

Camilla Rigoni Medeiros

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
EXTRATOS AQUOSOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POR MICRO-
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA A GÁS
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química na área de
Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos
Santos Madureira

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Medeiros, Camilla Rigoni

Determinação de compostos fenólicos em extratos aquosos de resíduos sólidos por microextração em fase sólida e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas / Camilla Rigoni Medeiros ; orientador, Luiz Augusto dos Santos Madureira - Florianópolis, SC, 2013.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Fenóis. 3. Matriz Aquosa. 4. SPME. 5. Resíduo Sólido. I. Madureira, Luiz Augusto dos Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Camilla Rigoni Medeiros

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
EXTRATOS AQUOSOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS POR
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA
A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

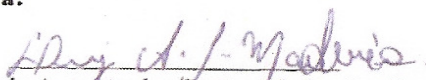
Florianópolis, 7 de junho de 2013.



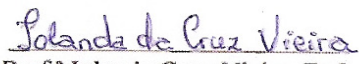
Prof. Almir Spinelli, Dr.

Coordenador do Curso (DQ – UFSC)


Banca Examinadora:




Prof. Luiz Augusto dos Santos Madureira, Dr.
Orientador (DQ – UFSC)



Prof.ª Iolanda Cruz Vieira, Dr.ª
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ – UFSC)



Prof. Gustavo Amadeu Mike, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (DQ – UFSC)



Prof. Fernando J.S. de Oliveira, Dr.
IQ-UFF e Petrobras

Este trabalho é dedicado ao meu
esposo, aos meus queridos pais e
irmãs.

AGRADECIMENTOS

Ao Guilherme, pelo grande auxílio na aplicação do planejamento de experimento. Por todo carinho e companheirismo acrescentando razão aos meus dias.

A minha família pelo exemplo e que de longe ou perto nunca deixarão me faltar amor.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira pela orientação e a então possibilidade de aprendizado proporcionada durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos companheiros de laboratório, especialmente Martinho Rau, Paulo S. Taube Jr. e Vânia R. Ferreira pelo grande auxílio no desenvolvimento do presente trabalho e carinho.

Aos meus amigos e grandes colaboradores do laboratório POLISSOL por toda assistência e carinho (Celso, Ismael, João e Leandro)

Aos professores Iolanda da Cruz Vieira, Gustavo Amadeu Mike, Fernando J. S. de Oliveira por participarem da banca de defesa e pelas contribuições oferecidas.

Aos funcionários da Central de Análises por todo apoio, suporte e convivência.

A Petrobras e Capes pelo apoio financeiro.

A ESSS pela disponibilização do software ModeFrontier®.

Nada é mais real,
Que aprender maneira simples de viver
Tudo é tão normal
Se a gente não se cansa nunca de aprender
Sempre olhar como se fosse a primeira vez
Se espantar como criança a perguntar por quês?

(Almir Sater / Paulo Simões)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a extração de compostos fenólicos para caracterização e classificação de resíduos sólidos por meio da técnica de micro-extração em fase sólida no modo *headspace*, seguida da determinação por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em matriz aquosa. O método foi adaptado da literatura para a determinação de fenóis em meio aquoso após os ensaios de solubilização e lixiviação, descritos pela ABNT, para posterior determinação de toxicidade. Inicialmente foi criado um planejamento de experimentos (DOE) utilizando o algoritmo *Latin Square* com 5 níveis, gerando 25 experimentos diferentes. Com os resultados obtidos pelo DOE, uma superfície de resposta foi gerada e então os parâmetros do método foram otimizados a partir dos resultados cromatográficos (A_{med}). Assim foi encontrada a condição ótima de temperatura, tempo de extração, acidificação e saturação com NaCl para a extração de fenóis em meio aquoso com a fibra de poliacrilato. A eficiência do método foi avaliada por meio de uma simulação da solubilização de um resíduo enriquecido com fenóis em 3 concentrações na faixa de 6 a 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ resultando em uma recuperação de 91 a 100%. Como método referência comparativo, optou-se pela extração líquido-líquido (LLE), conforme indicado pelas normas NBR10005 e 10006. Foi preparada uma solução aquosa enriquecida com fenóis em 3 concentrações na faixa de 6 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, simulando um extrato obtido após a solubilização de resíduo sólido, com recuperação que variou de 0 a 56%. A robustez da metodologia foi verificada com o uso de matrizes de diatomácea pura (DP) e residuária (DR), fortificadas com a mistura de fenóis nas proporções de 0,003 e 0,500 mg em 4 g de base seca, submetida aos ensaios de lixiviação e solubilização. Foram feitas determinações de fenóis nos tempos de 24, 72, 120 e 168 horas do processo de solubilização para avaliar a necessidade dos 7 dias de extração indicado pela norma. As amostras obtidas, com e sem filtração, foram então extraídas com a aplicação do método desenvolvido, com recuperações na faixa de 90-100% para os analitos a partir da DP e não se observou recuperação a partir da DR. O método proposto apresentou-se mais sensível que a ELL. Entretanto, estudos referentes à presença de interferentes devem ser feitos, pois estes podem alterar significativamente o equilíbrio e a disponibilidade dos fenóis no *headspace*.

Palavras-chave: SPME. Fenóis. Matriz aquosa. Diatomácea. Resíduo sólido.

ABSTRACT

The objective of the present work was to propose an analytical method for extraction of phenolic compounds waste management for solid residues by solid phase micro-extraction (SPME) and gas chromatography – mass spectrometry detection (GC-MS) in aqueous matrix. The method was adapted from literature to phenols monitored in aqueous samples after solubilization and leaching procedure of solid residue, as determined by *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, to posterior toxicity classification. A design of experiment (DOE) using Latin Square algorithm with 5 levels, giving 25 experiments was performed. After obtaining the experimental data, a surface response was created and the method's parameters were optimized considering chromatography response. Therefore, the optimal conditions of temperature, extraction time, acidification and salt saturation (NaCl) to extract phenol compounds in aqueous solution were determined. The liquid-liquid extraction (LLE) method was employed, in accordance with NBR 10005 and 10006 by ABNT recommendation, to compare the efficiency of the new method versus the conventional method. In the proposed method 3 concentrations ranging from 6 to 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ were used with recovery extending from 91 to 100%. In contrast the LLE recovery values dropped to 0-56% with 3 concentrations from 6 to 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Robustness of the new methodology was verified through the use of a pure and waste diatomaceous matrix, fortified with the phenols mix (0.003 mg and 0.500 mg in 4 g of dry weight sample, being submitted to the solubilization and leaching treatments. Since the ABNT regulation determine seven days to obtain a solubilization extract, concentrations of phenols after 24, 72, 120 and 168 hours of extraction were monitored. The soluble compounds, present in the extract, without filtration process and after filtration process were analyzed according the methodology previously developed and reached a recovery rate of 90-100% starting from a pure diatomaceous matrix. The recovery from a waste diatomaceous matrix was below the desired and in some tests the compounds wasn't even detected. The new methodology has proved to be more sensitive than the reference one, suggested by the normative. However, more efforts are needed to discover the real interference of other compounds present in the matrix, once they can disturb the equilibrium and availability of phenols in headspace.

Keywords: SPME.Phenols. Aqueous matrix. Diatomaceous. Solid residue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas fenólicas (● carbono (CH_n); ● cloro (-Cl); ● nitrogênio (N); ● oxigênio ($-\text{OH}_n$)).....	20
Figura 2 - Dispositivo da fibra de SPME: (a) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico) e (b) posição com a fibra exposta, (c) fibra + <i>holder</i> (Adaptado: VALENTE e AUGUSTO, 2000).	25
Figura 3 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de desorção do material extraído para análise por GC (VALENTE e AUGUSTO, 2000).....	27
Figura 4 - Modos de operação de SPME: (a) headspace e (b) amostragem direta (imersão).	29
Figura 5 - Representação de extração absorptiva envolvendo fibras com revestimentos líquidos e adsorptivas envolvendo revestimentos sólidos com poros grandes e pequenos (adaptado: LORD e PAWLISZYN, 2000).	30
Figura 6 - Projeções de uma matriz 5x5 a partir do algoritmo Latin Square.....	37
Figura 7 - Ilustração de picos e suas áreas em um cromatograma.	38
Figura 8 - a) Área média alta com pico nulo. b) Área média sem pico nulo.	38
Figura 9 - Exemplificação gráfica da condição de KKT para determinação da condição de otimalidade.	39
Figura 10 - Fluxo de trabalho para HS-SPME-PA. Como variáveis de entrada foram definidas: <i>temperatura</i> - na faixa de 25 a 60 °C, <i>NaCl</i> - concentração com saturação de 0% a 104%, <i>ácido</i> - volume de HCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) de 0 a 300 μL e <i>exp_tempo</i> - tempo de extração de 10 a 3600 segundos (10^x , para $1,000 < x < 3,558$). Para variáveis de saída adotou-se a <i>média</i> - média das áreas dos picos ($A_{Méd}$) e <i>menor_val</i> - menor valor de área aceito (A_{Mm}).....	40
Figura 11 - Fluxo de trabalho HS-SPME-PDMS. Como variáveis de entrada foram definidas: <i>temperatura</i> - na faixa de 25 a 60 °C, <i>NaCl</i> - concentração com saturação de 0% a 104%, <i>anidrido</i> - volume de anidrido acético de 20 a 500 μL e <i>exp_tempo</i> - tempo de extração de 30 a 3600 segundos (10^x , para $1,477 < x < 3,556$). Para variáveis de saída adotou-se a <i>média</i> - média das áreas dos picos ($A_{Méd}$) e <i>menor_val</i> - menor valor de área aceito (A_{Mm}).....	41
Figura 12 - Fluxograma dos ensaios de lixiviação e solubilização a partir do resíduo sólido fortificado (diatomácea).	45
Figura 13 - Cromatogramas dos compostos fenólicos por GC-MS com os respectivos fragmentos característicos dos fenóis utilizados na extração por SPME.....	47
Figura 14 - Ilustração para o procedimentos de cálculo de desvio, em que cada pico é identificado como j_x	48
Figura 15 - Aproximação por Função de Base Radial (a) média e (b) mínima área.....	49
Figura 16 - Curva de calibração obtida para o método referência para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF). Utilizando calibração com adição de padrão interno. Onde Ac = área	

do composto, A_{pi} = área do padrão interno, C_c = concentração do compostos e C_{pi} = concentração do padrão interno.51

Figura 17 - Frascos de extração dos ensaios de solubilização com matriz de diatomácea pura enriquecida com fenóis.....54

Figura 18 - Gráficos área versus tempo de estratificação (a) Amostra diatomácea residuária na concentração 0,120 mg / 4,0 g base seca (*DR_F_0,120 mg*). (b) Amostra diatomácea pura na concentração 0,003 mg / 4,0 g base seca (*DP_F_0,003 mg*). Tempo avaliado de 24, 72, 120 e 168 horas para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF) e pentaclorofenol (pCF).57

Figura 19 - Recuperação de amostra diatomácea pura (DP) 0,003mg / 4 g após 24, 72, 120, 168 horas de extração do solubilizado para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF) e pentaclorofenol (pCF). (a) Extrato filtrado. (b) Extrato não filtrado.58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de compostos fenólicos (KLEIBOHMER, 2001).....	19
Tabela 2 – Concentração máxima de fenóis totais permitidos em água/ corpos de água (CONAMA, 2012).....	23
Tabela 3 - Fibras comerciais, propriedades e aplicações	26
Tabela 4 - Detectores de cromatografia gasosa.(adaptado: BAUGH, 1994).....	33
Tabela 5 - Analitos e fragmentos utilizados para identificação dos fenóis por GC-MS.....	46
Tabela 6 - Configuração ótima para a Fibra PA.....	49
Tabela 7 - Pontos avaliados para validação da otimização	50
Tabela 8 – Recuperação de fenóis obtida por extração líquido-líquido	51
Tabela 9 – Parâmetros de mérito analíticos para o método SPME	53
Tabela 10 - Recuperação de fenóis obtida por SPME.....	53
Tabela 11 - Ensaio de lixiviação para resíduo sólido (diatomáceas pura e amostras) em dois níveis de concentração (0,003 mg de analito / 4,0 g de resíduo e 0,120 mg de analito / 4,0 g de resíduo).....	55
Tabela 12 - Recuperação amostra de diatomácea pura filtrada (DP_F) e não filtrada (DP_NF), na concentração de 0,003 mg / 4 g, após 24, 72, 120, 168 horas de extração do solubilizado	58

SIMBOLOGIA E ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ac - Área do composto
Ac/pi - Razão área do composto por área do padrão interno
 $A_{Méd}$ - Área média
 A_{Min} - Área mínima
BFGS - Broyden Fletcher Goldfarb Shanno
BTEX – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno
CFR – Code of Federal Regulation
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cwax – Carbowax
 C_0 – Concentração inicial
 C_m^e , C_h^e e C_f^e - Concentração na matriz, no headspace e na fibra (e = equilíbrio)
Cc - Concentração do composto
Cepi - Razão concentração do composto por concentração do padrão interno
 C_6D_5OD – Fenol deuterado
DOE - Design of experiment (Planejamento de experimento)
Df - Coeficiente de difusão do soluto
 D_m - Coeficiente de difusão do analito na matriz.
D.P - Diatomácea pura
D.R - Diatomácea resíduária
ECD - Electron capture detector (detector por captura de elétrons)
EPA/USA – Environmental Protection Agency (Agencia de Proteção Ambiental Norte Americana)
FID – Flame ionization detector (detector por ionização em chama)
FPD - Flame photometric detector (detector fotométrico de chama)
FS – Fused silica (sílica fundida)
FF - Full Factorial (Fatorial completo)
GC-MS – Gas Chromatography / Mass spectrometry (Cromatografia em Fase Gasosa / Espectrometria de Massas)
HS – Headspace
HPAs – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC – High performance liquid chromatography
 K_{fm} , K_{fh} , K_{hm} - Constantes de distribuição fibra-matriz, fibra-headspace e headspace-matriz
KKT - Karush Kuhn Tucker
LS - Latin Square (Quadrado Latino)

LLE – Liquid-liquid extraction (extração líquido-líquido)
LOD – Limite de Detecção
LOQ – Limite de Quantificação
LPE – Liquid phase extraction (extração em fase líquida)
LPME – Liquid phase microextraction (micro-extração em fase líquida)
L_f - Espessura de recobrimento
m/v - Razão massa/volume
m/z - Razão massa/carga
MF – Metil fenol
M.M. – Massa Molar
MS – Mass spectrometry (espectrometria de massas)
MAE - Microwave-assisted extraction
MSPD - Matrix solid phase dispersion (dispersão de matriz em fase sólida)
NBR - Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas
NPD -Nitrogen-phosphorous detector (detector nitrogênio – fósforo)
 n_m^e, n_h^e, n_f^e - Número de mols na matriz aquosa, no headspace e na fibra (e =equilíbrio)
 P_{ow} – Coeficiente de Partição Octanol – água
pCF – Pentaclorofenol
PID - Photo-ionization detector (detector de fotoionização)
pKa – Logaritmo negativo da constante de equilíbrio da ionização do ácido (K_a) - (-logK_a)
PA - Poliacrilato
PDMS - Polidimetilsiloxano
PLE - Pressurized liquid extraction) (extração por líquido pressurizado)
P.E – Ponto de Ebulição
PPM / PPB – Partes por milhão / Partes por bilhão
R – Coeficiente de correlação de Pearson
R² – Coeficiente de determinação
RBF –Radial Basis Function (função de base radial)
SPME – Solid-phase microextraction
S/R – Razão sinal/ruído
SFE - Supercritical fluid extraction (extração por fluido supercrítico)
SPE - Solid phase extraction (Extração em fase sólida)
S – Solubilidade em água
SBSE - Stir-bar sortive extraction
t_e - Tempo para atingir o equilíbrio
t₉₅ - Tempo que corresponde a extração de 95%
TCD - Thermal Conductivity Detector (Detector de condutividade térmica)

tCF – Triclorofenol

UV – Ultravioleta

V_m^e , V_h^e e V_f^e - Volume da matriz, do headspace e da fibra (e = equilíbrio)

