

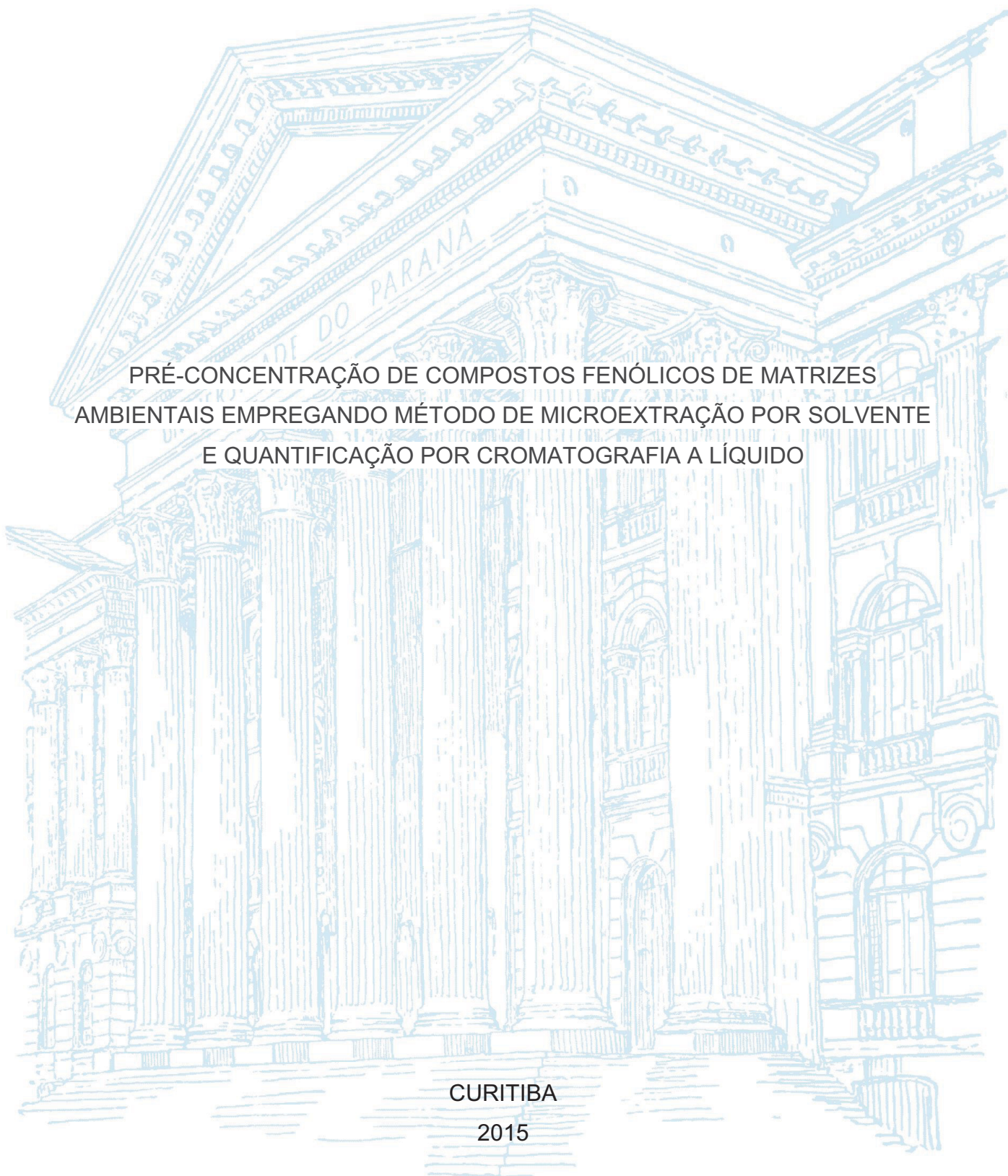
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL GARRETT DOLATTO

PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE MATRIZES
AMBIENTAIS EMPREGANDO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE
E QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

CURITIBA

2015



RAFAEL GARRETT DOLATTO

PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE MATRIZES
AMBIENTAIS EMPREGANDO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE
E QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor em Química, no Curso de Pós-
Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Abate
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Iara Messerschmidt

CURITIBA

2015

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

D659p Dolatto, Rafael Garrett
Pré-concentração de compostos fenólicos de matrizes ambientais empregando método de microextração por solvente e quantificação por cromatografia a líquido [Recurso eletrônico] / Rafael Garrett Dotatto – Curitiba, 2015.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2015.

Orientador: Gilberto Abate
Coorientadora: Iara Messerschmidt

1. Compostos fenólicos. 2. Solo. 3. Cromatografia. 4. Xisto. I. Universidade Federal do Paraná. II. Abate, Gilberto. III. Messerschmidt, Iara. IV. Título.

CDD: 547.632

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

**PRÉ-CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE MATRIZES AMBIENTAIS
EMPREGANDO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE E QUANTIFICAÇÃO
POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO**

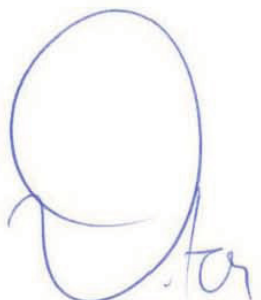
por

RAFAEL GARRETT DOLATTO

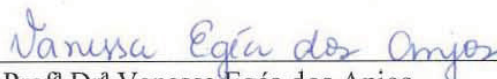
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Orientador: Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Vitor de Cinque Almeida
Dep. de Química – UEM



Prof.ª Dr.ª Vanessa Egéa dos Anjos
Dep. de Química – UEPG



Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedicado aos meus pais Marisa Garrett Dolatto e Celso Dolatto “in memoriam”, a minha irmã Karine Maria Garrett Dolatto e ao meu sobrinho Cauã Grienfelder Dolatto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a minha família pelos desafios que sempre superamos juntos!

Aos meus amigos e orientadores Prof. Dr. Gilberto Abate e Profa. Dra. Iara Messerschmidt que me iluminaram ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora pelas discussões, correção de relatórios, participação na banca de qualificação, empréstimo de equipamentos e reagentes sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi pelas discussões, sugestões e participação na banca de qualificação, e auxílio sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva pela importante contribuição no exame de qualificação.

Aos membros externos da banca de defesa Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos e Prof. Dr. Vitor de Cinque Almeida.

Em especial a Dra. Betânia Fraga Pereira pela amizade, conselhos e constante auxílio na condução deste trabalho.

Aos Dr. Carlos Augusto Posser Silveira, Dra. Rosane Martinazzo e Dr. Adilson Bamberg ambos do CPACT/Embrapa, Pelotas, RS pelas fundamentais contribuições que propiciaram a conclusão desta tese.

A Msc. Andréia Borgatto Apolinário (PETROBRAS/SIX, São Mateus do Sul, PR) pela autorização para as coletas de amostras de água na área industrial da PETROBRAS-SIX.

Aos companheiros do Laboratório de Processos e Projetos Ambientais: Aline, Estela, Edivaltrys, Marta, Nayana, Priscila, Juliana, Mayara, Younas, Liliam, Laiéli, Telma, Luís, Wellington, Ademar e Rafael.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental: Elisandra, Jeniffer, Juliane, Bárbara e Raquel pelo companheirismo e bons momentos.

Ao Grupo Tecnotrater, Sandra, Bianca e Marcus Vinicius.

Ao Grupo de Química Ambiental: Kelly, Emerson e Simone.

Aos Professores e técnicos do Departamento de Química da UFPR pela colaboração prestada.

Ao Departamento de Química da UFPR e PPGQ-UFPR por me acolher nesta jornada.

Ao Projeto Xisto Agrícola e todos os seus colaboradores em especial Lia, Marcela, Fátima e Thiago.

Ao programa REUNI, FAPEG/EMBRAPA CPACT e PETROBRAS-SIX pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o desenvolvimento de método analítico empregando microextração por solvente (SME) para extração e pré-concentração de fenol (Ph), *o*-Cresol (*o*-Cr), *m*-Cresol (*m*-Cr), *p*-Cresol (*p*-Cr) e 2,4-dimetil-fenol (2,4-DMF), visando a quantificação em amostras aquosas e extrato de solo previamente condicionado com xisto retortado (XR). As quantificações foram realizadas por cromatografia à líquido com detecção por arranjo de diodos (LC-DAD), fase móvel composta por acetonitrila:ácido acético 1,0 % (40:60), vazão de 1,00 mL min⁻¹, por eluição isocrática, coluna C18 (25 x 0,46 cm, 5 µm) a 40,0 °C, volume de injeção de 20,0 µL e detecção em comprimento de onda de 270 nm. Depois da avaliação de alguns procedimentos baseados em SME, foi proposta uma estratégia de extração em duas etapas (*two-step* SME), utilizando um balão volumétrico como frasco de extração. Na primeira etapa foi feita a extração com *n*-octanol, seguido por um segundo passo usando solução de NaOH como uma fase aceptora. As condições de extração como tipo de solvente extrator, volume de solvente, volume de amostra, pH, temperatura, tempo de agitação, efeito da força iônica, volume e concentração de solução aceptora de NaOH foram cuidadosamente investigadas de forma univariada e de modo multivariado por planejamento fatorial de experimentos fracionado 2⁵⁻¹. De acordo com os resultados do planejamento fatorial não foram observadas interações significativas entre as variáveis testadas, sendo que os efeitos mais importantes foram as concentrações de NaOH e NaCl e volume de *n*-octanol. Com base nos dois estudos as melhores condições de extração foram: 900 µL de *n*-octanol como solvente, NaOH 0,60 mol L⁻¹ como fase aceptora, tempo de extração de 5,0 min, HCl 0,01 mol L⁻¹ e NaCl 15,0 % na fase doadora, e 20,0 °C como temperatura de extração. Sob estas condições e utilizando 50,0 mL de amostra, o método apresentou limite de detecção entre 0,3 e 3,5 µg L⁻¹, limite de quantificação entre 1,2 e 10,6 µg L⁻¹, intervalo linear de 2,50 a 50,0 µg L⁻¹ (Ph, *o*-Cr, *m*-Cr+*p*-Cr) e entre 12,5 e 250,0 µg L⁻¹ (2,4-DMF). O método proposto, *two-step* SME foi aplicado com sucesso para a determinação dos compostos alvo em amostras aquosas de água da torneira, água de rio, água subterrânea, água do mar e um extrato aquoso obtido de um solo condicionado com XR. Foram observados resultados de recuperação de 72,5 a 126,0 % e desvio padrão relativo entre 0,3 e 11,5 %, sugerindo a utilização do método para a quantificação de compostos fenólicos polares em amostras aquosas, com exatidão e precisão adequadas.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Microextração por solvente. Cromatografia a líquido. Xisto retortado. Solo.

ABSTRACT

In the present work a solvent microextraction method (SME) was investigated for the extraction and preconcentration of phenol (Ph), *o*-Cresol (*o*-Cr), *m*-Cresol (*m*-Cr), *p*-Cresol (*p*-Cr) e 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), aiming the quantification in aqueous samples and in a soil extract from a soil previously conditioned with retorted shale (RS). Liquid chromatography with diode-array detector (LC-DAD) was employed with mobile phase composed by acetonitrile:1,0 % acetic acid (40:60), flow rate 1.00 mL min⁻¹ under isocratic elution, column C18 (25 x 0.46 cm, 5 μm) at 40.0 °C, volume of injection 20.0 μL, and detection in the wavelength of 270 nm. Some SME procedures were evaluated, and after that, the approach of two-step SME was proposed using a volumetric flask as an extraction flask. In the first step an extraction using *n*-octanol was made, followed by the second step of extraction by NaOH as an acceptor phase. All the extraction conditions as kind of extraction solvent, solvent volume, sample volume, pH, temperature, stirring time, ionic strength effect, volume and concentration of the NaOH as acceptor solution were thoroughly investigated by univariate study and using multivariate fractional design of experiments 2⁵⁻¹. The results of factorial design indicated no significant interactions between the variables, and the more important effects were the NaOH and NaCl concentrations and *n*-octanol volume. Based on both studies, the best conditions of microextraction were: 900 μL of *n*-octanol as solvent, 0.60 mol L⁻¹ NaOH as acceptor phase, extraction time of 5.0 min, 0.01 mol L⁻¹ HCl and 15.0 % NaCl in the donor phase, and 20.0 °C as temperature of extraction. Using these conditions and 50.0 mL of sample volume, the method presented limit of detection between 0.3 and 3.5 μg L⁻¹, limit of quantification between 1.2 and 11.6 μg L⁻¹, linear range from 2.50 to 50.0 μg L⁻¹ (Ph, *o*-Cr, *m*-Cr+*p*-Cr) and between 12.5 and 250.0 μg L⁻¹ (2,4-DMP). The proposed method *two-step* SME was successfully employed for determination of the target compounds in aqueous samples of tap water, river water, groundwater, sea water and an aqueous extract from a soil (Ultisol) conditioned with RS. Recovery results from 72.5 to 126.0 % and relative standard deviation between 0.3 and 11.5 % were observed, suggesting the use of the method for the quantification of polar phenolic compounds in aqueous samples, with appropriate accuracy and precision.

Keywords: Phenolic compounds. Solvent Microextraction. Liquid chromatography. Retorted Shale. Soil.

LISTA DE ACRÔNIMOS

A_p:	Área de pico
C₁₈:	Octadecilsilano
CF:	Compostos fenólicos
DI-LPME:	Direct immersed-liquid phase microextraction
DI-SDME:	Direct immersed single drop microextraction
DLLME:	Dispersive liquid liquid microextraction
DLLME-SFO	Dispersive liquid liquid microextraction-solidified floating organic droplets
DSDME:	Direct suspended droplet microextraction
EF:	Fator de enriquecimento
FLD:	Detector por fluorescência de raios X
GC-MS:	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
HF-LPME:	Hollow fiber-liquid phase microextraction
LC-DAD:	Cromatografia a líquido com detecção por arranjo de diodos
IL-DLLME	Ionic liquid dispersive liquid phase microextraction
LC-MS/MS:	Cromatografia em fase líquida acoplada a espectrômetro de massas tandem
LOD:	Limite de detecção
LLE:	Extração líquido-líquido
LLLME:	Liquid-Liquid-liquid microextraction
LPME-BE	Liquid phase microextraction with back extraction
LOQ:	Limite de quantificação
<i>m</i>-Cr:	<i>m</i> -Cresol
<i>m</i>-Cr+<i>p</i>-Cr:	Mistura de <i>m</i> -Cresol e <i>p</i> -Cresol
MS:	Espectrometria de massas
<i>n</i>:	Número de repetições
<i>o</i>-Cr:	<i>o</i> -Cresol
<i>p</i>-Cr:	<i>p</i> -Cresol
Ph:	Fenol
PTFE:	Politetrafluoretileno
R:	Recuperação
R²:	Coefficiente de determinação
Rs:	Resolução cromatográfica
RSD:	Desvio padrão relativo
<i>s</i>:	Estimativa de desvio padrão
S:	Inclinação de regressão linear
SD-LPME:	Solid drop-liquid phase microextraction
SDME:	Single drop microextraction
SME:	Solvent microextraction
SM-LLLME	Stir membrane-liquid liquid liquid microextraction
SPE:	Extração em fase sólida
SPME:	Microextração em fase sólida
T (1-6):	Tratamentos de campo variando de 1 a 6
T:	Temperatura
t_R:	Tempo de retenção
UV:	Ultravioleta
VMP:	Valores máximos permitidos
XR:	Xisto retornado
λ:	Comprimento de onda
2,4-DMF:	2,4-Dimetilfenol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CLASSIFICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR GOTA ÚNICA DE SOLVENTE.....	27
FIGURA 2: SDME COM IMERSÃO DIRETA DA GOTA NO PADRÃO AQUOSO.....	36
FIGURA 3: MICROEXTRAÇÃO EM GOTA DE SOLVENTE SUSPensa	37
FIGURA 4: ESQUEMA BÁSICO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM GOTA SOLIDIFICADA SD-LPME.	38
FIGURA 5: ESQUEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLLME).....	39
FIGURA 6: MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EM DUAS ETAPAS (TWO-STEP SME).....	40
FIGURA 7: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DOS CF ESTUDADOS	48
FIGURA 8: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS INJETADOS INDIVIDUALMENTE.....	49
FIGURA 9: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	51
FIGURA 10: CROMATOGRAMAS OBTIDOS EM DUAS COMPOSIÇÕES DISTINTAS DE FASE MÓVEL: A = CH ₃ CN:H ₃ COOH e B = CH ₃ OH:H ₃ COOH.....	52
FIGURA 11: CROMATOGRAMAS DOS CF PREPARADOS EM MEIO AQUOSO EM CONCENTRAÇÕES DE 0,50 mg L ⁻¹	53
FIGURA 12: CURVAS ANALÍTICAS DE Ph, m-Cr+p-Cr, o-Cr e 2,4-DMF.	54
FIGURA 13: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE Ph EM CONCENTRAÇÃO 50,0 mg L ⁻¹	60
FIGURA 14: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE o-Cr EM CONCENTRAÇÃO DE 50,0 mg L ⁻¹ E PRODUTO DA SÍNTESE (ACETATO DE O-CRESILA).....	61
FIGURA 15: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE p-Cr EM CONCENTRAÇÃO DE 50,0 mg L ⁻¹ E PRODUTO DA SÍNTESE (ACETATO DE P-CRESILA).	61
FIGURA 16: CROMATOGRAMAS DA AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ACETATO DE FENILA EM MEIO AQUOSO USANDO COMO EXTRATOR n-HEXANO:.....	62
FIGURA 17: AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR GOTA DE SOLVENTE SOLIDIFICADO (SD-LPME) VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV.	64
FIGURA 18: AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE FENOL.....	66
FIGURA 19: CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES AQUOSOS DE FENOL OBTIDOS APÓS SEREM SUBMETIDOS AO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EMPREGANDO n-OCTANOL COMO EXTRATOR	67
FIGURA 20: SELEÇÃO DO SOLVENTE PARA A EXTRAÇÃO DOS CF A PARTIR DE PADRÕES AQUOSOS DE 100 µg L ⁻¹ USANDO O MÉTODO TWO-STEP SME.....	68
FIGURA 21: AVALIAÇÃO DO VOLUME DE SOLUÇÃO ACEPTORA DE NaOH APÓS A EXECUÇÃO DE TODAS AS ETAPAS DO MÉTODO TWO-STEP SME	70
FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH PARA A EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME	71
FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE AGITAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME.....	72

FIGURA 24: AVALIAÇÃO DO VOLUME DE n-OCTANOL PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME.....	73
FIGURA 25: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HCL PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME.....	74
FIGURA 26: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE CF POR TWO-STEP SME.....	75
FIGURA 27: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME.....	77
FIGURA 28: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM FASE AQUOSA.....	79
FIGURA 29: CURVAS ANALÍTICAS DOS CF OBTIDAS VIA TWO-STEP SME.....	80
FIGURA 30: GRÁFICOS DE PARETO PARA EFEITOS CALCULADOS VERSUS VARIÁVEIS E INTERAÇÕES DE SEGUNDA ORDEM PARA CADA COMPOSTO FENÓLICO Ph, m-Cr+p-Cr, o-Cr e 4-DMF.	86
FIGURA 31: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ÁREAS PICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	87
FIGURA 32: CURVAS ANALÍTICAS, REFERENTES AOS CF, REALIZADAS POR TWO-STEP SME.....	90
FIGURA 33: CROMATOGRAMAS DOS CF (1) Ph, (2) m-Cr+p-Cr, (3) o-Cr e (4) 2,4-DMF, OBTIDOS POR TWO-STEP SME:	92
FIGURA 34: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO VOLUME DE INJEÇÃO NOS VALORES DE ÁREAS DE PICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURAS QUÍMICAS E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
TABELA 2: VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1} PARA O PROCEDIMENTO TWO-STEP SME.....	41
TABELA 3: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-1}	42
TABELA 4: AMOSTRAS DE ÁGUAS UTILIZADAS PARA VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO.....	45
TABELA 5: TRATAMENTOS, DOSES DE XR ACUMULADAS E ADUBAÇÃO APLICADA NO EXPERIMENTO DO PROJETO XISTO AGRÍCOLA.	46
TABELA 6: PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS (PADRÕES AQUOSOS).....	55
TABELA 7: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DETERMINADAS EM PADRÕES AQUOSOS APÓS O PROCEDIMENTO POR TWO-STEP SME.	78
TABELA 8: CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA EXTRAÇÃO DOS CF VIA TWO-STEP SME.	78
TABELA 9: PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS VIA TWO-STEP SME.	81
TABELA 10: ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM PADRÕES AQUOSOS, EMPREGANDO TWO-STEP SME E QUANTIFICAÇÃO POR LC-DAD.	82
TABELA 11: ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DOS CF EM EXTRATOS DE SOLO EMPREGANDO TWO-STEP SME.	82
TABELA 12: RESPOSTAS OBTIDAS COMO ÁREAS DE PICOS (A_p) DOS CF PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-1}	84
TABELA 13: EFEITOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{5-1} DO MÉTODO TWO-STEP SME.....	85
TABELA 14: CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA A EXTRAÇÃO DOS CF VIA TWO-STEP SME.....	88
TABELA 15: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DETERMINADAS EM PADRÕES AQUOSOS APÓS O PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO.....	89
TABELA 16: PARÂMETROS MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS VIA TWO-STEP SME.....	90
TABELA 17: PERCENTUAIS DE RECUPERAÇÃO (R) DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS, EXTRATOS DE XR E DE SOLO CONDICIONADO COM XR, DETERMINADOS POR TWO-STEP SME.....	94
TABELA 18: COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS MÉTODOS SME PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS AQUOSAS POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO E DETECÇÃO NA REGIÃO DO UV.	97

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	COMPOSTOS FENÓLICOS – ASPECTOS AMBIENTAIS	16
2.2	COMPOSTOS FENÓLICOS – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	17
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	19
2.4	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE MATRIZES AMBIENTAIS	21
2.5	MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE (SME)	25
2.6	SUBPRODUTOS DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO FOLHELHO PIROBETUMINOSO (XISTO)	30
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	SOLUÇÕES PADRÃO, REAGENTES E EQUIPAMENTOS	33
5.2	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	34
5.3	PROCEDIMENTO PARA DERIVATIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	35
5.4	MICROEXTRAÇÃO EM GOTA DE SOLVENTE (SDME)	35
5.5	MICROEXTRAÇÃO EM GOTA DE SOLVENTE SUSPensa (DSDME)	36
5.6	MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM GOTA SOLIDIFICADA (SD-LPME)	37
5.7	MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLLME)	38
5.8	MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EM DUAS ETAPAS (TWO-STEP SME)	40
5.9	DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO VIA TWO-STEP SME	41
5.10	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1}	41
5.11	CURVAS ANALÍTICAS	44
5.12	AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS	45
5.13	AMOSTRAS DE SOLO CONDICIONADO COM XISTO RETORTADO	45
5.14	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE SOLO CONDICIONADOS COM XR E DO XR	46
5.15	ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO	47
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1	ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR NA REGIÃO DO UV	47
6.2	CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO	49
6.3	CURVAS ANALÍTICAS POR DETERMINAÇÃO DIRETA	54
6.4	ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS USADAS PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUA	56
6.5	MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE	57
6.6	MICROEXTRAÇÃO POR GOTA ÚNICA DE SOLVENTE (SDME)	58
6.7	MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EM GOTA DIRETAMENTE SUSPensa (DSDME)	59
6.8	SÍNTESE DOS ÉSTERES DE FENOL	59
6.9	MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM GOTA SOLIDIFICADA (SD-LPME)	63
6.10	MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLLME)	64
6.11	MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EM DUAS ETAPAS (TWO-STEP SME)	65
6.12.1	Escolha do solvente	68

6.12.2	Avaliação do volume de NaOH.....	69
6.12.3	Estudo da concentração de NaOH	71
6.12.4	Estudo do tempo de agitação	72
6.12.5	Estudo do volume de n-octanol para a extração	73
6.12.6	Estudo da concentração de HCl	74
6.12.7	Estudo da temperatura	75
6.12.8	Estudo da força iônica	76
6.12	PARÂMETROS DE DESEMPENHO E CURVAS ANALÍTICAS.....	78
6.13.1	Avaliação da exatidão e precisão do método.....	81
6.13	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O MÉTODO TWO-STEP SME	83
6.14	PARÂMETROS DE MÉRITO E CURVAS ANALÍTICAS	88
6.15.1	Ensaio de recuperação em amostras aquosas	93
7	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos (CF) são caracterizados pela ligação de pelo menos um grupamento hidroxila (-OH) a um ou mais anéis benzênicos. Trata-se de uma ampla classe de moléculas que pode ser separada de acordo com sua origem no ambiente. Os CF de origem natural possuem funções biológicas importantes para plantas e animais, sendo de modo geral benéficos ao homem. Já os de origem sintética são de elevada relevância econômica e largamente empregados na indústria. No entanto podem causar a contaminação de águas e solos quando descartados inadequadamente em meio aquático e terrestre. No meio ambiente isso se torna um problema sério uma vez que podem apresentar efeitos nocivos aos animais e seres humanos.

Apesar de não terem efeitos tóxicos crônicos comprovados no homem são considerados suspeitos de serem carcinogênicos, podendo inclusive mimetizar proteínas nos organismos de animais agindo como interferentes endócrinos. No ambiente o aporte dos CF sintéticos ocorre principalmente em águas e solo devido a descartes inadequados de resíduos contendo estes compostos. Além disso, também podem ser formados subprodutos da decomposição de outros materiais no ambiente como polímeros, surfactantes, fármacos, tintas, pesticidas, herbicidas e resíduos de esgoto, de fundições e também na extração e processamento de combustíveis fósseis como carvão, xisto e petróleo.

Dentre esses materiais que podem conter CF em sua composição destacam-se os subprodutos da industrialização do folhelho pirobotuminoso ou xisto. Estudos de caracterização deste material mostraram em sua composição atrativas concentrações de elementos químicos, macro e micronutrientes importantes ao desenvolvimento vegetal. Por tal motivo a potencialidade do uso de xisto retornado (XR) vem sendo estudada do ponto de vista da segurança alimentar e eficiência agrônômica como condicionador de solo. Por outro lado, além dos elementos essenciais às plantas, também podem ocorrer nessa matriz (XR) outras espécies químicas como elementos metálicos e compostos orgânicos tóxicos. Dentre os compostos orgânicos, os CF como fenol e cresóis surgem em sua composição geralmente em concentrações traço. Uma vez que se espera utilizar o XR como condicionador de solos são necessários estudos de segurança ambiental do uso deste subproduto em solo, sendo as avaliações direcionadas a dessorção de espécies fenólicas em solo, extratos de solo e águas.

No entanto, a extração de CF de matrizes aquosas ambientais e de solos em concentrações traço é uma tarefa desafiadora. Isto se deve à ionização destas espécies em meio aquoso e também a possibilidade de ligação de hidrogênio da hidroxila fenólica intermolecular ou interação com a matriz aquosa, sedimentos e solo. Conseqüentemente, fenóis de baixa massa molar como fenol e cresóis apresentam elevadas polaridades e

solubilidades em água, o que dificulta sua extração por métodos clássicos de extração e determinação direta por métodos instrumentais como a cromatografia a gás (GC).

Já a cromatografia a líquido (LC) tem sido usada com sucesso na determinação de espécies fenólicas em concentrações de micro ($\mu\text{g L}^{-1}$) a nanogramas (ng L^{-1}), com o uso de sistemas de detecção apropriados como fluorescência (FLD) ou quando acoplada a espectrômetro de massas (MS). Por outro lado, os detectores espectrofotométricos têm menor custo e são capazes de atingir limites de quantificação (LOQ) iguais ou até menores do que aqueles estipulados nas legislações. No entanto, a absorvidade molar de alguns analitos fenólicos geralmente não é suficiente para proporcionar níveis de detecção satisfatórios para determinação em amostras ambientais. Em vista disso, procedimentos voltados ao enriquecimento e/ou derivatização dos compostos são utilizados, tanto para a técnica de GC como LC, visando incrementar os sinais analíticos.

Em virtude das limitações relacionadas com detectabilidade de CF sintéticos, aos níveis de concentração e polaridade desses analitos, vêm sendo relatado na literatura procedimentos de extração e pré-concentração envolvendo a miniaturização dos sistemas de extração. Essa diminuição da escala dos métodos visa torná-los mais simples, baratos e versáteis, facilitando o controle de variáveis e minimizando a geração de resíduos. Nesta vertente os métodos miniaturizados, como a microextração em fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME) e microextração por solvente (*Solvent Microextraction*, SME) foram desenvolvidos para diversos analitos, sendo que, de modo geral, a extração de compostos orgânicos de matrizes aquosas ainda é uma das mais estudadas. No entanto, dentre os vários métodos de SME voltados para a quantificação de espécies fenólicas em matrizes aquosas, poucos são destinados à quantificação por LC. Isso se deve, algumas vezes, à incompatibilidade do solvente extrator com as condições cromatográficas de análise, necessitando uma etapa adicional para transferir os analitos extraídos pelo solvente para uma fase compatível com as fases móveis empregadas em LC operando em fase reversa.

