nitrosaminas, não favorece a adsorção por SPME das nitrosaminas analisadas.

Utilizando-se a fibra Carbowax, foi avaliado também o limite de detecção por espectrometria de massas e pelo detector de quimiluminescência por ação de ozônio (TEA).

A detecção obtida por espectrometria de massas de baixa resolução empregando o modo SIM, foi de $50 \pm 4 \mu\text{gL}^{-1}$ para a NDMA, e $500 \pm 100 \mu\text{gL}^{-1}$ para a NDBA. A NDELA é detectável apenas em concentrações superiores a $500 \mu\text{gL}^{-1}$, mas com baixa repetibilidade (variação > 25%).

O mesmo procedimento foi repetido para avaliar o limite de detecção no equipamento GC/TEA obtendo-se como resultado um máximo de detecção de $20 \mu\text{gL}^{-1}$, o que é superado por meio da injeção direta de $5 \mu\text{L}$, quando se consegue detectar $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$.

Com os resultados obtidos concluiu-se que a concentração por SPME não é satisfatória para alcançar os níveis de concentração requeridos.

3. Separação e detecção

3.1 Otimização das condições cromatográficas (GC/TEA)

3.1.1 Temperatura e parâmetros do injetor x velocidade linear x Modo *Splitless*

Para otimização inicial das condições, foram testados os seguintes parâmetros:

Split: modo *splitless* e *pulsed splitless*; Injetor: temperaturas de 180 e 220° C;

Velocidade linear: 40 e 60 cm/s.

Os resultados obtidos estão na tabela IV-6 a seguir:

Tabela IV-6: Matriz de Planejamento - otimização das condições de operação cromatográfica.

Corrida	Modo de <i>split</i> <i>Splitless</i> =SL <i>Pulsed splitless</i> =PSL	Temperatura Injetor °C	Velocidade Linear cm/s	NDEA Área mV/s
1	SL	180	40	3950
2	PSL	180	40	4660
3	SL	220	40	6403
4	PSL	220	40	5675
5	SL	180	60	15402
6	PSL	180	60	130927
7	SL	220	60	90323
8	PSL	220	60	141038

A Figura IV-7 a seguir mostra o efeito dos parâmetros avaliados:

Figura IV-7: Temperatura e parâmetros do injetor x velocidade linear x modo *Splitless*

A partir destes resultados preliminares, verificou-se que o modo *pulsed splitless* auxilia no aumento da resposta em área, observando-se também que a temperatura do injetor pode ser elevada para 220° C. Como a resposta à temperatura do injetor pode

variar para diferentes nitrosaminas, optou-se posteriormente em manter a temperatura mais baixa (180° C), exceto no caso da NDELA.

As condições cromatográficas usadas foram: coluna 1 (Cpsil 50 m); temperatura coluna 170° C (1 min) 30° C/min até 290° C; temperatura da base do detector 290° C; temperatura pirólise 600° C; *cooler*: -10° C.

3.1.2 Avaliação do tempo de *splitless*

Foi estudada a influência do tempo de *splitless* na resposta em unidades de área para as nitrosaminas NDMA e NDPA, nos solventes piridina e acetona. Avaliou-se os tempos de *splitless* 0,5; 1; 2 e 3 minutos. Os resultados estão na Tabela IV-7 e Figura IV-8, a seguir.

Tabela IV-7: Influência do tempo de *splitless* e do solvente na resposta do detector (mV/s)

Solvente	Piridina				Acetona			
	0,5	1	2	3	0,5	1	2	3
Tempo <i>splitless</i> (min.)								
NDMA								
Área (mV/s)	135,7	149	118	130	417	449	552	385
NDPA								
Área (mV/s)	202,4	153	139	149	308	334	365	349

n= média de 2 observações.

Figura IV-8: Avaliação do tempo de *splitless*, usando piridina ou acetona como solvente.

Pelos resultados obtidos, optou-se pelo tempo de *splitless* de 2 minutos em acetona.

3.1.3 Influência do *purge flow* e seringa

Utilizando-se as condições cromatográficas de 1.6.1.1, foi verificada a influência da purga do septo na área obtida. A purga do septo é uma vazão escolhida de gás para limpar continuamente a parte inferior do septo, de maneira a impedir que gases vaporizados da amostra se adsorvam no septo. Tem por objetivo melhorar o perfil e a reprodutibilidade dos picos cromatográficos.

Foram testadas as vazões de purga de 30 e 100 mL/min com duas diferentes seringas, marca Hamilton, capacidade de 10 μ L.

A média de 10 injeções obtidas com a seringa denominada 1, foi de 94561 unidades de área (mV/s), com desvio padrão de 23910. A média de 10 injeções com a seringa 2 foi de 167311 unidades de área (mV/s), com desvio padrão de 11450. Observou-se então que a seringa estava influenciando os resultados, de forma muito significativa. Para diminuir esta variação, testava-se as seringas utilizadas e para a complementação do trabalho adquiriu-se a seringa Hamilton modelo 701N, 10 µL série 0442 com acurácia de 0,323 %.

A média de 10 injeções obtidas com purga de septo de 30 mL/min foi de 178391 com desvio padrão de 8093. Para a razão de 100 mL/min, a média obtida foi de 195242 unidades de área (mV/s), com desvio padrão de 5216. Optou-se então pela razão de purga de 100 mL/min.

3.1.4 Estudo dos Parâmetros: temperatura do elemento “peltier” ou “cooler”; fluxo de ozônio; fluxo de oxigênio e temperatura do forno de pirólise

Um planejamento fatorial completo de 2^4 foi realizado para avaliação da influência dos 4 fatores na resposta em área do cromatograma.

Os níveis avaliados para os fatores estudados estão descritos na Tabela IV-8 e os resultados obtidos na Tabela IV-9: Matriz de experimento com os valores de A,B,C e D.

Tabela IV-8: Fatores avaliados e níveis testados.

Efeito	Nível (+)	Nível (-)
A-cooller (°C)	10	4
B-ozônio (ml/min)	5	1
C-oxigênio (ml/min)	5	1
D-forno (°C)	800	600

Tabela IV-9: Matriz de experimento com valores de A, B, C e D.

Nº	Corrida	A:	B:	C:	D:	Resposta:
		Cooler (C°)	Ozônio (ml/min)	Oxigênio (ml/min)	Forno (C°)	Unidade de área (mV/min)
1	15	4	1	1	600	262684
2	1	4	1	1	600	234806
3	25	10	1	1	600	249771
4	19	10	1	1	600	252808
5	21	4	5	1	600	252512
6	5	4	5	1	600	248155
7	8	10	5	1	600	243208
8	17	10	5	1	600	249744
9	13	4	1	5	600	233168
10	22	4	1	5	600	238585
11	11	10	1	5	600	233167
12	27	10	1	5	600	228311
13	24	4	5	5	600	242399
14	10	4	5	5	600	238127
15	33	10	5	5	600	254442
16	20	10	5	5	600	230017
17	31	4	1	1	800	320000
18	35	4	1	1	800	319718
19	4	10	1	1	800	322379
20	16	10	1	1	800	312496
21	18	4	5	1	800	330174
22	2	4	5	1	800	325055
23	3	10	5	1	800	317576
24	14	10	5	1	800	310265
25	26	4	1	5	800	299104
26	34	4	1	5	800	299854
27	28	10	1	5	800	318241
28	23	10	1	5	800	321327
29	9	4	5	5	800	304779
30	6	4	5	5	800	309675
31	30	10	5	5	800	304620
32	29	10	5	5	800	306500
33	32	7	3	3	700	227720
34	7	7	3	3	700	243812
35	12	7	3	3	700	239440

O cálculo dos efeitos foi obtido multiplicando-se elemento a elemento as colunas da matriz de planejamento. Os coeficientes de contraste utilizados estão na Tabela IV-10 e os efeitos na Tabela IV-11.

Tabela IV-10: Coeficientes de contraste de um planejamento 2^4

M	A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	ABCD
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	-1	-1
1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1
1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	1
1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1
1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1
1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Onde: A: Cooler, B: Ozônio, C: Oxigênio, D: Forno

Transformando a Tabela IV-10 numa matriz X de elementos $+1$ e -1 , poderemos calcular todos os efeitos, fazendo o produto $X^t y$, onde y é a média das replicatas. O divisor para média é 16 e para os efeitos é 8. Os resultados estão na Tabela IV-11.

