

PROPOSTA DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO, USANDO HPLC-DAD, PARA SER APLICADO NA DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS E NITROFENÓIS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

Thaylanne Kadman Costa Duarte¹; Jeancarlo Pereira dos Anjos²

¹ Graduanda em Engenharia Química; Iniciação científica – FAPESB; thay.crf@gmail.com

² Doutor em Química; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; jeancarlo.anjos@fieb.org.br

RESUMO

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente conhecidas e fazem parte de vários processos industriais. Dentre elas, existem os clorofenóis e os nitrofenóis, ambos estão entre as substâncias mais tóxicas encontradas no meio ambiente, incluindo a presença em corpos d'água. O presente trabalho tem o objetivo de desenvolver e validar um método cromatográfico HPLC-DAD, para a determinação de clorofenóis e nitrofenóis em águas superficiais coletadas na região de Salvador-BA. Foi realizada a otimização da separação cromatográfica, com tempo total de corrida de 32 min. Valores obtidos para as figuras de mérito para o método proposto atestam a qualidade analítica para futura quantificação dos compostos em amostras reais de águas superficiais.

PALAVRAS-CHAVE: Clorofenóis, HPLC, desenvolvimento de método, validação de método.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente conhecidas e fazem parte de vários processos industriais. Dentre esta classe de substâncias, estão incluídos os clorofenóis e os nitrofenóis. Os clorofenóis são substâncias organocloradas, formadas a partir da substituição de um ou mais átomos de hidrogênio, no anel aromático do fenol, por átomos de cloro. Enquanto nos nitrofenóis há a substituição pelo grupo nitro. Ambos estão entre as substâncias mais tóxicas encontradas no meio ambiente, possuindo elevado potencial cancerígeno e de difícil biodegradabilidade. Ressalta-se que os clorofenóis são mais tóxicos que seus precursores fenólicos não clorados.^{1,2}

A propagação desses compostos no meio ambiente através da lixiviação e infiltração a partir do lixo industrial em fontes de água leva a sérios efeitos deletérios em todas as formas de vida. Nesse sentido, assegurar a qualidade da água é medida de grande impacto na prevenção de doenças, tornando indispensável a avaliação dos níveis de contaminação da mesma por substâncias indesejáveis.¹ O CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente), por meio da resolução nº430/2011, estabelece limites máximos permitidos para algumas destas substâncias em água, sendo este um dos parâmetros de avaliação da qualidade de águas superficiais.^{2,3}

Os métodos analíticos utilizados na determinação dessas substâncias em água têm se mostrado tediosos, devido aos longos tempos de preparo de amostras e o grande consumo de solventes orgânicos. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos ecologicamente amigáveis buscando um mínimo consumo e descarte de solventes orgânicos, menor tempo de análise e promovendo uma mínima manipulação das amostras.³

Diante dos expostos, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método cromatográfico, usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD), capaz de determinar clorofenóis e nitrofenóis em amostras de águas superficiais coletadas na região de Salvador-BA.

2. METODOLOGIA

O desenvolvimento e a validação do método foram feitos utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) da marca Shimadzu, equipado com uma unidade de bombeamento de solvente quaternária (LC-20AT), um injetor automático (SIL-20AHT), desgaseificador (DGU-205), forno para coluna (CTO-20A) e uma interface controladora (CBM-20A). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna NUCLEODUR® 100-5 C18 ec (150 mm x 4 mm ID; tamanho de partícula de 5 µm) acoplada à uma pré-coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Agilent (4.6 mm x 12.5 mm). Ácido acético 5% (solvente A) e acetonitrila (solvente B) foram utilizados como fase móvel, as quais tiveram os percentuais variando ao longo das análises.

Inicialmente, foi avaliado o seguinte gradiente de eluição da fase móvel: 0 a 35 min (0-92% B); 35 a 40 min (92-0% B); 40 a 42 min (0% B). Visando otimizar a corrida cromatográfica, diminuir o consumo de solventes e tornar a análise mais ambientalmente correta foram feitas mudanças no tempo total das corridas, reduzindo

para 32 minutos: 0 a 25 min (0-92% B); 25 a 30 min (92-0% B); 30 a 32 min (0% B). Durante toda a corrida cromatográfica, foi utilizado um fluxo constante de 1,00 mL/min e temperatura do forno de 40°C.