Dentre os modos de SME compatíveis com LC podem ser citados os sistemas utilizando três fases, denominado microextração líquido-líquido-líquido (*Liquid-Liquid-Liquid Microextraction*, LLLME), a microextração por solvente em duas etapas (*Two-step solvent microextraction*, SME), microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) e os procedimentos que empregam membranas porosas e ocas (*Hollow-fiber Liquid-phase Microextraction*, HF-LPME).

O preparo das amostras é fundamental para o sucesso da técnica de quantificação escolhida, para elevar o fator de enriquecimento (EF) dos analitos, redução de custos e a remoção ou diminuição da concentração de interferentes, visando o aumento da vida útil dos equipamentos, sinais analíticos com menos interferência e maior segurança aos analistas.

Nesse aspecto estudos voltados ao desenvolvimento de novos métodos analíticos de preparo de amostras são importantes, visando simplificar e minimizar custos de análises tornando-os mais ambientalmente adequados. Face ao exposto, neste trabalho foi desenvolvido um método de microextração por solvente (SME), denominado *two-step* SME, para a determinação de cinco espécies fenólicas de origem sintética: fenol (Ph), *o*-cresol (*o*-Cr), *m*-cresol (*m*-Cr), *p*-cresol (*p*-Cr) e 2,4-dimetilfenol (2,4-DMF), em amostras aquosas ambientais, extratos aquosos de xisto retornado (XR), de solo e de solo condicionado com XR. As quantificações foram realizadas por cromatografia em líquido (LC) com sistema de detecção espectrofotométrico por arranjo de diodos (DAD).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos fenólicos – aspectos ambientais

Compostos fenólicos podem ser encontrados no ambiente a partir de fontes naturais ou sintéticas. Dentre as fontes de origem natural destaca-se a presença de fenóis na composição de alimentos e plantas, principalmente na forma de flavonóides (SOLOMONS e FRHYLE, 2009 e GHASEMZADEH e GHASEMZADEH, 2011). Além disso, os fenóis podem surgir naturalmente no solo, a partir de dejetos de animais, ou pela degradação de substâncias húmicas (DEC e BOLLAG, 1994) e lignina presente na madeira (HÄTTENSCHWILER; VITOUSEK, 2000; MAHUGO SANTANA et al., 2009)(HÄTTENSCHWILER; VITOUSEK, 2000; MAHUGO *et al.*, 2009). Além disso, de modo geral não apresentam toxicidade para a maioria das plantas e animais, sendo em muitos casos considerados benéficos a saúde do homem. Dentre esses são citados na literatura os flavonóides as antocianinas, catequinas e polifenóis como resveratrol presentes em alimentos e bebidas, que apresentam propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE *et al.*, 2007; ARCHELA e DALL'ANTONIA, 2013).

Em relação às fontes sintéticas, as de origem antropogênicas são as principais causadoras de contaminação do ambiente (ENVIRONMENT AGENCY, 2003). O fenol é amplamente utilizado na fabricação de resinas fenólicas, como intermediário na produção de produtos como bisfenol A, ácido salicílico, alquilfenóis, anilina, xilenóis e ciclo-hexanona (NGUYEN, 2003). De acordo com Zhao e Lee (2001) esses compostos também são utilizados ou gerados na produção de plásticos, desinfetantes, fármacos, pesticidas, antioxidantes, papel e na indústria petroquímica. A contaminação ambiental por compostos fenólicos provenientes de fontes pontuais, como o descarte incorreto de efluentes contendo essas espécies, é um sério problema, principalmente pela suspeita de carcinogenicidade destas espécies. Além disso, havendo contaminação de águas e solos, estes compostos podem

entrar em contato com plantas, ou serem consumidos pelos seres vivos e pelo próprio homem. De acordo com Veeresh *et al.* (2005), os fenóis podem ter efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Eles são inibidores de crescimento para microrganismos em processos de tratamento biológico. Uma concentração de fenol igual ou superior a 1 mg L^{-1} afeta a vida aquática (VEERESH *et al.*, 2005). Outro aspecto é que se a contaminação ocorrer em corpos de água destinados a abastecimento público, pode ocorrer a cloração dos fenóis formando clorofenóis e por consequência a modificação das propriedades organolépticas da água.

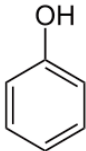
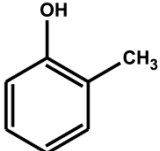
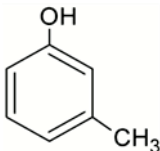
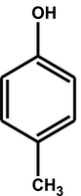
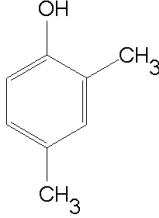
Considerando o risco de contaminação destes compostos em água e solo, a Agência de Proteção Ambiental (*United States - Environmental Protection Agency*, US-EPA) estipula valores de concentração de fenóis totais no máximo de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para águas destinadas a consumo humano e valores menores que $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para solos com finalidades agrícolas. De acordo com a diretiva 80/778 EEC da comunidade europeia (EEC, 1995) valores de concentração de CF totais em águas destinadas a consumo humano é de no máximo $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ou $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para cada espécie fenólica. No Brasil a Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 2008 e sua complementação dada pela Resolução 430 de 2011 estabelece a concentração máxima para águas classe 1 (águas doces) o valor de $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para fenóis totais. Em relação às águas subterrâneas a Resolução CONAMA 396 de 2008, estabelece valor máximo permitido (VMP) de $3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para fenóis totais em águas subterrâneas que forem destinadas para consumo humano e a Resolução CONAMA 420 de 2009 (CONAMA, 2009) estipula valores de concentração de $140 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para fenol e $175 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para cresóis ambos em águas subterrâneas. No que se refere a solos cultiváveis a mesma resolução estipula concentrações em solos de $160 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e para cresóis totais de $200 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de solo. Vale ressaltar que a Portaria do Ministério da Saúde MS 2914/11 (BRASIL, 2011) que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, apresenta os valores de VMP para dois CF clorados o pentaclorofenol e 2,4,6-triclorofenol, sendo seus VMP de 9 e $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

2.2 Compostos fenólicos – parâmetros físico-químicos

Os fenóis são caracterizados pela presença de um grupamento hidroxila ligado diretamente a um anel benzênico. Podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados. (SOLOMONS e FRHYLE, 2009; OLIVEIRA e BASTOS, 2011). O composto mais simples da família é o fenol ou hidroxibenzeno que faz parte da classe de compostos fenólicos sintéticos, assim como, os monometilfenóis

que recebem o nome de cresóis. Na Tabela 1 são mostradas as estruturas e algumas características físico-químicas de algumas espécies fenólicas.

TABELA 1 - ESTRUTURAS QUÍMICAS E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS.

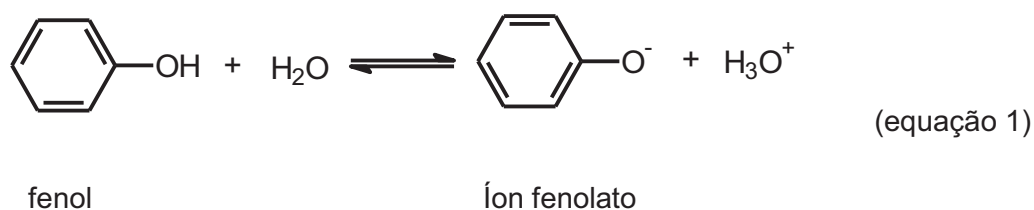
Composto	Ph	o-Cr	m-Cr	p-Cr	2,4-DMF
Estrutura					
M.M. (g mol ⁻¹) ^a	94,11	108,14	108,14	108,14	122,17
P (mm Hg) ^b	0,36	0,31	0,49	0,13	0,97
S (g L ⁻¹ a 20 °C) ^c	93,0	25,0	23,0	23,5	5,0
pK _a ^d a 25°C	9,89	10,20	10,09	10,26	10,60
Log K _{ow} ^e a 25°C	1,46	1,95	1,98	1,94	2,40

^a M.M. = massa molar; ^b P = pressão de vapor a 25 °C; ^c S = solubilidade em água; ^d pK_a = logaritmo da constante de dissociação e ^e K_{ow} = constante de partição octanol/água.

Fonte: IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1996

De acordo com a Tabela 1, os cresóis apresentam valores de seus parâmetros físico-químicos muito próximos, com exceção da pressão de vapor, com diferenças que permitem uma considerável diferenciação em relação ao fenol e 2,4-DMF. De um modo geral, as pressões de vapor são baixas, em comparação a outros compostos orgânicos, indicando que os compostos são pouco voláteis a 25 °C. Por outro lado, a solubilidade é relativamente elevada em água, sendo o fenol o mais solúvel e 2,4-DMF o menos solúvel. Os fenóis são compostos relativamente ácidos, porém, menos ácidos que os ácidos carboxílicos e podem ser convertidos em seus respectivos sais, por soluções aquosas de hidróxidos. Estes sais são conhecidos como fenóxidos ou fenolatos (GUILARDUCI *et al.*, 2006).

Em meio aquoso os CF exibem o comportamento de um ácido fraco, exemplificado pelo fenol, conforme equação 1.



Em meio alcalino se encontra na forma dissociada como íon fenolato (GUILARDUCI *et al.*, 2006).

Um parâmetro de grande importância, em estudos envolvendo a extração e determinação de fenóis, é o coeficiente de partição *n*-octanol/água (K_{OW}), pois é um indicativo da polaridade e afinidade dos compostos por outros solutos. O K_{OW} é definido como a relação da concentração em equilíbrio de um composto orgânico na fase *n*-octanol em relação à concentração do composto na fase aquosa, conforme a equação 2:

$$K_{ow} = \frac{C_o}{C_w} \quad (\text{Equação 2})$$

Na Equação 2, C_o denota a concentração em equilíbrio do composto de interesse na fase octanólica e C_w representa a concentração do composto químico na fase aquosa. O valor de K_{OW} é um parâmetro ambiental importante, pois pode ser usado para estimar o comportamento de compostos orgânicos, quando em contato com substratos ou matrizes complexas como solo, sendo considerada uma medida indicativa da hidrofobicidade de uma dada espécie orgânica (AGOSTINHO *et al.*, 2006). Nesse sentido o conhecimento das características da matriz como teor e tipo de matéria orgânica, granulometria e tipos de minerais juntamente com o conhecimento dos valores de K_{ow} são interessantes para inferir qual terá maior interação em águas, sedimentos e solos. De modo geral, em solos com elevados teores de matéria orgânica, estes tendem a sorver espécies orgânicas com maiores valores de log de K_{ow} , por outro lado compostos mais hidrofílicos, com baixos valores de K_{ow} , terão maior afinidade pela fase aquosa.

Os valores de log de K_{OW} de CF sintéticos como fenol e cresóis são menores comparativamente a espécies de caráter menos polares como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e bifenilas policloradas (PCB). De acordo com isso a tendência de CF em amostras de águas naturais é de permanecer, majoritariamente, na fase aquosa frente ao material particulado e sedimentos em suspensão. Deste modo, o conhecimento das características físico-químicas dos compostos, tem como uma das principais funções, auxiliar na interpretação de estudos de contaminação de águas e solos por essas espécies, e também direcionar a escolha dos métodos de extração e as técnicas de quantificação adequadas (MITRA, 2004).

2.3 Técnicas analíticas para quantificação de compostos fenólicos

Para a determinação de CF, as técnicas como cromatografia a gás (GC) e a líquido (LC) são as mais utilizadas devido a possibilidade de separação dos analitos mesmo quando estes se encontram presentes em matrizes complexas. Essas técnicas quando acopladas a sistemas de detecção modernos, proporcionam sensibilidade e seletividade necessárias para

determinação dos compostos de interesse em amostras aquosas ambientais em níveis de concentração na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} .

A GC, embora apresente limitações quanto à separação de compostos termo lábeis (que se decompõem com aquecimento) usualmente apresenta como vantagens menores limites de quantificação e maiores resoluções cromatográficas. No entanto na maior parte dos casos requer processos de derivatização em decorrência da elevada polaridade da maioria dos CF (FARAJI *et al.*, 2009; MAHUGO SANTANA *et al.*, 2009; PADILLA-SÁNCHEZ *et al.*, 2011). Por outro lado, atualmente, grande parte dos métodos via SME têm maior compatibilidade com GC. Isso devido a questões relacionadas ao solvente extrator, que pode ser injetado diretamente sistema, em micro volumes (1-50 μL) favorecendo elevados valores de fator de enriquecimento e no aspecto ambiental devido a economia de energia, materiais e solventes. Na maioria dos trabalhos consultados na literatura relativos à determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas são utilizados procedimentos por SME voltados a determinação por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). Esta apresenta seletividade, sensibilidade e LOQ compatíveis com amostras ambientais, onde os fenóis podem ocorrer em concentração traço ($\mu\text{g L}^{-1}$) (BAGHERI *et al.*, 2004). A GC por muitas vezes apresenta a vantagem da injeção direta do extrato do solvente orgânico contendo os analitos, mas requer que os analitos tenham baixa polaridade e que a programação de temperatura seja efetuada em consonância com os pontos de ebulição dos analitos. Para compostos com elevadas polaridades como CF geralmente é realizada uma etapa de derivatização prévia visando modificar sua forma química, implicando em substâncias como menores polaridades e pontos de ebulição.

A cromatografia à líquido é outra técnica frequentemente empregada para a quantificação de compostos fenólicos (ALCUDIA-LEÓN *et al.*, 2011; VERA-AVILA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013). Apresenta resoluções inferiores a GC e geralmente maiores valores de LOQ, mas sua principal vantagem é maior compatibilidade com amostras aquosas ambientais, sendo em muitos casos possível a injeção direta de várias amostras com preparação mínima. Além disso, em muitos casos não é necessário derivatização dos analitos (SARAJI e MARZBAN, 2010; ALCUDIA-LEÓN *et al.*, 2011 e ZHANG *et al.*, 2011). No entanto amostras como extratos de solo, ou efluentes industriais ainda requerem métodos de preparo, no sentido de se obter melhores sinais analíticos e também preservar os instrumentos (JAIN e VERMA, 2011). A qualidade dos sinais analíticos nesses casos será alcançada mediante à procedimentos de limpeza das amostras que visa eliminar ou diminuir a concentração de interferentes e ao mesmo tempo se possível promover a pré-concentração dos analitos.

Outra técnica emergente com aplicações relevantes em análises ambientais é a eletroforese capilar (CE) (WANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; TURKIA *et al.*, 2013) que

tem sido usada em paralelo a GC e LC. Apresenta como desvantagem altos limites de detecção que têm sido superados usando técnicas de derivatização ou com uso de injetor de alto volume (SANTANA *et al.*, 2009). Técnicas com menor custo como espectrofotometria na região do ultravioleta e voltametria também podem ser utilizadas, contudo, na maioria dos casos, há a limitação de baixa seletividade e sobreposição espectral, especialmente no caso da espectrofotometria (ZHAO e LEE, 2001).

2.4 Métodos de extração de compostos fenólicos de matrizes ambientais

Métodos de extração são de fundamental importância na determinação de poluentes orgânicos em matrizes ambientais. A extração e determinação de CF mais polares em baixos níveis de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou $\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras ambientais como águas e solo são geralmente problemáticas. Isso se deve a forte interação destes analitos com o solo, complexidade do substrato e elevada solubilidade em água (FUNG *et al.*, 2001). Dentre os métodos mais utilizados na literatura para extração de CF de matrizes ambientais podem ser citadas a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), extração em fase sólida (*solid phase extraction*, SPE), microextração em fase sólida (*solid phase microextraction*, SPME) e alguns métodos alternativos como extração em ponto nuvem (*cloud point extraction*, CPE), extração com barra sortiva de agitação (*stir-bar sortive extraction*, SBSE) e utilizando líquidos iônicos (*ionic liquids liquid phase microextraction*, IL-LPME).

A LLE é um método de extração de uma amostra aquosa com um solvente orgânico imiscível. É baseada na partição dos analitos entre a amostra (fase aquosa) e um solvente orgânico (fase orgânica). É considerado o método mais simples e robusto para extração de compostos orgânicos de amostras aquosas e suas vantagens estão relacionadas a simplicidade operacional e elevadas recuperações por ser um método exaustivo (MITRA, 2004). No entanto, neste processo há tendência de formação de emulsões e, dependendo da amostra, após a extração é necessário realizar a etapa de limpeza (*clean-up*) ou remoção de água do extrato, para eliminar compostos co-extraídos que eventualmente possam interferir na quantificação (PUIG e BARCELÓ, 1996 e EPA METHOD 604, 1984). A extração de compostos orgânicos polares e solúveis em água, como fenóis, é geralmente laboriosa via LLE (FUNG *et al.*, 2001), pois devido a elevada interação dos analitos com a fase aquosa são necessárias extrações sequenciais para atingir recuperações satisfatórias. Além disso, podem ocorrer alguns inconvenientes, como muito tempo para a evaporação de grandes volumes de solvente ou difícil descarte dos mesmos, os quais geralmente são inflamáveis ou tóxicos (SABIK *et al.*, 2000; LANÇAS, 2004; SANTANA *et al.*, 2009).

Em função das limitações da LLE, a abordagem via SPE, surgiu como uma alternativa, pois sua proposta era minimizar ou eliminar esses inconvenientes. De modo geral, a SPE é

baseada na interação de analitos, contidos em uma amostra líquida, que são eluídos por um cartucho contendo a fase sorvente imobilizada e com polaridade conhecida, que terá características químicas voltadas a favorecer uma maior interação com os compostos alvos com polaridades geralmente semelhantes a fase sorvente. Em outra etapa esses compostos retidos na fase sorvente são eluídos com um volume mínimo de solvente e posteriormente determinados por LC ou GC. A SPE possui diversas fases sorventes disponíveis comercialmente, e vem sendo utilizadas em trabalhos de monitoramento ambiental, ou no desenvolvimento e aprimoramento de métodos, geralmente cromatográficos, sendo bem consolidada atualmente. Dentre algumas fases para SPE destacam-se, a sílica, a alumina, o florisil, a celulose, as poliamidas e principalmente octadecilsilano C18 (LANÇAS, 2004). Especial destaque com relação ao procedimento empregando SPE consiste no fato do emprego de volumes muito inferiores de solventes, quando comparado a LLE (RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; SANTANA *et al.*, 2009), repercutindo em elevados fatores de enriquecimento. Por outro lado, sua utilização é mais restrita a amostras em fase líquida, geralmente necessitando solubilização dos analitos e elevados volumes de amostras para incremento dos valores de EF. A necessidade do uso de solventes orgânicos para eluição dos analitos e o custo relativamente elevado dos cartuchos, também são considerados inconvenientes. Em relação à extração de CF em solo é necessário procedimento anterior ou uma etapa de extração líquido-sólido para a transferência dos analitos contidos no solo para a fase aquosa, podendo essa ser posteriormente submetida à SPE (FUNG *et al.*, 2001). Essas características motivaram a realização de estudos voltados à processos alternativos de extração e enriquecimento dos analitos.

Nesse sentido, outro recurso que vem sendo bastante explorado é SPME (XU e LEE, 2007; ALVAREZ *et al.*, 2008; SANTANA *et al.*, 2009). A SPME foi originalmente desenvolvida por Arthur e Pawliszyn, 1990 e é fundamentada na sorção de analitos inorgânicos e orgânicos em amostras que podem estar em fases sólida, líquida e gasosa. Os compostos de interesse são retidos em uma fibra de sílica fundida recoberta com a fase sorvente de estrutura e polaridade conhecidas, existente na ponta de uma agulha de seringa cromatográfica. Embora esse tipo de extração seja mais direcionado a amostras líquidas, pode também ser utilizada em modo *headspace*, empregando ou não aquecimento, para volatilização de parte dos analitos da matriz sem que a mesma tenha contato com a fibra sorvente (MITRA, 2004; BRUNETTE *et al.*, 2008; CASSIANO *et al.*, 2014). A fibra sorvente é apresentada na forma retrátil, dentro da agulha da seringa cromatográfica, e após a injeção no cromatógrafo a gás os analitos são dessorvidos termicamente no injetor. Além disso, a SPME é compatível com LC, necessitando a dessorção dos compostos alvos com solvente ou fase líquida compatível às condições cromatográficas utilizadas na determinação. As principais vantagens da técnica

é a redução no volume de amostra e eliminação do uso de solvente quando usada em conjunto à GC. No entanto alguns autores ainda consideram as fibras frágeis, com vida útil curta e susceptível a perdas da camada de revestimento polimérico (DUAN *et al.*, 2011).

Outra estratégia robusta de extração em fase sólida é a extração em barra sortiva de agitação (SBSE). O método consiste em uma barra magnética recoberta com um material sorvente polidimetilsiloxano (PDMS). Essa barra então é colocada em um frasco contendo uma amostra aquosa e os analitos são sorvidos após intensa agitação magnética que na sequência são dessorvidos termicamente ou com solventes apropriados. Nesse sentido, as variáveis de extração como pH, temperatura, tempo de extração, velocidade de agitação, volume de amostra, características das barras magnéticas e tipo de material de revestimento são alguns fatores que irão influenciar na extração e no desempenho do procedimento (DAVID e SANDRA, 2007).

Baseado nisso Hu *et al.* (2007) desenvolveram um novo tipo de revestimento para aplicação em SBSE usando nanotubos de carbonos funcionalizados com grupo amino (MWCNTs-DDM/PDMS). Os autores estudaram a extração de sete fenóis (fenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dimetilfenol, *p*-cloro-*m*-cresol e 2,4,6-triclorofenol) em amostras ambientais de água e solo, seguido por quantificação via LC com detecção ultravioleta (LC-UV). A produção das barras foi avaliada em termos da reprodutibilidade entre lotes das barras produzidas, sendo obtido valores de desvio padrão relativo (RSD) entre 4,7% a 11,3 % ($n = 9$) para um lote e de 4,8% para 13,9% ($n = 8$) entre diferentes lotes de barras. Foram investigados vários parâmetros que afetam a extração dos CF incluindo o tempo de extração, pH, força iônica, solvente para dessorção, agitação e tempo de dessorção. Sob as condições experimentais ótimas, os valores de LOD foram determinados no intervalo de 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2-nitrofenol) a 1,76 $\mu\text{g L}^{-1}$ (fenol) e de LOQ no intervalo de 0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$ (2-nitrofenol) para 5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (fenol). A faixa linear foi de 5 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para fenol e 4-nitrofenol 1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 2-nitrofenol e 2 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para outros fenóis, respectivamente. Os valores de RSD do método desenvolvido situaram-se entre 6,2 e 11,6 % ($n = 8$, Conc. = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) e os EF variaram entre 6,5 e 62,8 vezes. O método proposto foi aplicado na quantificação de fenóis em amostras ambientais de água e solo e boas recuperações foram obtidas para as amostras enriquecidas. De acordo com os autores o método proposto é simples, altamente sensível e apropriado a quantificação dos analitos nas matrizes estudadas (HU *et al.*, 2013).

Além dos métodos miniaturizados de extração em fase sólida, que ainda empregam solventes, outros procedimentos da literatura relatam a utilização de outros tipos de soluções extratoras. Nesse caso a extração usando surfactantes (CPE) e com líquidos iônicos (IL-LPME).

A extração empregando a abordagem da técnica por ponto nuvem (*Cloud Point Extraction*, CPE), tem sido utilizada no preparo de amostras para determinações por cromatografias a líquido e a gás. A técnica é baseada na extração dos analitos (orgânicos ou inorgânicos) por uma fase rica em surfactante. Após o tempo de contato adequado com a amostra, a fase contendo surfactante é separada e tratada convenientemente para injeção no sistema por LC ou GC. Takagai e Hinze (2009), utilizando o surfactante Triton X-114, aplicaram com sucesso a CPE e a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa na quantificação de compostos fenólicos. O estudo foi baseado na derivatização dos analitos e do surfactante diretamente na fase rica em surfactante, antes da injeção no cromatógrafo a gás. O procedimento utilizado forneceu um melhor desempenho cromatográfico gerando tempo de eluição razoável, livre de sinais decorrentes da derivatização do surfactante e resultados reprodutíveis quanto aos tempos de retenção do analito. No mesmo trabalho foram testadas misturas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, herbicidas e fármacos para demonstrar a viabilidade e desempenho do método. Recuperações na faixa de 90-100% foram obtidas assim como baixos limites de detecção, indicando que o protocolo proposto pelos autores ofereceu uma atrativa alternativa para ser utilizada como uma etapa de pré-concentração antes da cromatografia a gás (TAKAGAI e HINZE, 2009). A utilização do mesmo procedimento empregando CPE também foi realizada com sucesso por Seronero *et al.* (2000), visando a extração e pré-concentração de diversos clorofenóis; bem como por Wei e He (2008) para a determinação de fenóis e *m*-nitrofenol (WEI *et al.*, 2008).

Os líquidos iônicos são compostos que podem ser utilizados como solventes não moleculares e que apresentam pontos de fusão inferiores a 100 °C. Suas propriedades os tornam atrativas para estudos envolvendo extração, pois possuem pressão de vapor desprezível à temperatura ambiente, elevada estabilidade térmica e viscosidade variável. A sua miscibilidade em água e solventes orgânicos pode ser modulada selecionando por incorporação de certos grupos funcionais na molécula do líquido iônico. Além disso, eles possuem uma grande variedade de propriedades físico-químicas ajustáveis. Essas propriedades têm motivado estudos em vários campos da química analítica incluindo em procedimentos de microextração por solvente (TRUJILLO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013).

Zhou *et al.* (2011) realizaram a determinação de fenóis por cromatografia a líquido utilizando para o preparo das amostras líquido iônico e microextração em modo líquido-líquido dispersivo com temperatura controlada. Os autores realizaram a extração e enriquecimento de 2-clorofenol, 2-naftol, 2,4-dinitrofenol, e 2,4-diclorofenol em amostras aquosas empregando líquido iônico, 1-octil-3-metil-imidazol hexafluorofosfato ([C₈MIM][PF₆]). Foram estudados os parâmetros que afetam a eficiência de extração, o volume de [C₈MIM][PF₆], temperatura, tempo de extração, o pH da amostra, da quantidade de etanol, tempo de centrifugação e efeito

de *salting out*. Sob condições ótimas de extração a faixa linear foi determinada em concentração de 1-100 ng mL⁻¹ para o 2-clorofenol, 2-naftol, 2,4-dinitrofenol, e 1,5-150 ng mL⁻¹ para 2,4 diclorofenol, e LOD no intervalo de 0,27 a 0,68 ng mL⁻¹. As precisões intra-dia e inter-dia foram estudadas e os resultados em termos de *RSD* ($n = 6$) foram de 2,1 a 3,7 % e 5,1 a 7,2 %, respectivamente. De acordo com os autores o método proposto foi aplicado com sucesso para analisar amostras de água enriquecidas em dois níveis de concentrações, sendo obtidas exatidões na faixa de 85,8 a 117,0 %. Os autores consideram que o método proposto por eles pode ser usado alternativamente na determinação de fenóis (ZHOU *et al.*, 2011). Por outro lado, a aquisição desses extratores ou sua síntese parece ser algo que requer uma grande dedicação do analista. Outro aspecto é que alguns líquidos iônicos apresentam elevada solubilidade em água e podem ser tóxicos para organismos aquáticos (PHAM *et al.*, 2010).

2.5 Microextração por solvente (SME)

A utilização de métodos miniaturizados de extração empregando microextração por solvente (SME) vem sendo relatada como uma atrativa ferramenta de extração, purificação e pré-concentração de analitos voláteis, não-voláteis, polares, pouco polares, iônicos e metálicos em diversas amostras que podem ser ambientais, forenses, clínicas e agrícolas (SANTANA *et al.*, 2011; KOKOSA, 2013). O Termo SME se refere de modo genérico aos procedimentos de microextração nos quais o solvente extrator encontra-se em contato direto com a amostra, enquanto que *liquid phase microextraction* (LPME) é usado para os modos nos quais o solvente é protegido por uso de alguma membrana porosa ou de outra natureza (KOKOSA, 2013). No entanto ainda parece não haver consenso na literatura em relação aos acrônimos de tais técnicas de microextração.

Neste trabalho entende-se que a microextração por solvente está inserida dentro da tendência atual de miniaturização dos procedimentos analíticos, sendo o acrônimo SME usado para se referir aos modos de microextração por solvente de forma mais ampla, englobando LPME.

A SME é uma adaptação da LLE para uma escala menor, no sentido de se obter melhores parâmetros de mérito, menor impacto ambiental e redução no risco ocupacional dos analistas. Baseia-se na partição do analito entre uma fase aquosa e neste caso um pequeno volume de solvente imiscível com a água, sendo realizada a extração e a pré-concentração, geralmente em uma gota suspensa ou microvolume de solvente extrator na faixa de 1-1000 µL. Essa abordagem vem sendo utilizada para um grande número de analitos, tais como alcoóis, fenóis, nitroaromáticos, clorobenzenos, compostos orgânicos voláteis, pesticidas e espécies inorgânicas, tendo como vantagens, baixo custo e mínimo consumo de solventes,

além de permitir a possibilidade de automação (LAMBROPOULOU *et al.*, 2007; KOCÚROVÁ *et al.*, 2013).