δ – Raio da camada limite

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
2REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS....	19
2.2 CLASSIFICAÇÃO DE FENÓIS.....	21
2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	24
2.3.1 Micro extração em fase sólida.....	24
2.3.2 Seleção do modo de extração.....	28
2.3.3 Seleção do tipo de fibra, volume, agitação e tempo de extração.....	29
2.3.4 Estudos realizados.....	32
2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA E MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	32
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	35
4.2 LIMPEZA DE MATERIAL.....	35
4.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS POR SPME.....	36
4.3.1 Metodologia de planejamento e otimização para extração com fibra de poliacrilato.....	37
4.3.2 Metodologia de planejamento e otimização para extração com fibra de polidimetilsiloxano.....	40
4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE SPME E MÉTODO PADRÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	42
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE EXTRATOS LIXIVIADOS E SOLUBILIZADOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS SEGUNDO NBR10004/ 10005/ 10006.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46

5.1 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS POR SPME.....	46
5.1.1 Validação da otimização.....	50
5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E MÉTODO PADRÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	50
5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE EXTRATOS LIXIVIADO E SOLUBILIZADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS SEGUNDO NBR 10004/ 10005/ 10006.....	54
5.3.1 Lixiviação.....	54
5.3.2 Solubilização.....	56
6.0 CONCLUSÕES.....	61
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICE A.....	69
TABELA A1. PONTOS ESTUDADOS NO DOE COM EXTRAÇÃO PELA FIBRA PA.....	69
APÊNDICE B.....	70
TABELA B1. PONTOS ESTUDADOS NO DOE COM EXTRAÇÃO PELA FIBRA PDMS.....	70
ANEXOS.....	71
ANEXO A - TABELA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SEGUNDO ABNT - NBR 10005:2004.....	71
ANEXO B - MÉTODO 8040A / <i>PHENOLS STANDARD ACCUSTANDARD</i> [®] COM 2000 µG/ML DE CADA COMPOSTOS EM ISOPROPANOL.....	72

1 INTRODUÇÃO

Têm-se indícios da utilização do petróleo desde os tempos bíblicos. Tijolos eram assentados com asfalto na antiga Babilônia e os fenícios empregavam o betume para calefação. Ainda, índios pré-colombianos utilizavam petróleo para impermeabilizar e decorar cerâmicas. (THOMAS, 2001; M. HÖÖK *et al*, 2010)

Nos dias atuais o petróleo é uma poderosa matéria-prima para a produção de inúmeros produtos que estão à nossa volta. As diversas frações geradas têm finalidade de combustíveis automotivos, produtos plásticos, asfalto, etc.

Os processos envolvidos na extração de petróleo geram três principais tipos de fluidos: óleo, gás e água, juntamente com impurezas. Os fluidos como gás e água, encontrados no final do processo de elevação, se dão por ocorrência natural (por exemplo, existência de aquíferos) nos poços perfurados ou pelo processo de injeção que utiliza água para estabelecimento das condições necessárias de pressão e viscosidade e, assim, melhorar a eficiência do processo de elevação do óleo. (M. HÖÖK *et al*, 2010; CORREA, 2003)

O processamento primário se procede com a separação dos fluidos, onde se tem interesse comercial no óleo e no gás, devendo a água ser separada para efeito de purificação dos outros dois. Essa água possui índices de óleo e algumas impurezas, devendo se aplicar tratamento para melhor extração de traços de petróleo e diminuir os índices de impurezas (substâncias tóxicas ou corrosivas) para posterior reuso ou descarte. Os processos industriais para produção de derivados de petróleo são fontes de resíduos altamente tóxicos, liberando resíduos sólidos e líquidos contaminados. Nesse contexto está inserida a necessidade de identificação de constituintes e classificação dos resíduos previamente à destinação final. O descarte de efluente líquido no Brasil é realizado dentro de regras normatizadas por órgão de controle do meio ambiente, nas quais a concentração máxima de poluentes em efluentes industriais é estipulada. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) por meio da Resolução 357 de 17/03/2005 determina, dentre outras coisas, que efluentes de qualquer fonte poluidora poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos d'água quando apresentar teor de óleos minerais inferior a 20 mg L^{-1} . Nos Estados Unidos o teor mensal máximo é de 29 mg L^{-1} e no Mar do Norte e na Índia 40 mg L^{-1} . (M. HÖÖK *et al*, 2010)

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que é o Fórum Nacional de Normalização no Brasil, confere a classificação dos

resíduos sólidos visando fornecer subsídios para o gerenciamento de resíduos por meio da ABNT NBR 10004:2004, baseada no *Code of Federal Regulations (CFR)– Title 40 – Protection of environmental – Part 260-265 – Hazardous waste management*. A partir dessa, com caráter complementar, encontram-se a NBR 10005 que possibilita a partir do extrato lixiviado, a classificação do resíduo como perigoso e não perigoso. E a NBR 10006 fixa os requisitos necessários para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos, visando diferenciar os resíduos como classe II A - não inertes, e classe II B – inertes.

Dentre os métodos disponíveis para o preparo de amostras para determinação de compostos orgânicos a extração *Soxhlet* de analitos em amostras sólidas e a extração líquido-líquido (LLE) estabelecidos pela CFR - 6420 *Standard Methods Committee* para amostras líquidas, são alguns dos métodos mais conhecidos e estabelecidos como padrão. No entanto, novas técnicas estão surgindo devido às dificuldades apresentadas pelos métodos padrões tradicionais, como o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, que além de necessitarem de alto grau de pureza, também são agressivos ao meio ambiente. Aliado a isso, busca-se uma extração de analitos com o menor número de etapas, maior rapidez na execução e que ainda supra as limitações de abundância e estado físico que o analito pode assumir. (HACHENBERG e SCHIMIDT, 1979)

Algumas das novas técnicas de extração que envolve pequenos volumes de solvente e rapidez são a extração e microextração em fase líquida (LPE, LPME) e extração e microextração em fase sólida (SPE e SPME), em substituição a tradicional extração líquido-líquido para amostras no estado líquido. A técnica de SPME também pode ser aplicada a analitos voláteis que possam assumir o estado gasoso seguido de sorção em uma fase sólida. (WORSFOLD *et al*, 2005; PAWLISZIN, 1995)

Neste trabalho procurou-se desenvolver uma metodologia para extração e determinação de fenóis em extratos aquosos por SPME associada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) visando substituir as metodologias padrões que envolvem um grande tempo de preparo de amostra, grandes quantidades de solvente e possível de perda de analitos. Prejuízos esses associados à adsorção em vidraria durante a manipulação assim como evaporação (compostos voláteis). Duas metodologias foram desenvolvidas com a utilização de planejamento de experimento para obtenção de superfície resposta seguido de otimização, para as fibras poliacrilato e polidimetilsiloxano. O método que apresentou melhores condições de extração foi

comparado, em termos de recuperação, com o método de extração líquido-líquido (CFR - 6420 da *Standard Methods Committee*), recomendado pela ABNT. A robustez da metodologia foi avaliada pela aplicação a outra matriz obtida após ensaios de lixiviação e solubilização de resíduos sólidos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia analítica para a determinação de compostos fenólicos em extratos aquosos provenientes de resíduo sólido, empregando micro-extração em fase sólida e cromatografia gasosa.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver uma metodologia em condições ótimas de extração por micro-extração em fase sólida no modo *headspace* para extração de fenóis em matriz aquosa, por meio de desenvolvimento de planejamento de experimento (com variação de temperatura, tempo de extração, concentração de sal, pH do meio ou excesso de composto derivatizante), e otimização com o auxílio do software **modeFrontier**[®]. Dentro do qual avaliar as extrações de fenóis, sem derivatização com fibra poliácrlato e após esterificação dos compostos fenólicos com fibra polidimetilsiloxano, para a escolha da metodologia mais robusta.
- Avaliar a sensibilidade da técnica por meio de comparação com um dos métodos convencionais sugerido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas para caracterização e classificação de resíduos sólidos. Dessa forma, simular um extrato solubilizado baseado apenas em meio aquoso e compostos fenólicos, comparar a recuperação obtida pelo método desenvolvido e um método sugerido pela ABNT.
- Enriquecer dois tipos de amostras de diatomácea, cedida pela PETROBRAS, com compostos fenólicos para simular uma matriz real de resíduo sólido. A partir dessas, executar as rotinas de lixiviação e solubilização de resíduo sólido estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, seguindo os procedimentos e também testar algumas alterações. Posteriormente estudar o comportamento de extração e recuperação dos analitos presentes no extrato lixiviado e solubilizado, e verificar a robustez da metodologia. Ainda, estudar a

influencia das etapas dos ensaios estabelecidos pela ABNT na recuperação dos compostos com base no método desenvolvido por SPME.

2REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

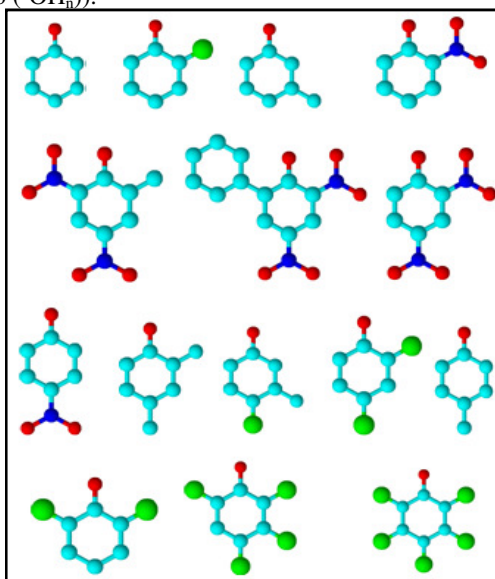
Os fenóis são compostos que apresentam na sua estrutura a presença de grupo hidroxila ligado a um anel aromático, podendo apresentar ligações com grupos clorados, nitrados, metilênicos e alquílicos. Em função disso possuem variações de acidez desde inferiores até superiores a da água (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas de compostos fenólicos (KLEIBOHMER, 2001)

Composto	M(g mol ⁻¹)	pKa	log P _{ow}	S(mg L ⁻¹)
Fenol	94,11	9,99	1,46	82000
2-metilfenol	108,14	10,26	-	25000
3- metilfenol	108,14	10,09	-	24000
4- metilfenol	108,14	10,26	-	19000
2,4-Dimetilfenol	122,16	10,5	2,42	4200
2-Clorofenol	128,56	8,52	2,29	23250
4-Clorofenol	128,56	9,37	2,53	2600
2,4-Diclorofenol	163,00	7,9	3,2	5550
2,6-Diclorofenol	163,00	6,8	2,92	2650
2,3,5-Triclorofenol	197,45	6,43	3,85	770
2,4,5-Triclorofenol	197,45	6,72	4,02	650
2,4,6-Triclorofenol	197,45	6,00	3,67	710
2,3,4,5-Tetraclorofenol	231,89	5,64	-	165
2,3,4,6-Tetraclorofenol	231,89	5,22	4,24	180
2,3,5,6-Tetraclorofenol	231,89	5,02	5,02	100
Pentaclorofenol	266,34	4,74	5,85	18
2-Nitrofenol	139,10	7,21	1,78	2100
4-Nitrofenol	139,10	7,16	1,9	16000
2,4-Dinitrofenol	184,10	4,09	1,53	5600
2-Metil-4,6-dinitrofenol	198,13	4,34	2,12	100
4-cloro-3-metilfenol	142,58	9,55	3,1	3850

Os fenóis ocorrem em abundância na natureza (ex. clorofenóis e cresóis em petróleo) e são empregados como aromatizantes, anti-sépticos, adesivos, desinfetantes, herbicidas, dentre outras aplicações. A extração e pré-processamento de petróleo geram efluentes nos quais alguns compostos fenólicos podem ser encontrados. As estruturas comumente presentes são o 4-cloro-3-metilfenol, 2-clorofenol, 2-metilfenol, 3-metilfenol, 4-metilfenol, 2-ciclohexil-4,6-dinitrofenol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,4-dimetilfenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, alguns representados na **Figura 1**. (SANTOS *et al*, 2001)

Figura 1 - Estruturas fenólicas (● carbono (CH_n); ● cloro (-Cl); ● nitrogênio (N); ● oxigênio (-OH_n)).



Esses compostos têm sua toxicidade, propriedade potencial de provocar um efeito adverso em consequência de sua interação com o organismo, relacionada à acidez e então a capacidade de adentrar às células, originando metagêneses e carcinogêneses (LEE *et al*, 2008). Essas características estão relacionadas com as propriedades físico-químicas dos fenóis que por sua vez estão arroladas às suas estruturas moleculares.

Conforme se observa pela **Tabela 1**, embora a maior parte dos fenóis seja compostos ácidos (clorofenóis e nitrofenóis), alguns possuem pK_a em torno de 10, como fenol e alquilfenóis. A solubilidade em água é um dos fatores mais significantes no acúmulo e transporte dos compostos no ambiente, o que varia muito entre os compostos fenólicos. O pentaclorofenol apresenta solubilidade de 18 mg L^{-1} enquanto o fenol de 82.000 mg L^{-1} . Entre os clorados, a solubilidade diminui quando o grau de cloração aumenta.

Os fenóis, com valores mais elevados de logaritmo do coeficiente de partição octanol - água ($\text{Log}P_{ow}$) encontram-se principalmente presente nos solos, sedimentos ou lodos, enquanto fenóis com valores mais baixos são encontrados principalmente em reservatórios aquáticos.

Os compostos fenólicos são suscetíveis a reações de alquilação (introdução de um grupo funcional alquila), acetilação (introdução de um grupo funcional acetila - C_nH_nCO), silanização (envolve a substituição de um hidrogênio ácido do composto com um grupo alquil-silício (-SiMe_n)), dentre outras (McMURRY, 2005; NOME, 2002; ZHOU *et al*, 2005; KOVÁCS *et al*, 2008; SARAJI e BAKHSHI, 2005; VERMEULEN *et al*, 2005; KIM e KIM, 2000). Essas reações são utilizadas para contornar a dificuldade no emprego de determinados métodos de extração e até mesmo de detecção de fenóis, pela transformação dos mesmos em compostos secundários.

2.2 CLASSIFICAÇÃO DE FENÓIS

Em face dos danos que esses compostos podem trazer ao meio ambiente e a saúde humana os órgãos nacionais responsáveis têm desenvolvido normas para delimitar a quantidade de fenóis nos resíduos, evitando grandes contaminações ambientais. Pela classificação dos resíduos sólidos, estabelecidos pela ABNT, são estabelecidos os limites máximos tolerados de 200 mg L^{-1} , 400 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} e $0,9 \text{ mg L}^{-1}$ para cresóis totais ou parciais 2,4,5-triclorofenóis, 2,4,6-triclorofenóis e pentaclorofenol, respectivamente, em extratos de ensaios de lixiviação. Caso sejam determinados teores acima dos estipulados pela norma, o resíduo é considerado perigoso. Para extratos de ensaio de solubilização o limite é estabelecido para o teor total de compostos fenólicos, não podendo ultrapassar $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004).

Pela norma NBR 10005 os resíduos sólidos devem ser submetidos a ensaios de lixiviação para classificação como classe I - perigosos e classe II - não perigosos. O ensaio consiste em determinar a

capacidade de transferência de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes no resíduo sólido, por meio de dissolução no meio extrator. O meio extrator pode apresentar $\text{pH} = 4,93 \pm 0,05$ (solução de extração nº1) ou $\text{pH} = 2,88 \pm 0,05$ (solução de extração nº2) e é selecionado após determinações preliminares no resíduo sólido. Para definição do procedimento de exposição ao meio extrator, é necessário determinar se o resíduo apresenta teor de sólidos inferior a 0,5%, superior a 0,5% ou igual a 100%, e verificar se o composto é volátil ou não volátil de acordo com o anexo A.1 da norma (**Anexo 1**).