Tabela IV-11: Efeitos

Média	A	B	C	D	AB	AC	AD
278552	-245	1302	-11815	70616	-4068	4112	876
BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	ABCD
1048	-1861	119	351	-4243	4576	-3727	-3026

A equação geral do modelo estatístico de um planejamento fatorial 2^4 é:

$$Y(A,B,C,D) = b_0 + b_a A + b_b B + b_c C + b_d D + b_{ab} AB + b_{ac} AC + b_{ad} AD + b_{bc} BC + b_{bd} BD + b_{cd} CD + b_{abc} ABC + b_{abd} ABD + b_{acd} ACD + b_{bcd} BCD + b_{abcd} ABCD$$

ou multiplicando por $\frac{1}{2}$ já que os valores dos coeficientes do modelo são sempre a metade dos valores dos efeitos:

$$Y(A,B,C,D) = 278552 - 122,5 A + 651 B - 5907,5 C + 35308 D - 2034 AB + 2056 AC + 438 AD + 524 BC - 930,5 BD + 59,5 CD + 175 ABC - 2121,5 ABD + 2288 ACD - 1863 BCD - 1513 ABCD$$

Cálculo da estimativa do erro e intervalo de confiança

Como o experimento foi realizado em duplicata, foi calculada a estimativa conjunta da variância como segue:

$$\text{Variância conjunta} = S^2 = \sum (d_i)^2 / 2N$$

Onde:

d_i = diferença entre as duplicatas (até i-ésimo ensaio)

$N = 16$ (número de ensaios)

A variância do efeito será $1/8$ da variância agregada, pois:

$$V(\text{Efeito}) = V(R_+ - R_-) = V(R_+) + V(R_-)$$

Onde $V(\text{efeito})$ = variância do efeito

$V(R_+)$ = variância da média dos resultados no nível (+)

$V(R_-)$ = variância da média dos resultados no nível (-)

Para 16 experimentos, temos:

$$V(R_i) + V(R_e) = (Sp)^2 / 16 + (Sp)^2 / 16 = (Sp)^2 / 8$$

Onde $(Sp)^2$ é a variância agregada.

A raiz quadrada da variância do efeito, corresponde ao erro padrão do efeito e quando multiplicado por $t_{16}=2,12$ (95%), temos o valor limite para a significância do valor absoluto do efeito, com 95 % de confiança.

Tabela IV-12: Variância, erro padrão do efeito e valor limite para a significância.

Variância agregada	54089482
Variância efeito	6761185
Erro padrão do efeito	2600
Valor limite da significância	5512

Tabela IV-13: Efeitos calculados e intervalos de confiança.

Média	278552+/- 2756
Efeitos Principais	
A	-245/-5512
B	1301+/-5512
C	-11814+/-5512
D	70616+/-5512
Interações de 2 fatores	
AB	-4067+/-5512
AC	4111+/-5512
AD	875+/-5512
BC	1048+/-5512
BD	-1861+/-5512
CD	119+/-5512
Interações de 3 fatores	
ABC	350+/-5512
ABD	-4243+/-5512
ACD	4576+/-5512
BCD	-3727+/-5512
Interação de 4 fatores	
ABCD	-3025+/-5512

Pelo critério de intervalo de confiança, só são significativos os efeitos principais C e D (Oxigênio e Forno). Isto pode ser visto pelo gráfico dos efeitos, Figura IV-9, como segue.

Figura IV-9: Gráfico dos Efeitos

A equação do modelo pode ser então simplificada para:

$$Y(A,B,C,D) = 278552 - 5907,5 C + 35308 D$$

Onde o coeficiente negativo C, representado pelo oxigênio, indica que quanto maior o fluxo, menor será a resposta da área. Por outro lado o efeito D, representado pela temperatura do forno, é diretamente proporcional ao aumento da resposta em área.

Pelo gráfico de resíduo, Figura IV-10, vemos que a variação é aleatória dentro da distribuição normal e portanto, há independência estatística.

DESIGN-EXPERT Plot
Unidade Area

Figura IV-10: Gráfico dos resíduos

Determinação da ANOVA

A análise da variância, Tabela IV-14, para o modelo ajustado, mostra que, apesar de não haver falta de ajuste dentro do espaço experimental estudado, a curvatura é significativa, mostrando que é necessário expandir o planejamento.

Tabela IV-14: ANOVA do Modelo Fatorial Proposto.

Fonte de Variação	Análise de Variância					
	Soma Quadrática	GL	Media Quadrática	Valor de F	Prob > F	
Modelo	4,101E+10	2	2,05E+10	348,2477	< 0.0001	significante
C	1,117E+09	1	1,117E+09	18,96551	0.0001	
D	3,989E+10	1	3,989E+10	677,53	< 0.0001	
Curvatura	4,738E+09	1	4,738E+09	80,46631	< 0.0001	significante
Resíduo	1,825E+09	31	58880301			
Falta de Ajuste	821382517	13	63183271	1,132873	0.3947	Não significativa
Erro Puro	1,004E+09	18	55772600			
Total	4,757E+10	34				

Superfície de resposta

As superfícies de resposta são mostradas nos gráficos a seguir, Figuras IV-11, IV-12 e IV-13, onde verificamos que não há atuação expressiva de A e B (*Cooler* e Ozônio), mas são significativas as respostas para C e D (Oxigênio e Forno).

Figura IV-11: Gráfico da superfície de resposta para o oxigênio e temperatura do forno

Figura IV-12: Gráfico da superfície de resposta para o *cooler* e ozônio

Figura IV-13: Gráfico da superfície de resposta para *cooler*, oxigênio e forno.

Os resultados obtidos neste planejamento permitiram fixar os parâmetros oxigênio, *cooler*, forno e ozônio.

Por meio destes resultados, viu-se que contrariamente ao indicado no manual do equipamento, o oxigênio deve ser mantido em fluxos baixos para proporcionar uma maior resposta e que o fluxo ideal seria a vazão de 1 mL/min. Devido, porém, ao projeto do equipamento GC/TEA, cujos controladores mássicos não conseguem manter fluxos tão baixos, foram utilizados os fluxos de 3 e de 5 mL para a análise das amostras e padrões.

A temperatura do *cooler* não influenciou a resposta e foi mantida em temperaturas entre zero e 5° C evitando desgaste do equipamento.

A influência do ozônio não é significativa, devendo ser mantida em fluxo adequado (25 mL) para suportar a descarga elétrica para a produção do ozônio.

É importante ressaltar que os experimentos realizados no ponto central indicam que há uma curvatura significativa, ou seja, fora do espaço experimental deve ser estudado um modelo quadrático, requerendo uma expansão do espaço experimental. Na prática isto é avaliado por meio de um planejamento em estrela (pontos axiais).

Aumentando-se a temperatura do forno, aumenta-se significativamente a resposta. Em vista disto, para definição da temperatura adequada estudou-se, a seguir, a influência da temperatura do forno na seletividade de resposta.

3.1.5 Avaliação da seletividade em função da temperatura de pirólise

Para avaliação da melhor temperatura do forno, para garantir a melhor razão seletividade x sensibilidade, foi estudada a variação da resposta em função da temperatura de pirólise do forno, utilizando uma solução de 1000 ppb(s) contendo as nitrosaminas NDMA, NDEA e NDPA.

As temperaturas do forno testadas foram: 350, 600 e 800° C.

As Figuras IV-14, IV-15 e IV-16, a seguir, mostram os perfis obtidos:

Figura IV-14: Cromatograma de mistura padrão de nitrosaminas submetidas à pirólise, a 350° C

Figura IV-15: Cromatograma de mistura padrão de nitrosaminas submetida à pirólise, a 600° C

Figura IV-16: Cromatograma de de mistura padrão de nitrosaminas submetidas as pirólise, à 800° C

Pelos cromatogramas obtidos, vemos que o aumento de temperatura, apesar de proporcionar um aumento em área, mostra também uma interferência do solvente em uso. A temperatura de 350° C mostra um cromatograma mais “limpo”, sem ação de interferentes, que apesar de presentes, não são detectados nesta temperatura.