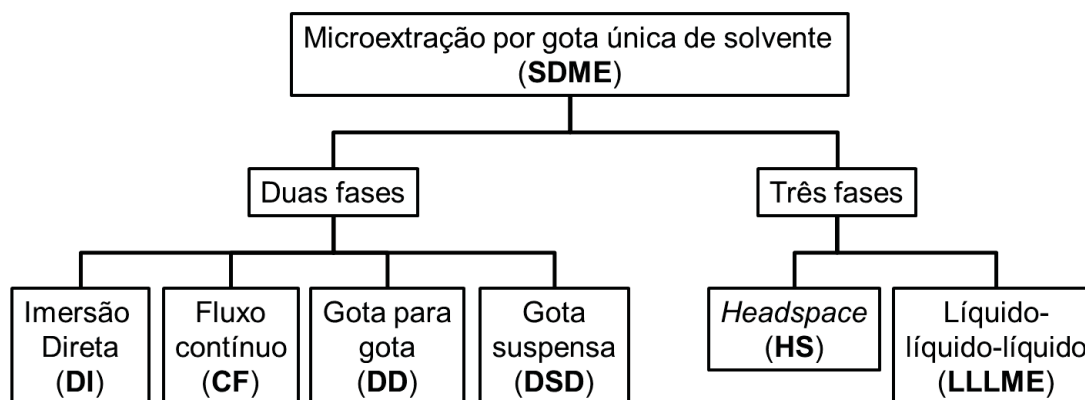
Dentre as vantagens citadas a miniaturização dos procedimentos analíticos é uma forte tendência nos métodos modernos de preparo de amostras que vão de encontro aos princípios de Química Analítica Verde. Doze princípios da Química Analítica Verde foram propostos por Anastas (1991) e listados abaixo:

1. Empregar, se possível, técnicas de análise direta evitando o preparo de amostra.
2. Reduzir os volumes e quantidades de amostras ao mínimo.
3. Realizar determinações *in situ*.
4. Integrar processos e operações analíticas visando economia de energia e reagentes.
5. Optar por métodos de preparo de amostra automáticos e miniaturizados.
6. Evitar procedimentos de derivatização.
7. Evitar a formação de grande volume de rejeitos de processos analíticos e tratar adequadamente os resíduos formados.
8. Optar por métodos que proporcionem a extração de múltiplos analitos ou que gerem múltiplos parâmetros de resposta.
9. Reduzir o consumo de energia.
10. Empregar reagentes de fontes renováveis sempre que possível.
11. Evitar ou substituir reagentes tóxicos.
12. Aumentar a segurança do analista.

Com base nos princípios é possível constatar que os métodos baseados em SME atendem a pelo menos oito dos princípios listados (2, 5-9, 11 e 12).

Outra característica que merece destaque é a versatilidade da SME. De acordo com as características físico-químicas do analito, isto é, polaridade, pressão de vapor, constante de dissociação ácida (pK_a), logaritmo da constante de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) e interferentes presentes podem ser feitas adaptações no método para maximizar as extrações. Na literatura, vários modos de SME por gota única são propostos, sendo mostrados alguns desses na Figura 1.

FIGURA 1: CLASSIFICAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR GOTA ÚNICA DE SOLVENTE.



FONTE: Adaptado de JEANNOT *et al.*, 2010.

De acordo com o esquema mostrado na Figura 1, a SDME pode ser dividida em quatro modos para sistemas compostos de duas fases e dois modos para aqueles com três fases. Cada um desses modos deve ser utilizado convenientemente conforme as características do analito, matriz, fator de enriquecimento (EF) e compatibilidade da técnica de microextração com a técnica de quantificação.

O método de microextração por imersão direta (DI ou DI-LPME) consiste na extração das espécies solubilizadas em matriz aquosa em uma gota de solvente orgânico, com volumes geralmente entre 1 e 10 μL , sendo essa gota exposta na ponta de uma agulha de seringa cromatográfica e mantida em contato com a fase aquosa. Após o tempo de contato adequado com a amostra, a gota é aspirada para o interior da seringa, e pode ser direcionada para a etapa de quantificação empregando a técnica instrumental apropriada, geralmente GC. A polaridade dos analitos deve ser média ou baixa a fim de facilitar a extração com solvente de baixa polaridade e imiscível em fase aquosa. Caso a polaridade dos analitos não seja adequada, vários trabalhos relatam a possibilidade de derivatização dos compostos para diminuir a sua solubilidade em água. Em relação a estudos envolvendo determinação de fenóis, parte dos trabalhos da literatura reportam a possibilidade de extração sem derivatização (JAIN e VERMA, 2011), no entanto, a maioria dos estudos faz uso da derivatização seguida de quantificação via GC-MS (ZHAO *et al.* 2007; FIAMEGOS e STALIKAS, 2007; ES-HAGHI *et al.* 2012).

No estudo de Bagheri *et al.* (2004) foi desenvolvido um sistema para a identificação e enriquecimento de fenóis e clorofenóis em amostras aquosas empregando o método de SDME para extração e quantificação por GC-MS. De acordo com os autores foi realizado procedimento anterior à extração, no qual os fenóis foram derivatizados, visando a adequação

da polaridade dos analitos e eliminação de interferentes. As principais vantagens da derivatização são a seletividade a um grupo de compostos e a mudança da polaridade das moléculas pela formação de ésteres que são mais facilmente extraíveis. Considerando a etapa de extração foram investigadas e determinadas as melhores condições do método, baseadas em diversos parâmetros como o tempo de extração, tipo de solvente extrator, velocidade de agitação e temperatura. O fator de enriquecimento e a linearidade foram estudados por enriquecimento de 1,0 mL de água de rio fortificada com uma solução padrão de fenol em um intervalo de concentração de 0,05 a 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após o procedimento via SDME foram obtidos limites de detecção (LOD) na faixa de 5 a 22 ng L^{-1} e de acordo com os autores aplicado com sucesso na extração de fenol e clorofenóis em amostras aquosas e quantificação por GC-MS (BAGHERI *et al.*, 2004).

Saraji e Bakhshi (2005) realizaram a determinação de traços de fenóis, nitrofenóis e clorofenóis em matrizes aquosas. Para isso empregaram extrações via SDME utilizando o solvente extrator acetato de hexila. A extração dos analitos das amostras foi feita com seringa cromatográfica, na qual foi realizada derivatização dos compostos para injeção e quantificação por GC-MS. Foram estudadas a influência do tipo e volume de reagente derivatizante, o tempo de derivatização, temperatura na etapa de derivatização, a seleção do solvente orgânico, o pH, força iônica, tempo de extração e temperatura de extração. Após estabelecimento das melhores condições de extração, os autores relataram simplicidade, elevada frequência analítica, baixo consumo de solvente, custos e de reagente de derivatização como as principais vantagens do procedimento, bem como adequado à determinação dos analitos fenólicos nas amostras. Por outro lado, esse método tem maior compatibilidade com a técnica de GC (SARAJI e BAKHSHI, 2005).

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi proposta por Rezaee *et al.* (2006). O método é baseado na rápida injeção de uma mistura de solventes, em uma amostra aquosa, proporcionando a dispersão do solvente imiscível em microgotículas acelerando a extração devido à grande área de contato deste com a fase aquosa (REZAEI *et al.*, 2006). A DLLME é relatada como simples, rápida e proporciona alto fator de enriquecimento, sendo uma técnica adequada para a extração em águas, mas requer o uso de solventes clorados que geralmente são tóxicos (LEONG *et al.*, 2014). Para a extração de compostos fenólicos de amostras aquosas a DLLME vem sendo utilizada com sucesso.

Hou *et al.* (2013) desenvolveram um método via DLLME para a extração de 4-nitrofenol, 2-naftol e bisfenol A em amostras de águas ambientais. O método foi baseado na solidificação de gotas de solvente (1-dodecanol) que apresenta menor densidade em relação ao meio aquoso e ponto de fusão adequado. O procedimento foi otimizado quanto ao tipo e volume do solvente de extração, solvente dispersante, a força iônica, pH e tempo de extração.

Os resultados obtidos em termos de EF foram 84 para 4-nitrofenol, 123 para o 2-naftol, e 97 para o bisfenol A. Os valores de LOD por LC foram 1,50, 0,10 e 1,02 ng mL⁻¹, respectivamente. Excelente linearidade foi observada no intervalo de concentração de 10 a 800 ng mL⁻¹, com coeficiente de determinação (r^2) variando entre 0,9988-0,9999. Os valores de RSD ($n = 5$) foram de 3,2 a 5,3 % e recuperações relativas para os três fenóis para água de torneira, de rio e água de chuvas 85,0 a 105,0 %, 98,3 a 110,0 % e 98,6 a 109,0 %, respectivamente (HOU *et al.*, 2013).

Por outro lado, extratos de matrizes contendo material particulado em suspensão ou com vários interferentes são mais desafiadores para a aplicação de métodos empregando microextração por solvente. Mesmo em micro volumes têm-se a tendência de formação de emulsões, a etapa para coletar alíquota de um micro volume de solvente extrator se torna complicada e a compatibilidade com cromatografia a líquido fica prejudicada.

Para minimizar esses inconvenientes Villar-Navarro *et al.* (2013) realizaram o desenvolvimento de um novo modo de microextração por solvente usando três fases e membranas porosas ocas para o procedimento. De acordo com os autores, pela primeira vez, foi utilizado a procedimento usando fibra oca com três fases para a extração simultânea, e análise por LC, de CF substituídos (alquil-, clorofenóis e nitrofenóis) considerados altamente tóxicos e/ou interferentes endócrinos. A extração foi realizada através de uma membrana de fibra oca em polipropileno Q3/2 Accurel® embebida com éter di-hexílico. O pH ótimo para as fases doadora e receptora e tempo de extração foram estabelecidos. Os valores de EF obtidos foram entre 30 e 700 proporcionando LOD entre 140 e 290 pg mL⁻¹. Os autores relatam que o método foi aplicado com sucesso na determinação dos analitos em amostras de água ambientais e residuais urbanas (VILLAR-NAVARRO *et al.*, 2013).

Zhao e Lee (2001) desenvolveram um método para a extração de CF em concentrações traço empregando sistema composto de três fases denominado Microextração Líquido-Líquido-Líquido (LLLME). O método consiste em um frasco preenchido com solução aquosa (fase doadora) contendo as espécies de interesse, sendo que essas devem ser necessariamente ionizáveis. O pH é ajustado para garantir a protonação dos analitos, reduzindo suas polaridades e facilitando a extração pelo solvente orgânico imiscível. Na sequência é realizada agitação magnética por tempo determinado para promover a passagem dos analitos para a fase orgânica. Após a agitação é introduzida a ponta de uma agulha de seringa cromatográfica, alguns milímetros abaixo do menisco na fase orgânica, de modo a formar uma microgota de solução (solução aceptora) com pH oposto ao da solução doadora. Novamente a agitação é ligada por um tempo estabelecido de modo a permitir a extração dos compostos para a gota. Depois da extração, a gota é aspirada para a seringa, neutralizada e injetada diretamente no LC. Utilizando esse modo de SDME os autores relataram a

determinação de concentrações de fenóis em nível de ng mL^{-1} com valores de RSD de no máximo 7,6 % (ZHAO e LEE, 2001).

Zhang *et al.* (2011) desenvolveram um novo modo de SME assistido por agitação magnética e por vórtex, a microextração em fase líquida em duas etapas “two-step SME”. Para isso foi construído um frasco em vidro que comportava maior volume de amostra (100 mL) e que também tinha a função de facilitar o procedimento de separação do solvente e propiciar velocidades de agitação maiores. Como estratégia analítica para compatibilizar o método com LC, os autores utilizaram solvente extrator, o *n*-octanol em duas etapas de extração. O primeiro passo envolvia a agitação intensa da amostra com o solvente (800 μL) que na sequência era separado da solução aquosa, por diferença de densidade, e coletado com auxílio de seringa cromatográfica. No segundo passo, em tubo de centrifuga, uma nova extração era realizada no *n*-octanol coletado utilizando solução aquosa de $\text{NaOH } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (50 μL) para promover a ionização dos CF, favorecendo a extração por aumento de suas afinidades pela fase aquosa. Por fim, após centrifugação, 20 μL da solução aquosa era coletado do fundo do tubo e injetado diretamente para determinação via LC-DAD. Com esse procedimento os autores relataram fatores de enriquecimento entre 296 a 954 para os compostos avaliados, LOQ entre 10 a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, recuperações em amostras de água fortificadas com os analitos (100 $\mu\text{g L}^{-1}$) entre 93 e 102,7 % com valores de RSD inferiores a 7,1 % (ZHANG *et al.*, 2011).

2.6 Subprodutos da industrialização do folhelho pirobetuminoso (Xisto)

O folhelho pirobetuminoso é uma rocha metamórfica de origem sedimentar conhecida por “Xisto”. Sua origem está associada ao depósito de materiais inorgânicos, animais, plantas, algas e outros elementos em fundos de mares e lagos, que após a ação de microrganismos e intemperismo resultou em um material orgânico chamado Querogênio. Esse material tem elevado teor de matéria orgânica podendo ser extraído com auxílio de solventes e por aquecimento, obtendo-se um óleo com características semelhantes ao petróleo (SPEIGHT, 2013). As jazidas de xisto no Brasil são encontradas em oito estados. A formação Irati, se estende pela região sul e centro-oeste, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás, sendo que no Paraná, na cidade de São Mateus ocorrem afloramentos da rocha ou a sua profundidade no solo é menor o que facilita a extração.

A importância econômica do Xisto para extração de óleo e gás é reconhecida mundialmente, pois a partir do óleo de xisto são gerados derivados como gasolina, nafta, lubrificantes e gás liquefeito de petróleo. Em vista disso na planta industrial da Petrobras –

SIX ou Superintendência de negócios do xisto locada em São Mateus do Sul – PR, é realizado o processamento do Xisto, ou a retortagem. Esse consiste na pirólise da rocha em temperaturas superiores a 450 °C em ambiente anóxico para a extração de óleo, gás e outros subprodutos. Dentre os subprodutos do processamento do xisto se destacam o calcário de xisto, os finos de xisto, água de xisto e xisto retortado (XR) (SPEIGHT, 2013).

Caracterizações químicas do XR têm mostrado a presença de elementos químicos que são essenciais ao desenvolvimento vegetal, como macro (N, P, K e S) e micronutrientes (B, Fe, Co, Cu, Mn, Cl, Mg, Ca e Se). Dessa forma, o XR apresenta potencial de uso como condicionador de solos atuando na liberação lenta desses nutrientes. Por essa razão o uso de XR como condicionador de solo vem sendo estudado em termos de segurança alimentar e agrônômica. No entanto, esse material também pode apresentar traços de elementos metálicos e espécies orgânicas como fenol e cresóis (KAHRU *et al.*, 2002). Devido a isso surge a necessidade de estudos de segurança ambiental do uso desse subproduto em solo, para avaliar a possível liberação de espécies fenólicas em solo e em águas. Considerando que esses analitos se encontram em concentrações traços, em matrizes complexas e que podem sofrer degradação no solo, se fazem necessários métodos e técnicas analíticas capazes de realizar a determinação nessas matrizes com confiabilidade e em concentrações compatíveis às legislações ambientais nacionais e internacionais.

3 JUSTIFICATIVA

O necessário crescimento das áreas de produção agrícola gera o acúmulo de rejeitos líquidos, sólidos e gasosos nesses meios de produção, o que pode afetar a segurança alimentar e ambiental dos ecossistemas. Esses rejeitos surgem no ambiente devido, principalmente, a práticas de manejo do solo e adubação sem acompanhamento técnico agrícola (ROCHA *et al.*, 2004). Além disso, cabe destacar também descartes inadequados dos mais variados tipos de rejeitos no ambiente como, por exemplo, subprodutos de mineração.

O Brasil ocupa destaque no cenário mundial, uma vez que seu território possui amplas áreas cultiváveis e, além disso, vem buscando outros insumos como fertilizantes, corretivos e condicionadores de solo, visando melhor aproveitamento dessas áreas, aumento de produção e melhoria na qualidade dos alimentos produzidos. Estes condicionadores, embora possam fornecer nutrientes essenciais ao solo, também podem conter teores consideráveis de compostos indesejáveis, dentre os quais as espécies fenólicas, o que torna de grande importância a realização de estudos de liberação de tais compostos em solos, ou mais especificamente na fase aquosa ou lixiviada do solo.

Neste contexto, o Projeto Xisto Agrícola, um convênio de cooperação técnica entre a Embrapa Clima Temperado/FAPEG, Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Petrobras/Unidade de Negócios do Xisto e Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (DQUI/UFPR) visa o desenvolvimento de novas matrizes fertilizantes, baseadas em subprodutos da mineração do xisto. O enfoque principal do estudo é o emprego dos subprodutos do xisto na agricultura, avaliando a eficiência agronômica e adaptação das mesmas à legislação brasileira em termos de segurança do alimento e segurança ambiental (segurança do sistema solo-planta-homem).

Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a determinação de CF, principalmente em meio aquoso, decorrentes do uso pontual de produtos aplicados ou originários de fontes difusas. Portanto, métodos que empreguem quantidades mínimas de solventes orgânicos e de amostras são interessantes do ponto de vista ambiental e econômico, uma vez que a geração de resíduos e os custos das análises serão menores, gerando métodos analíticos limpos na vertente da química verde. Além disso, este estudo contribuirá com o Projeto Xisto Agrícola, para a quantificação de CF em amostras aquosas, visando à avaliação de riscos ambientais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a potencialidade da microextração por solvente (SME) em conjunto com a técnica cromatográfica LC-DAD, direcionado para a determinação de CF em matrizes ambientais aquosas e extratos de solos.

4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer métodos analíticos cromatográficos que permitam quantificar os substratos de interesse em fase aquosa, direcionando a técnica analítica de acordo com as características dos analitos (fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol e 2,4-dimetilfenol);
- Investigar as melhores condições de extração do método de SME por gota suspensa, tais como pH, temperatura, volume da gota, agitação, características do solvente, tempo de contato, pré-concentração do poluente e possíveis interferentes, promovendo a extração dos analitos, além de gerar elevados fatores de enriquecimento;

- Aplicar o método analítico desenvolvido para a avaliação de amostras de extratos aquosos de solos originários de estudos de interação de CF com solo. Tais CF são originários do uso de Xisto Retortado (XR) como condicionador de solos. O método analítico também será aplicado para outras amostras de águas provenientes de diferentes fontes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Soluções padrão, reagentes e equipamentos

Os padrões analíticos das cinco espécies fenólicas utilizadas neste trabalho, fenol (Ph), *o*-cresol (*o*-Cr), *m*-cresol (*m*-Cr), *p*-cresol (*p*-Cr) e 2,4-dimetil-fenol (2,4-DMF) foram todos de alta pureza ($\geq 99,0\%$) marca Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA). Ainda foi utilizado em experimentos complementares o padrão analítico de acetato de fenila (99,0%) marca Sigma-Aldrich®. Para os procedimentos de microextração avaliados foram empregados *n*-hexano, ciclo-hexano, tolueno e acetato de butila ambos com grau cromatográfico da marca Sigma-Aldrich®, e *n*-octanol de grau cromatográfico da marca Merck® (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada para o preparo de todas as soluções foi obtida através de sistema de osmose reversa Quimis® (Diadema, SP, Brasil) e posteriormente purificada em sistema Millipore Simplicity® UV (Molsheim, França) equipado com lâmpada na região do UV e SIMfilter de porosidade 0,05 μm . Essa água obtida com resistividade na faixa de 18 M Ω cm foi denominada no presente trabalho como água ultrapura. Os solventes acetonitrila (CH₃CN) (J.T. Baker®, Cidade do México, México) e metanol (Carlo Erba®, Rodano, Itália) foram todos previamente filtrados em membranas em Politetrafluoretileno ou Teflon® (PTFE) da marca Milipore® com abertura de poro de 0,45 μm para as posteriores determinações cromatográficas. Os demais reagentes foram todos de grau analítico de marcas como JT Baker, Merck, Carlo Erba ou de qualidade similar.

As filtrações a vácuo dos padrões e amostras aquosas foram conduzidas utilizando sistema de filtração Nalgene® (Rochester, EUA) em polisulfona com capacidade de 250 mL. A bomba de vácuo utilizada foi da marca Quimis® modelo Q9558 e as membranas para filtração em nitrato de celulose da marca Sartorius® (Goettingen, Alemanha).

Para conduzir os estudos envolvendo o efeito da temperatura, foi empregado um banho termostático microprocessado Quimis® com circulador, modelo Q-214M2.

O pH das soluções padrão foi monitorado com auxílio de potenciômetro da marca Analion® PM608 Plus (São Paulo, Brasil) equipado com eletrodo de vidro combinado com sistema de referência Ag/AgCl.

Os extratos aquosos de XR e solo condicionado com XR foram obtidos em incubadora refrigerada e com agitação orbital, marca Tecnal®, modelo 421E.

As determinações espectrofotométricas na região do UV foram realizadas nos espectrofotômetros Shimadzu® (Kyoto, Japão) UV-2401A-PC (arranjo de diodos) e espectrofotômetro Femto® (São Paulo, Brasil) 700 plus. Todas as determinações espectrofotométricas foram realizadas empregando cubeta em quartzo com 1,00 cm de caminho ótico. Para medidas de absorvância em volumes de solução inferiores a 0,80 mL foi empregada uma cela de quartzo Hëllma® (Müllheim, Alemanha) para análise em fluxo.

5.2 Condições cromatográficas

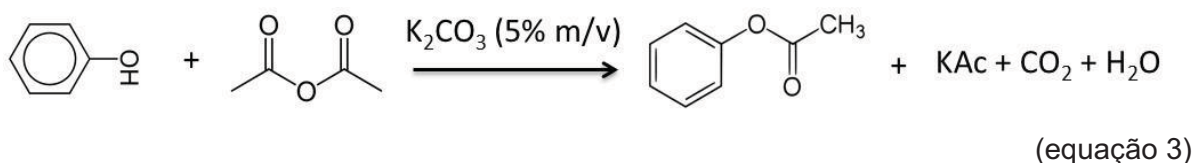
Nas determinações cromatográficas foi utilizado um equipamento institucional da marca Waters® (Milford, MA, EUA), constituído de um controlador (Waters 600 Controller) e bomba quaternária de duplo pistão recíproco (Waters 600E Pump), degaseificador (in Line AF), controlador de Temperatura (TCM II), amostrador automático 711 plus, módulo para aquecimento de colunas e detector PDA (photodiode-array Waters 2998). A integração e processamento dos cromatogramas foi realizada com o auxílio do software Empower 2 Pro.

Para as separações dos CF foi empregada coluna analítica marca Kromasil® AzkoNobel (Bohus, Sweden) com fase estacionária de octadecilsilano (C18) de dimensões de 25,0 cm de comprimento, 0,46 cm de diâmetro interno, tamanho de partículas de 5 µm e 100 Å de porosidade, protegida por coluna de guarda Kromasil® (C18) de 1 cm de comprimento por 0,46 cm de diâmetro interno e com partículas de 5 µm. As corridas cromatográficas foram realizadas em modo isocrático, em vazão de 1,00 mL min⁻¹, utilizando como fase móvel mistura de solução aquosa de ácido acético (CH₃COOH) a 1,0 % (v/v) e acetonitrila (CH₃CN) (60:40, v/v). A coluna analítica foi mantida em 40,0 °C em todas as determinações. Para a detecção na região do UV foi selecionado o comprimento de onda de 270 nm.

No cromatógrafo à líquido foram realizadas injeções de 20 µL de padrões aquosos mistos das cinco espécies fenólicas em concentração na faixa de 1,00 a 5000 µg L⁻¹. Estas soluções foram preparadas no dia do uso a partir de diluição da solução estoque de cada fenol em concentração de 1000 mg L⁻¹, as quais foram preparadas em metanol. Todos os padrões e amostras foram preparados em soluções de CH₃COOH 1,0 %:CH₃CN em proporção de 60:40. As soluções estoque foram armazenadas em frasco âmbar e mantidas em refrigeração a 4 °C até o momento da sua utilização.

5.3 Procedimento para derivatização e extração dos compostos fenólicos

Em um frasco tipo *vial* de 4 mL foi adicionado 1,00 mL de solução de CH₃OH contendo os CF na faixa de concentração de 1,00 a 100,0 µg L⁻¹, 2,00 mL de solução aquosa de K₂CO₃ 5% (m/v) e 1,0 mL de *n*-hexano contendo 200 µL de anidrido acético. A reação de acetilação (BAGHERI *et al.*, 2004) é mostrada na equação 3:

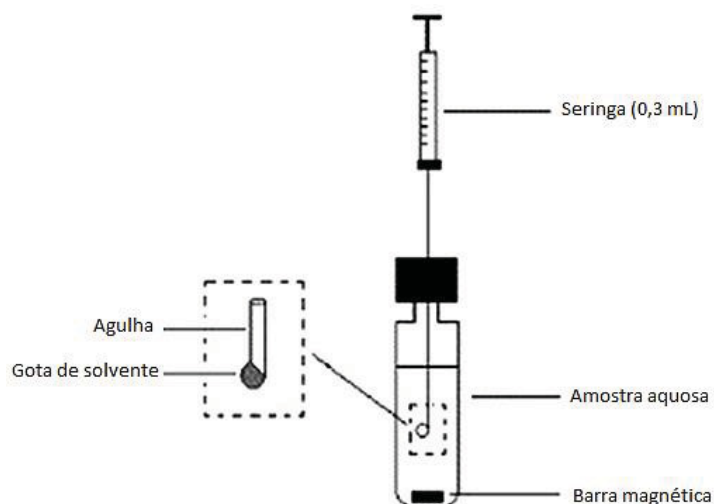


Em meio contendo com anidrido acético ocorre a acetilação do fenol e formação de éster correspondente, acetato de potássio (KAc) e ácido carbônico que se decompõe em CO₂ e H₂O no meio. Após agitação magnética por 1 minuto a fase orgânica foi separada, volatilizada em capela com fluxo de ar ligado (10 min) sendo os analitos reconstituídos em 1,00 mL de solução de H₂O:CH₃CN (60:40, v/v). Por fim, a mistura foi analisada por LC-DAD ou mantida no máximo por 24 h em refrigeração a 4 °C até o momento da determinação.

5.4 Microextração em gota de solvente (SDME)

O procedimento SDME foi adaptado segundo Bagheri *et al.* (2004), no qual após derivatização dos fenóis, foi realizada a extração dos analitos (ésteres de fenóis) com 100 µL de solvente orgânico *n*-hexano. Para isso foi utilizado um sistema similar ao mostrado na Figura 2.

FIGURA 2: SDME COM IMERSÃO DIRETA DA GOTA NO PADRÃO AQUOSO.



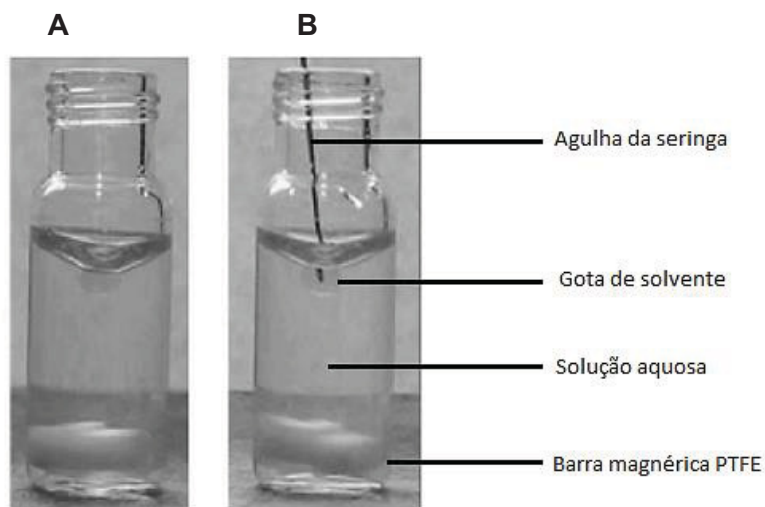
FONTE: Adaptado de SARAFRAZ-YAZDI e AMIRI, 2010.

No esquema mostrado na Figura 2 foi utilizado um frasco tipo *vial*, com volume de 4 mL, no qual foram colocados 3,00 mL de padrão aquoso contendo os fenóis derivatizados em concentração na faixa de 50,0 a 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O frasco foi fechado com septo de silicone, que foi perfurado pela agulha de seringa hipodérmica contendo 100 μL de *n*-hexano. Na sequência o êmbolo da seringa foi cuidadosamente pressionado para expor a gota de solvente orgânico, sendo a agitação magnética ligada em seguida e mantida por 15 min a aproximadamente 200 rpm em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Após esse tempo a gota foi aspirada para o interior da seringa, sendo o solvente posteriormente volatilizado em capela e o resíduo ressolubilizado em 300 μL de solução $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (60:40, v/v) para a quantificação via LC-DAD, sendo um procedimento similar realizado para a prova em branco. Cabe ressaltar que a prova em branco continha todos os reagentes utilizados na acetilação, exceto o padrão dos fenóis.

5.5 Microextração em gota de solvente suspensa (DSDME)

O modo de microextração DSDME mostrado na Figura 3 foi adaptado de acordo com YANGCHENG *et al.*, (2006).

FIGURA 3: MICROEXTRAÇÃO EM GOTA DE SOLVENTE SUSPENSA



FONTE: adaptado de Yangcheng *et al.*, 2006.