A NBR 10006 fixa os requisitos necessários para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos, visando diferenciar os resíduos como classe II A - não inertes e classe II B – inertes. No ensaio de solubilização o resíduo, após atender as exigências do tamanho das partículas, é misturado com água na proporção de 1000 mL para 250 g de base seca. Essa mistura é agitada por 5 minutos e então fica em repouso absoluto por 7 dias em uma temperatura de até 25°C.

A resolução CONAMA 357 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e o enquadramento conforme as diretrizes ambientais e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. A classificação é conferida pelo teor de fenóis totais e a tolerância varia de acordo com o tipo de corpo de água. Nas águas destinadas ao consumo humano (salobra e doce de classe 1) a tolerância é de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de fenóis totais, e para as águas não destinadas ao consumo humano e/ou utilização direta o valor estabelecido é de 10 a $60 \mu\text{g L}^{-1}$. Para qualquer lançamento de efluente em corpos de água é permitida uma concentração máxima de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fenóis totais conforme a tabela abaixo (**Tabela 2**) (CONAMA, 2012).

Tabela 2 – Concentração máxima de fenóis totais permitidos em água/ corpos de água (CONAMA, 2012).

<i>Tipo de água</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fenóis totais*</i>
Doce - Classe 1	Abastecimento para o consumo humano (após tratamento adequado), proteção de comunidades aquáticas, recreação de contato primário (natação, esqui aquático, mergulho, etc.), irrigação de hortaliças para consumo cru e frutas que desenvolvam rente ao solo com ingestão crua sem remoção de película.	0,003
Doce - Classe 3	Abastecimento para o consumo humano (após tratamento adequado), irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, pesca amadora, recreação de contato secundário, dessedentação de animais.	0,010
Salina - Classe 1	Recreação de contato primário, proteção de comunidades aquáticas, aquíicultura e pesca.	0,060
Salobra - Classe 1	Recreação de contato primário, proteção de comunidades aquáticas, aquíicultura e pesca, abastecimento para o consumo humano (após tratamento adequado), irrigação de hortaliças, irrigação de hortaliças para consumo cru e frutas que desenvolvam rente ao solo com ingestão crua sem remoção de película, irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.	0,003
Efluente	Qualquer fonte poluidora que lança resíduos em corpos de água.	0,500

*Fenóis totais = mg L⁻¹

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Em função do alto potencial poluidor, é permitida a presença de fenóis em corpos d'água em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a mg L^{-1} , incitando grande atenção em todo o mundo ao desenvolvimento de métodos de determinação. Dessa forma vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de se aprimorar a extração e detecção desses compostos. Atualmente existem alguns métodos padrões determinados pela *Environmental Protection Agency* (EPA) que possibilitam determinações totais ou parciais, fazendo uso de extrações líquido-líquido e determinações por cromatografia gasosa com detecções por captura de elétrons (ECD), ionização em chama (FID) e espectrometria de massa (MS). Esses métodos notavelmente empregam grandes quantidades de solvente além de terem problemas relacionados à sensível perda de analito (EPA, 2012; STANDARD METHODS COMMITTEE, 1993). Nesse contexto, novos métodos de extração e pré-concentração em desenvolvimento empregam técnicas que utilizam pequeno ou nenhum volume de solvente, menor número de etapas e tempo. Dentre as técnicas importantes que tem sido estudadas estão a extração por fluido supercrítico (SFE, *supercritical fluid extraction*), extração com líquido pressurizado (PLE, *pressurized liquid extraction*) ou um líquido aquecido por meio de micro-ondas (MAE, *microwave-assisted extraction*), extração em fase sólida, extração sortiva em barras de agitação (SBSE, *stir-bar sortive extraction*), a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, *matrix solid phase dispersion*) (LANÇAS e RISSATO, 1998; DÓREA e LOPEZ, 2004; LANÇAS, 2003). Dentre as técnicas mais modernas destaca-se a micro-extração em fase sólida desenvolvida por Janusz Pawliszyn em meados de 1990 que faz uso apenas da matriz e uma fibra extratora seguida de análise cromatográfica (ARTHUR, 1990).

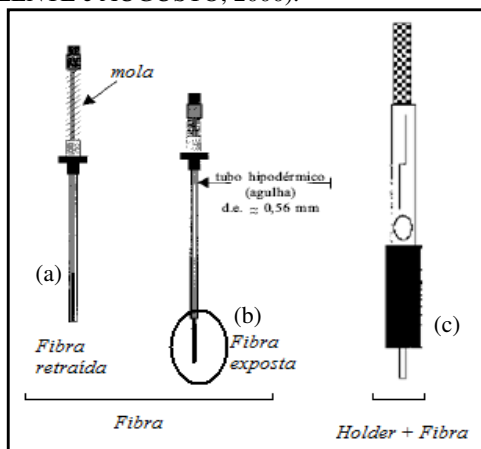
2.3.1 Micro extração em fase sólida

As técnicas de extração por *headspace* (HS) e SPME surgiram da necessidade de se extrair quantidades traço, ou analitos bem específicos em meio a uma amostra de alta complexidade de forma representativa e, ou ainda sem perda de analitos. Além disso, apresentam-se com uma solução à dificuldade da manipulação de microvolumes, como nas micro-extrações em fase líquida). O método de SPME se baseia na pré-concentração e extração de analitos em uma fase de vapor, onde o

analito é necessariamente mais volátil que a matriz. Esse volatiliza preferencialmente podendo ser determinado sem boa parte dos interferentes (outros componentes da amostra), por meio da análise do vapor desprendido contendo o analito (GOBATO e LANÇAS, 2001).

A micro-extração em fase sólida é uma das recentes técnicas desenvolvidas que possibilitam a extração de analitos com a utilização do processo de *headspace*. É amplamente utilizada como método de preparo de amostras no qual os compostos de interesse serão desorvidos e analisados por um instrumento analítico (GC - *Gas Chromatography* ou HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). O analito migra para uma extremidade sólida (fibra) sendo sorvido de acordo com os seus coeficientes de partição entre a matriz (solução) e a fase sólida. (VALENTE e AUGUSTO, 2000; KOLB e ETTRE, 1997) O dispositivo consiste de um bastão de fibra ótica, de sílica fundida (FS), com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero (ex., polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um sólido adsorvente (ex., carvão ativo microparticulado = Carboxen). A fibra fica protegida por um sistema chamado *holder*, uma espécie de agulha com função de perfurar o septo (**Figura 2**) (SUPELCO INC., 1996).

Figura 2 - Dispositivo da fibra de SPME: (a) Posição com a fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico) e (b) posição com a fibra exposta, (c) fibra + *holder* (Adaptado: VALENTE e AUGUSTO, 2000).



As espessuras dos recobrimentos (L_f) de fibras comerciais variam de 7 a 100 μm e seus volumes de 0,03 a 0,7 μL (SHIREY e MANI,

1997). A fibra encontra-se posicionada dentro da agulha que tem a finalidade de proteção, quando não em uso ou na perfuração do septo, antes da exposição da fibra à amostra ou injetor do cromatógrafo. A extração ocorre mergulhando-se a seção recoberta na amostra, ou no seu *headspace*. Algumas fibras disponíveis comercialmente estão relacionadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Fibras comerciais, propriedades e aplicações

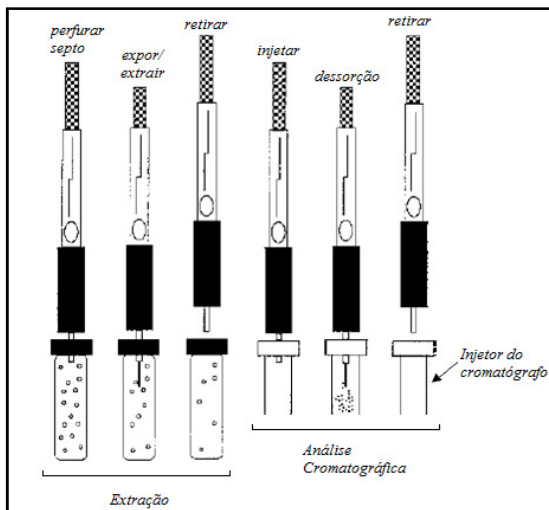
Polaridade	Composição química	Recobrimento (μm)	T (°C) ^a	Aplicação
Apolares	Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	200-280	Principalmente compostos apolares voláteis.
		30	200-280	Compostos apolares voláteis e semi-voláteis.
		7	220-320	Compostos apolares com alto peso molecular.
Polares	Poliacrilado (PA)	85	220-300	Compostos polares como fenóis, pesticidas organofosforados, cetonas, alcoóis.
	Carbowax/ divinilbenzeno (CW-DVB)	65	200-250	Voláteis de média e alta polaridade.
Semi - polares	PDMS-DVB	65	200-270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade
	Carboxen –PDMS	75	250-310	Voláteis

*(Adaptado Supelco Bellefonte, PA)

a = Faixa de temperatura de trabalho recomendada para a fibra

No método a fibra é exposta ao analito contido dentro de um frasco de vidro lacrado com um septo de composição inerte sob controle de agitação e temperatura. A sequência de procedimentos para realizar a extração e a dessorção no injetor do cromatógrafo é mostrada conforme **Figura 3**.

Figura 3 - Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído para análise por GC (VALENTE e AUGUSTO, 2000).



Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminado o tempo de extração a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no equipamento de separação e detecção. No caso de uma análise por cromatografia gasosa, com a fibra retraída o septo do injetor é perfurado, a fibra é exposta para dessorção térmica e, terminada essa etapa, é retraída e a agulha retirada.

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. Um sistema trifásico ideal seria o de uma fibra mergulhada numa matriz aquosa com um *headspace*. Sistemas reais com matrizes reais são mais complexos, pois os analitos podem interagir entre si, com as paredes do frasco e com o bastão de sílica fundida da fibra. A distribuição de massas na extração pode ser descrita a partir do que ocorreria num sistema ideal trifásico: antes da extração, n_0 moles do analito estariam presentes, com uma concentração C_0 , em um volume

V_m da matriz; quando completada a extração se teria n_m^e na matriz aquosa (e =equilíbrio), n_h^e no *headspace* e n_f^e na fibra. A conservação de massa no processo é expressa como:

$$n_0 = n_m^e + n_h^e + n_f^e \quad (1)$$

A Equação 2 correlaciona as constantes de distribuição fibra-matriz, $K_{fm} = C_f^e/C_m^e$, fibra-*headspace* $K_{fh} = C_f^e/C_h^e$ e *headspace*-matriz $K_{hm} = C_h^e/C_m^e$. É obtida da **Equação 1** com as substituições dos volumes e concentrações das fases em equilíbrio, respectivamente, para a matriz, o *headspace* e a fibra, V_m^e e C_m^e , V_h^e e C_h^e , V_f^e e C_f^e :

$$K_{fm} = K_{fh} + K_{hm} \quad (2)$$

Após arranjo das constantes de distribuição, da **Equação 1 e 2**, obtém-se uma equação que fornece a quantidade de analito extraído no sistema no ponto que considera-se atingido o equilíbrio (**Equação 3**) (MESTER *et al*, 2001; VALENTE e AUGUSTO, 2000; DÓREA *et al*, 2008; STASHENKO e MARTINEZ, 2004; WILSON *et al*, 2000).

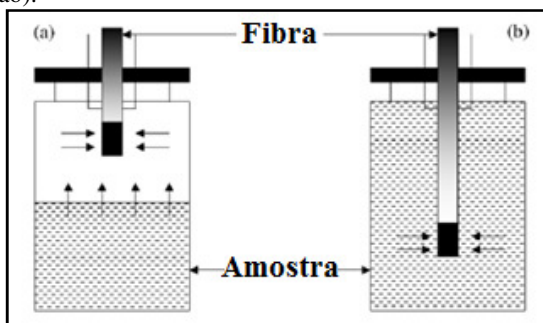
$$n_f^e = \frac{K_{fm} \times V_f \times C_0 \times V_m}{(K_{fm} \times V_f) + (K_{fm} \times V_h) + V_m} \quad (3)$$

2.3.2 Seleção do modo de extração

Os modos existentes são a SPME direta e de *headspace*. Na SPME direta a fibra é exposta em contato direto, ou seja, imersa na matriz. Dessa forma precauções devem ser tomadas para que seja aplicável a matrizes ácidas, líquidas contendo particulados e a matrizes sólidas para evitar trabalhos infrutíferos, uma vez que a fibra é um material muito sensível o que alteraria suas característica e capacidade de extração após cada procedimento. Já o modo *headspace* expõe-se a fibra sobre a matriz não havendo um contato direto e aumentando a vida útil da fibra. Em geral é indicado para analitos de média e alta volatilidade (MESTER *et al*, 2001) (**Figura 4**). Analitos polares, principalmente com hidrogênio ativo (alcoóis, fenóis, ácidos carboxílicos, aminas, etc.), podem tornar a extração por *headspace* mais difícil devido as fortes interações intermoleculares entre o analito e a

matriz. Para contornar tal dificuldade e aumentar a volatilidade do analito pode-se alterar a força iônica do meio com a adição de sal (ex. NaCl), aumentar a temperatura da solução com utilização de banhos térmicos ou ainda acidificar a amostra (ex. adição de HCl). Reações de derivatização (esterificação, transesterificação, acetilação, etc.) dos analitos também podem ser utilizadas como forma de aumentar a volatilidade do composto e a seletividade da extração, e ainda auxiliar na separação de compostos que coluem em métodos de separação e análises como os cromatográficos (STASHENKO e MARTINEZ, 2004; WILSON, 2000). No processo de derivatização emprega-se um composto que deve reagir o mais especificamente possível com o analito gerando um produto secundário de maior volatilidade e menor interação com a matriz. Dessa forma, o analito fica mais disponível na fase gasosa, sendo sorvido pela fibra, a qual deve apresentar composição seletiva ao novo composto.

Figura 4 - Modos de operação de SPME: (a) headspace e (b) amostragem direta (imersão).



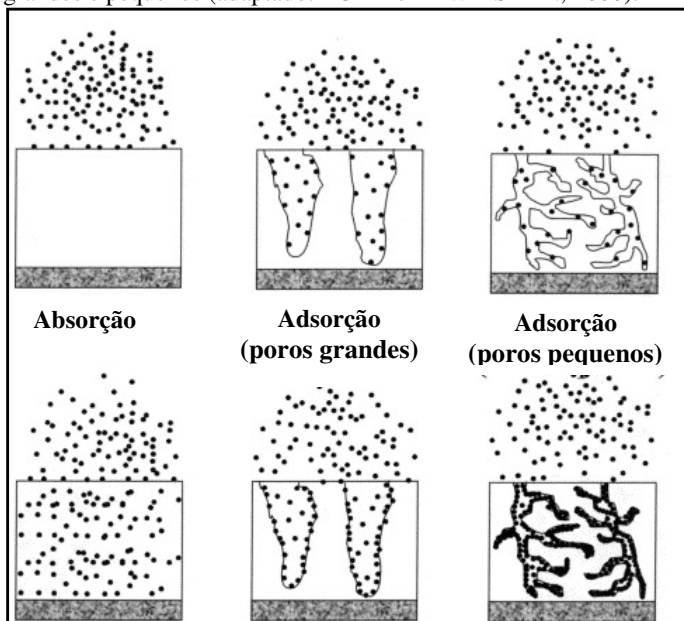
2.3.3 Seleção do tipo de fibra, volume, agitação e tempo de extração

A escolha do tipo de revestimento é um fator de grande importância, pois envolve a garantia de uma boa seletividade para os analitos de interesse a ser utilizada na extração. Existem sugestões gerais de uso para as fibras comercialmente disponíveis conforme descritos na **Tabela 3**, que são úteis como ponto de partida, mas devem ser testadas experimentalmente de forma a verificar qual fornece a melhor condição para os analitos que se pretende extrair.

O desempenho da extração é substancialmente alterado ao se escolher entre uma fibra de composição líquida ou sólida (**Figura 5**). Quando se trabalha com revestimentos líquidos as moléculas do analito são

absorvidas pelas moléculas do revestimento permitindo que as moléculas se difundam e penetrem no revestimento em um tempo razoável de extração. No caso de revestimentos sólidos, um processo de adsorção é observado, onde o material apresenta uma estrutura cristalina e caráter denso, reduzindo o coeficiente de difusão do analito no interior da estrutura. Assim a extração ocorre apenas na superfície da fibra (LORD e PAWLISZYN, 2000).