A razão para isto é a fraca energia de ligação do grupo NNO em relação ao nitrogênio orgânico. Isto faz com que somente nitrosaminas se clivem nessa temperatura e possam liberar o radical $\text{NO}^\bullet$ que reagindo com ozônio irá emitir a radiação detectada pela célula fotomultiplicadora (FINE; RUFEH, 1975).

3.1.6 Estudo da linearidade da resposta do detector de quimiluminescência (TEA)

A linearidade foi determinada por meio da análise da solução padrão de 1000 μL^{-1} em concentrações decrescentes, nas condições cromatográficas já otimizadas.

Linearidade é a capacidade de um equipamento ou método analítico gerar resultados proporcionais à concentração da espécie em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, na qual é possível relacionar o valor de uma variável dependente (medida) através do conhecimento da variável independente (concentração) (REES, 1995).

A linearidade foi determinada por meio de uma série de soluções de diferentes concentrações, abrangendo as faixas de interesse, do intervalo dinâmico.

Conceitua-se intervalo dinâmico como sendo a faixa linear utilizável e cujo cálculo pode ser feito pelo coeficiente de correlação r ou pelo coeficiente de determinação r^2 da curva dos padrões utilizados, utilizando-se o LQ (limite de quantificação) como o calibrador mais baixo, com a remoção sucessiva dos mais altos, até que se obtenha um coeficiente de determinação satisfatório de cerca de 0,98 (CHASIN, 1994).

3.1.7 Construção das curvas analíticas

Os valores obtidos para construção das curvas analíticas estão na Tabela IV-15 a seguir:

Tabela IV-15: Curvas Analíticas – respostas obtidas em unidades de área (mV/s) com a mistura padrão em diferentes concentrações de nitrosaminas voláteis.

Conc.ppb	NDMA	NDEA	NDPA	NPIP	NDBA	NMOR	NPYR
0,5	82,5	126,4	152,4	262,6	176,8	167,8	100,2
1	133,3	191,0	220,8	446,6	192,0	221,4	156,7
5	556,8	795,4	774,0	1975,4	667,6	846,4	514,2
10	1307,6	1451,8	1367,0	3959,6	1198,6	1619,8	1031,0
25	3858,8	3869,2	3629,6	10146,3	3006,2	4053,6	2516,8
50	18911,4	11399,6	6671,8	98619,0	8718,2	29246,2	5011,8
100	55719,2	56869,2	53275,6	125291,0	47721,8	58834,6	39106,2
250	155446,0	151222,0	130569,3	163479,5	96678,0	99765,7	84060,7
500	185039,0	171871,7	150809,0	181460,7	111700,0	115584,7	97649,0
600	194156,5	179893,5	159147,5	189136,5	120597,5	123240,0	105087,5
1000	224088,3	209119,3	186813,0	214141,7	139236,3	142364,3	122347,3

N = 4

As curvas de calibração obtidas estão dispostas nos gráficos a seguir:

Figura IV-17: Curvas analíticas da faixa de 0,5 – 10 μgL^{-1} de nitrosaminas voláteis

Figura IV-17: Curvas analíticas da faixa de 0,5 – 10 μgL^{-1} de nitrosaminas voláteis.

Figura IV-18: Curvas analíticas da faixa de 25 a 250 $\mu\text{g/L}$ de nitrosaminas voláteis

Figura IV-18: Curvas analíticas na faixa de 25 a 250 $\mu\text{g/L}^{-1}$ de nitrosaminas voláteis

Figura IV-18: Curvas analíticas na faixa de 25 a 250 μgL^{-1} de nitrosaminas voláteis

Figura IV-19: Curvas analíticas da faixa de 250 a 1000 μgL^{-1} de nitrosaminas voláteis

Figura IV-19: Curvas analíticas da faixa de 250 a 1000 μgL^{-1} de nitrosaminas voláteis

Pelos resultados obtidos, verificou-se que a resposta do equipamento é linear para as faixas de 0,5 a 10 e de 25 a 250 μgL^{-1} , excetuando NPIP, NDBA e NMOR, e logarítmica na faixa de 250 a 1000 μgL^{-1} , devido ao uso da concentração de 100 μgL^{-1} que, excluída, torna a resposta linear.

3.1.8 Avaliação do limite de detecção do equipamento

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos por meio das equações:

$$\text{LD} = b + (3 \cdot \text{dDPy/x})$$

$$\text{LQ} = b + (10 \cdot \text{dDPy/x})$$

Onde: b= interseção da curva da regressão linear ($y=ax+b$), entendido como sinal analítico do branco ou solvente.

DPy/x = desvio padrão dos valores de y em x (desvio padrão de b com solvente (branco)) obtido para os valores da prova.

A Tabela IV-16 e as Figuras IV-20 e IV-21 mostram os resultados obtidos.

Tabela IV-16: Limites de detecção e quantificação de nitrosaminas por GC/TEA

Nitrosamina	Média Área mV/s	DP mV/s	EQUAÇÃO $Y = ax + b$	LD (ppb)	LQ (ppb)
NDMA	82,5	14,34	$128,1x - 8,34$	0,3	1,1
NDEA	126,4	42,03	$140,41x + 61,95$	0,9	3,0
NDPA	152,4	41,23	$128,31x + 99,27$	1,0	3,2
NPIP	262,6	10,08	$389,15x + 55,81$	0,1	0,1
NDBA	176,8	7,80	$108,89x + 112,92$	0,2	0,7
NMOR	167,8	28,86	$153,93x + 78,89$	0,6	1,3
NPYR	100,2	12,82	$97,173x + 49,67$	0,4	0,7

LD = Limite Detecção

LQ = Limite Quantificação

DP = Desvio Padrão

N = 4

Figura IV-20: Cromatograma das nitrosaminas – Mistura Padrão - concentração 0,5 μgL^{-1}

Figura IV-21: Cromatograma das nitrosaminas – Mistura Padrão – concentração 1 μgL^{-1}

3.1.9 Avaliação da precisão e recuperação do procedimento

A precisão e recuperação do método foram obtidas por intermédio de amostras de água destilada e bruta fortificadas com quantidades conhecidas de nitrosaminas de acordo com o procedimento descrito no capítulo III, item 1.6.1.9.

Os resultados obtidos foram:

NDMA= Média ($10,8 \pm 1,59 \text{ ngL}^{-1}$) com reprodutibilidade (variação entre diferentes períodos) de $6,40 \text{ ngL}^{-1}$ e recuperação de $43 \% \pm 7 \%$.

NDBA = Média ($7,4 \pm 0,73 \text{ ngL}^{-1}$) com reprodutibilidade de $2,99 \text{ ngL}^{-1}$ e recuperação de $30 \pm 3 \%$.

Os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa esperada de recuperação para a técnica de extração empregada (10 - 50 %, segundo EPA 607).

3.1.10 Monitoramento do desempenho do sistema cromatográfico – cartas de controle

Para monitoramento do desempenho do sistema cromatográfico GC/TEA foram empregadas soluções de 5 e 25 μgL^{-1} e 50 mgL^{-1} que eram lançados em gráficos de carta de controle.

O acompanhamento foi feito com o auxílio de planilha *Excel* ou *software Statistics for Windows*, com objetivo de acompanhar o desempenho do sistema cromatográfico durante o período de uso.

Como ilustração, a Figura IV-22 mostra os resultados do período de 21/06/2002 a 03/07/2002, onde o registro de 9 pontos consecutivos abaixo da linha média permitiram verificar a ocorrência de um problema eletrônico com o equipamento.

Figura IV-22 : Carta de controle do período de 21/06 a 03/07/03

3.2 Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

A técnica de espectrometria de massas por impacto de elétrons foi utilizada para auxiliar a identificação de nitrosaminas nas amostras.

Na análise por CG/MS, a fragmentação das nitrosaminas alifáticas origina predominantemente ions em $m/z=30(\text{NO})$ e $42 (\text{CH}_2\text{NCH}_2)$, juntamente com fragmentos resultantes da clivagem alfa das cadeias alquila com subsequente perda de NOH e de OH do íon molecular (M-OH). Para a N-nitrosodimetilamina, a perda de OH é insignificante (GOUGH,1978).