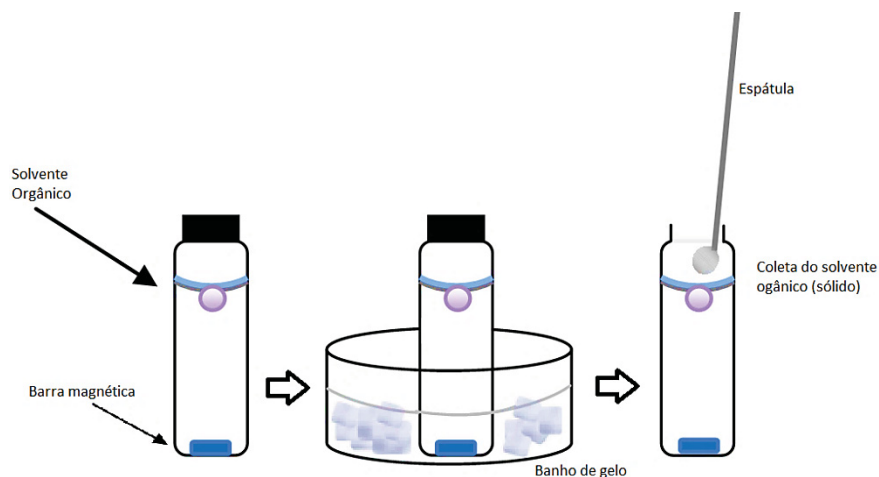
NOTA: Frasco a mostra sistema com a gota de solvente orgânico em agitação magnética em andamento e frasco b mostra seringa coletando parte da gota de solvente com agitação magnética ligada.

Em um frasco *vial* de 4 mL foram adicionados 3,00 mL de solução padrão aquosa contendo a mistura dos fenóis todos em concentração de 10,0 mg L⁻¹ e barra magnética para agitação. A agitação magnética foi mantida a 500 rpm e um volume de 20 µL foi adicionado formando uma gota que permaneceu em solução por 20 min em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Após esse tempo a gota de solvente foi cuidadosamente removida com auxílio de uma seringa hipodérmica com volume total de 0,5 mL. O solvente, por sua vez, foi volatilizado em capela e o resíduo resolubilizado em 300 µL de solução H₂O:CH₃CN (60:40, v/v). A prova em branco foi obtida empregando procedimento análogo, sendo adicionados todos os reagentes, porém sem a presença do padrão dos CF.

5.6 Microextração em fase líquida com gota solidificada (SD-LPME)

O método de microextração em fase líquida com gota solidificada (SD-LPME) foi empregado para testes de extração dos cinco CF em padrões aquosos. Para tal foi avaliado um volume de 10,0 mL de padrões aquosos dos CF em concentração na faixa de 1,00 a 5,00 mg L⁻¹, utilizando de 300 µL de álcool dodecílico (1-dodecanol) como solvente extrator. As extrações foram conduzidas em meio acidificado com HCl em um banho termostatizado em temperatura de 40,0 °C. O esquema básico é ilustrado na Figura 4.

FIGURA 4: ESQUEMA BÁSICO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA COM GOTA SOLIDIFICADA SD-LPME.



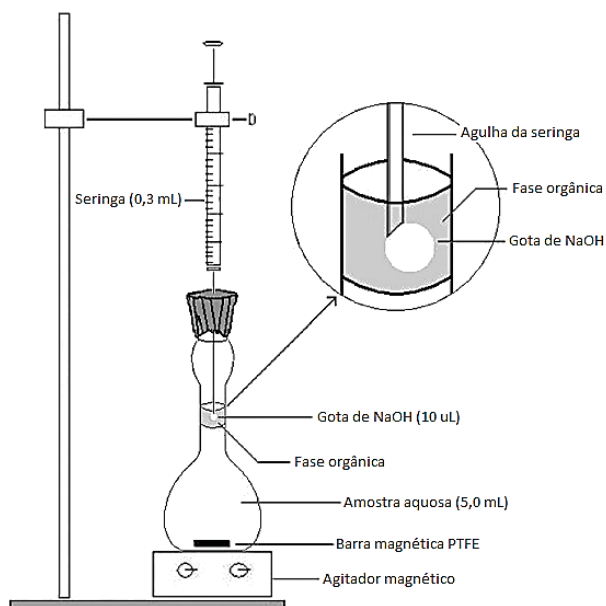
FONTE: Adaptado de MAHUGO-SANTANA *et al.*, 2011.

Em um frasco tipo *vial* de 10,0 mL contendo o padrão aquoso dos fenóis foi adicionado 1-dodecanol e a barra magnética, sendo o frasco fechado com septo plástico. Na sequência a solução foi agitada a 600 rpm por 20 minutos. Ao término do tempo o frasco ficou em repouso por 3 min na bancada para a separação das fases e em seguida colocado em banho de gelo por 10 minutos, ocasionando na solidificação do solvente. O solvente sólido foi removido com espátula metálica e colocado em tubo Eppendorf® de 1,5 mL juntamente com 100 µL de solução de hidróxido de sódio 0,50 mol L⁻¹. O tubo foi agitado em um vórtex por 1 minuto e centrifugado por 5 min a 2800 rpm. Com auxílio de micropipeta, 80 µL da solução de hidróxido de sódio foi removida e transferida para um *vial* sendo neutralizada com 70 µL de CH₃COOH glacial e o volume elevado a 1,0 mL com CH₃CN. A presença dos fenóis foi monitorada de forma qualitativa por espectrofotometria na região do UV de 200 a 400 nm, usando uma prova em branco preparada nas mesmas condições empregando 1,00 mL de solução de CH₃COOH e CH₃CN como referência.

5.7 Microextração líquido-líquido-líquido (LLLME)

O modo de microextração LLLME foi utilizado e adaptado conforme Jain e Verma, (2011). O sistema de microextração utilizado é ilustrado na Figura 5.

FIGURA 5: ESQUEMA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLLME)



FONTE: Adaptado de Jain e Verma, 2011.

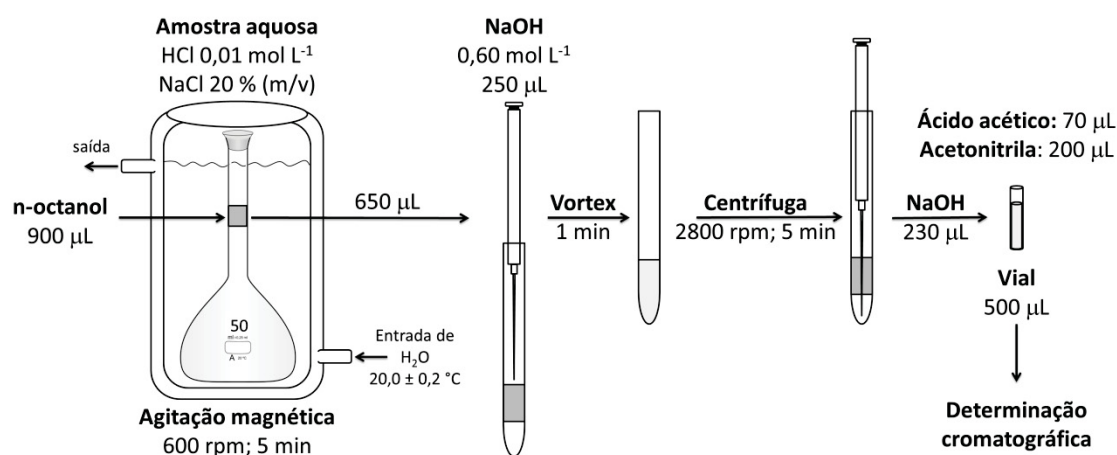
NOTA: Fase aquosa contendo os analitos, fase de solvente orgânico e fase aquosa (acceptora) de solução de NaOH A 0,50 mol L⁻¹.

A configuração mostrada na Figura 5 foi utilizada nos experimentos de extração dos fenóis, sem necessidade de derivatização. Para isso 10,0 mL de solução padrão aquosa, contendo os CF em concentração na faixa de 5,00 a 50,0 mg L⁻¹, foram colocados em balão volumétrico de 10,00 mL e o meio foi acidificado pela adição de 50 µL de ácido clorídrico concentrado. Na sequência foram adicionados 300 µL de *n*-hexano, sendo o balão volumétrico fechado e deixado em agitação magnética por 30 min, a 600 rpm e em temperatura ambiente (20 ± 2 °C). Após esse período, foi colocada cuidadosamente uma seringa hipodérmica de volume 0,5 mL, contendo 100 µL de solução aquosa de NaOH 0,50 mol L⁻¹, conforme ilustrado na Figura 5. A agulha da seringa foi mergulhada abaixo do menisco formado pela fase orgânica (*n*-hexano) e o êmbolo foi cuidadosamente pressionado para expor uma microgota (100 µL) de solução de NaOH. Após 10 min de agitação a gota foi aspirada para o interior da seringa hipodérmica e a solução contida na seringa foi neutralizada com 1,0 mL de solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹. Um procedimento análogo foi realizado com uma prova em branco. Após as extrações, as provas em branco e soluções padrão foram filtradas com seringa hipodérmica em membrana de PTFE com abertura de poro de 0,45 µm.

5.8 Microextração por solvente em duas etapas (two-step SME)

O procedimento de microextração em duas etapas foi adaptado a partir do trabalho de Zhao e Lee, 2001 e Zhang *et al.* (2011). Inicialmente o frasco de extração foi substituído por um balão volumétrico comum de laboratório e também foi construído sistema para controle de temperatura. O esquema do procedimento via *two-step* SME nas melhores condições estudadas é mostrado na Figura 6.

FIGURA 6: MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EM DUAS ETAPAS (*TWO-STEP* SME).



FONTE: O autor (2015).

Para a realização do experimento foi utilizado um balão volumétrico de 50,0 mL nos quais foi preparada solução aquosa dos CF em concentração entre 2,50 e 250,0 µg L⁻¹. No mesmo balão foi adicionada uma barra magnética em PTFE e 900 µL de *n*-octanol. O sistema foi mantido sob agitação por 5 min a 600 rpm em temperatura ambiente (20 ± 0,2 °C). Após essa etapa o balão foi deixado em repouso por 5 min para separação de fase, sendo retirada com micropipeta uma alíquota de 650 µL de *n*-octanol a qual foi transferida para um tubo de centrífuga de vidro de 10 mL. No tubo foram adicionados 250 µL de solução de NaOH 0,60 mol L⁻¹ e em seguida agitado em vórtex durante 1 min. Na sequência o tubo foi centrifugado por 5 min a 2800 rpm. Após a formação de duas fases foi retirada uma alíquota de 230 µL de solução de NaOH e esta transferida para um *vial* cromatográfico de 1,00 mL, juntamente com 70 µL de CH₃COOH glacial, 200 µL de CH₃CN totalizando um volume de 500 µL. Em paralelo um experimento análogo foi realizado como forma de controle, sem a adição dos CF. As

extrações foram todas realizadas em triplicata e a quantificação foi conduzida por LC-DAD. Para atingir essas melhores condições de extração, diversas variáveis foram avaliadas, conforme item 5.9.

5.9 Determinação das melhores condições de extração via two-step SME

Primeiramente foram definidos o tipo de solvente extrator (*n*-hexano, ciclo-hexano, acetato de butila e *n*-octanol) volume de solução receptora de NaOH (125, 250 e 500 μL) e a sua concentração (0,10, 0,15, 0,25, 0,40 e 0,60 mol L⁻¹). Com base nas melhores condições avaliadas anteriormente foram estudadas na sequência o tempo de agitação (2,5, 5, 10, 20 e 30 min), o volume de *n*-octanol (100, 300, 500, 700 e 900 μL), a influência da concentração de HCl no meio (0,01, 0,05, 0,10, 0,25 e 0,50 mol L⁻¹) e por fim a temperatura de extração (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 °C). Os padrões foram quantificados por cromatografia a líquido, sendo todos os ensaios realizados em triplicata.

5.10 Planejamento fatorial fracionado 2⁵⁻¹

O planejamento fatorial fracionado de dois níveis foi construído selecionando-se um subconjunto de tamanho 2⁵⁻¹ de todos os ensaios possíveis do planejamento 2⁵ e foram executados os experimentos somente para os ensaios escolhidos, metade do planejamento completo. Para tal, foram estudadas cinco variáveis: volume de *n*-octanol ($V_{n\text{-octa}}$), tempo de agitação (t), concentração NaCl (C_{NaCl}), volume e concentração de NaOH (V_{NaOH} e C_{NaOH}). Os valores de cada nível foram escolhidos com base nos experimentos univariados realizados previamente (item 5.9). As variáveis estudadas e os valores dos níveis são mostrados na Tabela 2.

TABELA 2: VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2⁵⁻¹ PARA O PROCEDIMENTO TWO-STEP SME.

Variáveis (fatores)	Nível inferior (-)	Nível superior (+)
$V_{n\text{-octanol}}$ (μL)	700	1100
C_{NaOH} (mol L ⁻¹)	0,30	0,70
C_{NaCl} (%)	15,0	25,0
V_{NaOH} (μL)	200	400
t (min)	5,0	15,0

FONTE: O autor (2015).

Considerando-se os cinco fatores e seus dois níveis, codificados com os sinais (+) superior e (-) inferior, foi construída a matriz de planejamento, resultando em 16 experimentos realizados em duplicata autêntica. O objetivo principal da realização de réplicas dos experimentos foi de verificar se as diferenças observadas entre as respostas (área do pico dos CF) seriam significativamente diferentes de zero e estimar os efeitos principais dos fatores com maior precisão. Estes experimentos foram realizados aleatoriamente por sorteio para minimizar distorções estatísticas nas respostas (NETO *et al.* 2010).

Na Tabela 3 é apresentada a matriz de coeficiente de contraste do planejamento fatorial 2^{5-1} , os sinais para os efeitos de interação de 2ª ordem entre todas as variáveis do planejamento são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas. A partir dos resultados dos experimentos, podem-se obter os efeitos principais das quatro variáveis e o efeito de interação de segunda ordem entre as variáveis.

Os efeitos são definidos como a mudança ocorrida na resposta quando se muda do nível inferior (-) para o nível superior (+), ou seja, são as quantificações da influência da mudança de nível do fator na resposta.

TABELA 3: MATRIZ DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-1}

Ensaio	V_{n-octa}	C_{NaOH}	C_{NaCl}	V_{NaOH}	t	V_{n-octa}	V_{n-octa}	V_{n-octa}	V_{n-octa}	C_{NaOH}	C_{NaOH}	C_{NaOH}	C_{NaCl}	C_{NaCl}	V_{NaOH}
						C_{NaOH}	C_{NaCl}	V_{NaOH}	t	V_{NaOH}	t	t	t	t	t
1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

FONTE: O autor (2015).

Os cálculos para estimativa dos efeitos do planejamento fatorial fracionário foram realizados de acordo com Neto e colaboradores (2010). O algoritmo usado para o cálculo dos efeitos se baseia na matriz do planejamento fatorial, onde é escolhida umas das colunas da Tabela 3 que se deseja calcular o efeito, aplica-se o sinal algébrico dos coeficientes de contrastes as respostas médias obtidas como resultado dos ensaios, faz-se o somatório dos valores e o resultado é dividido por 8. Por exemplo, para estimar o efeito de interação entre C_{NaCl} e t :

$C_{NaCl} \times t$	Respostas médias	Efeito
$\begin{pmatrix} -1 \\ 1 \\ 1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \\ -1 \\ 1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \end{pmatrix}^t$	$\begin{pmatrix} R_1 \\ R_2 \\ R_3 \\ R_4 \\ R_5 \\ R_6 \\ R_7 \\ R_8 \\ R_9 \\ R_{10} \\ R_{11} \\ R_{12} \\ R_{13} \\ R_{14} \\ R_{15} \\ R_{16} \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} -R_1 \\ R_2 \\ R_3 \\ -R_4 \\ -R_5 \\ R_6 \\ R_7 \\ -R_8 \\ R_9 \\ -R_{10} \\ -R_{11} \\ R_{12} \\ R_{13} \\ -R_{14} \\ -R_{15} \\ R_{16} \end{pmatrix}$
X	=	

$$efeito_{C_{NaCl} \times t} = \frac{-R_1 + R_2 + R_3 - R_4 - R_5 + R_6 + R_7 - R_8 + R_9 - R_{10} - R_{11} + R_{12} + R_{13} - R_{14} - R_{15} + R_{16}}{8} \quad (\text{equação 4})$$

A avaliação da influência dos fatores estudados na resposta foi realizada a partir da estimativa conjunta das variâncias s_c^2 , conforme equação 5:

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^n [(r_i^{pt} - 1) s_i^2]}{\sum_{i=1}^n (r_i^{pt} - 1)} \quad (\text{equação 5})$$

Sendo que, r^{pt} = número de repetições s_i^2 = variância para cada ensaio.

O desvio padrão é a raiz quadrada deste valor e o desvio padrão de um efeito (Erro padrão de um efeito) é metade disto. Neste trabalho, as avaliações de significância para a decisão estatística dos efeitos foram realizadas empregando o teste t com 95 % de confiança. Para isso efetuou-se a multiplicação de t_{16} encontrado na tabela de pontos de probabilidade de distribuição t com ν graus de liberdade pelo desvio padrão do efeito. Se os valores calculados por essa multiplicação forem maiores que os valores de desvio padrão do efeito são considerados efeitos autênticos e são feitas as interpretações destes de acordo com o ensaio realizado.

5.11 Curvas analíticas

Nas determinações dos CF foram utilizados dois métodos por LC-DAD para a obtenção das curvas analíticas. O primeiro baseado na determinação direta (sem procedimento de microextração), por LC-DAD de padrões preparados em mistura de solução de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 1,0 % (40:60, v/v) na faixa de 0,10 a 4,00 mg L^{-1} (cinco pontos) para os compostos Ph, *o*-Cr e 2,4-DMF e 0,20 a 8,00 mg L^{-1} para *m*-Cr+*p*-Cr. Essas curvas foram empregadas para monitoramento da eficiência global do processo de extração dos CF e cálculos de fatores de enriquecimento (EF). Os EF foram calculados pela razão entre a concentração da solução aquosa padrão fortificada com os CF em concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração obtida após a mesma ser submetida ao método de extração.

O segundo procedimento foi realizado por *two-step* SME conforme condições especificadas no item 5.10. Foram construídas curvas em duas faixas a partir de padrões aquosos mistos dos CF preparados em água ultrapura. Foi construída uma curva analítica na faixa de concentração de 2,50 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os compostos Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr e 12,5 a 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-DMF. Todas as curvas analíticas foram realizadas em triplicata.

Os parâmetros de méritos limite de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) foram calculados a partir dos dados das curvas analíticas, conforme Ribani *et al.*, (2004) e a Resolução ANVISA RDC 166 de 24 de Julho de 2017 (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2017). As equações utilizadas para esses cálculos são apresentas abaixo:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{s}{S} \quad (\text{equação 6}) \quad \text{LOD} = 3 \cdot \frac{s}{S} \quad (\text{equação 7})$$

Nas equações 6 e 7, s corresponde a estimativa de desvio padrão dos valores de intercepto e S o valor médio de sensibilidade ou inclinação da curva analítica

5.12 Amostras de águas naturais

As coletas foram feitas conforme as recomendações do Guia nacional de coleta e preservação de amostras para determinação de fenóis por cromatografia (BRASIL, 2011). Para tal foram utilizados frascos âmbar de vidro de 1 L previamente descontaminados. Essa limpeza consistiu de enxágue dos frascos, tampas e batoques com escova e detergente Extran® 2,5% (v/v), seguido por 20 enxágues em água corrente, 10 enxágues com água deionizada, 10 enxágues com água ultrapura, rinsagem com metanol grau cromatográfico e secagem em estufa a 60 °C por 24 h.

Foram coletadas amostras de água de torneira, rio, poço e marinha de parte superficial, por imersão completa do frasco e lavagem do mesmo com a amostra por três vezes, para todas as amostras. A amostragem de água corrente foi realizada após a torneira permanecer aberta por 2 minutos para minimizar impurezas das tubulações e oxigênio dissolvido. Todos os frascos tiveram o volume totalmente preenchido com as amostras e não foi utilizado conservante. Na sequência os frascos foram fechados com folha de alumínio, tampa de polipropileno e acondicionados em recipiente de isopor contendo gelo para transporte. Essas amostras permaneceram em refrigeração por no máximo 7 dias até o momento das determinações. Na Tabela 4 são apresentadas as amostras utilizadas na validação do procedimento *two-step* SME e algumas informações das condições das coletas.

TABELA 4: AMOSTRAS DE ÁGUAS UTILIZADAS PARA VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO.

Amostra	Procedência	Condições de coleta	pH
Água de Torneira	LQAA: Curitiba-PR	Após 2 min aberta.	6,4 ^b
Rio Taquaral	São Mateus do Sul-PR	^a T ~ 19 °C, límpida	6,8
Poço	São Mateus do Sul-PR	^a T ~ 15 °C, límpida	6,1
Água marinha	Baía de Babitonga, Joinville-SC	^a T ~ 26 °C, turva.	7,4

^a T = temperatura; ^b pH determinado a 20 °C.

FONTE: O autor (2015).

Em relação às amostras de água de Rio e poço, estas foram coletadas em áreas a jusante de local de mineração e processamento de xisto (folhelho pirobotuminoso) na cidade de São Mateus do Sul no estado do Paraná.

5.13 Amostras de solo condicionado com xisto retornado

As amostras de solo classificado como Argissolo vermelho distrófico arênico (BRASIL, 2013) foram coletadas com auxílio de trado manual, na camada superficial (0 - 20 cm), da

área experimental do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) localizada na cidade de Santa Maria, RS. Nessa área vem sendo conduzido um dos experimentos do Projeto Xisto Agrícola, desde 2009 até o momento, sendo avaliadas aplicações anuais de xisto retornado (XR), em doses crescentes, em solo. Na Tabela 5 é mostrado o resumo descritivo dos tratamentos, doses aplicadas de XR, o total de XR acumulado no solo e aplicações de fertilização de base.

TABELA 5: TRATAMENTOS, DOSES DE XR ACUMULADAS E ADUBAÇÃO APLICADA NO EXPERIMENTO DO PROJETO XISTO AGRÍCOLA.

Tratamentos	Doses anuais de XR ^c kg ha ⁻¹	XR acumulado ^d	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
T1 ^a	0	0	100	120	90
T2	750	3750	100	120	90
T3	1500	7500	100	120	90
T4	3000	15000	100	120	90
T5 ^b	0	0	0	0	0
T6	1500	7500	0	0	0

^a T1 – testemunha de adubação; ^b T5– testemunha absoluta; ^c aplicações anuais nas safras de verão (dezembro/janeiro); ^d dose acumulada de xisto retornado após 4 anos de experimento.

FONTE: O autor (2015).

Foram realizadas coletas de solo para cada tratamento. As amostras de solo foram secas ao ar por 30 dias e ao chegar ao laboratório de Química Analítica Ambiental (LQAA–DQUI/UFPR) foram quarteadas, armazenadas em potes de polipropileno e guardadas em armário até o momento da pesagem.

5.14 Obtenção dos extratos aquosos de solo condicionados com XR e do XR

A obtenção dos extratos aquosos de solo condicionados com XR e do extrato aquoso de XR foi feita empregando ensaios em batelada, nos quais a massa de sólido (solo + XR ou XR) foi estimada de acordo com a norma OECD (OECD 106, 2000) relativa a estudos de sorção/dessorção de compostos orgânicos em solos e sedimentos. Foi pesada uma massa de 6,0000 g ($\pm 0,0001$ g) de sólido que foi transferida para seis Erlenmeyers de vidro. Em cada um foi adicionado, com o auxílio de uma bureta, o volume de 180,0 mL de solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (pH, 4,46 \pm 0,02) e tampados com rolha de vidro. Na sequência os frascos foram colocados em incubadora refrigerada, agitados a 150 rpm, por 24 h em temperatura de 25,0 \pm 0,2 °C. Após a agitação as suspensões (sólido/líquido) foram filtradas em sistema de filtração a vácuo (Nalgene®), usando membrana de nitrato de celulose (Sartorius®) de

porosidade 0,45 μm e os extratos aquosos obtidos foram analisados e utilizados nos procedimentos de recuperação e quantificação dos CF de interesse.

5.15 Ensaio de recuperação

A precisão e exatidão do método *two-step* SME foram avaliadas por ensaios de recuperação em amostras aquosas de diferentes procedências e também em extratos aquosos de XR e extratos de solo condicionado com XR, todos fortificados com os padrões dos CF em três níveis de concentração.

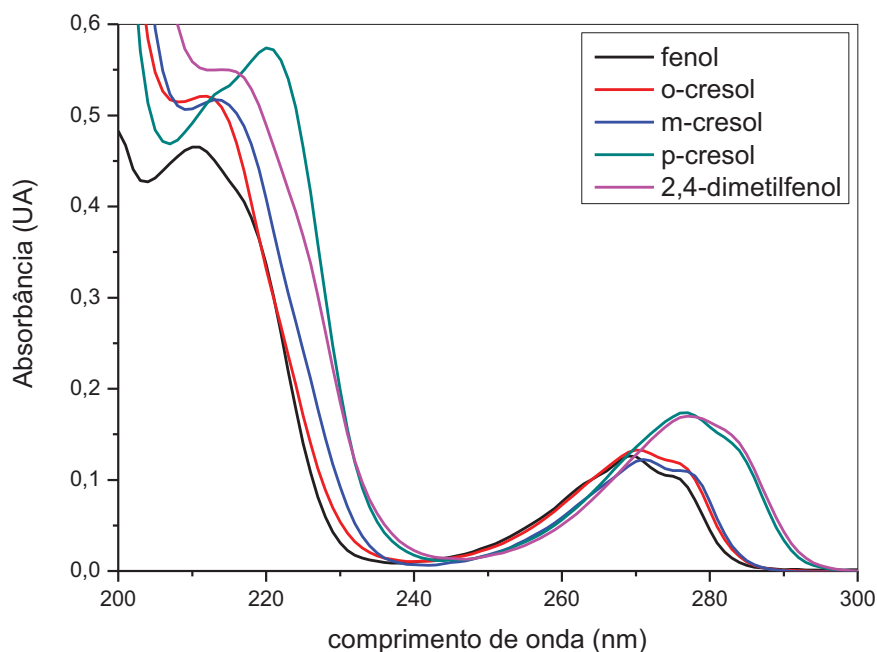
As amostras de água de torneira, rio, poço, marinha e extrato de XR e solo + XR foram todas filtradas em sistema a vácuo usando membrana de nitrato de celulose de porosidade 0,45 μm . Nestas amostras foram adicionadas alíquotas de padrão contendo as cinco espécies fenólicas, em três níveis de concentração, 6,00, 30,0 e 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e posteriormente 3,00, 15,0 e 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, juntamente com NaCl para ajuste da força iônica, proporcionando concentração de 20,0 % (m/v) desse sal nas soluções. Os extratos foram submetidos ao procedimento via *two-step* SME conforme item 5.11 sendo todos os ensaios realizados em triplicata. As quantificações foram feitas via LC-DAD.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Espectrofotometria de absorção molecular na região do UV

O objetivo deste estudo empregando espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) foi proporcionar o conhecimento dos comprimentos de onda de máxima de absorção de cada analito e monitorar de forma qualitativa a eficiência das extrações dos analitos em soluções padrão. Para isso, foram obtidos os espectros de absorção na região do UV (200 a 300 nm) que são mostrados na Figura 7.

FIGURA 7: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DOS CF ESTUDADOS



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Soluções aquosas de espécies fenólicas em concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, cada.

De acordo com os espectros na Figura 7 é possível observar que os cinco compostos apresentam duas bandas de absorção características. A banda na faixa de 200 a 240 nm exibe maiores absorvidades molares frente às bandas em comprimento de onda compreendido entre 240 e 300 nm. As bandas com maiores absorvidades molares seriam indicadas para a quantificação desses fenóis, no entanto nota-se que ocorre sobreposição espectral em todos os casos, o que inviabilizaria a determinação simultânea direta das espécies por esta técnica. Além disso, outros fatores dificultam a determinação dos compostos estudados em amostras aquosas ambientais por métodos clássicos como o método da 4-aminoantipirina e Folin-Ciocalteu. Entre tais fatores, pode-se citar alta solubilidade em água, baixas concentrações e interferentes que podem absorver na mesma região espectral, sendo que a região de menor comprimento de onda é mais susceptível às interferências espectrais. Em vista disso é necessária uma técnica capaz de separar os fenóis em questão, quantificá-los quando estão em baixas concentrações e se possível promover a eliminação da maioria dos interferentes. A técnica escolhida neste trabalho foi LC com sistema de detecção na região do UV. São necessários alguns procedimentos de tratamento das amostras no sentido de extrair e concentrar os analitos, eliminando o máximo possível de interferentes (*clean-up*) antes da injeção das amostras.