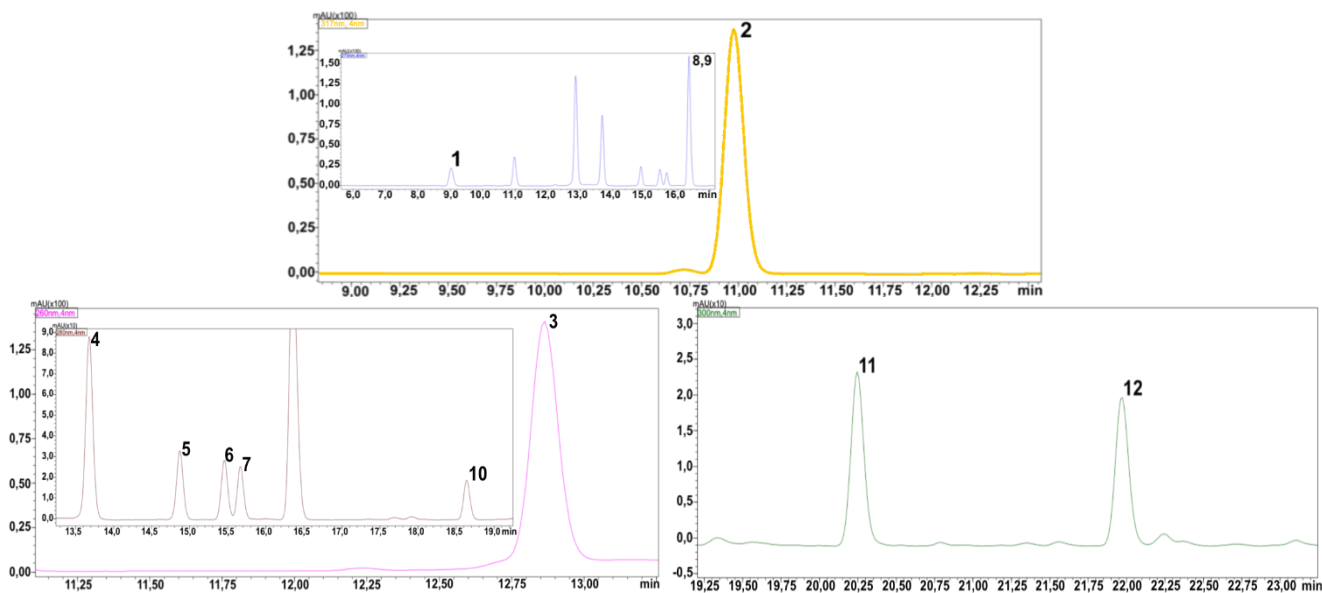
Foi utilizada uma mistura de 13 compostos fenólicos, clorados e nitrados, na etapa de desenvolvimento do método cromatográfico. As 13 substâncias contidas na mistura eram 4-cloro-3-metilfenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 2,4-dimetilfenol, 2,4-dinitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, fenol, 2,4,6-triclorofenol e 2,3,4,6-tetraclorofenol. Foi preparada, então, uma solução de trabalho na concentração de 10mg/L, a partir da solução estoque (200mg/L).

Para a construção das curvas analíticas, foram preparadas soluções nas concentrações de 0,01 mg/L; 0,025 mg/L; 0,075 mg/L; 0,1 mg/L; 0,125 mg/L; 0,15 mg/L; 0,175 mg/L e 0,2 mg/L, preparadas a partir da diluição sucessiva da solução estoque. Além disso, procedimentos para validação do método foram realizados de acordo com as recomendações de Ribani et al. (2004).⁴

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão representados os cromatogramas da mistura dos 13 compostos fenólicos (clorados e nitrados) na concentração de 10 mg/L. Cada um deles está no comprimento de onda de melhor absorção para cada composto.

Figura 1 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD referente à solução padrão da mistura de 13 compostos fenólicos clorados e nitrados, na concentração de 10 mg/L, em diferentes comprimentos de onda. (Rosa = 260 nm; Azul = 270 nm; Marrom = 280 nm; Verde = 300 nm; Amarelo = 317 nm)



Apesar de termos obtido a melhor separação cromatográfica conforme apresentada na Figura 1, percebe-se a possibilidade de coeluição entre alguns compostos uma vez que dos 13 analitos injetados, foi possível obter um máximo de 11 picos. Dois dos compostos coeluídos são os compostos sinalizados no cromatograma da Figura 1, como sendo os compostos 8 e 9. Além disso, uma segunda coeluição de picos ainda está sendo estudada.