As nitrosaminas cíclicas apresentam ions com M-17 e M-30 devido a perda de OH e NO (GOUGH,1978).

Os padrões das nitrosaminas voláteis, foram injetados para confirmação de sua identidade obtendo-se os fragmentogramas mostrados na Figura IV-23.

Figura IV-23: Espectros de massas das nitrosaminas avaliadas:

a) NDMA, b) NDEA, c) NDPA, d) NPIP, e) NDBA, f) NMOR, g) NPYR, h) NDELA

Figura IV-23: Espectros de massas das nitrosaminas avaliadas:
a) NDMA, b) NDEA, c) NDPA, d) NPIP, e) NDBA, f) NMOR, g) NPYR, h) NDELA

Figura IV–23: Espectros de massas das nitrosaminas avaliadas:
a) NDMA, b) NDEA, c) NDPA, d) NPIP, e) NDBA, f) NMOR, g) NPYR, h) NDELA

A análise por CG/MS da N-nitrosodietanolamina devido sua natureza polar exigiu a introdução de uma etapa de derivação no método de preparação de amostra, já que mesmo em altas concentrações (50 mgL^{-1}) apresentava grande adsorção no sistema com pouca repetibilidade.

Para minimizar este problema aproveitou-se então a presença da hidroxila na molécula, e derivou-se a amostra com o reagente bis-silil-trimetil trifluoracetamida. (BSTFA).

A escolha do BSTFA é devido a sua reação mais rápida quando comparado aos demais reagentes sililantes, como: o MSTFA (N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) o BSA (Bis-sililamida) entre outros (KNAPP, 1979).

A eficiência da reação se deve ao forte caráter aceptor de elétrons do grupo (-CF₃-) do BSTFA que estabiliza a carga negativa (no estado de transição) do grupo de partida, facilitando desta forma a substituição nucleofílica. Além disto, os produtos formados são estáveis e não provocam ruído na linha de base (KNAPP, 1979).

Observou-se que mesmo com a amostra derivada, a adsorção no sistema ainda persistia. Para minimizar esta adsorção passivava-se o sistema injetando-se 0,5 µL da solução de nitrosodietanolamina na concentração de 7000 mgL⁻¹ em injeções consecutivas até área constante e a seguir injeções de acetona para eliminar o excesso. As injeções consecutivas de padrão (concentração de 7 mgL⁻¹) mostraram não estar havendo retenção, indicando estarem os sítios já passivados e aptos a receberem quantidades menores do padrão. Este procedimento permitiu melhorar a detecção do espectrômetro de massas para a NDELA, encontrando-se um limite de detecção de 8 ± 2 µgL⁻¹ com injeção direta.

A adsorção de nitrosaminas nos sistemas analíticos foi também constatada por Braga, 2003, que tem por procedimento injetar várias vezes amostras saturadas com nitrosaminas para manter o sistema passivado durante a determinação de nitrosaminas em tabaco.

KING, 2003, relatou que o material cerâmico utilizado no forno de pirólise do GC/TEA está sujeito a ter seus sítios ativados e portanto aumentar a adsorção de nitrosaminas quando utilizado em temperaturas maiores que 500° C, tornando difícil a desativação mesmo retornando o sistema para temperaturas mais baixas.

Empregando análise por CG/MS, os extratos concentrados recebidos da CETESB foram inicialmente analisados empregando o modo de detecção *SIM* (*Single Ion Monitoring*), selecionando os fragmentos característicos das nitrosaminas voláteis indicados no item 1.6.2.1. Nestes extratos, no modo SIM não foram obtidas respostas para as nitrosaminas.

Usando o modo de detecção por *SCAN* e de acordo com o banco de dados do *software* do *National Institute of Standards and Technology* – *NIST*, 1988, foram

encontradas indicações da presença de N-nitrosoetilurea na amostra do extrato de água bruta originária de rio e N-nitrosododecilamina na fração ácida do extrato de água tratada, proveniente de reservatório de tratamento de água.

Estas indicações, obtidas com a biblioteca NIST do equipamento, não puderam ser confirmadas, pois os compostos assim identificados, não estavam entre os padrões disponíveis. Estes extratos foram posteriormente analisados por GC/TEA, obtendo-se os resultados apresentados na Tabela IV-17.

3.3 Aplicação do método proposto para a análise de nitrosaminas em água

Após o estudo dos parâmetros analíticos e das melhores condições cromatográficas, o método proposto para a análise traço (ngL^{-1}) de nitrosaminas esquematizado na Figura III-11 foi aplicado nas amostras coletadas e nos extratos recebidos da CETESB, obtidos conforme relatado por Coelho, 1995.

No cromatograma obtido na Figura IV-21, é possível observar que há possibilidade de diminuir o tempo de análise cromatográfica que, no entanto, foi mantido de forma a prevenir coeluição de compostos nitrosos eventualmente presentes na amostra e que não faziam parte da mistura padrão.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas IV-17 e IV-18.

Tabela IV-17 Resultados obtidos por GC/TEA, dos extratos recebidos.

Amostra		Concentração de nitrosamina **							
		ngL ⁻¹							
Código	Tipo/ Origem	NDMA TR: 3,50	NDEA TR: 4,86	NDPA TR: 6,45	NPIP TR: 10,79	NDBA TR: 11,20	NMOR TR: 12,01	NPYR TR: 16,91	Figura n°:
1 NB	Tratada/ Reservatório	-	-	-	-	-	-	-	-
1 H ⁺	Tratada/ Reservatório	2,2 ± 0,28	<LQ	<LQ	-	-	<LQ	2,2 ± 0,30	IV-24
2 H ⁺	Tratada/ Reservatório	5,1 ± 0,60	<LQ	<LQ	0,2 ± 0,08	2,7 ± 0,28	<LQ	<LQ	IV-25
3 NB	Tratada/ Reservatório	-	-	-	-	-	2,2 ± 0,40	-	IV-26
3 H ⁺	Tratada/ Reservatório	-	-	-	-	-	-	3,5 ± 1,63	IV-27
4	Bruta/ Rio (Jan)	-	-	-	-	-	-	-	IV-28
5	Bruta/ Rio (Jun)	-	-	-	-	-	-	-	IV-29

* (TR) tempo de retenção, min.

** (n) média de 3 injeções

(-) menor que limite de detecção

Figura IV-24: Cromatograma do extrato 1 H^+ proveniente de água tratada de ETA

Figura IV-25: Cromatograma do extrato 2 H^+ proveniente de água tratada de ETA

Figura IV-26: Cromatograma do extrato 3NB proveniente de água tratada de ETA

Figura IV-27 : Cromatograma do extrato 3 H⁺ proveniente de água tratada de ETA

Figura IV-28: Cromatograma do extrato 4 da água bruta coletada em rio (Jan)

Figura IV-29: Cromatograma do extrato 5 da água bruta coletada em rio (Jun)

Tabela IV-18 : Resultados de nitrosaminas obtidos por GC/TEA nas amostras de água coletadas.

Amostra		Concentração de nitrosamina **							
Tipo de água	Origem	NDMA	NDEA	NDPA	NPIP	NDBA	NMOR	NPYR	Figura n°:
		TR: 3.50	TR: 4.86	TR: 6.45	TR: 10.79	TR: 11.20	TR: 12.01	TR: 16.91	
Bruta/	Reservatório	-	-	-	<LQ	-	<LQ	-	IV - 2
ácida	Guarapiranga								
Bruta	Reservatório	-	-	<LQ	<LQ	-	-	<LQ	IV - 2
Tratada	Reservatório	Coeluição 2,2 *± 0,20	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	-	<LQ	IV - 1
Tratada/	Reservatório	3,04± 0,30	-	<LQ	1,1± 0,20	3,4± 0,30	<LQ	6,8± 0,40	IV - 1
ácida	Guarapiranga								
Água Rio	Rio Paraíba	-	-	-	<LQ	-	2,6± 0,30	1,2± 0,20	IV - 30
Água Poço	Água de poço	-	-	-	<LQ	-	-	<LQ	IV - 31

(*) Temperatura inicial da coluna = 50°

(**) média de 3 injeções

(-) menor que LD

Figura IV-30: Cromatograma de amostra da água bruta coletada no rio Paraíba

Figura IV-31: Cromatograma de amostra da água bruta, coletada em poço

Avaliando os resultados apresentados na Tabela IV-17, nota-se que as amostras provenientes de frações ácidas $1H^+$, $2H^+$ e $3H^+$ apresentaram picos correspondentes a compostos nitrosos não identificados e também a presença de NDPA e NDEA, além da NDMA, que a partir de 1999 tem sido preconizada como sub-produto do tratamento da água. Estes resultados podem contribuir para as respostas positivas destas amostras, apresentados na Tabela III-1, ao teste de mutagenicidade.

não foram detectados compostos nitrosos por GC/TEA.