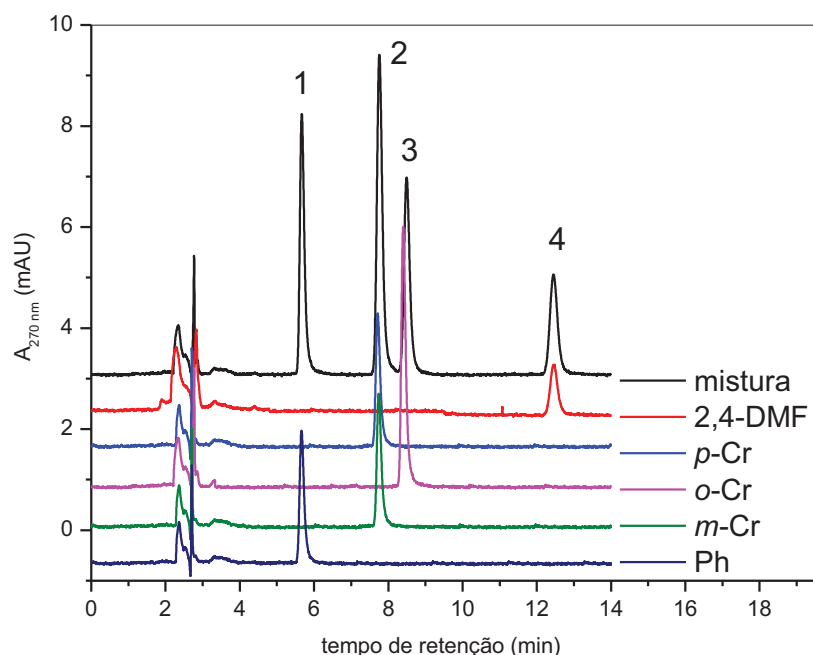
Por outro lado, procedimentos empregando tratamentos matemáticos como calibração multivariada poderiam ser empregados como alternativa à quantificação por cromatografia. Porém, neste trabalho foi empregada a técnica de LC para a separação e quantificação simultânea dos analitos.

6.2 Cromatografia a líquido

Neste estudo, que é voltado extração e quantificação de fenóis em amostras ambientais aquosas, foi utilizada a técnica de LC operando em fase reversa, e também visando à adequação do método de preparo de amostra. Tendo esses aspectos como norteadores do trabalho, foram avaliadas algumas variáveis no sistema cromatográfico com o intuito de estabelecer a separação das cinco espécies fenólicas, a partir dos padrões aquosos.

Primeiramente foram realizadas as injeções dos padrões aquosos individuais e da mistura visando a identificação dos tempos de retenção e condições para separação. O resultado é mostrado na Figura 8.

FIGURA 8: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS INJETADOS INDIVIDUALMENTE.



FONTE: O autor (2015).

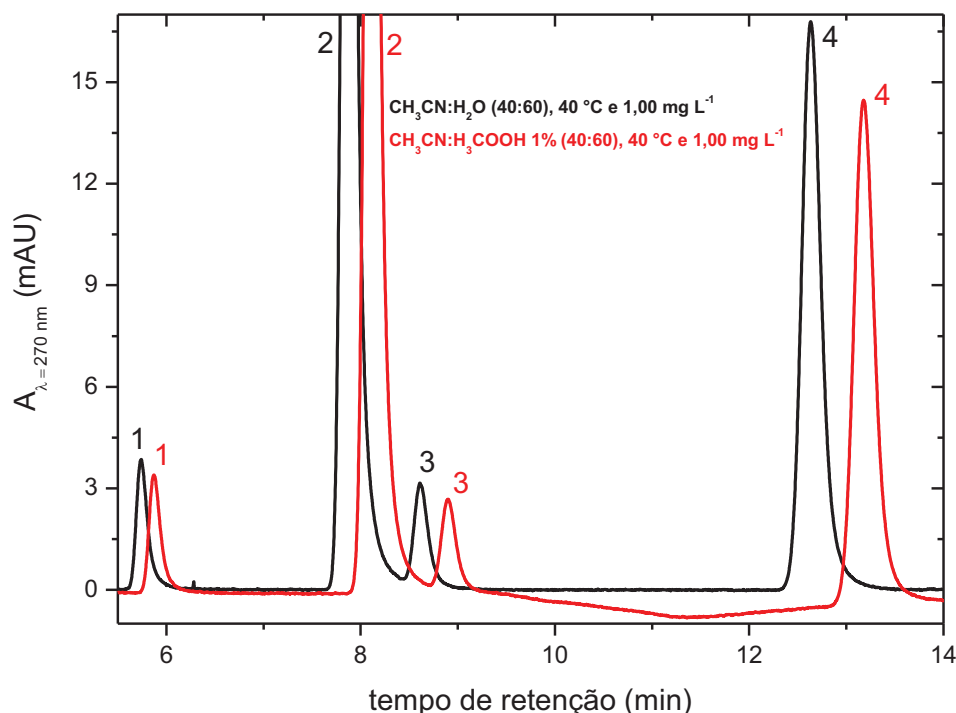
NOTA: em concentrações de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ e em mistura em concentração $2,00 \text{ mg L}^{-1}$: corrida em modo isocrático, fase móvel $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 1,0 %, 40:60 (v/v), vazão $1,00 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna = $40,0 \text{ }^\circ\text{C}$, detecção em λ de 270 nm e volume de injeção $20,0 \mu\text{L}$.

Com base nos cromatogramas mostrados na Figura 8 observa-se que nas condições cromatográficas avaliadas os compostos eluíram de acordo com seus valores de K_{ow} , ou seja, Ph ($t_R = 5,7$ min) < *m*-Cr ($t_R = 7,7$ min) = *p*-Cr ($t_R = 7,7$ min) < *o*-Cr ($t_R = 8,6$ min) < 2,4-DMF ($t_R = 12,4$ min). Não foi possível a separação dos compostos o *m*-Cr e *p*-Cr e para tentar realizar essa separação, algumas modificações nos parâmetros cromatográficos foram conduzidas visando à separação dos analitos.

Dentre os parâmetros cromatográficos, foram estudadas a composição química e vazão da fase móvel e temperatura da coluna. De acordo com as características físico-químicas dos compostos fenólicos, que são ionizáveis, optou-se por conduzir testes com composição de fase móvel modificada por adição de CH₃COOH 1,0 % (v/v). Essa estratégia foi utilizada devido aos valores de pKa dos CF variarem de 9,89 a 10,9, e, portanto, em uma solução aquosa com duas unidades de pH abaixo desses valores os compostos estão deslocados para a sua forma molecular. Ainda em relação à fase móvel foram testados como solventes o metanol (CH₃OH) e a acetonitrila (CH₃CN) ambos de grau cromatográfico, objetivando melhores resoluções e minimização de alargamento de picos.

Com base nisso foram avaliadas composições da fase móvel diminuindo a quantidade de CH₃CN visando investigar a separação do par crítico *m*-Cr+*p*-Cr. Foi constatado que operando em modo isocrático e variando a concentração de CH₃CN de 80 a 20 % em nenhum dos casos ocorreu separação. Considerando que três cresóis possuem valores muito próximos de pKa e log K_{ow} foram avaliadas eluições usando gradientes de concentração. Para tal foram testados gradientes iniciando em 60 % de CH₃CN por 1 min, 60 a 30 % de CH₃CN em 3 min e retornando a 60 % em 2 min. Utilizando outras proporções de gradiente também não foi observada a separação dos dois isômeros meta e *p*-cresol. Desta forma, optou-se trabalhar com sistema isocrático, buscando melhorar a resolução entre os picos de *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr. Para realizar a separação cromatográfica dos analitos foi selecionado o comprimento de onda de 270 nm conforme mostrado na Figura 8 (FAN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2013; SURSYAKOVA *et al.*, 2015) visando minimizar possíveis interferências de compostos orgânicos que também poderiam absorver em λ na faixa de 210 a 223 nm (BIRKETT *et al.*, 1995). Na Figura 9 são mostrados os cromatogramas das espécies fenólicas em duas composições distintas de fase móvel.

FIGURA 9: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



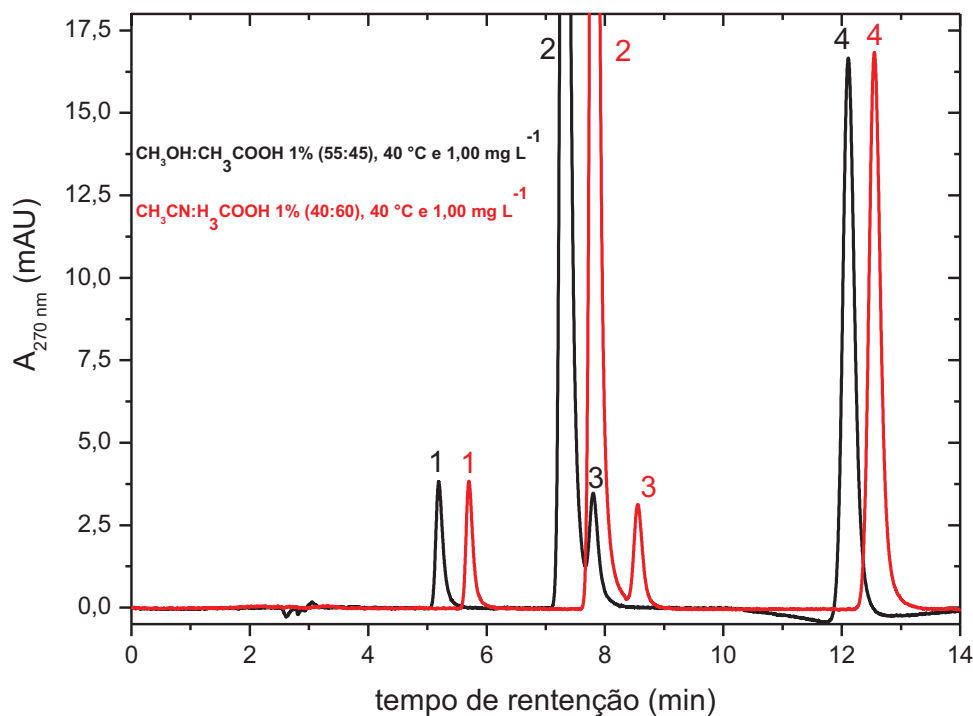
FONTE: O autor (2015).

NOTA: (1) Fenol, (2) *m*-Cr+*p*-Cr, (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF: 1,00 mL min⁻¹; CH₃CN:H₂O e CH₃CN:CH₃COOH 1,0 %, ambos (40:60 v/v); volume de injeção 20 µL.

Conforme a Figura 9 foram observados quatro picos referentes ao Ph ($t_r = 5,91$ min), mistura de *m*-Cr+*p*-Cr ($t_r = 7,96$ min), *o*-Cr ($t_r = 8,90$ min) e 2,4-DMF ($t_r = 12,70$ min) utilizando fase móvel composta por acetonitrila e água. Já no cromatograma em vermelho obtido nas condições de fase móvel acetonitrila:ácido acético 1% (40:60, v/v) foi constatada diminuição dos valores de áreas de pico e aumento dos tempos de retenção. As melhores separações das espécies ocorreram quando a composição da fase móvel continha a mistura CH₃CN e H₂O, na proporção (60:40, v/v). Contudo, visando manter os CF na forma molecular e também para adequar as condições da fase a móvel as características dos padrões e amostras obtidas por SME (acidificadas com ácido acético), optou-se por trabalhar com fase móvel contendo ácido acético.

Visando aumentar a resolução entre os picos cromatográficos de *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr, estudo semelhante foi conduzido, porém empregando fase móvel CH₃OH:CH₃COOH. Os cromatogramas utilizando CH₃CN:CH₃COOH e CH₃OH:CH₃COOH como fase móvel são mostrados na Figura 10.

FIGURA 10: CROMATOGRAMAS OBTIDOS EM DUAS COMPOSIÇÕES DISTINTAS DE FASE MÓVEL: A = CH₃CN:H₃COOH e B = CH₃OH:H₃COOH



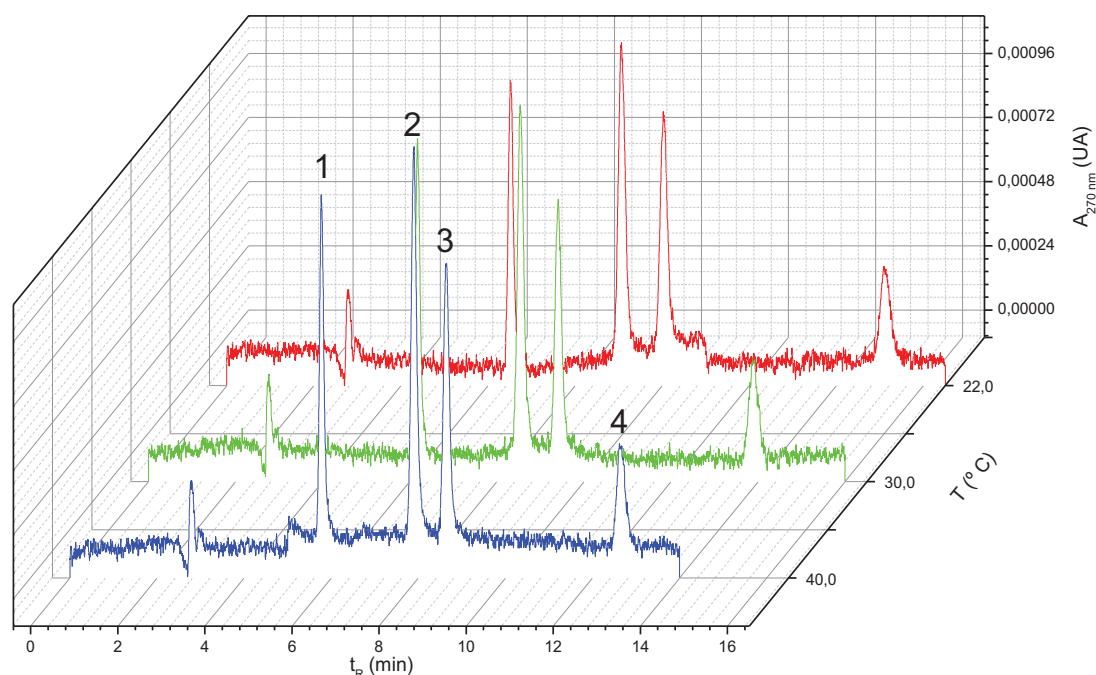
FONTE: O autor (2015).

NOTA: (1) Ph, (2) *m*-Cr+*p*-Cr, (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF: 1,00 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; detecção em $\lambda = 270$ nm.

Conforme Figura 10 nota-se que o emprego de CH₃CN como constituinte da fase móvel melhorou a resolução (R_s) da mistura de *m*-Cr+*p*-Cr em relação ao pico de *o*-Cr ($R_{s-2,3} = 1,08$), sendo escolhida a CH₃CN em lugar ao CH₃OH ($R_{s-2,3} = 0,86$) para continuidades dos estudos.

Outro fator avaliado foi a influência da temperatura da coluna cromatográfica na eficiência, resolução e tempo de corrida. As separações foram avaliadas em três temperaturas: ambiente (22 °C), 30,0 e 40,0°C e os resultados são mostrados nos cromatogramas da Figura 11.

FIGURA 11: CROMATOGRAMAS DOS CF PREPARADOS EM MEIO AQUOSO EM CONCENTRAÇÕES DE 0,50 mg L⁻¹



FONTE: O autor (2015).

NOTA: (1) Ph; (2) *m*-Cr+*p*-Cr; (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF; temperaturas da coluna analítica 22,0; 30,0 e 40,0 °C; CH₃CN:H₃COOH 1,0 % (40:60, v/v) a 1,00 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL.

Na Figura 11 são observados quatro picos correspondentes aos CF estudados, confirmados por comparação com os valores de tempo de retenção dos padrões injetados individualmente e nas mesmas condições cromatográficas. No pico 2 constata-se que dois compostos, *m*-Cr e *p*-Cr co-eluíram e não foi possível a separação em maiores temperaturas. Ruban e Pokhvoshchev (2007) relataram que diferentes materiais sorventes podem separar *o*-Cr de *m*-Cr e *p*-Cr, porém para estes dois últimos não ocorre separação (RUBAN e POKHVOSHCHIEV, 2007). Nesse sentido, alguns autores utilizam ciclodextrina como modificador de fase móvel para obter melhores resoluções (YOSHIKAWA *et al.* 1986; LEE *et al.* 2009) sendo que esses autores conseguiram a separação dos dois composto *m*-Cr e *p*-Cr.

Neste trabalho optou-se por realizar a quantificação da mistura dos dois isômeros, sem efeito significativo no objetivo principal do estudo e sem causar prejuízos ao desenvolvimento do método de microextração por solvente.

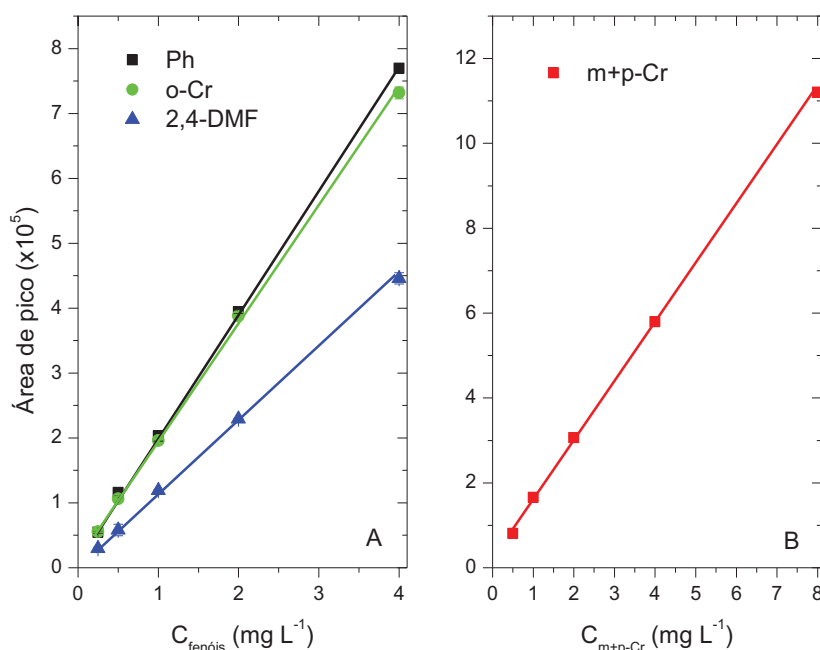
O aumento da temperatura proporcionou uma diminuição do tempo de retenção dos compostos. De modo geral, maiores temperaturas tendem a propiciar picos com menores larguras de base, melhores resoluções e diminuição do fator de retenção dos compostos (JARDIM e MALDANER, 2012). Em relação às resoluções cromatográficas (*R_s*) calculadas entre os picos 2 e 3, constatou-se diminuição dos valores com o aumento da temperatura,

sendo determinada a $R_s = 1,09$ para o par crítico 2 e 3 na maior temperatura testada. Este valor pode ser considerado satisfatório, de acordo com Collins *et al.*, (2006). Em temperaturas mais elevadas, ocorre a diminuição da viscosidade do solvente facilitando sua vazão através da coluna e conseqüentemente um aumento na velocidade de difusão dos solutos, o que ocasiona, geralmente, uma melhor resolução em função dos picos apresentarem menor largura na linha base. Temperaturas maiores não foram avaliadas no intuito de proteger a coluna cromatográfica que opera até no máximo 50 °C de acordo com o manual do fabricante. Desta maneira, para todas as quantificações realizadas por LC-DAD, a coluna cromatográfica (C18, 250 X 46 mm e 5 μ m) foi mantida na temperatura de 40,0 °C, eluição isocrática com fase móvel composta por $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{COOH}$ 1,0 % (40:60, v/v), vazão de 1,00 mL min^{-1} , volume de injeção e 20,0 μL e detecção em 270 nm.

6.3 Curvas analíticas por determinação direta

De posse das condições cromatográficas para separação dos compostos fenólicos, foram obtidas as curvas analíticas para os compostos (Figura 12), sem a utilização dos processos de microextração.

FIGURA 12: CURVAS ANALÍTICAS DE Ph, *m*-Cr+*p*-Cr, *o*-Cr e 2,4-DMF.



FONTE: O autor (2015).

NOTA: (A) concentrações na faixa de 0,25 A 4,00 mg L^{-1} para Ph, o-Cr e 2,4-DMF; (B) 0,50 a 8,00 mg L^{-1} para *m*-Cr+*p*-Cr e $n = 3$.

Conforme Figura 12 são observadas quatro curvas, sendo os dados da calibração instrumental da mistura de *m*-cresol e *p*-cresol, obtidos dos picos referentes a concentração dos dois compostos somada. Portanto, a faixa mostrada para a mistura *m*-Cr+*p*-Cr é referente a concentrações de 0,50 a 8,00 mg L⁻¹. Em relação à curva construída para o composto 2,4-DMF foi constatada a menor sensibilidade, provavelmente decorrente do alargamento de pico nas determinações cromatográficas uma vez que esse composto apresentou o maior dos tempos de retenção.

Essas curvas analíticas foram necessárias para avaliar o desempenho de diferentes métodos de microextração frente à extração de fenóis em padrões aquosos. No entanto, cabe ressaltar que os padrões das curvas foram preparados em solução aquosa e não passaram por qualquer procedimento de microextração por solvente. Na sequência as curvas foram avaliadas conforme alguns parâmetros de mérito mostrados na Tabela 6.

TABELA 6: PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS (PADRÕES AQUOSOS)

Composto	Intercepto	Inclinação	Faixa	LOQ	LOD	r ²
			mg L ⁻¹			
Ph	148,0	19410,0	0,25 - 4,00	0,10	0,03	0,9994
<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr	-73,1	29634,5	0,50 - 8,00	0,04	0,01	0,9991
<i>o</i> -Cr	-550,2	20160,7	0,25 - 4,00	0,27	0,08	0,9997
2,4-DMF	-128,6	13046,8	0,25 - 4,00	0,10	0,03	0,9996

n = 3.

FONTE: O autor (2015).

Conforme Tabela 6 observa-se que todas as curvas apresentaram correlações lineares satisfatórias, com coeficiente de determinação *r*² mínimo de 0,99, que pode ser considerado um valor adequado (BRASIL, 2017). Em vista das áreas de pico dos compostos *m*-Cr e *p*-Cr se somarem, isto devido sobreposição e eficiência inadequada da separação, foi verificada maior sensibilidade da curva analítica para a mistura *m*+*p*-Cr. Os valores obtidos de LOD e LOQ foram determinados conforme as equações 6 e 7 (materiais e métodos). No que diz respeito a fenóis totais em águas e solos os resultados calculados, para os dois parâmetros foram relativamente baixos, no entanto superiores aos valores orientadores encontrados em documentos de agências e órgãos ambientais nacionais (CONAMA 357/2005 e CETESB 195-2005-E). Vislumbrando métodos analíticos que atendam aos valores estabelecidos nas legislações, especialmente para CF, a escolha ou desenvolvimento de estratégias com a finalidade de extração, *clean-up* e pré-concentração são importantes no sentido de proporcionar maior confiabilidade, qualidade dos sinais analíticos e menores valores de LOQ.

6.4 Estratégias analíticas usadas para extração de compostos fenólicos em água

Como primeira estratégia de extração empregou-se a LLE em escala reduzida visando estudar algumas variáveis de extração, como concentração dos CF, volume de solvente extrator, tipo e tempo de agitação, efeito da força iônica, pH entre outros fatores. Em paralelo a esses estudos foram conduzidos ensaios por espectrofotometria de absorção molecular na região do UV e por LC-DAD para o monitoramento qualitativo e quantitativo do desempenho desses ensaios e métodos de extração testados.

Para isso partiu-se do pressuposto de que os compostos fenólicos seriam extraídos de matrizes aquosas mais facilmente, com solventes orgânicos com o devido ajuste de algumas propriedades, como a polaridade das moléculas dos analitos, força iônica do meio e modificação da estrutura química dos fenóis (derivatização).

Vários experimentos foram conduzidos, empregando agitação magnética e orbital, visando a extração das espécies em padrões aquosos (25,0 mL) em concentração de 1,00 mg L⁻¹. Para isso foi estudado somente a extração do Ph de padrão aquoso, pois dentre as espécies de interesse neste trabalho, essa era a que apresentava a maior solubilidade em água, e teoricamente maior dificuldade para a extração. Uma vez que fosse realizada a extração do composto fenólico mais polar a expectativa era que para os demais, menos polares, a extração seria favorável.

Avaliando a extração de Ph com extratores como *n*-hexano, tolueno e acetato de butila (500 a 1000 µL) não foi constatada a presença do analito nesses extratos orgânicos, em concentrações de Ph mensuráveis por espectrofotometria na região do UV (220 e 270 nm). Em paralelo foi avaliada a extração de Ph em meio ácido (HCl 0,50 mol L⁻¹), visando deslocar o equilíbrio no sentido no qual as moléculas de Ph estão na forma molecular, diminuindo sua polaridade e aumentando a afinidade pela fase orgânica. Ainda nessa mesma linha, a adição de eletrólito aos padrões aquosos teve como objetivo enriquecer a fase orgânica com o Ph devido ao efeito *salting out*. A adição de um eletrólito como NaCl ao meio aquoso faz com que mais moléculas de água solvatem os íons Na⁺ e Cl⁻ e isso diminui a disponibilidade de moléculas de H₂O destinadas a solvatar as espécies orgânicas menos polares (fenóis) que estão em solução. Consequentemente, a solubilidade dos fenóis nessa situação tenderia ser menor, favorecendo melhores condições de extração com solventes orgânicos menos polares. Entretanto, em nenhum dos casos foram observados resultados satisfatórios, portanto outros estudos foram conduzidos empregando trabalhos envolvendo microextração por solvente.

6.5 *Microextração por solvente*

Inicialmente foram feitos estudos para extração de Ph, *o*-Cr, *m*-Cr, *p*-Cr e 2,4-DMF, em meio aquoso, empregando *n*-hexano e acetato de butila, em volume na faixa de 1,0 a 2,0 mL. Para conduzir tal procedimento, as soluções padrão contendo fenóis foram acidificadas com CH₃COOH glacial, visando a protonação das espécies fenólicas, aumentando suas afinidades pelos solventes orgânicos, devido à diminuição da polaridade. Os resultados obtidos por UV para extração dos fenóis, em concentração de 50,0 mg L⁻¹, com os dois solventes citados indicam que a extração não ocorreu, com base em detecção qualitativa por espectroscopia na região do UV. Não foram observadas bandas de absorção dos compostos fenólicos nos extratos, na região de 200 a 400 nm, indicativo que o método de extração escolhido, nas condições testadas, não foi apropriado. Outra maneira de diminuir a polaridade dos analitos é realizando a derivatização dos mesmos aos seus respectivos ésteres (BAGHERI *et al.*, 2004).

Normalmente, na quantificação dos CF por GC-MS é necessário realizar a derivatização dos mesmos, com posterior extração dos ésteres de fenóis formados com pequenos volumes de *n*-hexano para injeção no cromatógrafo a gás. Para trabalhar com a LC a derivatização dos CF também foi avaliada, porém com adaptações no método de extração para compatibilizá-la à quantificação por cromatografia a líquido. O processo de derivatização é realizado nos analitos em uma amostra visando modificações na estrutura química destes, permitindo melhores condições de extração, determinação, estabilidade, polaridade, solubilidade e outras, visando características compatíveis e favoráveis a uma determinada técnica de quantificação.

No caso da LC, operando em fase reversa, a injeção de solvente orgânico imiscível (*n*-hexano) com a fase móvel (aquosa) não é possível, sendo necessária outra etapa de preparo para volatilizar o solvente extrator e ressolubilizar os analitos em uma fase aquosa ou compatível com a fase móvel utilizada no método cromatográfico. Sendo assim, após a derivatização, extração e volatilização do solvente, o resíduo foi ressolubilizado em 500 µL de CH₃CN e levado a quantificação por LC/DAD. A análise dos resultados indicou que não foram identificados picos dos compostos fenólicos, sugerindo que na etapa de volatilização deve ter havido perdas dos analitos que têm menores pressões de vapor que os fenóis. Concentrações mais elevadas dos analitos foram avaliadas por LC-DAD e por espectrofotometria na região do UV, na etapa de derivatização, mas também sem sucesso. De posse disso e do aumento do tempo de análise na etapa de volatilização do solvente, buscou-se outras estratégias como redução do volume de solventes orgânicos usados na extração objetivando menor tempo para volatilizar o solvente.

Nesse sentido, foram estudados outros modos de microextração com solvente: SDME, DSDME, SD-LPME que empregam volumes reduzidos de solventes extratores (1-100 μL). E nesses métodos também foram testadas outras condições operacionais como a substituição de solventes extratores; volumes de amostra e solvente; concentração dos CF nos padrões aquosos; tempo de extração; pH, tipo e velocidade de agitação; temperatura e derivatização dos CF.

6.6 Microextração por gota única de solvente (SDME)

Foi desenvolvido procedimento de microextração por gota única de solvente. Para tal foi empregada a configuração descrita no subitem 5.5 e derivatização dos analitos. A análise dos resultados obtidos após determinação por LC indicaram que possivelmente não houve derivatização dos fenóis nas concentrações analisadas na amostra (1,00 mg L^{-1}) ou, as condições de extração no momento de realização dos experimentos (pH, temperatura, força iônica e agitação) não foram adequadas. Adicionalmente, concentrações elevadas dos fenóis (1,50 a 5,00 mg L^{-1}) foram testadas, sendo a proporção dos reagentes derivatizantes corrigidas. Novamente não foi detectada por LC a presença de picos indicativos dos ésteres de fenóis. Neste caso, duas hipóteses para este resultado foram levantadas. A primeira delas, considerando que a reação de derivatização não ocorreu, e a segunda possibilidade que a concentração de fenóis nos padrões aquosos não foi suficiente para proporcionar após derivatização e extração uma concentração de ésteres de detectáveis por LC na região do UV (254 nm).