Outro fato importante é que, ainda será necessário o estabelecer a identidade de cada pico, a qual será realizada em um LC-MS, por meio da avaliação dos espectros de massas de cada composto para que seja realizada a identificação inequívoca dos mesmos. Este fato será necessário uma vez que os compostos estudados foram adquiridos provenientes de uma mistura e não temos os padrões individuais das substâncias para a identificação dos picos até o momento.

Os resultados obtidos para os testes de validação do método estão descritos na Tabela 1. Nesta, consta a faixa de concentração das curvas analíticas feitas para cada composto, a linearidade (R^2), os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ), e a precisão interdia (5 dias consecutivos) do método (CV).

A boa linearidade do método foi atestada por meio dos valores de $R^2 \geq 0,99$, para todos os compostos. A obtenção de coeficientes de variação (CV%) com valores menores que 15%, conforme a Resolução N° 899/2003 da ANVISA, indica a boa precisão.⁵

TABELA 1 – Figuras de mérito dos testes para validação do método cromatográfico.

Compostos	Faixa linear (mg/L)	R ²	LD ^a (mg/L)	LQ ^b (mg/L)	Precisão interdia ^c CV (%)			
					0,01 mg/L	0,025 mg/L	0,1 mg/L	0,2 mg/L
1	0,025 - 0,2	0,9973	0,009	0,029	-x-	4,28	3,16	1,75
2	0,01 - 0,2	0,9969	0,008	0,027	3,77	-x-	1,36	1,35
3	0,01 - 0,2	0,9967	0,008	0,028	11,8	-x-	4,99	2,46
4	0,01 - 0,2	0,9954	0,010	0,032	6,57	-x-	5,12	4,61
5	0,01 - 0,2	0,9974	0,007	0,025	12,3	-x-	6,16	3,72
6	0,025 - 0,2	0,9961	0,011	0,035	-x-	8,06	5,13	4,25
7	0,01 - 0,2	0,9962	0,009	0,030	10,4	-x-	7,96	5,87
8	0,01 - 0,2	0,9964	0,009	0,029	15,3	-x-	3,87	2,41
9	0,025 - 0,2	0,9956	0,011	0,036	-x-	8,15	7,07	4,91
10	0,025 - 0,175	0,9965	0,010	0,032	-x-	12,6	2,63	2,18
11	0,025 - 0,2	0,9961	0,011	0,036	-x-	16,2	8,94	4,35

^aLimite de detecção; ^bLimite de quantificação; ^cCV = coeficiente de variação de n = 10 para 5 dias diferentes.

Os valores de LD e LQ foram calculados por meio da regressão linear das curvas e indicam, respectivamente, a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado e menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Os baixos valores de LD obtidos atestam a alta sensibilidade do método proposto, sem a utilização de um método de pré-concentração dos analitos até o momento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método cromatográfico proposto mostrou-se eficiente e abrangente para a análise de compostos fenólicos clorados e nitrados, de modo a utilizar conceitos da Química Verde tais como menor tempo de análise e, conseqüentemente, redução no consumo de solventes orgânicos. Entretanto, novas etapas serão implementadas como a confirmação da sequência de eluição dos compostos associados aos respectivos picos cromatográficos já separados, bem como a aplicação do método em amostras reais de águas superficiais.

Agradecimentos

À FAPESB, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

5. REFERÊNCIAS

- SILVEIRA DOS SANTOS et al., **Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de bismuto**: Aplicação em águas de chuva de regiões de Santa Catarina. *Eclética Química Journal*, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 158-181, abr. 2018.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente; <http://www.mma.gov.br/conama>, acessada em 03 de maio de 2019.
- RODRIGUES, Guilherme Dias et al., **Alternativas verdes para o preparo de amostra e determinação de poluentes fenólicos em água**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1370-1378, 2010.
- RIBANI, Marcelo et al., **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Out. 2004.
- ALVES, A. A. A. et al., **Validação do método analítico em CLAE com derivatização pós-coluna para a quantificação de carbamatos em água de abastecimento público**. *Revista DAE*, v. 66, n. 212, p.80-94, 2018.