Não foram detectados compostos nitrosos por GC/TEA nas amostras 4 e 5, Tabela IV-17, que apresentaram um maior número de revertentes no teste de mutagenicidade, Tabela III-1.

Cabe ressaltar que estes resultados são apenas exploratórios já que foram obtidos de um número limitado de amostras, com objetivo de testar o procedimento nas matrizes.

Os resultados obtidos com a água coletada na ETA Guarapiranga apresentados na Tabela IV-18 reforçam os resultados obtidos com os extratos cedidos pela CETESB, pois evidenciam a presença de compostos nitrosos em amostras de águas tratadas, indicando também a presença de outras nitrosaminas além da NDMA.

Nas amostras de água bruta coletadas no reservatório Guarapiranga não foram detectadas nitrosaminas.

Na água de poço da região de Tremembé foram detectadas NPIP e NPYR abaixo do limite de quantificação e na água do rio Paraíba foram detectadas NPIP, NMOR e NPYR.

Na Tabela IV-19 estão apresentadas as concentrações mínimas e máximas de NDMA monitoradas em águas dos EUA e Canadá. A faixa de concentração encontrada neste estudo para NDMA é comparável ao reportado nestes trabalhos.

Tabela IV-19: Concentrações de NDMA reportadas em águas avaliadas em estudos anteriores.

País/região	Tipo de amostra	Faixa de concentração ngL⁻¹	Referência bibliográfica
EUA, Califórnia	Tratada	ND a 10	Najm, 2002
Canadá, Ontário	Tratada	ND a 5	Najm, 2000; Tonkins, 1995
EUA, Baltimore	Efluente	35 - 940	Hartmetz, 1980
China, Heber	Subterrânea	6,9 - 45 *	Cheng Guanf-Fu, 1995
Brasil, São Paulo	Tratada	ND a 5,0	Este estudo

(*) µgL⁻¹

(ND) não detectado

CAPÍTULO V: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A fase crítica para a precisão do método (repetibilidade; reprodutibilidade) é a fase de pré-concentração, comum a todas as técnicas de detecção citadas, e necessárias para alcançar a meta estabelecida de $0,7 \text{ ngL}^{-1}$.

A pré-concentração pode ser feita empregando a extração líquido-líquido (ELL) manual, ou a ELL em circuito fechado que, apesar de consumir um tempo elevado de análise (mínimo 10 h), apresenta a vantagem de otimizar o tempo de manuseio requerido do pesquisador ou analista, que se restringirá à montagem do sistema e seu monitoramento periódico.

Na etapa de concentração da amostra, a evaporação por nitrogênio ou empregando o sistema Kuderna Danish, são igualmente satisfatórias, preferindo-se o nitrogênio por consumir menor tempo de análise ($2 \times 4\text{h}$).

A utilização da técnica de SPME como pré-concentração ou concentração da amostra, foi descartada, uma vez que não permitiu atingir os níveis de detecção requeridos.

Com esta metodologia o alvo desejado de $0,7 \text{ ngL}^{-1}$ de detecção foi alcançado utilizando apenas o GC/TEA através de um minucioso estudo dos parâmetros envolvidos na detecção e separação cromatográfica, que permitiram melhorar em 10 vezes a sensibilidade do equipamento, sem a necessidade do dessorvedor térmico.

Para o alcance do objetivo, a utilização do planejamento de experimentos foi uma ferramenta fundamental. Por intermédio dela, os parâmetros críticos das principais etapas envolvidas no processo analítico, puderam ser estudados e otimizados.

Foram identificados como parâmetros críticos: a temperatura do forno de pirólise, que foi fixada em 350°C para garantir a seletividade e o fluxo de oxigênio, que deve ser utilizado no menor fluxo permitido pelos controladores mássicos do equipamento para garantir a sensibilidade ($1 \text{ a } 5 \text{ mL/min}$).

Em adição, comparativamente a outros detectores, o procedimento proposto elimina as várias etapas necessárias para descontaminação de material, requisitadas no uso do NPD (EPA 607), e apresenta sensibilidade compatível com as técnicas de espectrometria de massas empregadas, como a *High Resolution Mass Spectroscopy* (HRMS) e *Positive Chemical Ionization Mass Spectroscopy* (PCI MS), com a vantagem de uma operação mais simples e de menor custo.

A metodologia proposta para a análise de traços de nitrosaminas em águas empregando GC/TEA mostrou boa seletividade, linearidade e precisão adequada com coeficientes de variação, na análise cromatográfica, na faixa entre 6 a 12% para as nitrosaminas analisadas. Considerando o propósito das análises, os limites de detecção alcançados foram adequados, como por exemplo, $0,2 \text{ ngL}^{-1}$ para a N-nitrosopiperidina e $2,0 \text{ ngL}^{-1}$ para a N-nitrosopropilamina levando em conta a recuperação obtida na etapa de pré-concentração.

O método foi aplicado a amostras de água tratada, água bruta de reservatório e de rio, água de poço artesiano e extratos orgânicos provenientes de amostras de águas tratadas e brutas, detectando algumas nitrosaminas voláteis de interesse toxicológico, como por exemplo, a N-nitrosodimetilamina (NDMA), que foi encontrada, dependendo da amostra, em concentrações abaixo do limite de detecção até $5,0 \text{ ngL}^{-1}$.

Os resultados obtidos na análise de nitrosaminas nas amostras de águas são exploratórios e insuficientes para uma avaliação ambiental, mas mostra que se trata de um método alternativo promissor e viável para ser implantado em análise de rotina.

Como recomendação para trabalhos futuros, o tempo e a eficiência de extração poderão ser otimizados através do uso de extratores e injetores automáticos. Ainda como possibilidade de aumentar mais a sensibilidade do método (pgL^{-1} ou ppq), sugere-se a utilização do injetor para grandes volumes, que permite a injeção de até $200 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra, o que aumentaria em 20 vezes o volume injetado, e ainda acoplar ao equipamento GC/TEA o dessorvedor térmico com vias de poder detectar assim pgL^{-1} ou ppq.

- ALLSOBROOK, A.G.; Du PLESSIS, L.S.; HARRINGTON, J.S.; NUNN, A; NUNN, J.R. N-nitroso compounds in the environment. **IARC Sci. Publ.**, n.9, p.197-199, 1974.
- AMARAL, R. **Critérios para interpretação de análises físico químicas de águas**. São Paulo: CETESB. 1984.
- ARAKI, A.; MURAMATSU, M., MATSUSHIMA, T. Comparison of mutagenicities of N-nitrosamines on *Salmonella typhimurium*. TA100 and *Escherichia coli* WP₂uvr/PKM101 using rat and hamster liver S₉, **Gann.**, **75**, p.8-16, 1984.
- ARAUJO, M.E; CYRNE, L.; MARINHO, S.H.; NOBERTO, F. **Os compostos N-nitrosos e o cancro**. Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletin/79/b179.htm>. Acesso em: fev. 2001.
- ATHAYDE, P. **Regras para referência bibliográfica e trabalhos acadêmicos**: adaptadas da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Belo Horizonte: Keimelion, 2000.
- AYANABA, A.; ALEXANDER, M. Transformations of methylamines and formation of a hazardous product, dimethylnitrosamine in samples of treated sewage and lake water. **J. Environ. Qual.**, v.3, p.83, 1974.
- BAKER, M.N. **The quest for pure water**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, AWWA, 1981. v.1.
- BARTSCH, H.; O'NEILL, I.K.; SCHULTE, H. The relevance of N-nitroso compounds to human cancer: exposures and mechanisms. **IARC Sci. Publ.**, n.84, 1987.
- BARWICK, V.; ELLISON, S.; LUCKING, C.; BURN, M. Experimental studies of uncertainties associated with chromatographic techniques. **J. Chromatogr.**, v.4, p.207-276, 918, 2001.
- BATALHA, B. **Agro, saúde e desinfecção**. São Paulo: CETES, 1994.