Figura 5 - Representação de extração absorptiva envolvendo fibras com revestimentos líquidos e adsorptivas envolvendo revestimentos sólidos com poros grandes e pequenos (adaptado: LORD e PAWLISZYN, 2000).



Outro fator a ser considerado é o volume de amostra a ser utilizado, uma vez que a sensibilidade da técnica depende do número de mols do analito extraído da amostra. Portanto a escolha do volume deve ser feita com base na faixa de concentração de analito adotada na rotina para que se trabalhe dentro da faixa de sensibilidade da fibra. Uma vez definido o volume, a quantidade de composto extraída é proporcional à concentração de analito inicial da amostra se o equilíbrio é atingido.

O tempo para se atingir o equilíbrio tende ao infinito, por esse motivo se adota um tempo de equilíbrio prático. A **Equação 4**, expressa o tempo para atingir o equilíbrio, t_e , em função da espessura do

recobrimento (L_f) e do coeficiente de difusão do soluto nessa camada (D_f), utilizando um tempo que corresponde a extração de 95% da massa que seria extraída após um tempo infinito de extração (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_f^2}{2D_f^2} \quad (4)$$

Aumentos na espessura do recobrimento, apesar de propiciar uma maior quantidade de analito retido pela fibra, geram maiores tempos de extração. Por outro lado outros parâmetros de operação devem ser cuidadosamente avaliados, como a temperatura e o nível de agitação da amostra durante a extração, a fim de otimizar a difusão do analito na fibra (DÓREA, 2008). Em amostras gasosas a convecção natural e difusão garantem um rápido equilíbrio, mas em matrizes aquosas se faz necessário a utilização de técnicas de agitação que atuará de forma a abreviar o processo uma vez que a transferência de massa é favorecida (MESTER *et al.*, 2000; SEMENOV *et al.*, 2000). Com uma aproximação pode-se simular a existência de uma hipotética camada limite, de raio δ , sem agitação chega-se a um modelo (**Equação 5**) que é uma variação da **Equação 4**. Uma agitação perfeita ocorre apenas fora da camada limite, o δ da camada estática depende da taxa de agitação. Quanto maior a taxa de agitação menor é δ . O tempo máximo de extração pode ser calculado pela **Equação 5** na qual D_m é o coeficiente de difusão do analito na matriz (URICH, 2000).

$$t_e \approx t_{95} = 3 \times \frac{\delta \times K_{fm} \times L_f}{D_m} \quad (5)$$

A agitação magnética, por sua simplicidade, é a mais comumente utilizada. Outras técnicas demandam dispositivos mais complexos como, por exemplo, vibração da fibra usada em injetor automático, movimentação circular do frasco, e sonicação, que diminui o tempo de equilíbrio, mas pode adulterar a amostra (MESTER *et al.*, 2000; VALENTE e AUGUSTO, 2000; URICH, 2000).

2.3.4 Estudos realizados

Muitas aplicações de SPME relacionadas a extrações de analitos nas mais diferenciadas matrizes são encontradas na literatura. Assim, se evidencia a importância de um estudo minucioso para desenvolvimento de métodos para matrizes específicas. Nesse sentido, OHLENBUSCH *et al.*, em 2000, estudaram a extração de fenol e fenóis halogenados a partir de matéria orgânica presente em meio aquoso.

Em 2010, LÓPEZ-DARIAS *et al.* desenvolveram um método para determinação e quantificação de poluentes em meio aquoso com o uso de uma fibra com recobrimento polimérico por um líquido iônico. Compararam a extração entre a fibra com o novo recobrimento e fibras comerciais como PDMS e PA.

Ainda em 2010, PIZARRO *et al.* estudaram a micro-extração em fase sólida por *headspace* de alguns compostos fenólicos a partir de matriz de cerveja. DELGADO *et al.*, em 2011, analisaram o perfil de voláteis no queijo espanhol de leite de cabra cru (“Queso Ibores”) em quatro estágios de maturação (1, 30, 60 e 90 dias). Em 2012, SAKHVIDI *et al.* aplicaram a técnica de SPME para a amostragem e quantificação de três anestésicos inaláveis: halotano, soflurano e sevoflurano em ar de ambiente operacional. Os autores estudaram os parâmetros temperatura, umidade e velocidade do ar com extração por meio da fibra CAR-PDMS.

2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA E MÉTODOS DE DETECÇÃO

Reservatórios de água e aquíferos estão expostos a contaminações de milhares de micropoluentes de fontes industriais, farmacêuticas, da agricultura e de origens naturais. Em muitos países a concentração de poluentes é controlada por programas regulatórios da qualidade de água. Para tal tarefa são comumente utilizados métodos baseados em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas ou, líquida com detecção de fluorescência/ultravioleta-visível (UV) (SAKHVIDI *et al.*, 2012).

A cromatografia gasosa foi introduzida por James e Martin em 1952 (JAME *et al.*, 1952) e tem como base a separação de substâncias de uma amostra. A técnica consiste atualmente na injeção da amostra, na forma líquida e imediata vaporização, ou gasosa, seguido de arraste através da coluna cromatográfica pelo gás de arraste, a fase móvel (gás inerte: N₂, He, Ar). Na coluna se dá a distribuição dos componentes entre a fase estacionária e fase móvel e a diferença na interação dos

analitos entre essas duas fases leva à separação dos analitos. A fase estacionária se caracteriza pelo recobrimento da coluna que pode ter diferentes polaridades dependendo do analito que se quer determinar.

Na saída da coluna encontra-se o detector que proporciona um sinal elétrico que é amplificado e registrado gerando um cromatograma característico das espécies analisadas.

Existem vários tipos de detectores usados em cromatografia gasosa como descrito na **Tabela 4**. O desenvolvimento de detectores provem da necessidade de sistemas de detecção que possuam respostas seletivas para grupos particulares de compostos para simplificar os cromatogramas de amostras complexas. A seletividade dos tipos de detectores é classificada como não-seletivos (ou universal) para os detectores que respondem a todos os compostos que se diferenciam do gás de arraste, seletivos que respondem a uma faixa de compostos que apresentam alguma propriedade química ou física em comum e, ainda específicos que respondem a um único grupo químico (BAUGH, 1994).

Tabela 4 - Detectores de cromatografia gasosa.(adaptado: BAUGH, 1994)

Detector	Seletividade	Detectabilidade
Flame ionization (FID)	Maioria dos compostos orgânicos	100pg
Thermal Conductivity (TCD)	Universal	1ng
Electron Capture (ECD)	Haletos, nitratos, nitrilas, peróxidos, anidridos, organometálicos	50fg
Nitrogen-phosphorous (NPD)	Nitrogênio, fósforo	10pg
Flame photometric (FPD)	Enxofre, fósforo, boro, arsênio, germânio, selênio, cromo	100pg
Photo-ionization (PID)	Alifáticos, aromáticos, heterocíclicos, cetonas, ésteres, aldeídos, aminas, organosulfurados, alguns organometálicos, O ₂ , NH ₃ , H ₂ S, HI, ICL, Cl ₂ , I ₂ , PH ₃	2pg
Microchannel plates – Mass spectrometry (MCP-MS)	Maioria dos compostos orgânicos	--
Electron Multiplier – Mass spectrometry (EM-MS)	Maioria dos compostos orgânicos	--

Ao se proceder com o desenvolvimento de um método para análise de determinados compostos, alguns parâmetros devem ser ajustados. O tipo de injeção *split/ splitless* é definido de acordo com a abundância do analito. Quando em pequenas quantidades deve ser evitado o modo *split*, pois utiliza diluição e fracionamento da amostra injetada influenciando de forma quantitativa na detecção dos analitos. A coluna cromatográfica interfere de forma qualitativa, pois nela ocorre a separação dos analitos por afinidade química. A qualidade da separação pode ainda ser complementarmente influenciada pela alteração de temperatura e o fluxo do gás de arraste. Programações de aquecimento da coluna no forno cromatográfico ao longo da separação podem fornecer uma melhor definição dos picos dos analitos, evitando algumas vezes eluição simultânea dos compostos ou ainda abreviando o tempo de corrida. O controle do fluxo de gás de arraste também contribui para a qualidade da separação dos compostos.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Para a micro-extração em fase sólida foram utilizados frascos de 20 mL com lacre de alumínio e septo de silicone, fibras de poliacrilato (PA) e de polidimetilsiloxano (PDMS) da Sigma Aldrich, BelleFonte, USA. Para os meios extratotes utilizou-se cloreto de sódio (NaCl), ácido clorídrico (HCl), anidrido acético, mistura de fenóis (19 compostos 2000 µg mL⁻¹ cada em isopropanol - *AccuStandard*[®] - (**Anexo B**)), e água tipo Mili-Q.

No método comparativo empregando extração líquido-líquido foram utilizados funis de separação de 125 mL, balões de fundo redondo de 50 mL, e balões volumétricos para preparo das soluções a serem recuperadas. Como padrão interno utilizou-se fenol deuterado (Sigma-Aldrich, USA).

Para o desenvolvimento da metodologia indicada pela ABNT para extração de fenóis em resíduos sólidos utilizou-se os materiais e reagentes recomendados pela norma para os ensaios de lixiviação (ácido acético glacial, água MiliQ) e solubilização, assim como os citados acima para micro-extração em fase sólida.

Para a detecção dos compostos foram utilizados os equipamentos: Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas PolarisQ da Thermo Scientific (CG-MS).

4.2 LIMPEZA DE MATERIAL

As vidrarias utilizadas passaram por procedimento de limpeza previamente, para eliminação da presença de possíveis contaminantes, o que comprometeria o resultado das análises. O procedimento consistiu em imergir o material em um banho de detergente (Extran a 5% v/v) por aproximadamente 24 horas, seguido de enxágues exaustivos em água da torneira e em seguida com água ultrapura (Mili-Q[®]). Após esse procedimento as vidrarias foram calcinadas em forno mufla a 400°C por 4 horas.

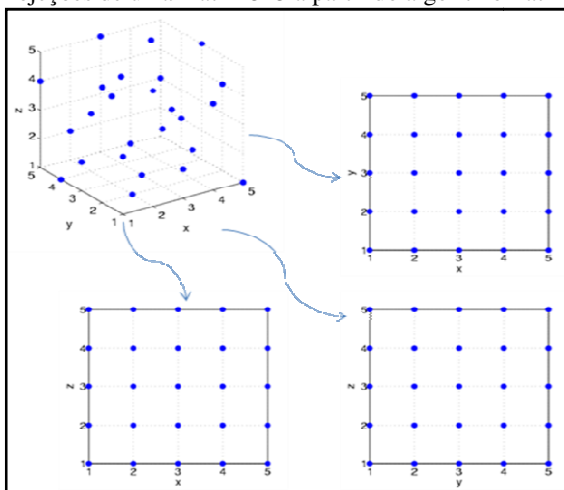
As fibras de SPME novas foram submetidas a um processo de condicionamento antes do início das análises conforme indicação do fabricante. Permanecendo entre meia a uma hora na temperatura indicada de acordo com a composição da fibra no injetor do cromatógrafo. Nos dias de análises as fibras foram submetidas a limpezas térmicas sucessivas até a obtenção de um cromatograma sem a

presença dos compostos analisados. Após a rotina de análises, passa-se novamente por um ciclo de limpeza térmica devido a possibilidade de ocorrência de efeito de memória.

4.3 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS POR SPME

Visando encontrar uma combinação de parâmetros que resulte na melhor extração de possíveis fenóis presentes em meio aquoso, buscou-se o desenvolvimento de uma técnica de otimização com o auxílio do software **modeFrontier**[®]. Inicialmente foi desenvolvido um planejamento de experimento (DOE, *design of experiment*) visando a extração de fenóis sem derivatização, com utilização de fibra de poliacrilato (PA). Outro planejamento com extração de fenóis derivatizados (na forma de ésteres) e uso da fibra de polidimetilsiloxano (PDMS), seguida de detecção por GC-MS. O algoritmo utilizado para gerar as configurações iniciais foi *Latin Square* (LS), o qual é dependente do número de níveis e independe do número de variáveis, em que cada variável de entrada apresentará o mesmo número de níveis **m** (MONTGOMERY, 2001). O modelo tem como característica um número de pontos **m²**, onde para uma escolha de 5 níveis, como no presente trabalho, são gerados uma lista de 25 pontos independente do número de variáveis (**Figura 6**). Há uma enorme vantagem em relação ao modelo *Full Factorial* (FF) em termos de pontos gerados, que necessita de **mⁿ** pontos, onde **n** é o número de variáveis de entrada, assim aumentando exponencialmente o número de pontos requeridos. O modelo LS varre praticamente o mesmo espaço de informações que o FF, embora com menor número de pontos. Essa propriedade é alcançada devido às projeções do planejamento LS no espaço gerado entre duas variáveis ter as mesmas características que o *Full Factorial*.

Figura 6 - Projeções de uma matriz 5x5 a partir do algoritmo Latin Square.

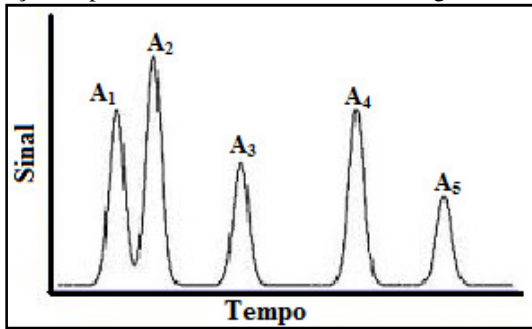


4.3.1 Metodologia de planejamento e otimização para extração com fibra de poliacrilato

Foram utilizados frascos de 20 mL com septo de silicone e lacre de alumínio, onde foram adicionados um volume total de 4 mL de uma solução aquosa de concentração final de fenóis de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo uma mistura de 19 compostos fenólicos, e a agitação foi fixada para todas as análises.

Como variáveis de entrada foram definidas: temperatura na faixa de 25 a 60 °C, concentração de NaCl com saturação de 0% a 104% (m/v), volume de HCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) de 0 a 300 μL e tempo de extração de 10 a 3600 segundos, que foram definidas como as variáveis de maior importância na extração com base em estudo prévio na literatura disponível. Para cada combinação do planejamento LS foi realizado a integração dos picos de todos os compostos detectados com o intuito medir o reflexo da variação das condições dos parâmetros estudados no sinal de cada composto. Através dessas medidas definiu-se como variáveis de saída a média das áreas dos picos (A_{Med}) e menor valor de área (A_{Min}) obtidos nos cromatogramas conforme apresentado na **Figura 7** e descrito matematicamente pela **Equação 6**.

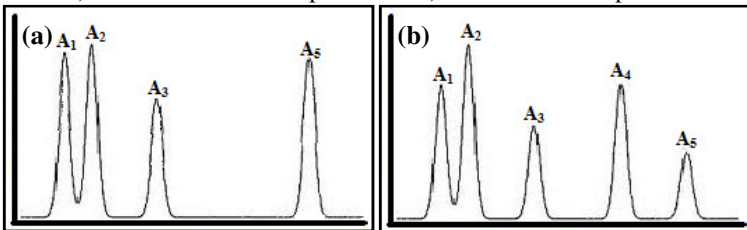
Figura 7 - Ilustração de picos e suas áreas em um cromatograma.



$$A_{Méd} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A_i ; \quad A_{Min} = \min[A_i] \quad i \in [1, n] \subset \mathbb{N} \quad (6)$$

Neste experimento o objetivo é que se maximize a área média, no entanto deve obrigatoriamente haver a presença de todos os componentes da mistura. Sendo assim, não basta simplesmente a maximização de $A_{méd}$ pois alguns dos compostos podem deixar de ser extraídos, conforme ilustrado na **Figura 8**.

Figura 8 - a) Área média alta com pico nulo. b) Área média sem pico nulo.