De posse dessas hipóteses, algumas adaptações foram testadas com o intuito de avaliar o rendimento da reação de formação dos ésteres dos compostos fenólicos. Foi testado o aumento na concentração dos reagentes derivatizantes, mas isto implicou em maior formação de gás CO_2 proveniente da adição de K_2CO_3 em meio contendo anidrido acético. Esse maior desprendimento de gás poderia volatilizar parte dos ésteres devido à alta pressão de vapor e também parte dos CF resultando em perdas. Adicionalmente causou instabilidade na gota de solvente, que estava imersa na solução da amostra, fazendo com que ela se desprendesse da agulha, assim como relatado Xu *et al.* (2007). Regueiro *et al.* (2009) estudaram a determinação de clorofenóis por (*head space single drop microextraction*, HS-SDME) e também descreveram problemas semelhantes na etapa de derivatização, quando utilizado meio contendo carbonato de potássio. Os autores relataram que eliminaram a formação de bolhas mediante a substituição do sal de K_2CO_3 por monohidrogenofosfato de sódio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Esse sal, em meio aquoso, torna o meio básico, atingindo pH próximo ao requerido pelo método de acetilação de fenóis. Considerando então

os problemas de estabilidade da gota de solvente extrator e a formação de bolhas, optou-se por teste empregando outro modo de microextração no qual não é necessária a utilização de gota suspensa, ou seja, o DSDME.

6.7 Microextração por solvente em gota diretamente suspensa (DSDME)

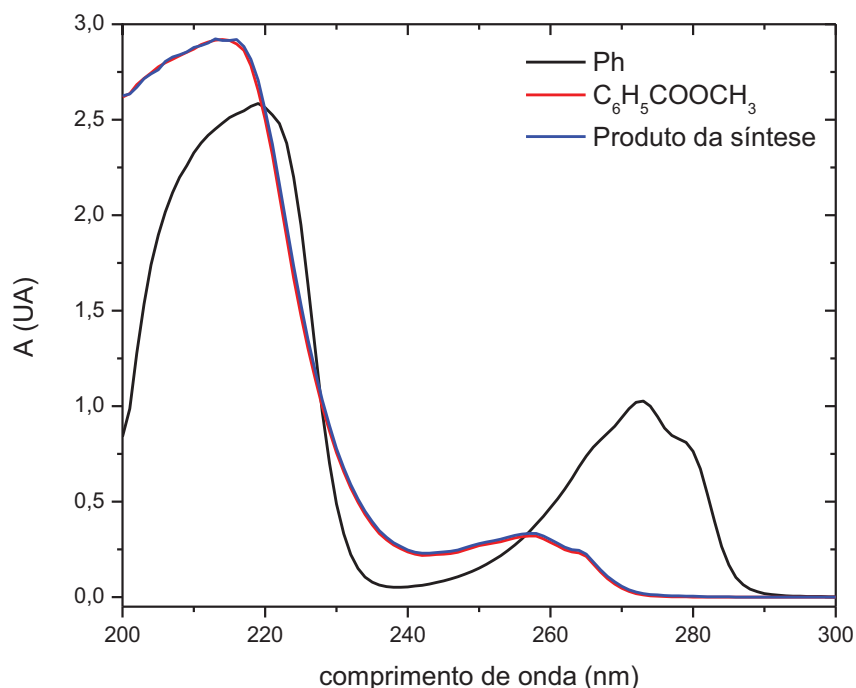
Com o objetivo de avaliar se as condições de agitação poderiam proporcionar melhor superfície de contato com os analitos e a gota de solvente, modo DSDME foi averiguado, conforme subitem 5.5. Além disso, foi feita uma adaptação no método para a reação de derivatização, sendo a realizada a troca do K_2CO_3 por NaOH em concentração $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para minimizar a formação de bolhas de CO_2 no meio.

A DSDME tem como característica maiores recuperações na extração de analitos orgânicos e inorgânicos, pois proporciona melhor contato da gota de solvente orgânico com a amostra (YANGCHENG *et al.*, 2006). O extrato obtido foi avaliado por espectroscopia na região do UV (200 a 400 nm) e posteriormente por LC. Os resultados obtidos por varredura na região do UV não apresentaram bandas de absorção que poderiam ser indicativas dos produtos de reação e da extração dos mesmos. Em relação às análises por LC também não foram detectados picos dos produtos acetilados, nas condições cromatográficas testadas. Deste modo, foi avaliado se a reação de derivatização estava ocorrendo nas condições estudadas investigando-se a síntese alguns ésteres de fenol e posteriormente calculando seus respectivos índices de ésteres.

6.8 Síntese dos ésteres de fenol

A síntese dos ésteres de fenol teve dois objetivos principais: avaliar a eficiência de reação de esterificação dos fenóis e obter alguns dos padrões para posteriores comparações com o procedimento realizado em amostras contendo fenóis. Foram realizadas as tentativas para síntese de três compostos, acetato de fenila, 2-metilfenil acetato e 4-metilfenil acetato. Para avaliar a síntese foi realizado teste qualitativo, por espectroscopia na região do UV, comparando os produtos de reação com padrão puro de acetato de fenila e com espectros de compostos fenólicos. Os espectros de absorção na região do UV dos compostos fenólicos e dos produtos da síntese são mostrados na Figura13.

FIGURA 13: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO EM SOLUÇÃO AQUOSA DE Ph EM CONCENTRAÇÃO 50,0 mg L⁻¹

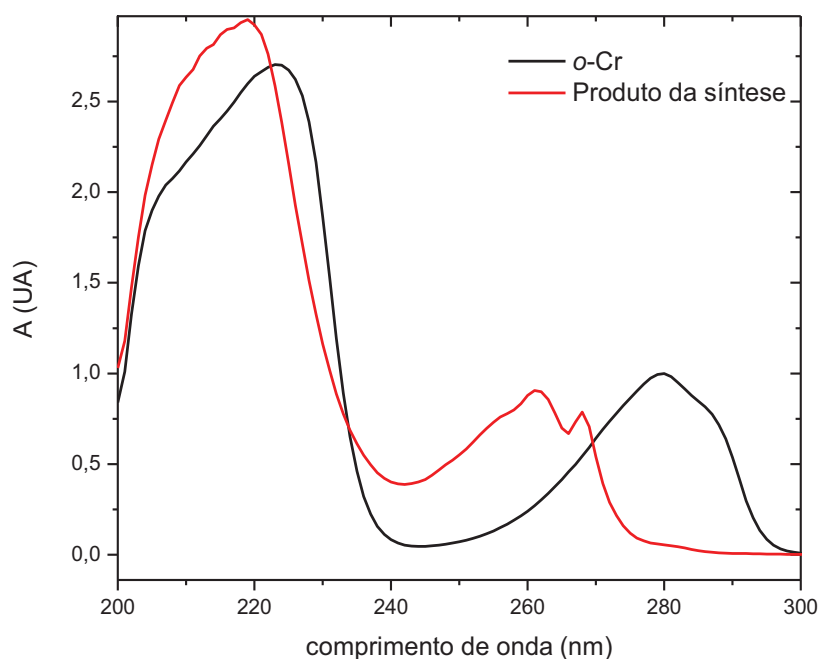


FONTE: O autor (2015).

NOTA: Solução padrão acetato de fenila (C₆H₅COOCH₃) em concentração 25,0 mg L⁻¹ (C); composto sintetizado (possivelmente acetato de fenila).

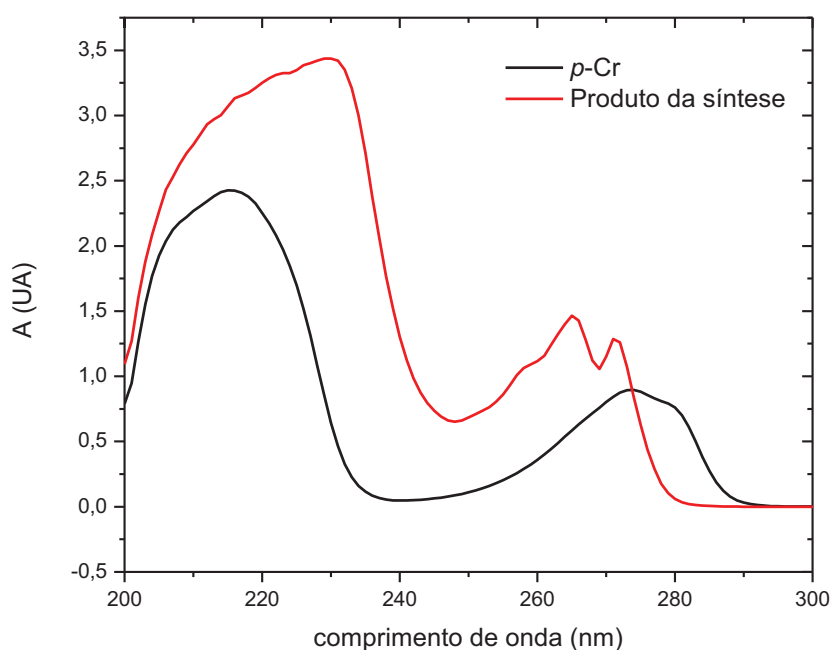
De acordo com a Figura 13 é possível observar no espectro do Ph duas bandas de absorção (218 e 274 nm) características de solução aquosa de Ph padrão em concentração 50,0 mg L⁻¹. Já no espectro em vermelho tem-se o padrão analítico de acetato de fenila em meio aquoso em concentração de 25,0 mg L⁻¹. Neste espectro observam-se duas bandas de absorção, sendo a mais intensa em λ de 215 nm e uma segunda banda com menor absorvidade molar em λ de 254 nm. Comparando o espectro do padrão de C₆H₅COOCH₃ com o produto de síntese, nota-se que estes apresentam absorções em regiões semelhantes. Com base nisso, sugere-se que o rendimento da reação parece ter sido satisfatório, sendo observada praticamente sobreposição dos espectros B e C. Sínteses análogas foram conduzidas para os compostos *o*-Cr e *p*-cresol, no entanto não foi realizada a comparação com padrão analítico desses ésteres dos fenóis derivados, pois esses padrões não foram adquiridos para estes ensaios. Os seus espectros de absorção dos compostos sintetizados são mostrados nas Figuras 14 e 15.

FIGURA 14: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE *o*-Cr EM CONCENTRAÇÃO DE 50,0 mg L⁻¹ E PRODUTO DA SÍNTESE (ACETATO DE *O*-CRESILA).



FONTE: O autor (2015).

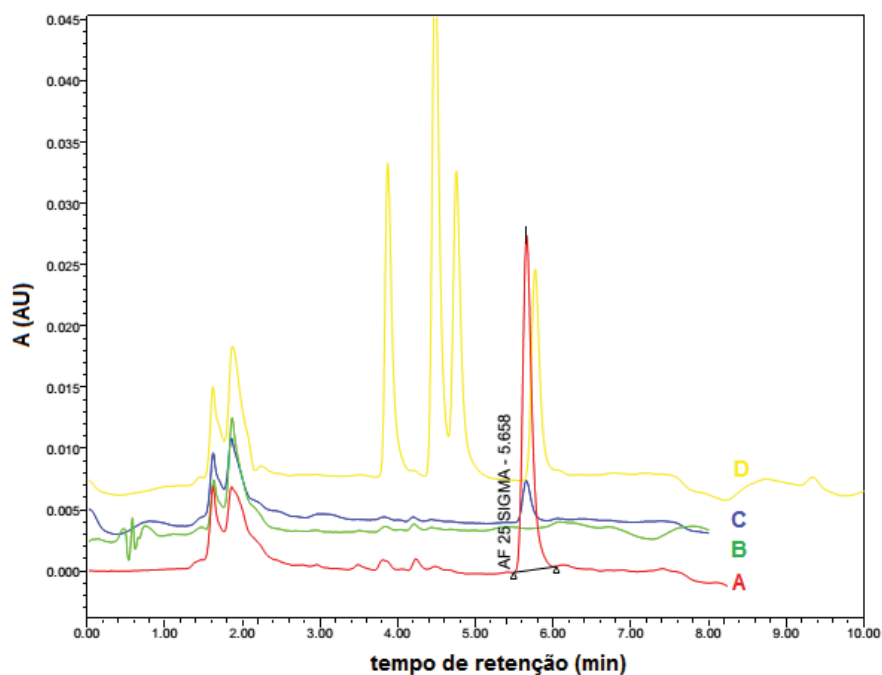
FIGURA 15: ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV DO PADRÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE *p*-Cr EM CONCENTRAÇÃO DE 50,0 mg L⁻¹ E PRODUTO DA SÍNTESE (ACETATO DE *P*-CRESILA).



FONTE: O autor (2015).

Conforme Figuras 14 e 15 foram observados perfis semelhantes aos resultados obtidos para síntese de acetato de fenila. Em vista disso, foi estudado comportamento cromatográfico do padrão analítico de acetato de fenila frente a duas situações. Na primeira foi preparada solução (2 mL) de acetato de fenila em concentração de $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ em meio de *n*-hexano. Na sequência essa solução foi volatilizada em capela e o resíduo do frasco ressolubilizado em $300 \mu\text{L}$ de CH_3CN . No segundo teste, durante 30 min, foi realizada a extração com 2 mL de *n*-hexano em 10 mL de uma solução em concentração de 100 mg L^{-1} de acetato de fenila. Após esse tempo uma alíquota de aproximadamente 1,5 mL de *n*-hexano foi removida do frasco de extração, a qual foi volatilizada em capela e o resíduo reconstituído com $300 \mu\text{L}$ de CH_3CN . Esses padrões provenientes dos dois ensaios foram injetados ($20 \mu\text{L}$) no LC e posteriormente comparados ao sinal e padrão analítico do acetato de fenila e compostos fenólicos, conforme mostrado na Figura 16.

FIGURA 16: CROMATOGRAMAS DA AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ACETATO DE FENILA EM MEIO AQUOSO USANDO COMO EXTRATOR *n*-HEXANO:



FONTE: O autor (2015).

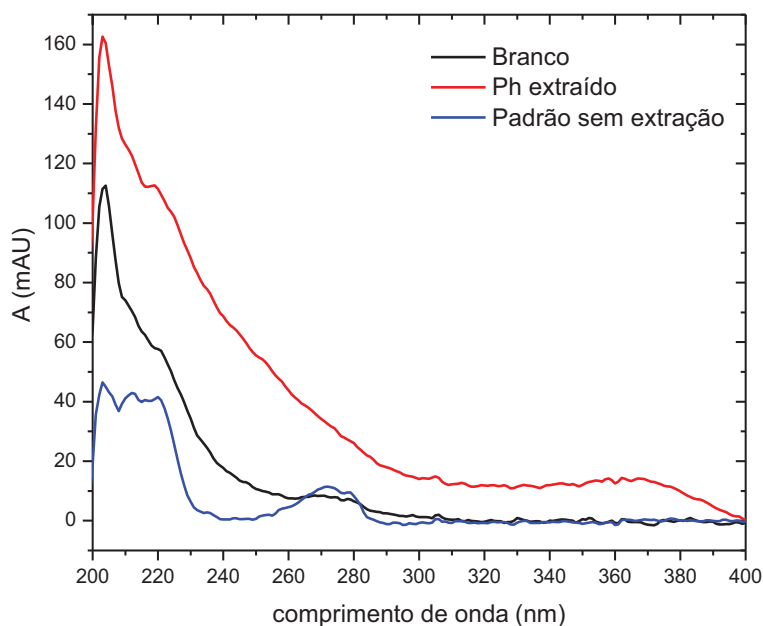
NOTA: (A) cromatograma do padrão aquoso de acetato de fenila ($25,0 \text{ mg L}^{-1}$); (B) cromatograma do padrão ressolubilizado após extração de solução aquosa de acetato de fenila ($25,0 \text{ mg L}^{-1}$); (C) cromatograma do padrão ressolubilizado da solução acetato de fenila em meio de *n*-hexano e (D) cromatogramas dos padrões aquosos dos compostos fenólicos em concentração de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$. Condições: fase móvel $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40 v/v), detecção em $\lambda = 254 \text{ nm}$ (éster) e 270 nm (fenóis), vazão $1,00 \text{ mL min}^{-1}$ e injeção de $20 \mu\text{L}$.

De acordo com a Figura 16 é possível constatar no cromatograma A que o tempo de retenção do acetato de fenila é 5,75 min, sendo que o padrão em concentração de $25,0 \text{ mg L}^{-1}$ apresentou sinal com intensidade de $\sim 30 \text{ mAU}$ frente aos sinais obtidos para uma solução dos CF (cromatograma B) em concentração $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (17 mAU). Neste caso, como a concentração do acetato de fenila avaliada neste estudo foi maior do que a dos CF, constatou-se que a absorvidade molar do acetato de fenila é menor em relação aos fenóis. No cromatograma B observa-se que não foi detectado o analito indicando que não foi extraído em quantidade mensurável pelo detector UV. Por fim no cromatograma C nota-se que ocorrem perdas no processo de volatilização empregado no teste repercutindo em uma diminuição significativa da área de pico do analito. A luz destas observações buscou-se na literatura procedimentos voltados para extração e quantificação dos CF compatíveis a LC-DAD (ZHAO e LEE, 2001; ZHANG *et al.*, 2011) e além disso considerando as perdas no processo de volatilização foi avaliada a possibilidade de determinação dos fenóis por LC de modo direto, sem derivatização. Para isso foram realizadas algumas adaptações e testados três métodos de microextração, a microextração por gota de solvente solidificado (SD-LPME), microextração líquido-líquido-líquido (LLLME) e microextração por solvente em duas etapas (*two-step* SME).

6.9 Microextração em fase líquida com gota solidificada (SD-LPME)

O procedimento de microextração em fase líquida com gota solidificada foi empregado utilizando duas etapas de extração. Para isso após o procedimento de extração o solvente (1-dodecanol), depois de solidificado, foi levado a um tubo Eppendorf no qual foi permaneceu em temperatura ambiente do laboratório ($\sim 20 \text{ }^\circ\text{C}$) até sua fusão. Na sequência foi realizada uma nova extração com solução de NaOH que foi posteriormente neutralizada com CH_3COOH glacial e avaliada por espectrofotometria na região do UV, utilizando uma cubeta para injeção em fluxo com 1 cm de caminho ótico. Esta cubeta foi utilizada por possuir menor volume interno, requerendo menor volume de solução a ser medida. Esses resultados são mostrados na Figura 17.

FIGURA 17: AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE MICROEXTRAÇÃO POR GOTA DE SOLVENTE SOLIDIFICADO (SD-LPME) VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV.



FONTE: O autor (2015).

NOTA: (A) espectro UV da prova em branco obtida após extração por 30 min, pH ~ 3 a 40 °C; (B) espectro UV da solução contendo fenol em concentração inicial de 1,00 mg L⁻¹ obtido após 30 min de extração, pH ~ 3 a 40 °C e (C) espectro de solução padrão de fenol em concentração 1,00 mg L⁻¹ em meio de CH₃CN.

Primeiramente na Figura 17 observa-se que em A no espectro de absorção da prova em branco ocorre absorção na faixa de 200 a 300 nm. No espectro B não foi constatada a banda característica de fenol em λ de 270 nm, sugerindo que a extração não ocorreu e não foi possível detectar o fenol nesse padrão. Com base nisso foi avaliado outro procedimento de microextração, a LLLME.

6.10 Microextração líquido-líquido-líquido (LLLME)

O procedimento de LLLME foi avaliado visando à extração direta dos cinco fenóis sem a necessidade de derivatização (ZHAO e LEE, 2001; ZHANG, *et al.*, 2011). Este procedimento foi escolhido visando eliminar a etapa de volatilização de solvente e pela compatibilidade com análise via LC-DAD. Para as extrações foi utilizada solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ como solução receptora dos fenóis. De acordo com os resultados obtidos inicialmente por espectroscopia UV na faixa de 200 a 400 nm não foi observada absorção característica dos fenóis nos extratos de solução de NaOH. Concentrações maiores dos fenóis na faixa de 10,0 a 30,0 mg L⁻¹ foram avaliadas em paralelo, porém sem resultados indicativos da extração dos

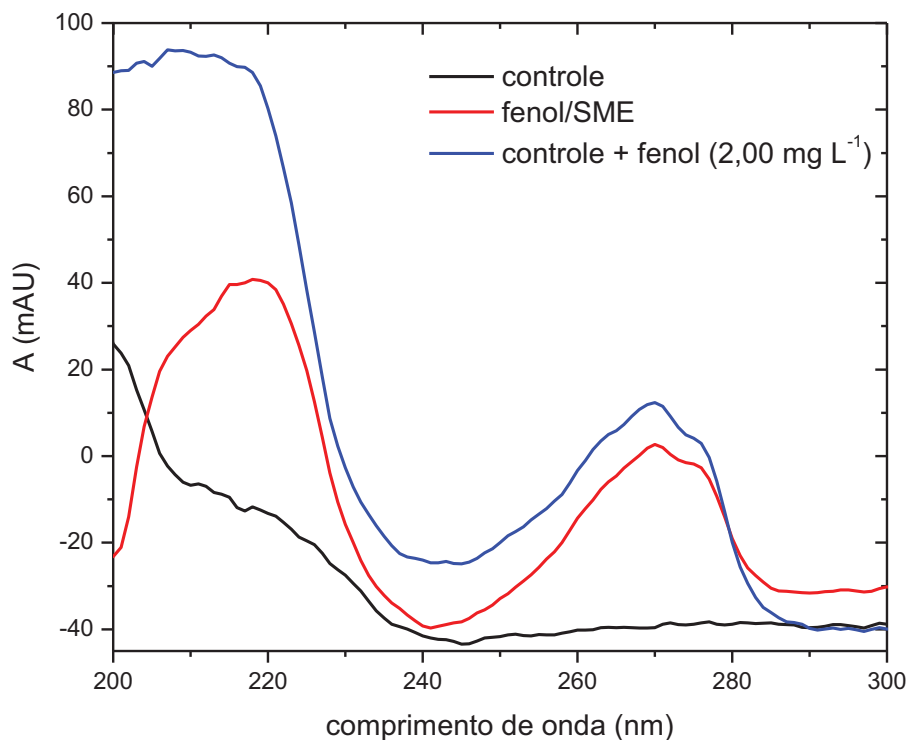
compostos. O mesmo estudo foi realizado com a fase orgânica, e foi observada absorção em 220 e 270 nm, porém este resultado foi obtido apenas para concentração de Ph de 50,0 mg L⁻¹. Por outro lado, o valor de absorção na banda de maior absorvidade molar (220 nm) apresentou valor de absorbância de 0,045 unidades, indicando que a extração, após 30 min de contato com agitação magnética, promoveu pequena remoção dos fenóis do meio aquoso. Apesar de o valor ser considerado abaixo do esperado, este foi avaliado como um indicativo da extração dos compostos na fase orgânica.

Com base nos resultados anteriores foram avaliadas as determinações empregando LLLME por LC/DAD. No que diz respeito às amostras, antes da injeção no cromatógrafo, estas foram neutralizadas com solução de HCl em concentração de 1,00 mol L⁻¹, avolumadas a 1,00 mL, filtradas e colocadas em *via/s* de 1 mL. Os resultados utilizando diferentes proporções de fase móvel CH₃CN:H₂O não mostraram a presença dos picos ou sinais relativos aos fenóis, indicando possivelmente que o procedimento de extração, nas condições avaliadas, não foi eficiente para as extrações. Devido à alta polaridade dos compostos fenólicos foi utilizado método que proporcionasse maior agitação e área de contato do solvente e amostra.

6.11 Microextração por solvente em duas etapas (*two-step* SME)

O método *two-step* SME foi testado, pois as condições experimentais deste procedimento favorecem maior área de contato do solvente extrator com o padrão ou amostra aquosa. Isso ocorre durante a agitação, devido à formação de microgotas de solvente, que sofre dispersão pela solução, acelerando a extração e facilitando a partição do analito entre a fase aquosa e a orgânica (ANDRUCH, *et al.*, 2012). Para o teste realizado neste estudo foi feita adaptação do trabalho de Zhang, *et al.* (2011) sendo utilizada a técnica de espectrofotometria na região do UV para ensaios preliminares qualitativos. Os resultados obtidos para este estudo são mostrados na Figura 18.

FIGURA 18: AVALIAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV DE SOLUÇÕES AQUOSAS DE FENOL.

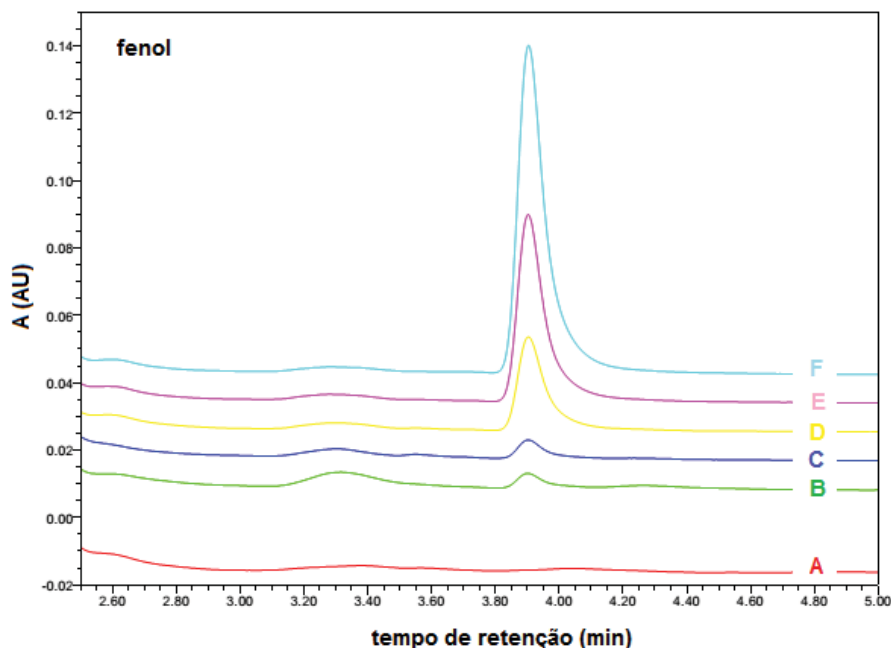


FONTE: O autor (2015).

NOTA: em concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ submetidas a procedimento de microextração por solvente usando *n*-octanol como extrator: (controle) espectro da solução controle após procedimento de SME; (fenol/SME) espectro da solução aquosa de fenol após processo de extração por SME e (controle + fenol ($2,00 \text{ mg L}^{-1}$)) espectro de absorção UV da solução controle submetida a SME e posteriormente fortificada com fenol com concentração final $2,00 \text{ mg L}^{-1}$.

Diferentemente dos outros experimentos realizados, usando *n*-hexano como solvente extrator, neste estudo foi avaliado o *n*-octanol por ser um solvente compatível com a técnica de LC-DAD operando em fase reversa e pela versatilidade na extração de outros analitos fenólicos (ZHANG, *et al.*, 2011). Na Figura 18 é possível observar que o método *two-step* SME usando esse solvente foi adequado para a extração do fenol da solução aquosa. Com base na solução da prova em branco que foi fortificada com padrão de fenol de modo a proporcionar concentração final de $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ foi constatado que ocorreu pré-concentração de aproximadamente 20 vezes empregando o método SME citado. De acordo com esses ensaios um estudo semelhante foi conduzido via determinação por LC e os resultados são apresentados na Figura 19.

FIGURA 19: CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES AQUOSOS DE FENOL OBTIDOS APÓS SEREM SUBMETIDOS AO PROCESSO DE MICROEXTRAÇÃO POR SOLVENTE EMPREGANDO *n*-OCTANOL COMO EXTRATOR



FONTE: O autor (2015).

NOTA: (A) prova em branco; concentrações de fenol (B) 0,10; (C) 0,25; (D) 0,50; (E) 1,00; (F) 2,00 mg L⁻¹.

Utilizando cinco padrões aquosos de fenóis em concentrações crescentes foi observado que ocorreu a extração do fenol pelo *n*-octanol, sendo as áreas de picos proporcionais à concentração do analito. Em outros estudos realizados por LC-DAD partiu-se de concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de Ph e foi determinado aproximadamente 1300 µg L⁻¹ no padrão, após o procedimento por *two-step* SME, sugerindo que ocorreu pré-concentração deste analito. Provas em branco (A) foram testadas em paralelo e não foram constatados picos de compostos fenólicos. Considerando estes ensaios como positivos os demais fenóis foram avaliados do mesmo modo, porém com os padrões contendo a mistura dos cinco compostos em concentração de 100 µg L⁻¹. Novamente os resultados indicaram concentração das espécies em torno de 10 a 30 vezes superiores, sugerindo que o método investigado seria apropriado.