- BILLEDEAU, S.; HEINZE, M.; WILKES, T.; Application of the particle beam interface of high performance liquid chromatography – thermal energy analysis and electron impact mass spectrometry for detection of non-volatile N-nitrosamines. **J. Chromatogr. A**, v.688, p.55-65, 1994.
- BOGOVSKI, P.; WALKER, E.A. N-nitroso compounds in the environment. **IARC Sci. Publ.**, n.9, 1974.
- BOUCHIKHI, B.; MAVELLE, T.; DEBY, G. Precautions to be taken in the analysis of total N-nitroso compounds. **Food Addit. Contam.**, v.6, p.209-217, 1989.
- BRAGA, W.F. Centro de Pesquisas Souza Cruz. Rio de Janeiro, 2003 [Comunicação Pessoal].
- BRENNAN, S.; FRANK, C.W. Rapid determination of nitrosodiethanolamine in cosmetics. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.34, n.1, p.41-46, 1983.
- BRUNS, R.; BARROS, B.; SCARMINIO, I. **Como fazer experimentos**. Campinas: UNICAMP, 2001.
- BRUSSELS BELGIUM EUROPEAN. **Critical evaluations of methods for the determination of nitrosamines**. Brussels, 1991. p.37. (Technical Report, n.42).
- BURGESS, E.M.; JAVANISH, J.M., Photochemical decomposition of N-nitrosamines. **Tetrahedron Lett.**, p.1221, 1984.
- CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT. **Priority substances list. assessment report N-nitroso dimethylamine**. Ontario: Cepa, 1999.
- CARARO, A. Poços clandestinos jorram em São Paulo. **Jornal da Tarde**, São Paulo, 18 out. 2002.
- CASTEGNARO, M.; WALKER, E.A. New data from collaborative studies on analysis of nitrosamines. In: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Environmental aspects of N-nitroso compounds**. Lyon: IARC, 1978.

- CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Priori Canadian Environmental Protection Act-Priority Substances List Draft for Public Comments. **N-Nitrosodimethylamine**. Ontario: CEPA, 1999.
- CHASIN, A.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.; Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, v30, n.2, p.49-53, 1994.
- CHENG GUANF FU e HONG DA XU - 1995.
- CHILD, P.; KAA, G.; BENITZ, D.; FOWLIE P.; HONG-YOU, R. **Reaction between chlorine and a dimethylamine containing polyeletrolite leading to the formation of N-nitrosodimethylamine**. Disponível em: <http://www.pollutech.com.papers> . Acesso em: nov. 1999.
- CHOI, J.; VALENTINE, R. A kinetic model of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation during water chlorination, chloramination. **Water Sci. Technol.**, v.46, n.3, p.65-71, 2002.
- CLEMENT, R.; YANG, P. Environmental Analysis. **Anal. Chem.** 73,p.2761-2790,2001.
- COELHO, M.C.L.S. **Mutagenicidade de quatro efluentes líquidos industriais lançados no Rio Paraíba do Sul, avaliada através do teste de Ames**. São Paulo, 1995. 81p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.
- CROSS, C.; **Thin Layer Chromatography, Quantitative Environmental and Clinical Application**. Editado por J. C. Touchstone and D. Rogers (John Wiley & Sons), p.300-308,1980.
- DEAN, J.R. **Extraction methods for environmental analysis**. New York: Wiley, 1998. p.23.
- DE QUEIROZ, M. **Dosage des nitrosamines dans L'eau**. Toulouse: Institut National Polytechnique de Toulouse , 1991.

- DIALLO, S.; ZHOU, J.; Chantal, D.; PROJNON, P.; HAMON, N. Determination of N-nitrosodiethanolamine as nitrite in liquid chromatography with fluorescence detection after alkaline denitrosation. **J. Chromatogr., A**, v.721, p.75-81,1996.
- DOUGLAS, M.L.; KABACOFF, B.L.; ANDERSON, G.A.; CHENG, M.C. The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.29, p.581-605, 1978.
- EATON, A.; BRIGGS, M. NDMA analysis of a new DBP. In: PROCEEDINGS OF THE AWWA WARWE QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, Salt lake City, 2000.
- EATON, A. Analytical methods options for a new disinfection by-product. Disponível em: <http://www.dhs.cahwnet.gov/ps/ddwem/chemicals/NDMA/NDMAlabs.htm>. Acesso em: 4 nov. 2000.
- ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES. N-nitroso N-ethyl-urea. 10th. Report on Carcinogens. Disponível em: <http://ehp.nichs.nih.gov/roc/tenth/profiles/s130enu.pdf>. Acesso em: jan. 2003.
- EISENBRAND, G.; ARCHER, M.; BRUNNEMANN, K.D.; FINE, D.H.; HECHT, S.S.; HOFFMANN, D.; KRULL, J.; WEBB, K.S. Problems of contamination and artefact formation in nitrosamine sampling and analysis. **Environ. Carcinog.: Sel. Methods Anal.**, v.6, n.45, p.25-34, 1983.
- EINSENBRAND, G.; BLANKART, M.; SOMMER, H.; WEBER, B. N nitrosoalkanolamines in cosmetics. **IARC Sci. Publ.**, n.105, p 238-241, 1991.
- ENVIRONMENTAL PROTECTON AGENCY. **Method EPA 607**, 1980. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscienc/methods/guid/607.pdf>. Acesso em: 1998,1999,2001,2002 e 2003.

- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. National recommended water quality criteria 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/waterscience/pc/revcom.pdf> . Acesso em: jan. 2003.
- FALTA de Água no Sudeste, **Jornal O Estado de São Paulo**, 29 out. 2002.
- FELLION, Y.; De SMIDT, B. An HPLC UV method for the direct evaluation for N-nitrosodiethanolamine in some cosmetic products and raw material. **IARC Sci. Publ.**, n.31, 1980. [N-Nitroso Compd: Anal., Form. Occurrence].
- FINE, D.H.; ROUNBEHLER, D.; HUFFMAN, F.; GARRISON, A.; WOLFE, N. LEPSTEIN, S.. **Bull. Environ.Contam. Toxicol.**, v.14, p.404-408, 1975.
- FINE, D.; ROUNBEHLER, D.; ROUNBEHLER, A.; SILVERGLEID, A.; SAWICKI, K.; KROST, K.; MARRAIS, G. N-nitroso compounds in the environment. **Environ. Sci. Technol.**, v.11, p.581-584,1977.
- FINE, D. N-nitroso compounds in the environment. **Environ. Sci. Technol.**, v.10, p.40-122, 1980.
- FINE, D.; ROUNBEHLER, P. N-nitroso compounds in water. In: INTERNATIONAL CONFERENCE AN INDOOR AIR QUALITY AND CLIMATE, 4, Berlim (west), 1987. **Proceedings**. p.17-21.
- FINE, M. D. H., RUFEB, F. Description of the thermal energy analyser for N-nitroso compounds. In: WORKING CONFERENCE. **Proceedings**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1975. p.40-44.
- FRANCE, LIONS. **IARC monographs on evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans of some N–nitroso compounds**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1978. v.17.
- GARDINER, W. **Statistical analysis methods for chemists**. London: Royal Society of Chemistry, 1997.