Com o intuito de impedir tal comportamento incorporou-se uma restrição na menor área medida (A_{min}). Essa preocupação foi baseada em dados da literatura que relatam que em SPME com o passar do tempo pode haver expulsão de alguns compostos de menor afinidade já presentes na fibra devido a maior afinidade por outros ainda presentes no *headspace* quando se utiliza fibras que apresentam revestimentos adsorvivos (LORD e PAWLISZYN, 2000; SUKOLA *et al*, 2001). Embora seja utilizado apenas os recobrimentos adsorvivos no presente trabalho, esse fator foi levado em consideração, assim o tempo de extração entrou como uma das variáveis do método.

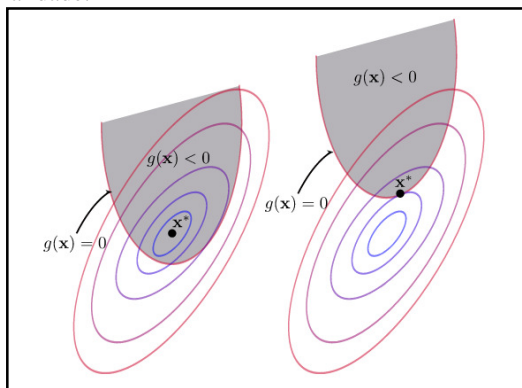
Após a definição das métricas o problema de otimização é postulado como segue:

$$\begin{aligned} \max \quad & f(x)=A_{med}(x) \\ \text{Sujeito à} \quad & g(x)=A_{min}(x)-A_{crit} > 0 \\ \text{onde } x = & \{Tempo;Temp;[NaCl];[HCl]\} \end{aligned} \quad (7)$$

Onde a condição de otimalidade para a **Equação 7** é conhecida como condição KKT (*Karush Kuhn Tucker*) (RAO, 2009) como segue abaixo na **Equação 8 e Figura 9**:

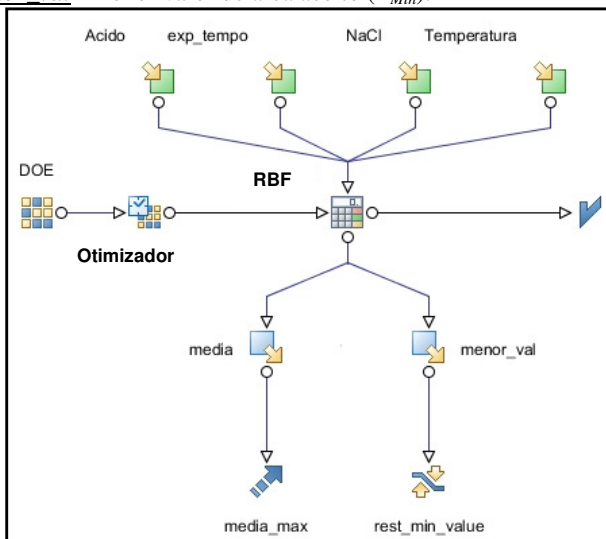
$$\nabla f + \lambda \nabla g = \nabla A_{med} + \lambda \nabla A_{min} = 0 \quad (8)$$

Figura 9 - Exemplificação gráfica da condição de KKT para determinação da condição de otimalidade.



Para representação de A_{med} e A_{min} em relação aos parâmetros de entrada foi utilizada uma técnica de interpolação conhecida como bases radiais (RBF – *Radial Basis Function*) dos quais precisam ser alimentados com dados de entrada e saída. Sendo assim, para configurar a RBF foi utilizado LS com o número de níveis de $m = 5$ e replicatas de alguns pontos. A metodologia está exemplificada no fluxo de trabalho na figura abaixo (**Figura 10**).

Figura 10 - Fluxo de trabalho para HS-SPME-PA. Como variáveis de entrada foram definidas: *temperatura* - na faixa de 25 a 60 °C, *NaCl* - concentração com saturação de 0% a 104%, *ácido* - volume de HCl (1,0 mol L⁻¹) de 0 a 300 µL e *exp tempo* - tempo de extração de 10 a 3600 segundos (10^x, para 1,000 < x < 3,558). Para variáveis de saída adotou-se a *média* - média das áreas dos picos (*A_{Méd}*) e *menor_val* - menor valor de área aceito (*A_{Min}*).



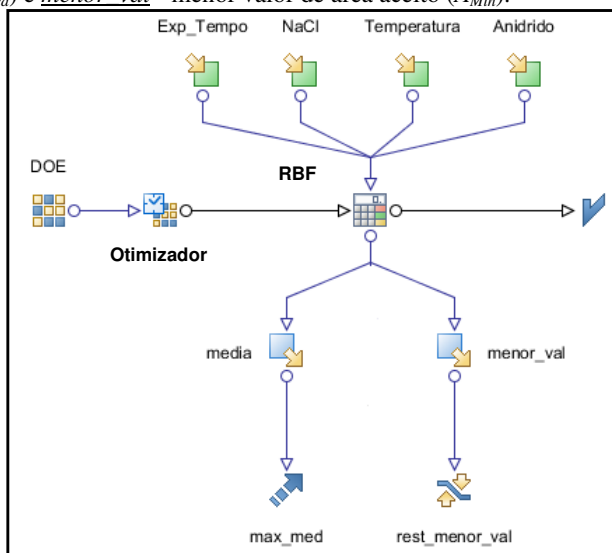
Para as análises cromatográficas seguiu-se uma programação que foi previamente estudada e definida com temperatura do injetor, no modo *splitless*, de 250°C, rampa de aquecimento (50 °C por 5 min, 6,0 °C min⁻¹ até 120,0 °C, 8,0°C min⁻¹ até 220,0°C, 15,0 °C min⁻¹ até 280,0°C por 5 min), fluxo 1,0 mL min⁻¹, *splitless time* 0,5 min. Um sistema GC-MS PolarisQ da Thermo, com uma coluna DB5 (5% fenila–95% dimetilsiloxano) dimensões: 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm.

4.3.2 Metodologia de planejamento e otimização para extração com fibra de polidimetilsiloxano

Foram utilizados frascos de 20 mL septo de silicone e lacre de alumínio, volume total de 4 mL, concentração final de fenóis de 100 µg L⁻¹ de uma *mistura* de 19 compostos fenólicos e a agitação foi mantida para todas as análises. Como variáveis de entrada foram definidas: temperatura na faixa de 25 a 60 °C, concentração de cloreto de sódio (NaCl) com saturação de 0% a 104%, volume de anidrido acético de 20

a 500 μL e tempo de extração de 30 a 3600 segundos, que foram definidas como as variáveis de maior importância na extração com base em estudo prévio na literatura disponível. Para cada combinação do planejamento LS foi realizado a integração dos picos de todos os compostos detectados com o intuito de medir a influência de cada um. Através dessas medidas definiu-se como variáveis de saída a média das áreas dos picos ($A_{Méd}$) e menor valor de área (A_{Min}) no cromatograma conforme raciocínio desenvolvido para a metodologia com a fibra PA. O pH foi mantido em torno de 11, pela adição de carbonato de sódio no meio aquoso, previamente à adição de anidrido para facilitar a reação de derivatização. A metodologia está exemplificada no fluxo de trabalho na **Figura 11**.

Figura 11 - Fluxo de trabalho HS-SPME-PDMS. Como variáveis de entrada foram definidas: temperatura - na faixa de 25 a 60 $^{\circ}\text{C}$, NaCl - concentração com saturação de 0% a 104%, anidrido - volume de anidrido acético de 20 a 500 μL e exp tempo - tempo de extração de 30 a 3600 segundos (10^x , para $1,477 < x < 3,556$). Para variáveis de saída adotou-se a média - média das áreas dos picos ($A_{Méd}$) e menor val - menor valor de área aceito (A_{Min}).



4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE SPME E MÉTODO PADRÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A Associação Brasileira de Normas Técnicas determina que o resíduo sólido industrial deva passar por ensaios de lixiviação e solubilização para ser classificado e então descartado adequadamente. Partindo desse princípio se escolheu para a comparação entre os métodos a simulação de um extrato de solubilizado, que nada mais é do que um meio aquoso com compostos nele solúveis após contato da amostra por 7 dias (168 horas) a 25°C. O limite máximo permitido pela norma é 0,01 mg L⁻¹ de fenóis totais, sendo que no presente trabalho foram considerados os 2, 3 e 4-metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6-tCF e 2,4,5-tCF) e pentaclorofenol (pCF); sendo esses os compostos avaliados pelos métodos executados. Dois métodos foram adotados para comparação, um deles é a micro-extração em fase sólida com fibra PA com determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. O segundo é o método de referência, CFR - 6420 da *Standard Methods Committee* de extração líquido-líquido com determinação por cromatografia gasosa, sugerido pela ABNT.

As concentrações utilizadas para enriquecimento da água e analisadas pelo método CFR-6420 foram 6, 15 e 20 µg L⁻¹ e para o SPME foram 6, 10 e 15 µg L⁻¹. Todas as soluções foram feitas em triplicata gerando 9 experimentos para cada metodologia.

As quantidades de ácido e sal, o tempo de extração e temperatura utilizados foram os obtidos com a otimização anteriormente realizada. A curva de calibração seguiu a faixa de valores 1 a 150 µg L⁻¹ com 7 pontos, sendo que cada ponto passou pelo método de extração da mesma forma que as amostras simuladas.

No método referência adotou-se as determinações já estipuladas (STANDARD METHODS COMMITTEE, 1993), adaptando para um volume menor de amostra. O método estipula a utilização de aproximadamente 1,0 litro de solução e funis de separação de 2,0 litros para alguns procedimentos de controle de qualidade. Então, optou-se por utilizar aproximadamente 60 mL de solução de água ultra pura com a mistura de fenóis ajustando-se o pH na faixa de 1 a 2. Após isso, foram realizadas 3 extrações líquido-líquido consecutivas com 4,0 mL de diclorometano. Posteriormente as amostras foram pré-concentradas por rotaevaporação seguida por uma concentração final com nitrogênio gasoso até a eliminação completa do solvente. Todas as amostras foram reavolumadas para 1,5 mL com 2-propanol e adição de padrão interno

(fenol deuterado – 300 $\mu\text{g L}^{-1}$), aplicando então a detecção e quantificação por GC-MS.

O método CFR - 6420 sugere as condições cromatográficas a serem utilizadas, porém com a utilização de uma coluna empacotada. No equipamento disponível no laboratório utiliza-se coluna capilar. Dessa forma, seguiu-se com uma programação especificamente desenvolvida para esta análise: temperatura inicial de 40°C por 7 min, 5 °C min^{-1} até 70 °C (2 min), 10°C min^{-1} até 220 °C, 15°C min^{-1} até 280°C (5 min). Todas as amostras foram obtidas em triplicata gerando 9 experimentos.

A curva de calibração foi desenvolvida com 7 pontos numa faixa de concentração de 50 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, pelo método de adição de padrão interno utilizando fenol deuterado ($\text{C}_6\text{D}_5\text{OD}$).

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA A ANÁLISE DE EXTRATOS LIXIVIADOS E SOLUBILIZADOS DE RESÍDUOS SÓLIDOS SEGUNDO NBR10004/ 10005/ 10006

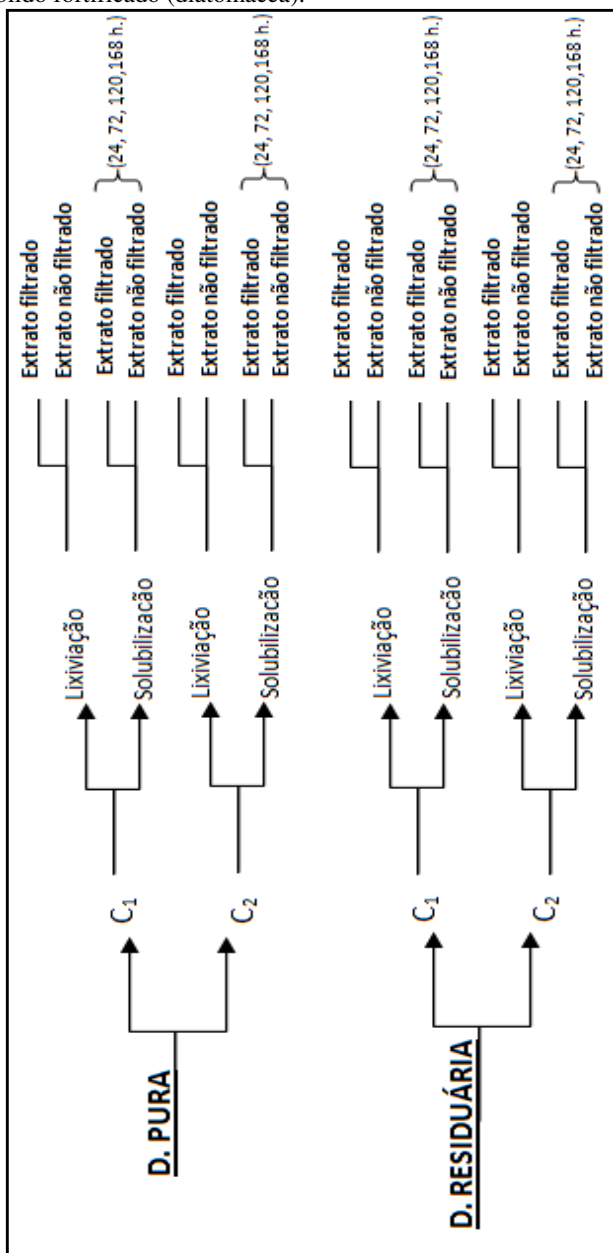
Visando analisar o comportamento de extração do método frente a extratos líquidos obtidos após aplicação de ensaios de lixiviação e solubilização em resíduos sólidos buscou-se uma aplicação em amostra real. Algumas modificações nos ensaios estabelecidos foram feitas com o intuito de se verificar o nível de compatibilidade com a extração de fenóis e perdas durante o processo. A amostra selecionada foi diatomácea, material utilizado na filtração e purificação de biodiesel. Para um melhor mapeamento, no estudo utilizou-se a diatomácea pura (D.P.) antes de passar pelo processo, e isenta de contaminantes, e diatomácea residuária (D.R.), obtida posteriormente ao processo de purificação. Foram realizados testes de branco com as amostras sem enriquecimento para constatar a ausência dos analitos. Posteriormente foi realizado o ensaio de lixiviação com as duas matrizes selecionadas, onde previamente utilizou-se 4,0 gramas da base seca enriquecendo com analito em duas concentrações de 0,003 mg / 4,0 g e 0,120 mg / 4,0 g.

Para a lixiviação seguiu-se com o procedimento para compostos não voláteis segundo a norma. Fez-se uso de 30 mL de solução extratora 1 (solução ácida) conforme definido pela norma ABNT NBR10005:2004. A amostra foi deixada sob agitação por aproximadamente 18 horas. A etapa de filtração sugerida pela norma foi testada em duplicata: uma passou por filtração e a outra sem passar pelo processo, sendo ambas posteriormente extraídas por SPME.

Para o ensaio de solubilização a proporção de analito/base seca foi a mesma utilizada na lixiviação, seguindo com a adição de água MiliQ na proporção 250 g / 1500 mL, sugerida pela norma ABNT NBR10006:2004. Para a extração por SPME apenas uma alíquota do extrato foi utilizada e avolumada para os 4,0 mL no frasco de micro-extração, pois a concentração encontrava-se em nível de mg L^{-1} . Avaliou-se os extratos obtidos após 24, 72, 120 e 168 horas quanto à concentração dos analitos uma vez que a norma fixa 7 dias de extração. Todos os testes foram feitos em duplicatas para se testar a etapa da filtração, como segue fluxograma abaixo (**Figura 12**).

Previamente à extração por SPME, os extratos de lixiviação e solubilização foram diluídos para que a concentração na solução de extração de fenóis tivesse o limite máximo de 500 ou 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, evitando saturação da fibra e desvio da linearidade da extração. Esse procedimento foi tomado com base na coloração amarelo forte apresentada pelos extratos característica da presença de fenóis, indicando alta concentração extraída dos resíduos. Considerando que todo o fenol usado na fortificação das matrizes fosse transferido para o meio extrator as concentrações ficariam na casa de 500 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os extratos solubilizados e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os lixiviados segundo as fortificações de 0,003 mg / 4,0 g e 0,120 mg / 4,0 g.