Com base nisso o método foi estudado de forma univariada para a determinação das variáveis de extração. Para tal, algumas variáveis foram testadas separadamente, como tipo de agitação (manual, orbital, magnética e ultrassom), velocidade de agitação magnética (200, 400 e 600 rpm), tempo de agitação em vórtex (20, 40 e 60 s) e volume de amostra (10,00, 25,00, 50,00 e 100,0 mL). As melhores condições determinadas foram agitação magnética a

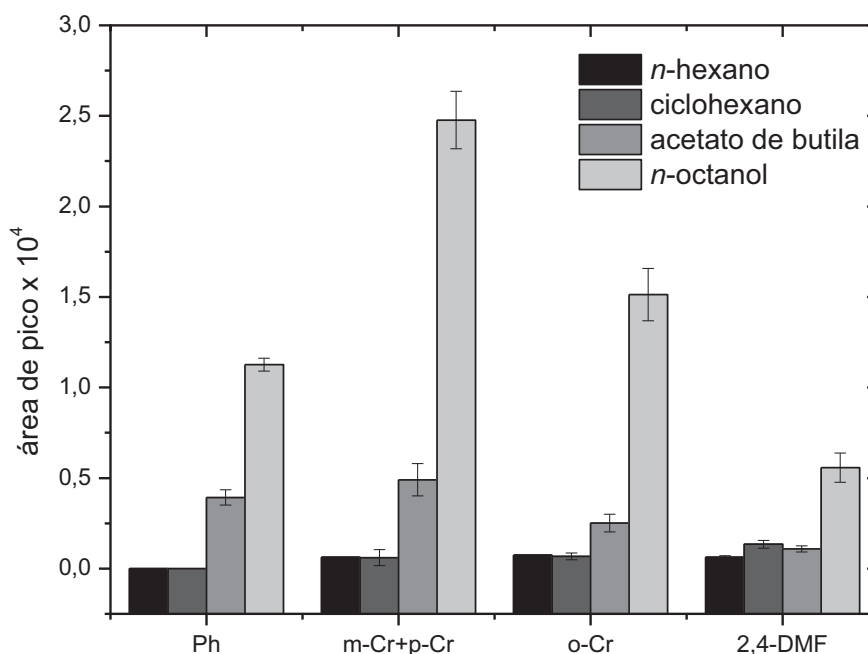
600 rpm, vórtex a 70 % por 1 min e de 25,00 a 50,00 mL de amostra. Além disso, foram utilizadas soluções padrão mistas dos analitos em concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Essas variáveis foram então mantidas fixas para condução dos demais experimentos.

Após a definição das variáveis operacionais, foram realizados ensaios para a determinação do tipo de solvente extrator, concentração de solução aceptora (NaOH), tempo de extração, volume de solvente extrator, concentração de HCl, temperatura e concentração de NaCl.

6.12.1 Escolha do solvente

O tipo de solvente empregado no procedimento de microextração é fundamental para proporcionar elevados EF dos analitos. Por isso selecionou-se solventes extratores com densidade inferior a água, baixa volatilidade, baixa solubilidade em água, com polaridades compatíveis aos analitos e com comportamento cromatográfico adequado. Os escolhidos para o experimento, em ordem crescente de polaridade, foram *n*-hexano, ciclo-hexano, acetato de butila e *n*-octanol, sendo os resultados apresentados na Figura 20.

FIGURA 20: SELEÇÃO DO SOLVENTE PARA A EXTRAÇÃO DOS CF A PARTIR DE PADRÕES AQUOSOS DE $100 \mu\text{g L}^{-1}$ USANDO O MÉTODO *TWO-STEP* SME



FONTE: O autor (2015).

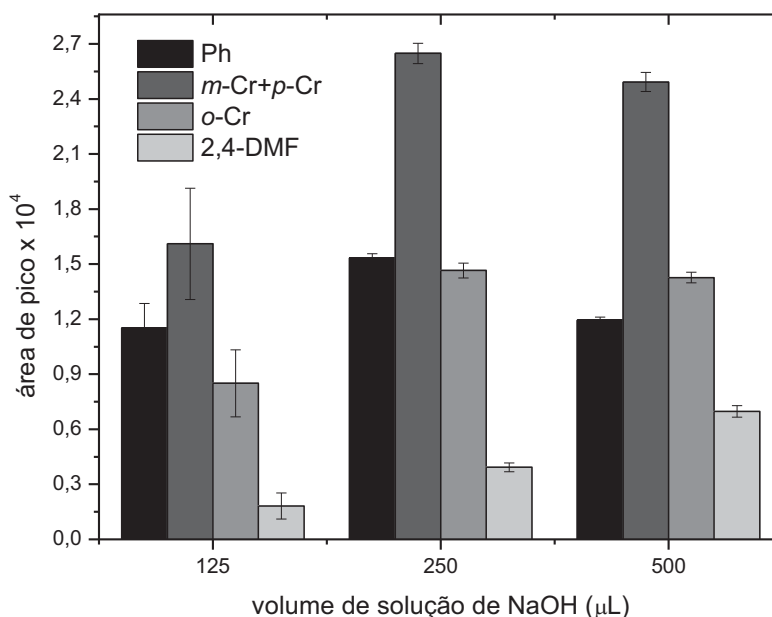
NOTA: Tempo de extração 10 min; volume dos solventes orgânicos $500 \mu\text{L}$; solução receptora de NaOH em volume de $250 \mu\text{L}$ em concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; $n = 3$.

Conforme a Figura 20, os resultados obtidos indicam aumentos nos sinais analíticos empregando *n*-octanol como solvente extrator. Provavelmente a presença de grupo hidroxila desse solvente favoreceu a interação de hidrogênio com os CF, o que também pode ser constatado com menor intensidade para a extração solvente acetato de butila que tem polaridade inferior somente ao *n*-octanol dentre os solventes estudados. Adicionalmente foram testadas misturas binárias destes solventes e em várias proporções, no entanto, os resultados de áreas de picos foram todos inferiores aos obtidos com *n*-octanol puro. Além disso, esse solvente tem compatibilidade com a técnica de LC-DAD (fase reversa) e potencial para a extração de outros analitos fenólicos como nitrofenóis e clorofenóis, embora esses analitos não tenham sido estudados no presente trabalho. Desta maneira o *n*-octanol foi utilizado para a condução dos demais ensaios de microextração. De acordo com vários autores esse solvente tem mostrado o melhor desempenho para um grande número de diferentes analitos, dentre eles os CF (HERRERA-HERRERA *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011 e HE *et al.*, 2014).

6.12.2 Avaliação do volume de NaOH

O volume de solução de NaOH foi estudado visando reduzir ao máximo os volumes finais dos padrões e amostras submetidas ao procedimento de SME. O objetivo em minimizar esses valores foi uma tentativa de proporcionar concentrações maiores dos CF na solução receptora de NaOH. Os resultados são mostrados na Figura 21.

FIGURA 21: AVALIAÇÃO DO VOLUME DE SOLUÇÃO ACEPTORA DE NaOH APÓS A EXECUÇÃO DE TODAS AS ETAPAS DO MÉTODO *TWO-STEP* SME



FONTE: O autor (2015).

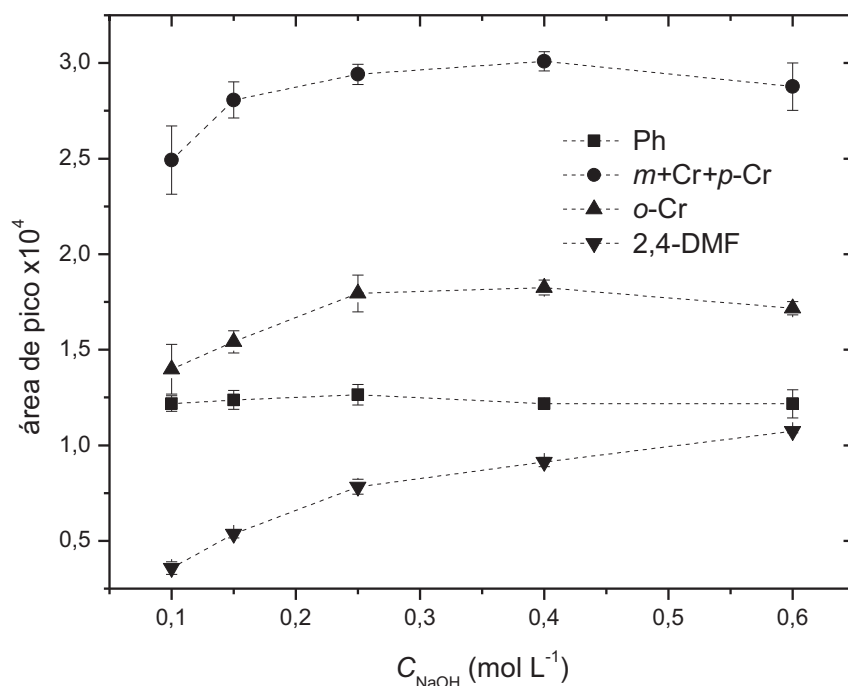
NOTA: CF em concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, tempo de extração 10 minutos; solução de NaOH em concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; volume de *n*-octanol de $500 \mu\text{L}$ e $n = 3$.

Conforme Figura 21 verificou-se que maiores volumes de solução de NaOH proporcionaram aumento dos sinais analíticos do composto 2,4-DMF e para os demais compostos fenólicos esse aumento das áreas de pico cromatográficos ocorreu empregando $250 \mu\text{L}$ e se manteve semelhante para $500 \mu\text{L}$. O esperado para volumes menores de solução receptora seriam maiores sinais analíticos decorrentes do efeito de menor diluição. No entanto, o comportamento observado é oposto no menor volume de NaOH ($125 \mu\text{L}$) bem como maiores estimativas de desvios padrão nesse ponto. Isso ocorreu diante da dificuldade operacional em remover um volume menor de solução aceptora. Já os menores valores de área de pico podem estar relacionados à dificuldade para a ionização das espécies fenólicas, dificultando a extração. Já para os volumes maiores de solução de NaOH essa extração foi mais eficiente, sendo mais significativa para o 2,4-DMF. O uso de solução final com volume de $250 \mu\text{L}$ praticamente dobrou o valor de área de pico deste analito e como esse apresentou menores valores de área frente aos demais CF o valor de $250 \mu\text{L}$ de solução de NaOH foi selecionado para os experimentos subsequentes.

6.12.3 Estudo da concentração de NaOH

Após a extração dos CF pelo solvente é necessária uma segunda etapa na qual é feita a extração dos analitos com solução de aceptora de NaOH. Esta tem a função de ionizar as espécies fenólicas, aumentando sua hidrofiliicidade o que propicia a transferência para fase aquosa. Nesse sentido, a concentração de solução de NaOH foi investigada na faixa de 0,01 a 0,60 mol L⁻¹. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 22.

FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaOH PARA A EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Tempo de extração de 10 min; volumes de *n*-octanol de 500 μ L e volume de solução de NaOH de 250 μ L para $n = 3$.

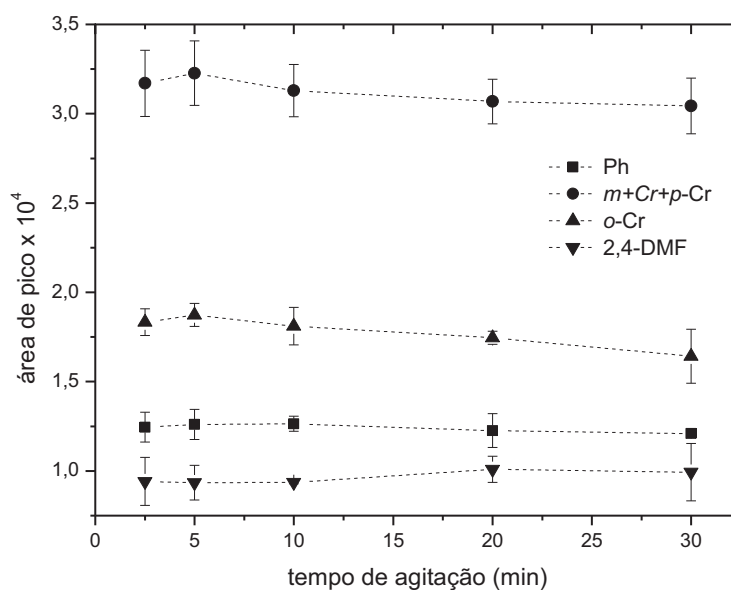
Primeiramente a tentativa de extração dos CF em solução diluída de NaOH (0,01 mol L⁻¹) não foi satisfatória e aumentos nos valores de área de pico (A_p) só foram constatados a partir de concentrações de solução aceptora acima de 0,10 mol L⁻¹. Com base nisso a faixa selecionada para o estudo foi de 0,10 a 0,60 mol L⁻¹ de NaOH. De acordo com a Figura 22 foi constatado que o Ph praticamente não apresentou variação em termos de aumento de A_p na faixa de concentração de NaOH avaliada. Outros trabalhos na literatura empregam concentração de NaOH de 0,10 mol L⁻¹ provavelmente para aumentar a vida útil das colunas cromatográficas ou utilizar menores volumes de ácido para neutralização (ALCUDIA-LEÓN *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011a; VILLAR-NAVARRO *et al.*, 2012) no entanto, os analitos *m*-Cr+*p*-Cr e 2,4-DMF exibiram maiores A_p a partir do ponto em 0,25 mol L⁻¹, sendo que essa

tendência de crescimento foi mais relevante ao 2,4-DMF. Deste modo foi escolhido o valor de $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ de concentração de solução aceptora para os estudos posteriores.

6.12.4 Estudo do tempo de agitação

O tempo de extração é um fator importante nos estudos por SME, pois menores tempos de agitação tendem propiciar maiores frequências analíticas e podem influenciar o desempenho de extração dos compostos. Por outro lado, isso não pode ser o único critério para a escolha do tempo adequado, sendo necessário avaliar as áreas de picos dos analitos submetidos ao procedimento. Os resultados de área de pico em função do tempo de agitação do padrão aquoso em contato com *n*-octanol são mostrados na Figura 23.

FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE AGITAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR *TWO-STEP* SME



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Volume de *n*-octanol de 500 μL ; 250 μL de solução aceptora de NaOH em concentração $0,60 \text{ mol L}^{-1}$ e $n = 3$.

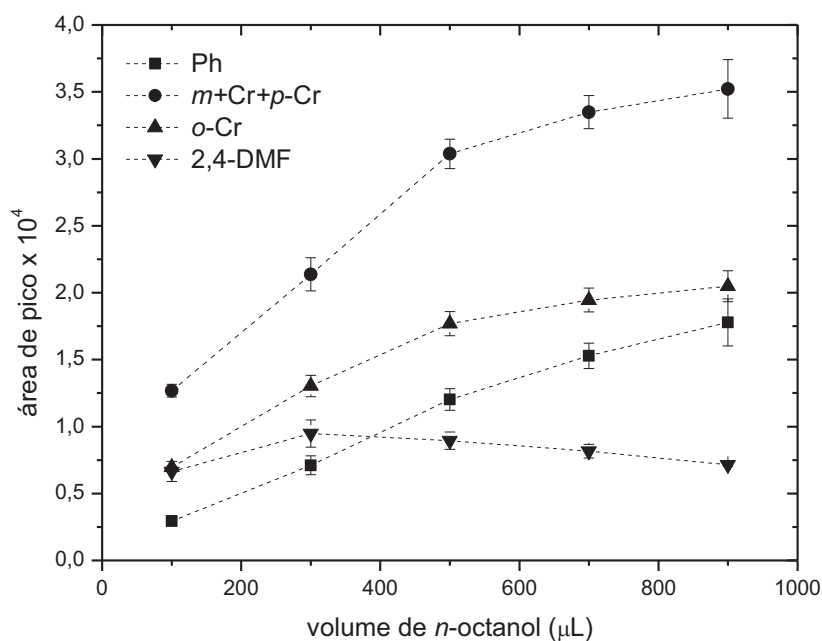
Com base na Figura 23 verificou-se que para o composto 2,4-DMF os valores médios de A_p tendem ser ligeiramente maiores nos tempos superiores a 10 min de agitação. Em relação aos outros compostos a partir de 5 min as áreas médias de pico se mantiveram estatisticamente iguais para os demais analitos. Provavelmente a elevada velocidade de agitação favoreceu uma transferência de massa mais eficiente, para os CF mais polares (Ph,

m-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr). Já para a espécie mais apolar, o 2,4-DMF foi necessária agitação por maior tempo, para atingir o equilíbrio aparente entre as fases. Resultado semelhante foi relatado na literatura para fenóis, nitrofenóis e *p*-clorofenol (ZHANG *et al.*, 2011) sendo descrito que 10 min foi suficiente para o equilíbrio aparente entre esses analitos estudados pelos autores. Com base nisso foi definido o tempo de 5 min para a condução dos demais estudos.

6.12.5 Estudo do volume de *n*-octanol para a extração

Foi avaliada a extração com volumes de *n*-octanol na faixa de 100 a 900 μL . Os resultados são mostrados na Figura 24.

FIGURA 24: AVALIAÇÃO DO VOLUME DE *n*-OCTANOL PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Tempo de extração de 5 min; 250 μL de solução aceptora de NaOH em concentração 0,60 mol L^{-1} ; $n = 3$.

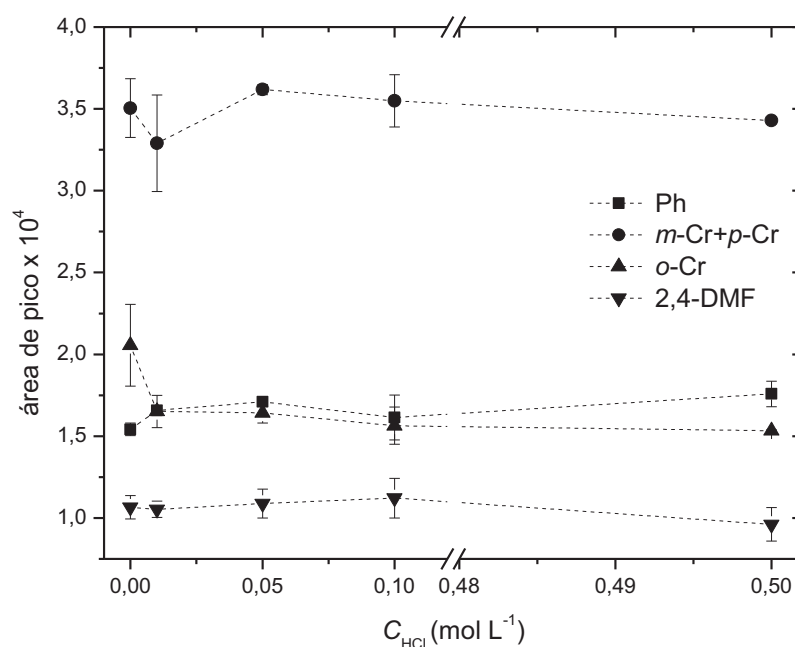
Conforme os resultados mostrados na Figura 24 podem ser observados desempenhos distintos de extração para os analitos. Primeiramente a mistura *m*-Cr+*p*-Cr, *o*-Cr e Ph exibiram tendências semelhantes, sendo constatado aumento das áreas de pico com o maior volume de *n*-octanol utilizado nas extrações. Resultado parecido foi encontrado na literatura para fenóis, nitrofenóis e *p*-clorofenol (ZHANG *et al.*, 2011). Por outro lado, o composto 2,4-DMF

exibiu desempenho inverso e isso pode estar relacionado com a segunda etapa do procedimento de extração. Dentre os analitos estudados o 2,4-DMF possui o maior valor de $\log K_{ow}$ (2,40) o que teoricamente favorece uma maior transferência de massa deste para o *n*-octanol. No entanto, na segunda etapa do método, na extração pela solução de NaOH, a extração não é tão eficiente provavelmente devido à alta afinidade do 2,4-DMF pelo solvente. Considerando que os três analitos apresentaram incrementos relevantes nas áreas de pico, com aumento do volume de *n*-octanol, e devido à facilidade operacional para separação de fases com maior volume de *n*-octanol, optou-se em realizar os estudos com 900 μL de *n*-octanol (MORADI *et al.* 2010 e ZHANG *et al.* 2011).

6.12.6 Estudo da concentração de HCl

Em relação à extração de CF em matrizes aquosas o estudo da influência do pH é fundamental para aumentar a concentração dos analitos na fase orgânica. Para isso foram avaliadas extrações dos fenóis em padrões aquosos preparados em meio acidificado com HCl em concentração na faixa de 0,01 a 0,50 mol L^{-1} . Os resultados obtidos são mostrados na Figura 25.

FIGURA 25: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HCL PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME



FONTE: O Autor (2015).

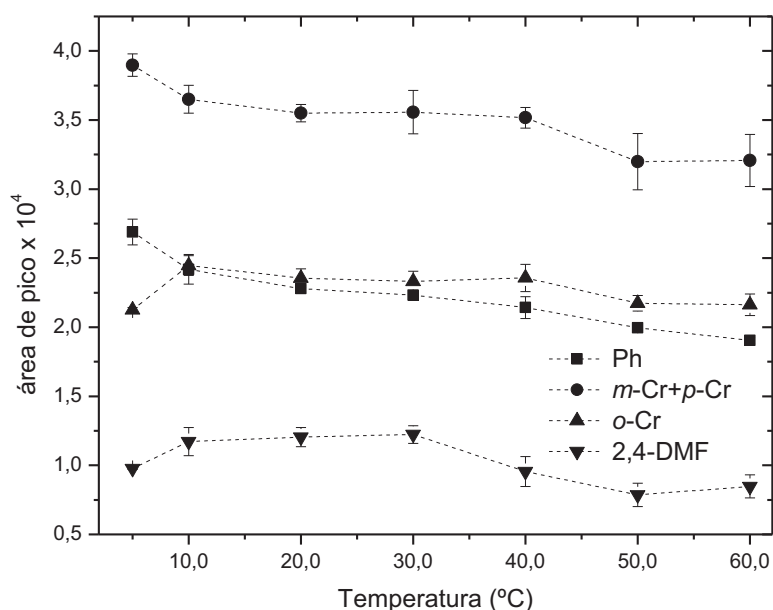
NOTA: Tempo de extração de 5 min; volume de *n*-octanol de 900 μL ; 250 μL de solução aceptora de NaOH em concentração 0,60 mol L^{-1} e $n = 3$.

Conforme ilustrado na Figura 25 praticamente não ocorreram ganhos nos valores de áreas de pico em maiores concentrações de HCl. As áreas de pico médias praticamente se mantêm constantes em relação aos padrões preparados em água ultrapura. Isso pode ser explicado devido aos valores de pK_a dos fenóis todos acima de 9,9. O pH natural da água ultrapura usada nos experimentos foi ao redor de 5,1, neste valor o equilíbrio de protonação das espécies fenólicas está deslocado no sentido de manter os compostos em sua forma neutra. Outros trabalhos relatam a utilização de meio acidificado para extração, na faixa de pH entre 3 a 8, sendo selecionado pH 6,0 (FAN *et al.*, 2009). Adicionalmente em outros procedimentos de microextração na literatura, a utilização de pH 2,0 para CF parece ser consenso (ALCUDIA-LEÓN *et al.*, 2011; VERA-AVILA *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013). Tendo isso em mente, para os estudos seguintes foi adotada a adição de HCl em concentração de 0,01 mol L⁻¹.

6.12.7 Estudo da temperatura

Dentre as variáveis de extração a temperatura é relatada em alguns trabalhos como um dos fatores de maior relevância para proporcionar maiores EF (FARAJI *et al.*, 2009; YANG e CHENG, 2013). Os resultados obtidos para a extração dos CF a partir de padrões aquosos são mostrados na Figura 26.

FIGURA 26: ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DE CF POR TWO-STEP SME



FONTE: O autor (2015).

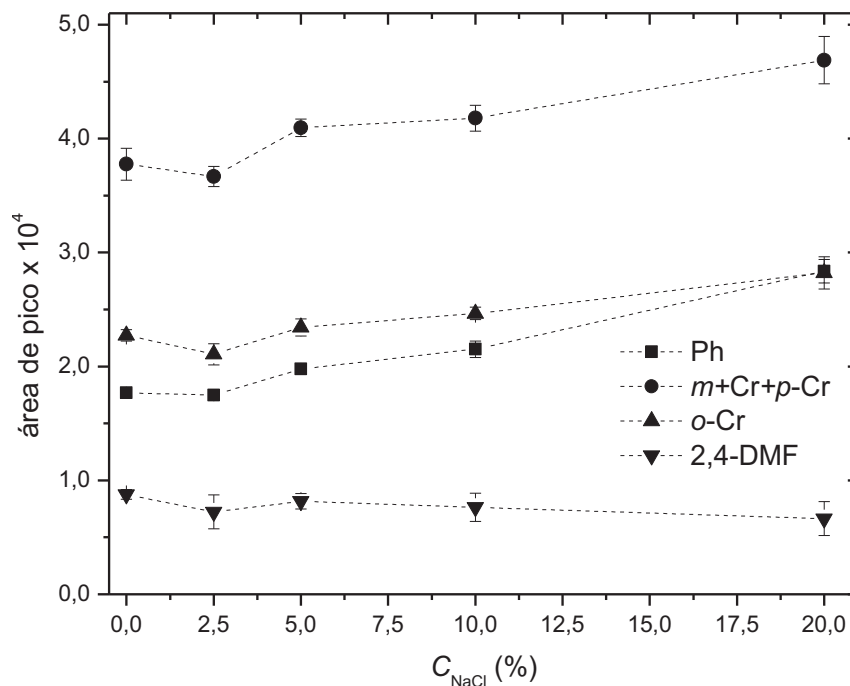
NOTA: Tempo de extração 5 min; padrões preparados em meio de HCl 0,01 mol L⁻¹; 250 µL de solução aceptora de NaOH em concentração 0,60 mol L⁻¹; volume de *n*-octanol 900 µL e *n* = 3.

Conforme a análise dos resultados da Figura 26 foi constatada que na faixa entre 5 a 60 °C o perfil de extração é semelhante para os compostos estudados. Observa-se de modo geral que o aumento da temperatura a partir de 30,0 °C tende a diminuir a extração das espécies fenólicas dos padrões aquosos. Provavelmente em maiores temperaturas a solubilidade em água dos CF tende a crescer dificultando a extração pelo *n*-octanol. Por outro lado, para Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr na faixa entre 10 a 40 °C verificou-se que ocorreu pouca variação na área de pico, sendo constatado comportamento semelhante para o 2,4-DMF, porém em uma faixa menor de temperatura (10-30 °C). Esses resultados se mostraram semelhantes ao trabalho realizado por Yang *et al.* (2013) para extração de nitrofenóis, no qual os autores observaram diminuição nas extrações dos analitos em temperaturas acima de 40 °C. Em vista desses resultados, optou-se por realizar os experimentos em laboratório em temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

6.12.8 Estudo da força iônica

Zhang e colaboradores (2011) relataram o efeito da força iônica por *two-step* SME, porém para CF, alguns trabalhos têm mostrado resultados discrepantes para *n*-octanol (FARAJI *et al.*, 2009 e SARAJI e MARZBAN, 2010). A justificativa para a adição de sais ao meio de extração se encontra no efeito *salting out* tipicamente um dos recursos empregados em SME (FARAJI *et al.*, 2009) e LLE convencional. A adição de sal ao meio aquoso faz como que as moléculas de água tenham uma maior afinidade pelas esferas de hidratação dos íons provenientes da ionização do sal e isso faz com que menos moléculas de água estejam disponíveis para solubilizar os compostos orgânicos. Deste modo foi avaliado o efeito da força iônica por meio da adição de NaCl às soluções padrão na faixa de concentração de 0,10 a 20 % (m/v). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 27.

FIGURA 27: AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl PARA EXTRAÇÃO DOS CF POR TWO-STEP SME



FONTE: O autor (2015).

NOTA: Tempo de extração 5 min; volume de *n*-octanol 900 μL ; padrões preparados em meio de HCl 0,01 mol L^{-1} ; 250 μL de solução aceptora de NaOH em concentração 0,60 mol L^{-1} ; volume de *n*-octanol 900 μL ; temperatura 20 $^{\circ}\text{C}$ e $n = 3$

De acordo com os resultados mostrados na Figura 27, constata-se que a adição de NaCl em concentrações superiores a 5 % promoveu um aumento dos sinais analíticos, exceto para o 2,4-DMF. Maiores concentrações de NaCl não foram avaliadas devido ao limite de solubilidade deste sal em fase aquosa. Além disso, por questão de segurança, poderia haver a cristalização do mesmo na presença da fase móvel, devido à concentração de 40 % de CH_3CN . Desta maneira foi selecionada concentração de sal em 20 % para todos os experimentos. Zhang *et al.* (2011) estudaram o efeito da adição de NaCl na extração de CF a partir padrões aquosos, no entanto, os autores relatam que o efeito da força iônica foi desprezível, provavelmente devido a menor faixa de concentração de NaCl investigada (menor que 1% m/v). Uma vez definidas as melhores condições de extração para os CF, passou-se a etapa de estudo dos parâmetros de mérito ou desempenho das curvas analíticas para validação do método.

6.12 Parâmetros de desempenho e curvas analíticas

Utilizando a curva analítica preparada sem emprego da SME foram calculadas as concentrações dos padrões após procedimento de microextração. Foi realizado o cálculo dos fatores de enriquecimento (EF) efetuando-se a razão da concentração obtida após o procedimento de microextração pela concentração inicial. Esses valores de EF foram calculados com base na quantificação de 5 padrões preparados em concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ sendo os resultados e os valores de RSD, mostrados na Tabela 9.