- GOUGH, T.A. Determination of N-nitroso compounds by mass spectrometry. **Analyst**, v.103, p.785-806, 1978.
- GOUGH, T.A.; McPHAIL, M.A.; WOOD, B.J. A comparison of various mass spectrometric and chemiluminescent detectors for estimation of volatile nitrosamines. **J. Agric. Food Chem.**, v.25, n.3, p.663-667, 1997.
- GRAHAN, J.E.; ANDREWS, S.; FARGUHR, G.J.; MERESZ, O. Factors affecting NDMA formation during water treatment. In: AWWA WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, New Orleans, 1995. **Proceedings**. S.l.: American Water Work Association, 1995.
- HABICH, A.; GROB, K.. **J. High Res. Chromatogr. Chromatogram Comm.**, v.17, p.492-494, 1984.
- HARTMETZ, G., SLEMNOVA, J. Detection of volatile nitrosamines in waste water from chemical plants by combined capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.25, p.106-112, 1980.
- HEYNS, K.; KOCH, H. **Tetrahedron Lett.** 1970, 10, 741 *apud* GOUGH, T. Determination of N-nitrosocompounds by mass spectrometry. **Analyst**, v.103, p.785-806, 1978.
- HOTCHKISS, J.H. Analytical methodology for sample preparation detection, quantitation and confirmation of nitrosamines. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.64, n.84, p.1037-1054, 1981.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Lyon: IARC, WHO, 1971. p.107-124.
- INTERNATIONAL REGISTER OF POTENTIALLY TOXIC CHEMICAL. **Nitrosamines**: scientific reviews of soviet literature on toxicity and hazards of chemicals. S.l.: United Nations Environment Programme, USSR. Academy of Medical Sciences, 1984. 111p.

- ISSAQ, H.J.; GLENON, M.; WEISS, D.E.; CHMURNY, G.. **J. Liq. Chromatogr.**, v.9, p.2763-2779, 1986.
- JENKINS, T.F.; MIYARES, P.H. **Anal. Chem.**, v.63, p.1341-1343, 1991.
- JENKINS, S.W.O.; ROESTER, C.J.; TAGUSHI, V.; WANG, D.T.; PALMETIER, HONG, K.P. N-nitrosodimethylamine in drinking water using a rapid, solid phase extraction method. **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v.2, n.4, p.207-210, 1995.
- JOB, D.B.; HUNSINGER, R.B.; MEREZ, O.; TAGUSHI, V. Study of the occurrence and inhibition of formation of n-Nitrosodimethylamine (NDMA) in the Ohsweken water supply. In: AWWA WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, 1992. **Proceedings**. S.l.: American Water Works Association, 1992.
- JOB, D.B.; HUNSINGER, R.B.; TAGUSHI, V.; MEREZ, O. **Removal of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from the Ohsweken (six nations) water supply: final report**. Ontario: Ministry of Environment and Energy, 1994.
- KATAOKA, H.; HAYATSU, T.; HIETSCH, G.; STEINKELLNER, H.; NISHIOKA, S.; NARIMATSU, S.; KNASMULLER, S.; HAYATSU, H. Identification of mutagenic heterocyclic amines in the water of the Danube river. **Mutat. Res.**, v.466, p.27-35, 2000.
- KIMOTO, W.; DOOLEY, J.; FIDLER, W. Role of strong ion exchange resins in nitrosamine formation in water. **Water Res.**, v.14, p.869-876, 1980.
- KING, M. **Adsorção de nitrosaminas no forno de pirólise em altas temperaturas**. Antek, 2003. [Comunicação Pessoal].
- KNAPP, D. **Handbook of analytical derivatizations reactions**. New York: Wiley, 1979.
- KUMMROW, F. **Blue rayon como alternativa para extração de compostos orgânicos genotóxicos presentes em amostras de águas**. São Paulo, 2001. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- LAGGETT, D.C.; JENKINS, T.F.; MIYARES, P. **Anal. Chem.**, v.62, p.1355-1356, 1990.
- LABORATÓRIO DE ANÁLISES MINERAIS. Laudo de análise de caracterização de água de poço. S.l.: s.n., 2001.
- LEENHEER, J.A. Concentration, partitioning and isolation techniques. In: MINEAR, R.A.; KEITH, L.H., eds. **Water analysis**. Orlando: Academic Press, 1984. v.3.
- LEEUWEN, F. Safe drinking water: the toxicologist's approach. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, S51-S58, 2000.
- LEVALLOIS, P.; AYOTE, P.; MCORNEN, W.; DESNOSIRN, J.M.S; GRINGS, T.; Excretion of volatile nitrosamine in a rural population in relation to food and drinking water consumption. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, p.1013-1019, 2000.
- LIJINSKY, W. Chemical structural effects in carcinogenesis by nitrosamines. **IARC Sci. Publ.**, v.41, p.533-542, 1982.
- LOEPPKY, R. Reducing environmental nitrosamines, contamination and exposure in the United States. In: **Das nitrosamin – problem**. Berlin: Verlag Chemie, 1983. p.305-317.
- LOW, H, **Arch. Env. Health** 29,257 (1974) *apud* ARAUJO, M.E; CYRNE, L.; MARINHO, S.H.; NOBERTO, F. **Os compostos N-nitrosos e o cancro**. Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Disponível em: http://www.spq.pt/boletin/79/b179_07.htm. Acesso em: fev. 2001.
- MACEDO, J. **Águas & águas**. São Paulo: Varela, 2001.
- MARON, D.; AMES, B. Revised method for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v.97, p.267-281, 1983.
- MCGLAHAN, N.; WALTERS, C.; MCLEAN, A. **Lancet**, 1968, vol2 p1017 *apud* GOUGH, T. Determination of N-nitroso compounds by mass spectrometry. **Analyst**, v.103, p.785-806, 1978.

- MARTINS, J.P.; SAMPAIO, M.C.S.; CASTRO, M.T.; CARPINELLI, S.R.; SILVA, V.R. **Uma nova política de mananciais**, Fotolito editora, 1997, 3 *apud* REZEMINI, A.L. **Desenvolvimento e aplicação de método para a determinação do 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5)-furanona(MX) em água potável**. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- MEIER, J. Genotoxic activity of organic chemical in drinking water. **Mutat. Res.**, v.196, p.211-245, 1988.
- MELLONI, E. Século 21 - Perspectiva: água recurso cada vez mais cobiçado. **Jornal O Estado de São Paulo**, 10 set. 2002.
- MIRVISH, S. Formation of N-nitroso compounds, kinetics and *in vivo* occurrence. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.31, p.325-351, 1975.
- MIRVISH, S. N-nitroso compounds: their chemical, *in vivo* formation and possible importance as environmental carcinogens. **J. Toxicol. Environ. Health**, v.2, p.1267-1277, 1977.
- MOE. ONTARIO MINISTRY of ENVIRONMENT. Drinking water surveillance program, 1996-1997: executive summary report. Disponível em: [Http://www.ene.gov.on.ca/envision/dwsp/index96_97.htm](http://www.ene.gov.on.ca/envision/dwsp/index96_97.htm). Acesso em: nov. 1999.
- MONTAIGNE, F., Água sob pressão. **Natl. Geogr. Brasil**, p.50-82, set., 2002.
- MORTELMANS, ZEIGER 2000 (MEIER) 1988.
- NAJM, I; TRUSSELL A. NPMA formation in water e wastewater. In: AWWA WATER QUALITY TECHNOLOGY CONFERENCE, Salt Lake City, 2000. **Proceedings**. S.L.: American Water Works Association, 2000.
- NATIONAL ACADEMY of SCIENCE. Nitrosamines and cancer. Disponível em: [Http://www.pnas.org](http://www.pnas.org) . Acesso em: fev. 2001.