Figura 12 - Fluxograma dos ensaios de lixiviação e solubilização a partir do resíduo sólido fortificado (diatomácea).



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

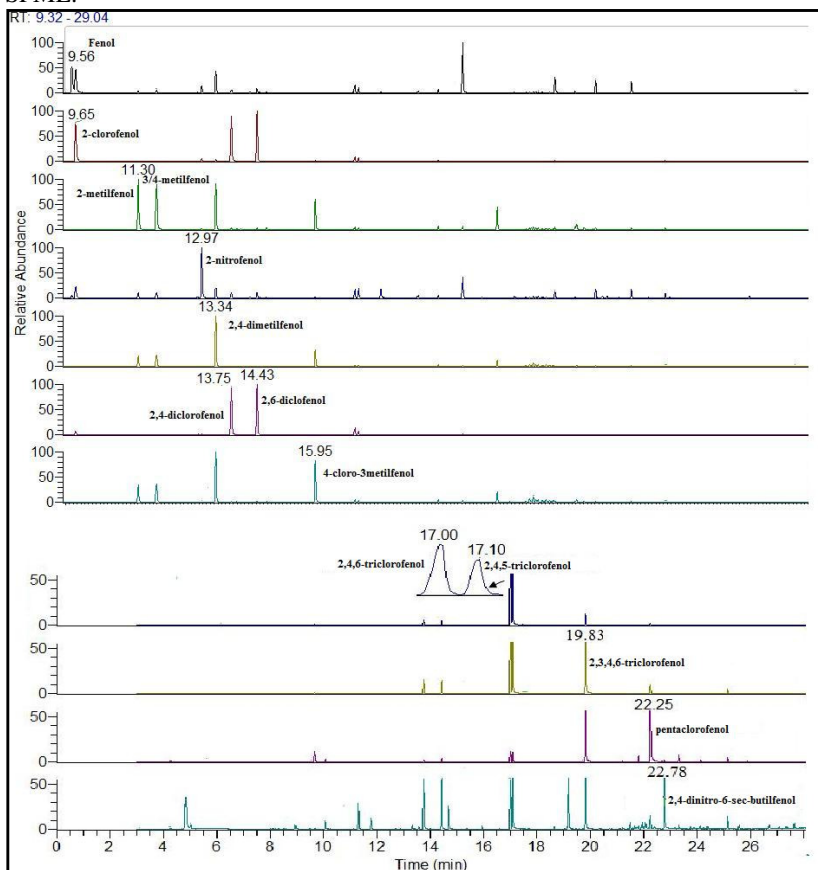
5.1 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE FENÓIS POR SPME

A mistura de fenóis utilizada no experimento possui uma combinação de 19 compostos. No entanto, alguns compostos apresentaram baixo nível de detecção e não foram incluídos nas etapas seguintes de otimização e recuperação. Abaixo na **Tabela 5** e **Figura 13** encontram-se os diagramas cromatográficos onde são apresentados os cromatogramas parciais com os respectivos tempos de retenção e a ordem de eluição dos fenóis e também os fragmentos usados na identificação dos compostos.

Tabela 5 - Analitos e fragmentos utilizados para identificação dos fenóis por GC-MS

Analito	Fragmentos (m/z)
Fenol	65, 66, 94
2-clorofenol	63,100, 128
2-metilfenol	51, 77, 89, 108
3/4-metilfenol	51, 77, 89, 107
2-nitrofenol	65, 81, 93, 109, 139
2,4-dimetilfenol	51, 77, 107, 122
2,4-dicloro	63, 73, 98, 126, 162
2,6-dicloro	63, 73, 99, 126, 162
4-cloro-3-metilfenol	51, 77, 107, 142
2,4,6-triclorofenol	62, 97, 132, 160, 196
2,4,-5triclorofenol	61, 97, 132, 160, 197
2,3,4,6-tetraclorofenol	61, 96, 131, 166, 196, 232
Pentaclorofenol	60, 95, 130, 167, 202, 230, 266
Dinoseb	89, 117, 133, 147, 163, 211, 240

Figura 13 - Cromatogramas dos compostos fenólicos por GC-MS com os respectivos fragmentos característicos dos fenóis utilizados na extração por SPME.



Com o resultado obtido pelo planejamento LS foi possível identificar que a extração com a fibra PA mostrou-se muito mais robusta do que pela extração com a fibra PDMS. As áreas médias obtidas pela extração com a fibra poliacrilato apresentaram uma distribuição mais uniforme, com um desvio padrão médio ($\sigma_{Méd}$) das áreas 6,5 vezes menor em relação a PDMS (**Apendice A1 e B1**).

O desvio médio é calculado de acordo com a **Equação 9**.

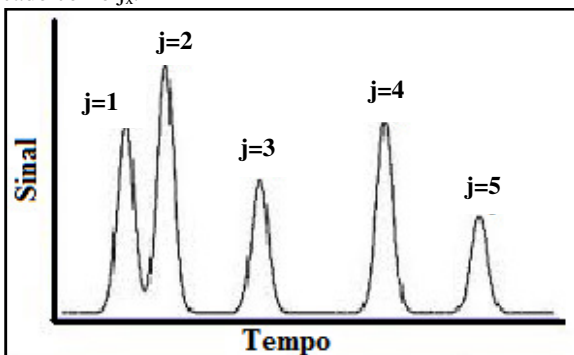
$$\sigma_{Méd} = \frac{1}{m} \times \left(\sum_{i=1}^m \sigma_i \right) \quad (9)$$

Onde m é o número de experimentos e $\sigma_{Méd}$ é o desvio médio. Sendo que o desvio de cada experimento é definido como:

$$\sigma_i = \sqrt{\frac{1}{n-1} \left(\sum_{j=1}^n (A_j^i - A_{Méd}^i)^2 \right)} \quad (10)$$

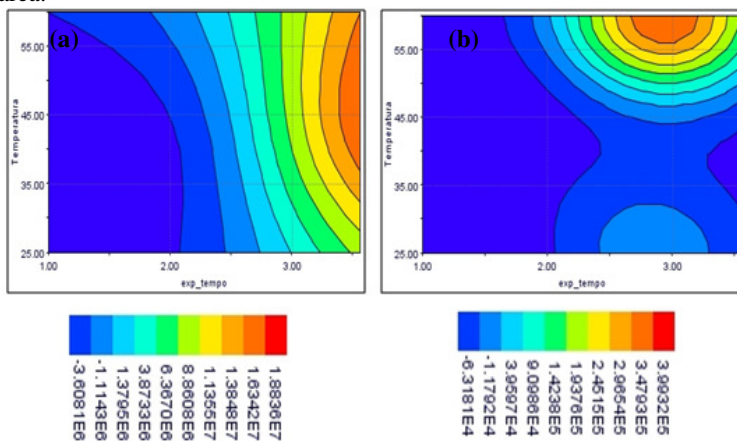
Onde n é o número de áreas ou picos em um dado cromatograma e j cada pico como ilustrado na **Figura 14**.

Figura 14 - Ilustração para o procedimentos de cálculo de desvio, em que cada pico é identificado como j_x .



Além da questão dos desvios altos outro problema da metodologia com a fibra PDMS é a necessidade de utilizar o agente derivatizante em excesso em relação à concentração de fenol para garantir a condição de otimalidade. Isso representa uma dificuldade quando se trabalha com amostras reais no qual fica difícil definir o excesso de anidrido uma vez que a concentração de fenóis não é conhecida. Com base nessas dificuldades apresentadas com a fibra PDMS, adotou-se o DOE do método de extração com a fibra PA para a criação da superfície de resposta conforme **Figura 15**.

Figura 15 - Aproximação por Função de Base Radial (a) média e (b) mínima área.



Na **figura 15** as regiões dentro do intervalo de cor vermelha apresentam os maiores valores tanto para $A_{méd}$ e A_{min} , já para o intervalo azul localizam-se os menores valores. Observando-se o gráfico de $A_{méd}$ nota-se que a temperatura deve ser escolhida na região de 45 °C, e o expoente tempo em torno de 3,6, resultando em 1 hora. Entretanto, analisando A_{min} nota-se que os maiores valores encontra-se na região de temperatura 60 °C e expoente de tempo 2,8, com tempo aproximadamente de 10 minutos. Logo para encontrar o ponto ótimo recorre-se a **Equação 7**, a qual estabelecesse um valor crítico (A_{crit}) para A_{min} . Além disso, graficamente é impossível visualizar as outras variáveis simultaneamente, em consequência buscou-se utilizar um algoritmo de otimização que encontre a melhor configuração. Existem várias opções na literatura para lidar com esse tipo de problema⁴⁸, nesse trabalho optou-se por se trabalhar com o método BFGS, o qual é um método de Newton modificado. Aplicando-se o algoritmo de otimização nas superfícies respostas da **Figura 15**, encontrou-se o ponto que está mostrado na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Configuração ótima para a Fibra PA

Ácido (μL)	NaCl (g)	Temperatura (°C)	Tempo [seg (10^x)]
90,0	0,8700	60,00	3,027

O ponto ótimo é proveniente de uma otimização baseado em uma interpolação não linear dos dados, o qual pode apresentar incoerência

quando confrontado com o experimento real. Sendo assim, o ponto ótimo deve ser testado juntamente com outros pontos para se certificar que o mesmo é a melhor solução.

5.1.1 Validação da otimização

Com o melhor método e condições definidos foi feito um procedimento de validação com a execução de mais 5 experimentos, o quais estão listados abaixo (**Tabela 7**). Dentre os pontos estão o ótimo gerado pelo BFGS (ponto 2), o melhor ponto do DOE (ponto 3), e três pontos gerados a partir de variações aleatórias em torno do ótimo.

Tabela 7 - Pontos avaliados para validação da otimização

Ponto	Ácido (μL)	NaCl (g)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (10^x segundos)
1	200,0	0,870	60,00	3,0270
2	90,0	0,870	60,00	3,0270
3	100,0	0,750	60,00	2,9100
4	150,0	0,870	60,00	3,0270
5	250,0	0,870	60,00	3,0270

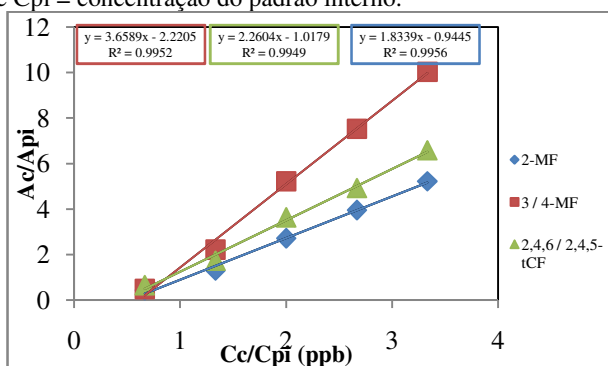
Conforme o esperado, o ponto que apresentou o melhor resultado em função de A_{min} e $A_{méd}$ foi o **ponto 2** com temperatura máxima em 60°C , concentração de cloreto de sódio (NaCl) com saturação de 60,3% (m/v), volume de ácido clorídrico ($1,0\text{ mol L}^{-1}$) de $90\ \mu\text{L}$ e tempo de extração de 1080 segundos.

5.2 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO E MÉTODO PADRÃO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A curva de calibração obtida pelo método padrão apresentou linearidade na faixa de 200 a $1000\ \mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos analisados (**Figura 16**). Porém os pontos de 50 e $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ também avaliados não apresentaram condições de quantificação para inserção na curva. Devido a dificuldade de separação os compostos 3 e 4-metilfenol foram quantificados juntos assim como os 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol; o composto pentaclorofenol não foi detectado em concentrações abaixo de $800\ \mu\text{g L}^{-1}$. Em uma análise de cromatografia gasosa com coluna capilar, ao se injetar analitos na presença de solventes, esses contribuem

com o sangramento da própria coluna, fenômeno que também ocorre quando a coluna é submetida a altas temperaturas durante a corrida. Esses fenômenos aliados à presença do pentaclorofenol em baixas concentrações podem ter contribuído para a não detecção, onde o sinal do composto é mascarado pelos sinais dos fragmentos de siloxano proveniente da composição da coluna. Essa dificuldade também foi encontrada na análise da recuperação.

Figura 16 - Curva de calibração obtida para o método referência para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF). Utilizando calibração com adição de padrão interno. Onde A_c = área do composto, A_{pi} = área do padrão interno, C_c = concentração do compostos e C_{pi} = concentração do padrão interno.



Os resultados obtidos para recuperação dos compostos após aplicação do método de extração líquido-líquido estão apresentados na tabela abaixo (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Recuperação de fenóis obtida por extração líquido-líquido

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	(6 $\mu\text{g L}^{-1}$)	(15 $\mu\text{g L}^{-1}$)	(20 $\mu\text{g L}^{-1}$)
	Recuperação (%)		
2-MF	<LOQ	<LOQ	25,3±1,5
3 / 4-MF	<LOQ	<LOQ	24,2±2,6
2,4,6-tCF / 2,4,5-tCF	56,4±7,6	42,1±12,4	34,2±4,7

Obs. Número de replicatas =3. Onde se tem <LOQ leia-se menor que o limite de quantificação, assim como 2, 3 e 4 – metilfenol para 2, 3 e 4-MF, 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol para 2,4,6 e 2,4,5-tCF.

Pelo método referência não foi possível recuperar os compostos 2, 3 e 4-MF para as soluções que apresentavam concentrações de 6 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, já para a concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ houve recuperação de 25,3% para **2-MF** e 24,2% para **3 e 4-MF**, valores abaixo dos recomendados pela literatura (BRITO *et al*, 2003; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996). Os triclofenóis foram recuperados em todos os níveis, porém também com valores abaixo dos aceitáveis. Possivelmente essa recuperação pode ser melhorada pela utilização de maior volume de CH_2Cl_2 (solvente de extração), todavia não necessariamente chegará há um valor aceitável, pois em baixas concentrações as perdas inerentes ao processo podem superar a capacidade de recuperação do método. As várias etapas do processo possibilitam perdas por volatilidade ou ainda por adsorção dos analitos nas paredes das vidrarias. Esses fatos demonstram que a extração líquido-líquido possui limitações que impossibilitam a análise para esses analitos nesses níveis de concentração.

Pelo método desenvolvido (SPME) a curva de calibração obtida apresentou boa linearidade na faixa estudada. Alguns parâmetros de mérito analíticos foram obtidos a partir da curva de calibração desenvolvida para a análise de recuperação em meio aquoso. O coeficiente de correlação da curva, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) estão apresentados na tabela abaixo (**Tabela 9**). Os parâmetros LOD e LOQ foram calculados baseados nas relações 3:1 sinal/ruído e 10:1 sinal/ruído, respectivamente (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1996).

A correlação encontrada para todos os compostos estudados apresentou-se no intervalo de $0,91 < R < 0,99$ indicando caráter fortíssimo de correlação na faixa de concentração analisada (BRITO *et al*, 2003).

Tabela 9 – Parâmetros de mérito analíticos para o método SPME

Analitos	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R
2-MF	3-100	0,43	1,43	0,9989
3 /4-MF	3-100	0,32	1,07	0,9997
2,4,6-tCF	1-100	0,02	0,06	0,9988
2,4,5-tCF	1-100	0,04	0,13	0,9993
pCF	3-100	0,08	0,27	0,9993

R = coeficiente de correlação de Pearson, LOD = limite de detecção, LOQ = limite de quantificação

2, 3 e 4-MF = 2, 3 e 4 – metilfenol, 2,4,6 e 2,4,5-tCF = 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol, pCF = pentaclorofenol

A recuperação obtida por SPME demonstrou-se efetiva, pois os valores para todos os compostos de interesse e em todos os níveis de concentração ficaram na faixa de 90 a 100%, conforme pode ser visualizado na tabela abaixo (**Tabela 10**). Por esse método foi possível ainda a separação dos triclorofenóis e a recuperação de pentaclorofenol.

Tabela 10 - Recuperação de fenóis obtida por SPME

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3
	($6 \mu\text{g L}^{-1}$)	($10 \mu\text{g L}^{-1}$)	($15 \mu\text{g L}^{-1}$)
	Recuperação (%)		
2-MF	103,5±0,7	107,6±3,8	99,2±10,0
3 /4-MF	98,6±1,6	107,6±4,8	95,7±9,8
2,4,6-tCF	113,6±0,4	98,9±0,6	99,4±1,6
2,4,5-tCF	104,5±0,3	91,3±2,1	95,7±4,8
pCF	92,9±1,7	99,8±3,6	99,8±3,5

Obs. Número de replicatas =3

2, 3 e 4-MF = 2, 3 e 4 – metilfenol, 2,4,6 e 2,4,5-tCF = 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol, pCF = pentaclorofenol

A partir da observação dos resultados obtidos para os dois métodos é possível constatar que a extração líquido-líquido não apresentou

sensibilidade na faixa de concentração estuda. Embora o método concentre os analitos presentes na amostra de forma que a concentração final obtida deve-se ser muito maior do que o presente inicialmente indicando que a metodologia envolva níveis altos de perdas durante o processamento.

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DE EXTRATOS LIXIVIADO E SOLUBILIZADO DE RESÍDUOS SÓLIDOS SEGUNDO NBR 10004/ 10005/ 10006

A mistura de fenóis apresenta cor amarelo forte e assim que adicionada à diatomácea e a água ultra pura, isentas de compostos orgânicos, essa coloração permaneceu. Mesmo após a filtração a coloração persistiu, fortalecendo a ideia de que os mesmos encontravam-se presentes no meio extrator embora alguns não tenham sido extraídos pelo método SPME (**Figura 17**).

Figura 17 - Frascos de extração dos ensaios de solubilização com matriz de diatomácea pura enriquecida com fenóis.



5.3.1 Lixiviação

Nos ensaios de lixiviação, o comportamento para recuperação dos compostos fenólicos a partir da matriz de diatomácea residuária (indicado na **Tabela 11** e pelas iniciais DR) apresentou valores, em sua maioria, insatisfatórios. Na concentração de menor nível (DR_F_0,003 mg) conseguiu-se a quantificação apenas de **2-MF** e **3 /4-MF** quando o extrato passou por filtração, os valores estão apresentados na **Tabela 11**. Enquanto que para a amostra DR_NF_0,003 mg nenhum dos compostos foi detectado.

Tabela 11 - Ensaio de lixiviação para resíduo sólido (diatomáceas pura e amostras) em dois níveis de concentração (0,003 mg de analito / 4,0 g de resíduo e 0,120 mg de analito / 4,0 g de resíduo)

	2-MF	3/4-MF	2,4,6-tCF	2,4,5-tCF	pCF
RECUPERAÇÃO (%)					
DR_F_0.003mg	86,4±6,3	102,6±7,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DR_NF_0.003mg	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DR_F_0.120mg	101,1±5,3	86,4±5,0	10,8±7,6	9,9±8,1	<LOQ
DR_NF_0.120mg	87,1±5,3	84,5±5,0	11,0±7,6	10,0±8,1	<LOQ
DP_F_0.003mg	101,0±6,3	101,3±7,5	79,6±7,6	60,5±7,0	<LOQ
DP_NF_0.003mg	101,5±6,3	102,5±7,5	104,3±7,6	102,4±7,0	58,8±15,9
DP_F_0.120mg	90,4±5,3	102,1±5,0	82,2±7,6	83,0±8,1	41,5±6,1
DP_NF_0.120mg	92,4±5,3	103,0±5,0	92,3±7,6	90,0±8,1	59,5±6,1

Obs. Onde se tem <LOQ leia-se menor que o limite de quantificação, F = filtrado, NF = não filtrado, DP = diatomácea pura, DR = diatomácea residuária, 2, 3 e 4-MF = 2, 3 e 4 – metilfenol, 2,4,6 e 2,4,5-tCF = 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol, pCF = pentaclorofenol

De maneira geral podemos observar que os resultados para amostra com filtração foram melhores, sendo que tal comportamento pode ser explicado pela presença de óleo no resíduo. O óleo é praticamente todo eliminado por filtração não passando para a matriz de extração e assim não interferindo no equilíbrio de extração. Além disso, possíveis outros interferentes podem estar formando complexos com os analitos no extrato aquoso, alterando o equilíbrio e a concentração dos fenóis na fase de *headspace*.

Nos outros níveis de concentração e tipo de matriz sólida (DR_0,120 mg, DP_0,120 mg e DP_0,003 mg) foi possível a quantificação dos compostos, exceto para o pentaclorofenol. Esse composto quando detectado apresentou baixa recuperação, sendo que só foi detectado quando a extração foi feita a partir de extrato da matriz de diatomácea pura, indicando a existência de uma forte interação analito / matriz (meio aquoso com presença de óleo e metais).

Os triclorofenóis também demonstraram comportamento similar embora mais fraco devido a uma maior recuperação frente à amostra DP. Como os compostos clorados em geral apresentaram comportamento similar é possível que o pH do meio também tenha influência, uma vez que a acidez desses compostos difere bastante dos

outros dois que são metilados e resultaram em melhores recuperações. Os compostos clorados apresentam pKa bastante ácido, precisando que o meio seja fortemente ácido para que eles estejam protonados e menos reativos. Para efeito de comparação entre as recuperações quando as amostras passaram por filtração (DP_F) ou não (DP_NF), os resultados não foram conclusivos, pois para alguns compostos houve melhor recuperação a partir do extrato não filtrado, e para outros os resultados foram melhores para o extrato filtrado. Isso evidencia que o processo de filtração não causa perdas drásticas de analito, e ainda serve para eliminação de interferentes, como óleos, que impedem a volatilização dos compostos.

5.3.2 Solubilização

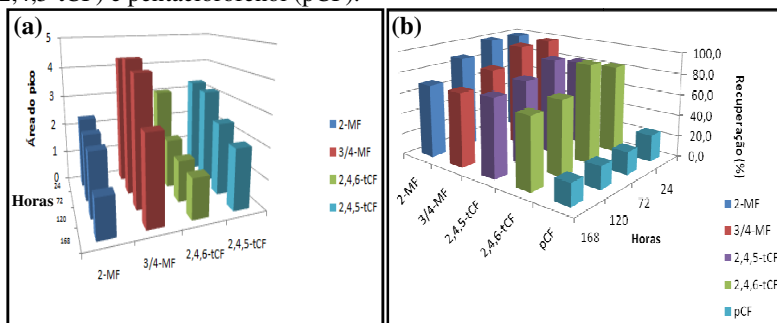
As análises do ensaio de solubilização apresentaram resultados abaixo do esperado para recuperação de pentaclorofenol, e esse é o composto analisado que apresenta o menor pKa. Sendo indício da necessidade de uma maior acidificação do extrato previamente à extração por SPME para garantia da protonação e conseqüente maior disposição do pCF na fase *headspace*.

Na análise da diatomácea pura não filtrada pegou-se uma alíquota do sobrenadante, não garantindo uma distribuição homogênea dos analitos. Portanto uma possível explicação da menor recuperação em relação às amostras filtradas para alguns compostos. Ainda pode ocorrer repasse de interferentes provenientes de sua própria composição, ao processo de extração que dificultem a volatilização dos analitos. O fato mencionado anteriormente pode ser explicado também pela retenção dos compostos pela matriz uma vez que a composição da diatomácea é a base de alguns catalisadores para fenóis. Observando-se ainda a possibilidade de adulteração da composição devido ao fato dos fenóis sofrerem reações de oxidação por catálise com ácidos inorgânicos como ácido sulfúrico e clorídrico (ATOBUCHI e KANOUGI, 2004; MARTINOVIC *et al*, 2006). Outro fator que influencia os baixos níveis de recuperação de compostos clorados é a solubilidade dos mesmos em meio aquoso, que é bem inferior aos outros compostos fenólicos, de forma que não são extraídos nos ensaios de solubilização e lixiviação. Dessa forma uma menor concentração desses estará presente no meio extrator que combinado a presença de interferentes levam a baixa recuperação alcançada.

Outra ressalva é que os analitos que apresentaram boa recuperação apresentam pKa elevado não sendo tão afetados por

alterações de pH na faixa estudada (1 a 2). Tem-se a impressão de uma sensível perda dos analitos quando se concebe o extrato pelo período de 168 horas, o que pode ser devido a degradação dos compostos devido permanência a 25 °C. No caso da diatomácea residuária (DR) foi analisado um comportamento de perda dos analitos com o passar das horas com base nas áreas, embora não tenha sido possível quantificar os resultados devido aos baixos valores encontrados (**Figura 18.a**). Esse comportamento também foi observado na amostra de diatomácea pura (DP) que apresentou valores quantificáveis. Esse desempenho pode ser observado pelos gráficos de área versus tempo de diatomácea residuária (DR_F_0,120 mg) e recuperação versus tempo para diatomácea pura (DP_F_0,003 mg) (**Figura 18**).

Figura 18 - Gráficos área versus tempo de estratificação (a) Amostra diatomácea residuária na concentração 0,120 mg / 4,0 g base seca (DR_F_0,120 mg). (b) Amostra diatomácea pura na concentração 0,003 mg / 4,0 g base seca (DP_F_0,003 mg). Tempo avaliado de 24, 72, 120 e 168 horas para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF) e pentaclorofenol (pCF).



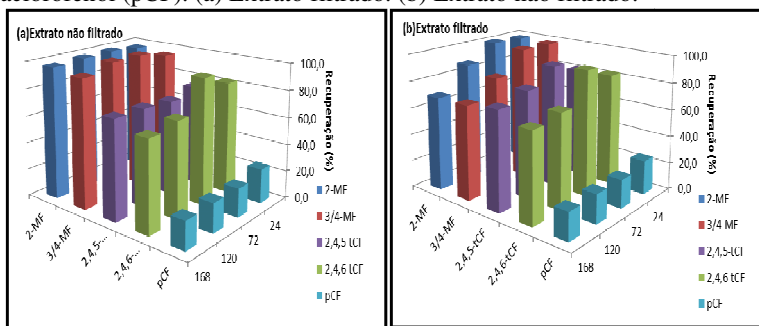
As recuperações obtidas para a diatomácea pura filtrada e não filtrada estão na **Tabela 12** e **Figura 19**. Os desvios foram baseados em análises em triplicatas de amostras que passaram pelo procedimento de fortificação e agitação por meia hora seguida da extração por SPME. O comportamento de recuperação para os dois níveis de concentração foram similares, portanto optou-se por apresentar os valores para o nível mais baixo de concentração.

Tabela 12 - Recuperação amostra de diatomácea pura filtrada (DP_F) e não filtrada (DP_NF), na concentração de 0,003 mg / 4 g, após 24, 72, 120, 168 horas de extração do solubilizado

	Tempo (h)	2-MF	3/4-MF	2,4,6-tCF	2,4,5-tCF	pCF
Filtrada	24	99,0±6,3	98,3±7,5	83,1±7,6	81,8±7,0	25,1±2,1
	72	100,0±6,3	98,6±7,5	92,7±7,6	90,8±7,0	20,9±2,1
	120	87,8±6,3	82,6±7,5	69,8±7,6	79,3±7,0	21,2±2,1
	168	69,4±6,3	69,7±7,5	65,8±7,6	72,9±7,0	20,3±2,1
Não filtrada	24	97,0±6,3	95,0±7,5	68,3±7,6	74,7±7,0	17,6±2,1
	72	99,1±6,3	103,0±7,5	63,4±7,6	70,1±7,0	15,1±2,1
	120	98,6±6,3	102,3±7,5	62,7±7,6	71,8±7,0	15,2±2,1
	168	97,2±6,3	94,3±7,5	63,7±7,6	72,1±7,0	12,8±2,1

Obs. F = filtrado, NF = não filtrado, DP = diatomácea pura, DR = diatomácea residuária, 2, 3 e 4-MF = 2, 3 e 4 – metilfenol, 2,4,6 e 2,4,5-tCF = 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol, pCF = pentaclorofenol.

Figura 19 - Recuperação de amostra diatomácea pura (DP) 0,003mg / 4 g após 24, 72, 120, 168 horas de extração do solubilizado para os compostos 2, 3 e 4 – metilfenol (2, 3 e 4-MF), 2,4,6 e 2,4,5-triclorofenol (2,4,6 e 2,4,5-tCF) e pentaclorofenol (pCF). (a) Extrato filtrado. (b) Extrato não filtrado.



As extrações dos extratos de solubilização da diatomácea residuária sem filtração (DR_NF_0,003mg e DR_NF_0,120mg) não apresentaram resultados qualificáveis, enquanto as amostras que passaram por filtração foram qualificáveis, mas não quantificáveis. O comportamento observado para as amostras DR pode ser explicado pelo

fato de que a diatomácea residuária possui vários interferentes, contaminantes provenientes do processo de purificação como resíduos de metais e óleos, além de sua própria composição, alterando o equilíbrio na extração por SPME. Devido a interações entre constituintes de matrizes e os analitos, as condições de volatilidade e o equilíbrio do meio de extração por SPME são alterados. Além da possibilidade de uma degradação acelerada pela combinação das condições do meio extrator e a temperatura aplicada.

6.0 CONCLUSÕES

Com a utilização de um algoritmo de planejamento de experimento, criação de superfície de resposta e otimização das variáveis envolvidas no método SPME foi possível encontrar uma condição mais adequada de extração utilizando um menor número de testes. Essa abordagem se mostrou confiável uma vez que a determinação do ponto ótimo foi validada com a repetição de pontos compreendidos no entorno da condição de otimalidade. A metodologia mais robusta foi utilizando a fibra PA. O tempo de extração, introduzido como variável de entrada, apresentou-se no centro da faixa estudada para a condição de se obter a extração mais uniforme e máxima para os analitos, tempo esse pequeno conferindo praticidade a metodologia. Quanto a adição de sal para alteração da força iônica observou-se que adição em quantidade que conferiu 50% da quantidade necessária para saturação foi a que já conferiu a máxima contribuição na extração. Com a mudança de pH foi possível observar que há a necessidade se ter um meio ácido para extração, mas que esse deve alcançar níveis de pH em torno de 1,6.

O método desenvolvido no presente trabalho apresentou maior sensibilidade para a extração de fenóis, quando comparado a um dos métodos clássicos por extração líquido-líquido. Obtiveram-se valores altos de recuperação dos analitos em uma matriz de meio aquoso simples com ausência de interferentes pela metodologia empregando SPME, enquanto que não foi possível extrair os mesmos por LLE no nível de concentração estudado. Além da sensibilidade, outra vantagem da técnica de SPME é que não há necessidade do uso de solventes. Fato que implicaria em riscos de contaminação do operador, uso de grande quantidade de solvente onde o descarte adequado envolve gastos altos. No estudo da avaliação da robustez do método quando na presença de interferentes (compostos metálicos, óleos, etc.) o desempenho ficou abaixo do esperado para todos os compostos para uma das matrizes (*DR_F_0,120 mg*, *DR_NF_0,120 mg*, *DR_F_0,003 mg* E *DR_NF_0,003 mg*) referente aos ensaios de solubilização. Na lixiviação a recuperação alcançou valores mais altos, sendo até mesmo possível a quantificação de metilfenóis a partir de matrizes de diatomácea residuária (DR). Em outra matriz (DP), apenas o pentaclorofenol apresentou valores muito abaixo do ideal para avaliação de recuperação a partir de extratos solubilizados, indicando uma possível interação entre matriz/interferentes e analito. A partir da análise do tempo de maturação na solubilização não se observou grande variação e então influencia nas

recuperações, indicando que talvez para fenóis o tempo de 7 dias possa ser diminuído.