- NASCIMENTO, H.; ANDERSON, C.; PEREIRA, C.; CARVALHO, E. **Estudo de viabilidade para uma fábrica de água mineral**. São Paulo: Fundação Vanzolini. 1995. [Relatório do Curso Estudo de Viabilidade de Projetos].
- NAVAS, M.J.; JIMENEZ, A.M. Review of chemiluminescent methods in food analysis. **Food Chem.**, v.55, n.1, p.7-15, 1996.
- NEURATH, G.; SCHREIBER, O. Investigations on amines in the human environment. **IARC Sci. Publ.**, n.9, p.211-214, 1974.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Harzadous substances data bank**. Disponível em: <http://www.nlm.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/hsdbfs.html>. Acesso em: jan. 2000.
- NIESSNER, G.; KLAMPLL, C.W. direct comparison of solid phase extration and solid phase microextration for the gas chromatographic determination of dibenzylamine in artificial saliva leachates from baby bottle teats. **Anal. Chim. Acta.**, v.414, p.133-140, 2000.
- NIKAIDO, M.; DEAN-RAYMOND, D.; FRANCIS, A.; ALEXANDER, M. **Water Res.**, v.11, p.1085-1087, 1977.
- NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. Nitrosamines: method n.2522, 1994. Disponível em: <http://www.adc.gov/niosh/nman/pdfs/2522.pdf>. Acesso em: set. 1998.
- NORIN, H.; RENBERG, L. **Water Res.**, v.14, p.1397-1402, 1980.
- NOVAES, W. Os mistérios da água, **Jornal O Estado de São Paulo**, 11 jan. 2002.
- NOVAES, W. O caminho das águas, **Jornal O Estado de São Paulo**, 29 mar. 2002.
- NTP - NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Disponível em: http://server.niehs.nih.gov/agi/ih_indexes/ALL_SRCH/ih_ALL_SRCH_Frames.htm. Acesso em: jul. 2003

- OHSHIMA, H., BARTSH, H. The influence of vitamin c on the *in vitro* formation of nitrosamines. In: COUSELL, J.N.; HORMING, D.H., eds. **Vitamin C: ascorbic acid**. London: Applied Science, 1981. p.215-224.
- OLIVEIRA, G.F. **Considerações sobre espécies químicas presentes em amostras de água de compartimentos da Represa Billings**. São Paulo, 1998. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION. Method OSHA volatile nitrosamines, mixture I. Disponível em: <http://www.osha-slc.gov/dts/sltc/methods/organic/org027/org027.html>. Acesso em: nov. 1998.
- PEN, L.; CHANG, J.M.; PAULIOZYN, J. Determination of amines in air and water using derivatization combined with solid – phase microextraction. **J. Chromatogr., A.**, v.773, p.249-260, 1997.
- PENTEADO, J.C.P. **Metodologia Analítica para Análise de PCBs em Fígado de Peixe do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo, 2000. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- PLOMLEY, J.B.; KOESTER, C.J; MARCH, R. **Anal. Chem.**, v.66, p.4437–4443, 1994.
- PORTER, T. Recombinant CYP2E1 ames mutagenicity test. Disponível em: <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/2E1.html>. Acesso em: mar. 2003.
- REES, D.G. **Essential statistics**. 3.ed. London: Chapman & Hall, 1995.
- REDING, R. **J. Chromatogr. Sci.**, v.25, p.338-344, 1986.
- REZEMINI, A.L. **Desenvolvimento e aplicação de método para a determinação do 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5)-furanona(mx) em água potável**. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.
- RICHARDSON, M.L.; WEBB, K.S.; GOUGH T.A. **Ecotoxicol. Environ.**, v.4, p.207-212, 1980.

RICHARDSON, S. Water analysis. **Anal. Chem.**, v.73, n.12, p.2719-2734, 2001.

SABESP - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatórios de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo, 2002**. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/agua_geral.asp. Acesso em: 12 de janeiro de 2003.

SABESP - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Situação dos recursos hídricos do Rio Paraíba do Sul e Serra da Mantiqueira**. Relatório de 1995 do comitê das bacias hidrográficas do Rio Paraíba do Sul e Serra da Mantiqueira. In: Penteado, J.C.P. **Metodologia analítica para análise de PCBs em fígado de peixe do Rio Paraíba do Sul**. São Paulo, 2000. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade de São Paulo.

SABESP - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: http://www.sabesp.com.br/qualidade/qual_agua10.html. Acesso em: nov. 2002.

SAX, N. **Hazardous chemicals information annual**. New York: Van Nostrand Reinhold Information Services. 1986. p.629.

SCANLAN, R.; REYES, F. An update on analytical techniques for N-nitrosamines. **Food Technol.**, p.95-99, 1985.

SEN, N.P. Gas-liquid chromatographic determination of dimethyl nitrosamine as dimethylnitroamine at picograms levels. **J. Chromatogr.**, v.51, p.301-304, 1970.

SEN, N.P.; KUBACKI, S.J. Revision of methodologies for determination of non volatile n-nitroso compounds in food. **Food Addit. Contam.**, v.4, n.4, p.357-383, 1987.

SEN, N.; SEAMAN, S. Rapid semi quantitative estimation of n-nitrosodibutylamine and n-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid phase microextraction

- followed by gas chromatography-thermal energy analysis. **J. Chromatogr., A**, v.788, p.131-140, 1997.
- SHUSHUNOVA, A.; SHKOCLICH, P. CG determination of diethyl and dimethylnitrosamine in aqueous solutions and waste water. **Zh. Anal. Khim.**, v.34, n.9, p.1855-1857, 1979. (CG) Agro.
- SPECTRUM LABORATORIES. MSDS of compounds. Disponível em: <http://www.speclab.com/compound/chemabc.htm>. Acesso em: set. 2000.
- SPIEGELHADER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Contamination of amines with nitrosamines. **Angew. Chem.**, v.17, p.367-368, 1978.
- THAKKAR, N.; KONDAWAR, V. Use of alkali flame ionization detector in the analysis of volatile N-nitrosamines in aquatic environment. **Indian J. Environ. Prot.**, v.8, n.8, 1988.
- TATE, R.L.III; ALEXANDER, M. Stability of nitrosamines in samples of lake water, soil and sewage. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.54, p.327-330, 1975.
- THOMPSON, M. Recent trends in interlaboratory precision at ppb and sub ppb concentrations in relation to fitness for purpose criterio in proficiency testing. **Analyst**, v.125, p.385-386, 2000.
- TOMKINS, B.; GRIEST, W.; HIGGINS, C. Determination of N-nitrosodimethylamine at part per trillion levels in drinking waters and contaminated ground waters. **Anal. Chem.**, v.67, p.4387-4395, 1995.
- UKAMA-ISHIKAWA, S.; SAWADA, A.; KASUYA, K.; MOCHIZUK, M. mutagenicity of isomeric alkane diazotate, precursors for ultimate alkylating species of carcinogenic – N-nitroso compounds. **Mutat. Res.**, 4123 (99-107), 1998.
- VALENTINE, R. Occurrence and formation of nitrosamines in drinking water. distribution systems. Iowa University Disponível em: <http://natu.usgs.gov/wrri/oogrants/1a>. Acesso em: nov. 2001.

- WALKER, E.A.; CASTEGNANO, M.; GRICIUTE, L.; LYLE, R.E.. Volatile and non-volatile N-nitroso compounds in foods and other environmental media. in: enviromental aspects of N-nitroso compounds. **IARC Sci. Publ.**, n.19, p.311-324, 1978.
- WALTERS, C.L.; JOHNSON, E.M.; RAY, N. Separation and detection of volatile and non-volatile N-nitrosamines. **Analyst**, v.95, p.485-489, 1970.
- WARTESEN, J.; SCANLAN, R.; BILLS, D.; LYBBEY, L. **J. Agric. Food Chem.**, v.23, p.898-902, 1975.
- WERCINSKI, S.A. **Solid phase microextraction: a practical guide**. New York: Marcel Deckker, 1999. p.59.
- WERNIMONT, G.T. **Use of statistics to develop and evaluate analytical methods**. Arlington: AOAC, 1993.
- WILLIAMS, D.; CcBEL, G.; BENAT, F. Desinfection by-products in canadian drinking water. **Chemosphere**, v.34, n.2, p.299-316, 1997.
- WILCOX, P.; WILLIAMSON, S. Mutagenic activity of concentrated drinking water samples. **Environ. Health Perspect.**, v.69, p.141-149, 1986.
- WISHNOK, J.S. N-nitrosamines. In: **ENCYCLOPEDIA of chemical technology**. New York: Wiley Interscience, 1981. v.15, p.988-996.
- YAN, F.; BORNY, J. **sensitive and selective detection of nitrosamines in real world samples**. S.l.: Antek Instruments, 1999.
- YOU, Jin Mao; ZHAO, Bin; ZHU, Qing Cun. High performance liquid chromatographic determination of n-nitrosoamines by pre column fluorescence derivatization with 9-phenanthrene chloride. **Chinese Chem. Lett.**, v.7, n.12, p.1113-1116, 1996.