A combinação das propriedades físico-químicas (solubilidade em água e pKa) dos analitos influencia na partição entre a matriz e meio extrator. Seguido de uma segunda etapa de partição na SPME entre meio extrator / *headspace* / fibra que por sua vez é influenciada pela alteração de composição da matriz (meio aquoso) que altera a força iônica, pH, dentre outras propriedades. Dessa forma os níveis de recuperação se dão pela combinação dessas duas etapas, não podendo ser atribuída apenas a metodologia desenvolvida. O que pode-se concluir quanto a metodologia desenvolvida é que ela não é robusta, uma vez que a recuperação é significativamente maior quando se aplica filtração após a obtenção dos extratos e antes da extração com a fibra, processo que elimina boa parte dos particulados e até mesmo substâncias oleosas. Embora essa técnica ainda apresente considerável maior sensibilidade que a ELL.

As reais causas e alterações necessárias, para serem confirmadas, precisariam ser estudadas por meio de exaustivas repetições das análises para que fossem estatisticamente plausíveis de explicações. Assim como a determinação dos constituintes / interferentes presentes na matriz. Além da necessidade de desenvolvimento de um planejamento de experimento, para ponderar as contribuições de possíveis interferentes presentes na matriz buscando uma maior robustez do método e possibilitando o emprego dela e substituição dos métodos convencionais, na qual o testado apresentou-se pior na análise de fenóis nos níveis exigidos pela ABNT.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHUR, C. L. e PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers**, *Analytical Chem.*, 62, 2145-2148, 1990.

ATOBUCHI, T. e KANOUGI, T. **Phenol oxidation over alkaline earth metal ion exchange beta zeolite in the presence of ketone**. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 222, 253–257, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004, 10005 e 10006**. Rio de Janeiro, 2004.

BAUGH, P. J., **Gas Chromatography: A Practical Approach**. Oxford University Press, USA, c.2, 1994.

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. A., POLESE, L. e RIBEIRO, M. L. **Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão**. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, 13, 129-146, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução N^o 357**. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/conama>>, acesso em Dezembro de 2012.

CORREA, O. L. S. **Petróleo, noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia**, Interciência, Rio de Janeiro, 2003.

DELGADO, F. J., GONZALEZ-CRESPO, J., CAVA, R. e RAMIREZ, R. **Formation of the aroma of a raw goat Milk cheese during the maturation analyzed by SPMEGC-MS**. *Food Chemistry*, 129, 1156-1163, 2011.

DÓREA, H. S., GAUJAC, A. e NAVICKIENE, S. **Microextração em fase sólida: aspectos termodinâmicos e cinéticos**. *Scientia Plena* 4, 077201, 2008.

DÓREA, H. S. e LOPES, W. G. **Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM**. *Química Nova*, 27, 892, 2004.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Method 604 - Phenols (methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater)**. Appendix A, part 136.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 8000 C - Determinative chromatographic separations**, 2003.

GOBATO, E. A. A. F. E LANÇAS, F. M. **Comparação entre injeção na coluna (“on-column”) e headspace dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água**. Quím. Nova, 24, n.º. 2, 176-179, 2001.

HACHENBERG, H. e SCHIMIDT, A. P. **Gas Chromatographic headspace analysis**. 1ª Ed. Londres, Inglaterra, 1979.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH), 1996.. **Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures**.

JAMES, A. T., e MARTIN, A. J. P. **Gas liquid partition chromatography**. Biochem. J. Proc., 50, 1952.

KIM, K.-R. e KIM, H. **Gas chromatographic profiling and screening for phenols as isobutoxycarbonyl derivatives in aqueous samples**. Journal of Chromatography A, 866, 87–96, 2000.

KLEIBOHMER, W. (Ed.). **Environmental Analysis Handbook of Analytical Separations**. Elsevier Science B. V., v.3, c.6, 2001.

KOLB, B. e ETTRE, L. S. **Static headspace-gas chromatography – Theory and practice**. Wiley-VCH, 1997.

KOVÁCS, A., KENDE, A., MORRTL, M., VOLK, G., RIKKER, T. E. e TOROKOS, K. **Determination of phenols and chlorophenols as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography–mass spectrometry**. J. Chromatogr. A, 1194, 139–142, 2008.

LANÇAS, F. M.; **The role of the separation sciences in the 21th century**. J. Braz. Chem. Society., 14, 183, 2003.

LANÇAS, F. M.; RISSATO, S. R.; **Influence of temperature, pressure, modifier, and collection mode on supercritical CO₂ extraction efficiencies of Diuron from sugar cane and orange samples.** J. Microcol., 10, 473, 1998.

LEE, MR.; LEE, RJ.; HO, HP. **Purge-assisted headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in aqueous samples.** Journal of Chromatography A, 1213, 245-248, 2008.

LÓPEZ-DARIAS, J., PINO, V., ANDERSON, J. L., GRAHAM, C. M. e AFONSO, A. M. **Determination of water pollutants by direct-immersion solid-phase microextraction using polymeric ionic liquid coatings.** Journal of Chromatography A, 1217, 1236-1243, 2010.

LORD, H. e PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A, 885, 153–193, 2000.**

MARTINOVIC, S., VLAHOVIC, M., BOLJANAC, T. e PAVLOVIC, L. **Preparation of filter aids based on diatomites.** Int. J. Miner. Process. 80, 255–260, 2006.

MESTER, Z., STURGEON, R. E PAWLISZYN, J. **Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation.** Spectrochimica Acta part B: Atomic Spectroscopy, 56, 233-260, 2001.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** John Wiley, 5th Edition, New York, 2001.

M. HÖÖK, M., BARDI, U., FENG, L. E PANG, X. **Development of oil formation theories and their importance for peak oil.** Marine and Petroleum Geology, 27, 2010.

McMURRY, J.; **Química Orgânica – Combo.** Tradução da 6ª edição Norte-Americana, São Paulo, Pioneira Thomson Learning, 2005.

NOME, R. C. **Uso de um novo método de agitação para microextração em fase sólida – SPME – na determinação de fenóis.** Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

O. DAVID SPARKMAN, O. D. , PENTON, Z. e KITSON, F. G. **Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide**. San Diego, c. 1, 1996.

OHLENBUSCH, G., KUMKE, M. U. e FRIMMEL F.H. **Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction**. The Science of the Total Environment, 253, 63-74, 2000.

PAWLISZIN, J. **New directions in sample preparations for analysis of organic compounds**. Trends in Analytical Chemistry, 14, 113, 1995.

PIZARRO, C., PÉREZ-DEL-NOTARIO, N. e GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. **Optimisation of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer**. Journal of Chromatography A, 1217, 6013-6021, 2010.

RAO, S. S. **Engineering Optimization Theory and Practice**, New Jersey, John Wiley & Sonc, 4th Edition, 2009.

SANTOS, Â. F. ; GABBARDO, I. T. ; CARNEIRO, M. E. R. ; VITAL, N. A. A. ; XIMENES, M. S. ; FALCÃO, C. ; OUTROS ; MUEHE, D. . **Monitoramento ambiental da atividade de produção de Petróleo na Bacia de Campos**. CENPES / Petrobrás, Rio de Janeiro, 2001.

SAKHVIDI, M. J. Z., BAHRAMI, A. R., GHIASYAND, A., MAHJUB, H. e TUDURI, L. **Determination of Inhalational Anesthetics in Field and Laboratory by SPME-GC-MS**. Analytical letters, 45, 375-385, 2012.

SARAJI, M. e BAKHSHI, M. **Determination of phenols in water samples by single drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography–mass spectrometric detection**. Journal of Chromatography A ,1098, 30–36, 2005.

SEITZ, W., SCHULZ, W. e WEBER, W. H. **Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water**. Rapid Commun Mass Spectrom, 20, 2281-2285, 2006.

SEMENOV, S. N., KOZIEL, J. A. e PAWLISZYN, J. **Kinetics of solid-phase extraction and solid phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm.** J. Chromatography A, 873, 39-51, 2000.

SHIREY, R. E. e MANI, V., 1997. **Pittcon Conference.** Atlanta, GA. STASHENKO, E. E. e MARTINEZ, J. R.. **Derivatization and solid-phase.** Trends in Analytical Chemistry, 23, 8, 2004.

STANDARD METHODS COMMITTEE. **Method 6420 – Liquid-Liquid extraction Gas Chromatographic Method.** (Standard method for the examination of water and wastewater), 1993.

SUKOLA, K., KOZIEL, J., AUGUSTO, F. e PAWLISZYN, J. **Diffusion-based Calibration for SPME analyses of aqueous samples.** Analytical Chemistry, 73, 13-18, 2001.

SUPELCO INC.; **Chromatographic Products (catálogo).** Supelco, Bellefonte, PA, 373, 1996.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de engenharia de petróleo.** Interciência, Petrobrás, Rio de Janeiro, 2001.

URICH, S. **Solid-phase microextraction in biomedical analysis.** Journal of Chromatography A, 902, 167-194, 2000.

VALENTE, A. L. P. e AUGUSTO, F. **Microextração por fase sólida.** Química Nova, 23, 4, 2000.

VERMEULEN, A., WELVAERT, K. e VERCAMMEN, J. **Evaluation of a dedicated gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of phenols in water.** Journal of Chromatography A, 1071, 41–46, 2005.

WILSON, I. D., ADLARD, E. R., COOKE, M. e POOLE, C. **Encyclopedia of Separation.** Science. Elsevier Science Ltd., 2000.

WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A. E POOLE, C. **Encyclopedia of Analytical Science.** Elsevier Science Ltd., 2005.

ZHOU, F., LI, X. E ZENG, Z. **Determination of phenolic compounds in wastewater samples using a novel fiber by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography.** *Analytica Chimica Acta* 538, 63–70, 2005.

APÊNDICE A

TABELA A1. PONTOS ESTUDADOS NO DOE COM EXTRAÇÃO PELA FIBRA PA.

Ácido (μL)	NaCl (g)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (10^3 segundos)	$A_{\text{méd}}$	A_{min}
400,0	1,500	60,00	1,6395	1453121	0
0,0	0,375	51,25	1,6395	288136,2	0
0,0	1,500	25,00	1,0000	17966,3	0
300,0	1,125	33,75	1,0000	150901,7	0
0,0	1,125	60,00	3,5580	20097584	0
400,0	1,500	60,00	1,6395	2832351	191477
200,0	1,500	42,50	3,5580	47479602	5341186
400,0	0,375	33,75	3,5580	5689188	721990,2
200,0	0,750	33,75	1,6395	204970,1	0
0,0	0,000	33,75	2,9185	413204,8	0
100,0	1,125	25,00	1,6395	108814,6	0
100,0	0,750	60,00	2,9185	9894517	729226,1
100,0	1,500	33,75	2,2790	2609241	341096,3
100,0	0,750	60,00	2,9185	11992329	888208,4
400,0	1,125	42,50	2,9185	1914905	152892,8
200,0	0,375	25,00	2,9185	2994294	183975,9
100,0	0,375	42,50	1,0000	390842,6	0
300,0	0,000	42,50	1,6395	70280,8	0
300,0	0,750	25,00	3,5580	52705,2	0
200,0	0,000	60,00	1,0000	40686,6	0
0,0	0,750	42,50	2,2790	321371,3	0
300,0	1,500	51,25	2,9185	7203334	378065,6
0,0	0,000	33,75	2,9185	705242,8	0
400,0	0,000	25,00	2,2790	147440,9	0
400,0	0,750	51,25	1,0000	146535,5	0
300,0	0,375	60,00	2,2790	1478542	0
200,0	1,125	51,25	2,2790	2561574	90524,2
200,0	0,375	25,00	2,9185	475261,8	148312,3
300,0	0,000	42,50	1,6395	105097,5	0
Desvio médio(σ)			707.669,8		

APÊNDICE B

TABELA B.1. PONTOS ESTUDADOS NO DOE COM EXTRAÇÃO PELA FIBRA PDMS.

Anidrido Acético (μL)	NaCl (g)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (10^x segundos)	$A_{\text{méd}}$	A_{min}
20,0	1,125	33,75	1,9968	10593413	0
500,0	0,375	60,00	1,9968	4348449	1113091
380,0	0,000	60,00	2,5165	5812058	831136,5
260,0	0,000	51,25	1,9968	3163216	593811,1
20,0	1,500	60,00	3,0362	75161864	0
260,0	0,375	33,75	2,5165	4617768	1044402
500,0	1,500	33,75	3,5560	14069879	3388848
140,0	1,125	60,00	1,4770	12399880	193157,3
140,0	1,500	51,25	2,5165	50233835	656722,9
380,0	0,000	60,00	2,5165	4812058	761136,5
140,0	0,375	42,50	3,5560	26742594	711693,2
380,0	1,500	42,50	1,9968	1464085	0
20,0	0,375	51,25	1,4770	5365826	0
140,0	0,000	33,75	3,0362	6452469	690742,6
140,0	0,750	25,00	1,9968	1876823	105299,3
500,0	0,000	42,50	1,4770	482508,2	261718,7
140,0	0,750	25,00	1,9968	2361664	416269,3
260,0	1,125	42,50	3,0362	24827427	1236336
260,0	1,500	25,00	1,4770	269064,9	0
20,0	0,750	42,50	2,5165	17231076	0
380,0	0,750	33,75	1,4770	275697,7	0
380,0	1,125	51,25	3,5560	24658317	1238717
500,0	0,375	60,00	1,9968	3304740	796501
20,0	0,000	25,00	3,0362	9609550	117189,5
20,0	1,500	60,00	3,0362	57835094	0
260,0	0,750	60,00	3,5560	5379744	2059489
20,0	0,000	25,00	3,5560	26968324	579065,9
500,0	0,750	51,25	3,0362	10186728	1430780
500,0	1,125	25,00	2,5165	567580,2	0
Desvio médio(σ)		4.609.045			

ANEXOS

ANEXO A - TABELA DE COMPOSTOS VOLÁTEIS SEGUNDO ABNT - NBR 10005:2004

Tabela A.1 - Compostos voláteis

Composto	Número CAS
Acetato de etila	141-78-6
Acetona	67-64-1
Álcool n-butílico	71-36-3
Benzeno	72-43-2
Cloreto de metileno	75-09-2
Cloreto de vinila	75-01-4
Clorobenzeno	108-90-7
Clorofórmio	67-66-3
1,2 - Dicloroetano	107-06-2
1,1 - Dicloroetano	75-35-4
Dissulfeto de carbono	75-15-0
Éter etílico	60-29-7
Etilbenzeno	100-41-4
Isobutanol	78-83-1
Metanol	67-56-1
Metil etil cetona	78-93-3
Metil isobutil cetona	108-10-1
Tetracloreto de carbono	56-23-5
Tetracloroetileno	127-18-4
Tolueno	108-88-3
1,1,2-Tricloro-1,2,2-trifluoetano	76-13-1
1,1,1-Tricloroetano	71-55-6
Tricloroetileno	79-01-6
Triclorofluormetano	75-69-4
Xilenos/dimetilbenzenos	1330-20-7

ANEXO B - MÉTODO 8040A / *PHENOLS STANDARD ACCUSTANDARD*[®] COM 2000 µG/ML DE CADA COMPOSTOS EM ISOPROPANOL

Concentração	2000 µg mL⁻¹		
Número de componentes	19		
Condição de armazenamento	Refrig (0-5° C)		
Analitos	Analito	CAS Number	Concentração (µg mL ⁻¹)
	Dinoseb	88-85-7	2000
	4-Cloro-3-metilfenol	59-50-7	2000
	2-Clorofenol	95-57-8	2000
	o-Cresol	95-48-7	2000
	m-Cresol	108-39-4	2000
	p-Cresol	106-44-5	2000
	Dinex	131-89-5	2000
	2,4-Diclorofenol	120-83-2	2000
	2,6-Diclorofenol	87-65-0	2000
	2,4-Dimetilfenol	105-67-9	2000
	2-Metil-4,6-dinitrofenol	534-52-1	2000
	2,4-Dinitrofenol	51-28-5	2000
	2-Nitrofenol	88-75-5	2000
	4-Nitrofenol	100-02-7	2000
	Pentaclorofenol	87-86-5	2000
	Fenol	108-95-2	2000
	2,3,4,6-Tetraclorofenol	58-90-2	2000
	2,4,5-Triclorofenol	95-95-4	2000
	2,4,6- Triclorofenol	88-06-2	2000