TABELA 7: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DETERMINADAS EM PADRÕES AQUOSOS APÓS O PROCEDIMENTO POR *TWO-STEP* SME.

Analito	Volume de padrão (mL)	C _{inicial} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C _{final} média ($\mu\text{g L}^{-1}$) após <i>two-step</i> SME	RSD ^a (%)	EF ^b
Ph	25,00	100	1430 \pm 73	5	14
<i>m-Cr+p-Cr</i>	25,00	200	5264 \pm 288	5	26
<i>o-Cr</i>	25,00	100	1348 \pm 79	6	13
2,4-DMF	25,00	100	643 \pm 50	8	6

^a RSD: Desvio padrão relativo; ^b EF: fator de enriquecimento e $n = 3$.

FONTE: O autor (2015).

De acordo com a Tabela 9 foi constatado que o procedimento de microextração proporcionou fatores de concentração na faixa de 6 a 26 vezes para os analitos. Embora o método utilizado propiciasse a concentração dos CF a partir de 25,00 mL de padrão para 0,50 mL de solução final (50 x), nos cálculos dos EF foi considerado que o método de extração não é exaustivo. Dessa forma, os valores de EF foram estimados pela razão entre os valores concentração obtidos após o procedimento de microextração e os iniciais. Foram observados valores máximos de RSD de 8% para 3 réplicas autênticas ($n = 3$), indicativo de repetitividade satisfatória. Na Tabela 10 é mostrado o resumo dos resultados obtidos para as variáveis estudadas do procedimento *two-step* SME.

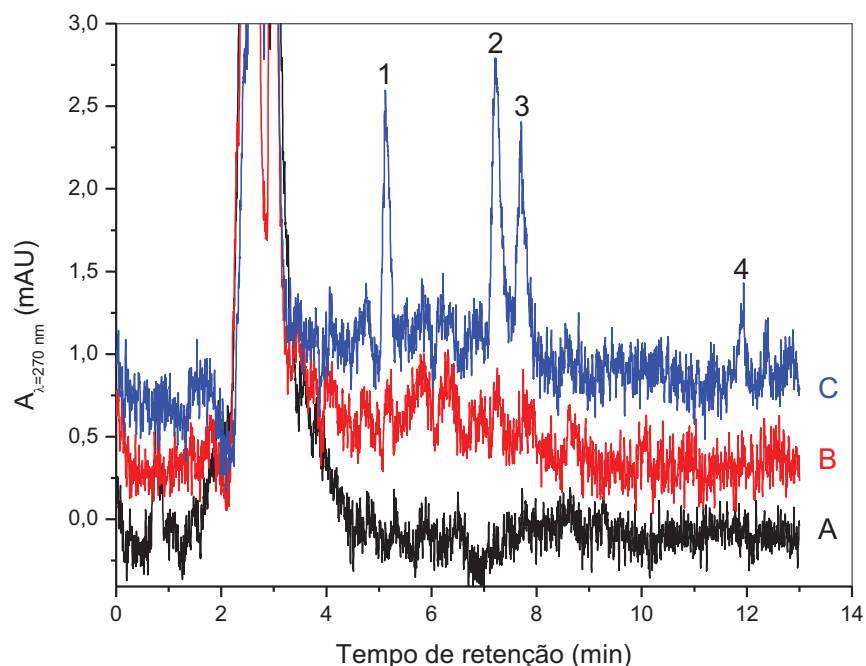
TABELA 8: CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA EXTRAÇÃO DOS CF VIA *TWO-STEP* SME.

Variável	Faixa estudada	Resultados selecionados ($n = 3$)
C _{fenóis} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,00 – 500,0 1,00 – 1000,0	5,00 - 100,0 (Ph; <i>m-Cr+p-Cr</i> e <i>o-Cr</i>) 25,00 – 250,0 (2,4-DMF)
V _{<i>n</i>-octanol} (μL)	150 – 900	900
C _{NaOH} (mol L^{-1})	0,10 - 0,60	0,60
V _{NaOH} (μL)	125 - 500	250
C _{NaCl} (% m/v)	0,01 - 20,0	20,0
C _{HCl} (mol L^{-1})	0,01 - 0,50	0,01
t (min)	2,5 – 30,0	5
Tipo de agitação	Magnética / Orbital	Magnética
Velocidade de agitação (rpm)	100 - 600	600

FONTE: O autor (2015).

Os resultados apresentados na Tabela 10 foram selecionados com base nos maiores valores dos sinais analíticos obtidos nas faixas estudadas. Com base nesses resultados foi aplicado o procedimento por *two-step* SME em padrões aquosos contendo os cinco CF em concentração de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e em soluções aquosas que não receberam adição de fenóis (prova em branco). Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 28.

FIGURA 28: CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM FASE AQUOSA



FONTE: O autor (2015).

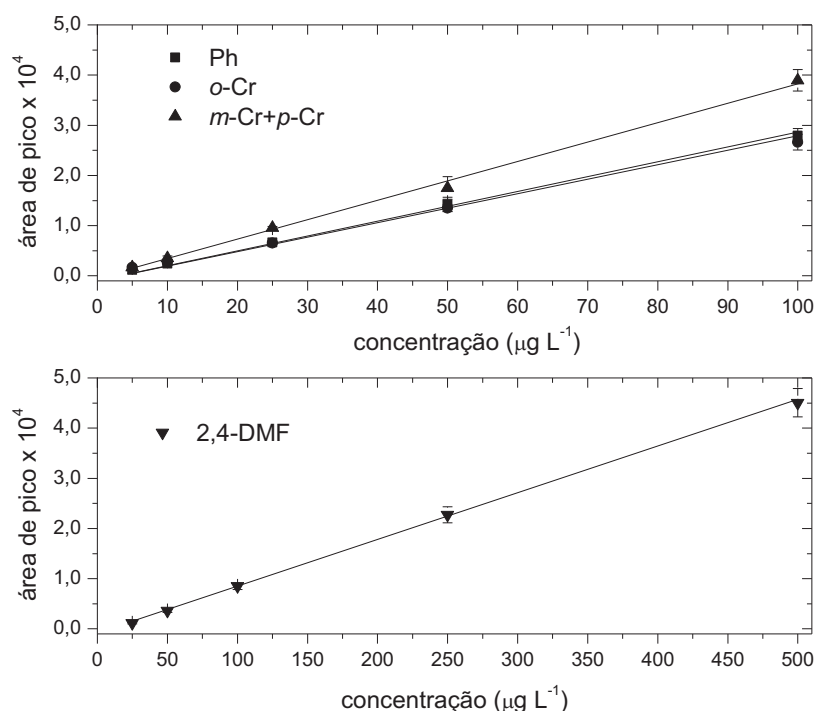
NOTA: (1) Ph, (2) *m*-Cr+*p*-Cr, (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF: (A) prova em branco obtida via *two-step* SME; (B) determinação direta dos CF em concentração de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ sem empregar procedimento de pré-concentração; (C) determinação dos compostos em padrão aquoso fortificado em concentração de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ e obtido por *two-step* SME.

Como constatado na Figura 28, o procedimento de microextração proporcionou um considerável incremento nos valores de área de picos dos CF. Não foram detectados outros picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos CF e também quaisquer deformações na linha base dos cromatogramas. Isso foi considerado adequado e foram construídas curvas analíticas para os CF aplicando-se o procedimento *two-step* SME para padrões aquosos preparados em água ultrapura.

Os valores para a construção das curvas analíticas ou a definição do ponto de menor concentração foram realizados após a injeção de padrões dos CF preparados via *two-step* SME em concentrações decrescentes de $5,00, 4,00, 3,00, 2,00$ e $1,00 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ph, *m*-Cr+*p*-

Cr e *o*-Cr. Foi possível visualizar picos dos compostos Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr a partir de 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, no entanto a integração dos picos com repetitividade satisfatória foi observada para os padrões em concentração de 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (RSD = 12 %, $n = 3$) e esse foi selecionado como primeiro ponto das curvas analíticas. Para o 2,4-DMF foram feitas injeções de padrão de concentração 25,0, 20,0, 15,0, 10,0 e 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ sendo determinada a concentração de 25,0 para $\mu\text{g L}^{-1}$ (RSD = 8 %, $n = 3$). Desta maneira foram definidas duas faixas de concentração para a construção das curvas analíticas. A primeira entre 5,00 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr e a outra de 25,0 a 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-DMF. Essa divisão ocorreu em vista dos menores valores de áreas pico constatados para o 2,4-DMF, provavelmente devido ao alargamento da base do pico ($t_r = 11,9$ min) e também devido a sua menor absorvidade molar. De posse disso as curvas analíticas foram obtidas nas duas faixas de concentração, e são apresentadas na Figura 29.

FIGURA 29: CURVAS ANALÍTICAS DOS CF OBTIDAS VIA *TWO-STEP* SME



FONTE: O Autor (2015).

NOTA: Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr em concentração de 5,00 A 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,4-DMF na faixa de 25,0 a 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 3$.

De acordo com a avaliação das inclinações das curvas analíticas exibidas na Figura 29 é possível constatar maior sensibilidade para a mistura *m*-Cr+*p*-Cr decorrente da soma dos sinais analíticos do composto *m*-Cr e *p*-Cr que co-eluem. Também foi possível verificar

repetitividade satisfatória, observada de acordo com as barras de desvio. De posse das curvas analíticas alguns parâmetros de mérito foram obtidos e mostrados na Tabela 11.

TABELA 9: PARÂMETROS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS VIA *TWO-STEP* SME.

Composto	Intercepto*	Inclinação*	Faixa	LOQ	LOD	r^2
			$\mu\text{g L}^{-1}$			
Ph	-190 \pm 40	276 \pm 7	5,00-100,0	1,4	0,4	0,9982
<i>m-Cr+p-Cr</i>	-243 \pm 192	388 \pm 12	5,00-100,0	4,9	1,5	0,9999
<i>o-Cr</i>	114 \pm 69	265 \pm 14	5,00-100,0	2,6	0,8	0,9996
2,4-DMF	-1184 \pm 177	95 \pm 3	25,00-500,0	18,6	5,6	0,9991

*Valores médios \pm estimativas de desvio padrão ($n = 3$).

FONTE: O Autor (2015).

Conforme Tabela 11 é possível observar baixos valores de estimativa de desvio padrão para os valores de sensibilidade (*slope*), sendo os valores de RSD inferiores a 6,2 % ($n = 3$). Isso indica uma repetitividade adequada das curvas analíticas. Considerando os valores de RSD satisfatórios, foram calculados os valores de limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD) do método, conforme Resolução ANVISA RE 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Todos os valores de LOQ calculados foram considerados coerentes e inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas. Também foram calculados os valores de RSD das alturas de pico ($n = 3$), referentes ao primeiro ponto das curvas analíticas obtidas para cada composto fenólico. No que se refere ao ponto de concentração 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ph e cresóis os valores de RSD foram inferiores a 8 %, e para o composto 2,4-DMF o valor determinado para concentração de 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi de 9 %, sendo ambos os valores de RSD considerados satisfatórios. Em relação à linearidade, avaliada pelo coeficiente de determinação r^2 , foram observados valores superiores a 0,99, o que é indicativo de correlação linear adequada de acordo com a Resolução ANVISA RDC 166 de 24 de Julho de 2017 (BRASIL, 2017).

6.13.1 Avaliação da exatidão e precisão do método

Após a avaliação dos parâmetros de mérito das curvas analíticas foi realizado estudo de recuperação visando avaliar a exatidão e precisão do método de microextração. Para tal, foram testadas determinações em padrões aquosos, em três níveis de concentração, sendo um dos padrões em concentração próxima ao primeiro ponto das curvas analíticas de fenóis e cresóis. Os resultados dos ensaios de recuperação são mostrados na Tabela 12.

TABELA 10: ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM PADRÕES AQUOSOS, EMPREGANDO *TWO-STEP* SME E QUANTIFICAÇÃO POR LC-DAD.

Analito	6,00 µg L ⁻¹		40,0 µg L ⁻¹		80,0 µg L ⁻¹	
	C _{Determinada} ^a	R ^b (%)	C _{Determinada} ^a	R ^b (%)	C _{Determinada} ^a	R ^b (%)
Ph	6,3 ± 0,5	105	41 ± 2	103	83 ± 2	104
<i>m-Cr+p-Cr</i>	6,3 ± 0,3	105	38 ± 2	95	77 ± 1	96
<i>o-Cr</i>	6,0 ± 0,2	100	42 ± 1	105	85 ± 1	106
2,4-DMF*	*	*	45 ± 4	113	81 ± 5	101

^a C_{Determinada} (µg L⁻¹) ± estimativa de desvio padrão ($n = 3$); ^b R = Recuperação média %; * Inferior ao LOQ.

FONTE: O Autor (2015).

Conforme resultados apresentados na Tabela 12 foram obtidos baixos valores de estimativas de desvio padrão, propiciando valores de RSD inferiores a 9 % sendo indicativos de adequada repetitividade. Foram obtidas recuperações bastante satisfatórias, com valores próximos a 100 %, demonstrando atrativas características sob do ponto de vista da exatidão, na determinação dos compostos fenólicos em padrões aquosos, sugerindo que o método poderia ser empregado com amostras reais. Sendo os resultados considerados aceitáveis para as determinações em padrões aquosos, foi realizado ensaio em extratos de solo, visando avaliar o efeito de matriz nas recuperações e na precisão do método de microextração. Os resultados dos ensaios de recuperação em extratos de solo são mostrados na Tabela 13.

TABELA 11: ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DOS CF EM EXTRATOS DE SOLO EMPREGANDO *TWO-STEP* SME.

Analito	6,00 µg L ⁻¹		30,0 µg L ⁻¹		80,0 µg L ⁻¹	
	C _{Determinada}	R (%)	C _{Determinada}	R (%)	C _{Determinada}	R (%)
Ph	6,3 ± 0,3	105	28 ± 2	93	69,8 ± 0,6	87
<i>m-Cr+p-Cr</i>	7,1 ± 0,1	118	30,8 ± 0,6	103	80,6 ± 0,2	101
<i>o-Cr</i>	5,3 ± 0,2	88	29 ± 1	97	79 ± 1	99
2,4-DMF	*	-	32 ± 3	107	84 ± 6	105

C_{Determinada} (µg L⁻¹) ± estimativa de desvio padrão ($n = 3$); R = Recuperação média %; * inferior ao LOQ.

FONTE: O Autor (2015).

Não foi possível detectar os fenóis nos extratos de solo que não receberam fortificação dos compostos, indicando que a amostra não continha os fenóis estudados, considerando-se os valores de LOQ de 5,00 µg L⁻¹ para cada espécie fenólica. No que diz respeito à exatidão do método, os valores de recuperações se situaram na faixa de 87 a 118 %, o que pode ser considerado adequado para este tipo de matriz, sugerindo não haver interferência de matriz, pelo menos para a amostra que foi utilizada. O maior valor de repetitividade em termos de RSD foi 9,5 % ($n = 3$) sendo esse considerado adequado para este tipo de matriz.

No sentido de investigar se ocorreriam interações entre as variáveis de extração do método SME desenvolvido, foram aplicados estudos envolvendo planejamentos fatoriais de experimentos.

6.13 **Planejamento fatorial para o método two-step SME**

O planejamento fatorial foi utilizado visando verificar o efeito das variáveis no procedimento de extração, interações entre elas e avaliar a possibilidade de serem realizadas algumas modificações nos fatores do procedimento SME, no sentido de melhorar as condições analíticas de extração, principalmente amostras aquosas e extratos de solo. Entende-se por isso aumento da quantidade extraída dos CF para repercutir em maiores áreas de pico gerando menores valores de LOQ. Além disso, como se trata do desenvolvimento de um método de extração que antecede a etapa de quantificação cromatográfica espera-se que as possíveis alterações após o planejamento fatorial propiciem maiores frequências analíticas.

O planejamento fatorial fracionário fornece um meio de obter boas estimativas dos efeitos principais e talvez das interações de segunda ordem, com um menor número de experimentos. Se considerarmos que os efeitos de altas ordens, principalmente para planejamentos com $k > 4$, são quase sempre não significativos, a realização de ensaios para estimar tais efeitos de interação pode ser irrelevante. Desta maneira, com um número menor de experimentos, é possível obter informações daqueles efeitos mais importantes e retirar, na maioria das vezes, as mesmas conclusões caso fosse realizado um planejamento fatorial completo. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionários (TEÓFILO *et al.*, 2006).

Para avaliar melhores condições experimentais de extração pelo método *two-step* SME foi feito um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} , sendo selecionadas as variáveis de extração volume de *n*-octanol ($V_{n\text{-octanol}}$, 700 e 1100 μL), tempo de extração (t , 5 e 15 min), Concentração de NaCl (C_{NaCl} , 15 e 25 %), concentração (C_{NaOH} , 0,30 e 0,70 mol L^{-1}) e volume da solução receptora de NaOH (V_{NaOH} , 100 e 300 μL). No planejamento fatorial os níveis superior e inferior foram selecionados com base nos experimentos univariados, considerando valores acima e abaixo dos obtidos, para cada experimento, nas melhores condições de extração. As áreas de picos dos CF (respostas do planejamento fatorial 2^{5-1}), experimentos realizados em duplicata, são apresentadas na Tabela 14.

TABELA 12: RESPOSTAS OBTIDAS COMO ÁREAS DE PICOS (A_P) DOS CF PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-1} .

Ensaio	Ph		<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr		<i>o</i> -Cr		2,4-DMF	
	R ₁ ^a	R ₂ ^b	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	17344	16291	33007	27599	18214	19198	4885	2635
2	24040	19223	32207	31276	16102	21023	1919	3193
3	19305	15558	32912	30633	18529	23452	6901	5965
4	21675	19759	35747	29989	20140	22347	4433	4137
5	22086	22883	32006	35304	17497	19780	4006	4214
6	25910	24189	31218	35413	16353	18757	2264	2422
7	24889	27483	42336	41651	24621	24898	9194	4963
8	29670	25774	34873	42182	19517	25374	4911	5215
9	19614	18520	42280	34443	23602	26373	8174	7803
10	24670	22532	46525	42896	25185	24304	6154	7254
11	19820	19595	45190	34251	25284	26379	11140	7363
12	23933	22281	45436	34947	25406	28552	8641	8133
13	26362	24308	40467	46511	22458	27589	8051	6731
14	32542	29082	44751	49765	23788	28803	6802	6268
15	27660	25388	41843	49765	24334	29251	11404	7663
16	30820	32413	46706	48471	26820	29482	10183	9148

^aR₁ = resposta da primeira repetição e ^bR₂ = resposta da segunda repetição. FONTE: O Autor (2015).

Com base nas áreas médias de picos da Tabela 14 e nos coeficientes de contrastes das variáveis do planejamento da Tabela 3, foram calculados os efeitos principais e de interação para cada fator, sendo os resultados mostrados na Tabela 15.

TABELA 13: EFEITOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁵⁻¹ DO MÉTODO TWO-STEP SME.

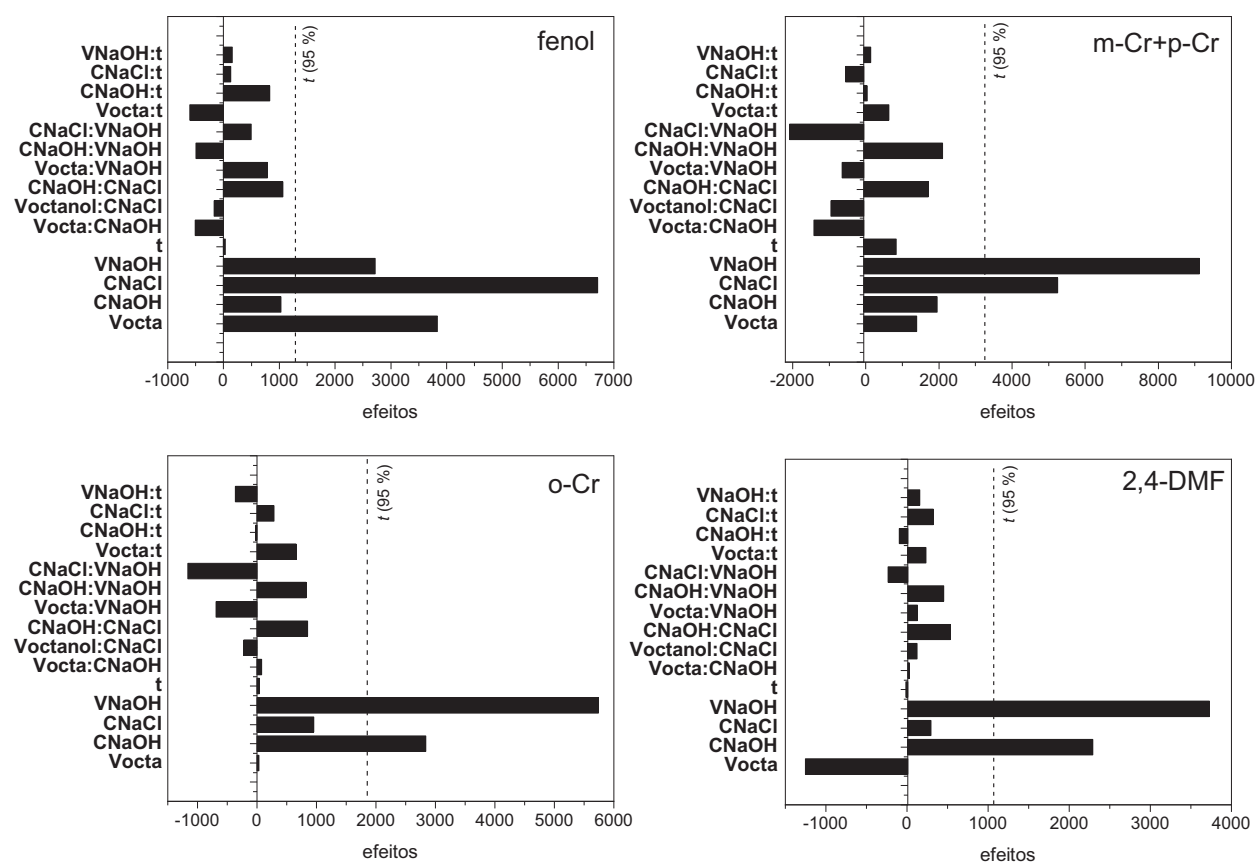
Efeitos e interações	Ph	<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr	<i>o</i> -Cr	2,4-DMF
V _{<i>n</i>-octa}	3838	1388	31	-1251
C _{NaOH}	1027	1954	2835	2289
C _{NaCl}	6706	5245	952	294
V _{NaOH}	2716	9118	5738	3728
t	31	834	40	-16
V _{<i>n</i>-octa} X C _{NaOH}	-509	-1416	80	27
V _{<i>n</i>-octa} X C _{NaCl}	-170	-951	-222	124
V _{<i>n</i>-octa} X V _{NaOH}	788	1705	853	533
V _{<i>n</i>-octa} X t	-603	-643	-687	130
C _{NaOH} X C _{NaCl}	1065	2095	824	452
C _{NaOH} X V _{NaOH}	-492	-2082	-1159	-234
C _{NaOH} X t	829	634	654	232
C _{NaCl} X V _{NaOH}	495	43	-22	-96
C _{NaCl} X t	130	-549	289	325
V _{NaOH} X t	156	139	-366	158

FONTE: O Autor (2015).

Como pode ser constatado na Tabela 15, os efeitos de primeira ordem foram mais relevantes, na ordem da concentração de NaCl > volume de *n*-octanol > volume de NaOH > concentração de NaOH. Em relação à influência da adição de NaCl, esta foi relatada por Zhang *et al.* (2011), que considerou que essa variável exerce pouca influência na extração de CF, considerando estudos abaixo da concentração de NaCl de 5,0 % (m/v). No entanto, conforme Tabela 15 observa-se que em concentrações maiores a força iônica propicia aumento da resposta de extração das espécies fenólicas devido ao efeito *salting out*.

Neste estudo os efeitos por interação dos fatores foram menores do que os efeitos principais na extração dos compostos fenólicos. Interações de segunda e terceira ordem não foram significativas, isso foi determinado com base nos valores calculados de erros padrão dos efeitos e comparados em termos de suas significâncias estatísticas obtidas de acordo com o teste *t de student*. Os Gráficos de Pareto, na Figura 30, mostram o efeito das variáveis experimentais.

FIGURA 30: GRÁFICOS DE PARETO PARA EFEITOS CALCULADOS VERSUS VARIÁVEIS E INTERAÇÕES DE SEGUNDA ORDEM PARA CADA COMPOSTO FENÓLICO Ph, *m*-Cr+*p*-Cr, *o*-Cr e 4-DMF.

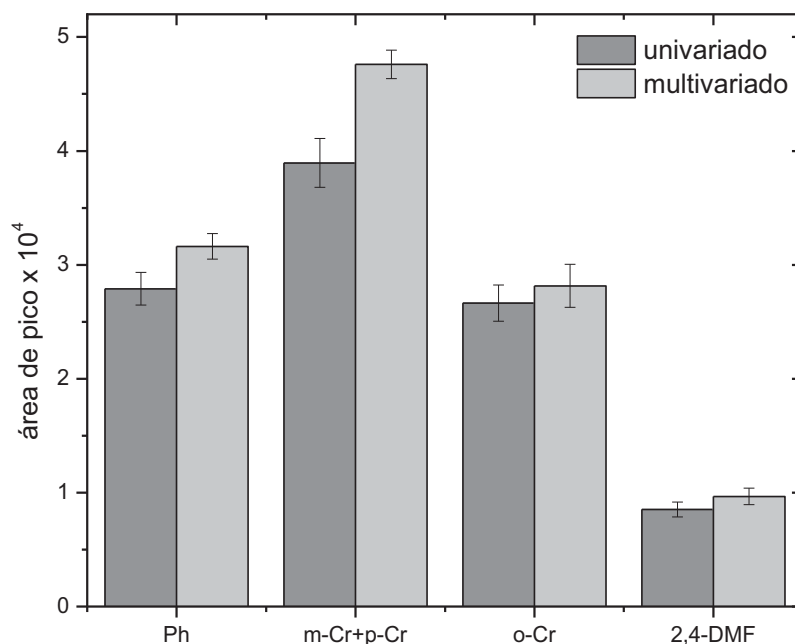


FONTE: O Autor (2015).

Com base nos resultados das análises de variância, considerando um nível de confiança de 95% (t_{15}), valor de t de 2,131 e valores de erro padrão foram 1332 (Ph), 3215 (*m*-Cr+*p*-Cr), 1892 (*o*-Cr) e 1021 (2,4-DMF) pode-se concluir que o efeito principal volume de NaOH foi significativo para todos os CF estudados, com menor influência na extração do fenol, enquanto o efeito principal concentração de NaCl foi significativo somente para extração de Ph e *m*-Cr+*p*-Cr. Isto pode ser atribuído ao efeito da força iônica ser mais pronunciado para os analitos com maiores solubilidades em água. Outro ponto de destaque é a melhor condição para o volume de *n*-octanol como sendo 1100 μL na extração do Ph e menores volumes na extração dos outros compostos fenólicos, principalmente o 2,4-DMF que apresenta menor detectabilidade dentre eles. A concentração de NaOH na fase aceptora foi menos significativa, até 0,70 mol L⁻¹, para os compostos alvo frente a variável volume da mesma solução usada no planejamento fatorial, devido à maior área de contato de solução aceptora com a fase orgânica. Por outro lado, anteriormente nesse trabalho foram avaliados de forma univariada os volumes de solução de NaOH, sendo constatada a melhor condição utilizando 250 μL

tendendo a redução das áreas picos em volumes maiores (500 μL). Em vista dos resultados obtidos no planejamento fatorial indicarem o uso 400 μL de solução aceptora foi realizada comparação entre os valores de áreas de pico nas melhores condições obtidas de forma uni e multivariada. Esses resultados são mostrados na Figura 31.

FIGURA 31: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS MÉDIAS DE ÁREAS PICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: O Autor (2015).

NOTA: Em concentração de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ nas melhores condições de extração obtidas de forma univariada ($V_{n\text{-octanol}}$, 900 μL ; C_{NaOH} , 0,60 mol L^{-1} ; V_{NaOH} , 300 μL ; t, 5 min, C_{NaCl} 20 %, $n = 3$) e multivariada ($V_{n\text{-octanol}}$, 1100 μL ; C_{NaOH} , 0,70 mol L^{-1} ; V_{NaOH} , 400 μL ; t, 15 min, C_{NaCl} 25 %, $n = 2$).

De acordo com a Figura 31 observa-se para dois analitos, fenol e a mistura *m-Cr+p-Cr*, que as áreas de picos médias, obtidas após avaliação do método SME em duas condições diferentes, são similares em termos de estimativas de desvio padrão. Isso sugere que a diminuição dos valores de LOQ nesse caso não seriam tão atrativas, pois o custo para isso seria a utilização de maiores concentrações de solução de NaCl e NaOH, maiores volumes de *n*-octanol e NaOH e o triplo do tempo, diminuindo a frequência analítica do método. Desta maneira, foram mantidas as condições de extração do método obtido pela determinação das condições de extração de forma univariada. Os resultados comparativos entre os fatores avaliados de forma univariada e multivariada são mostrados na Tabela 16.

TABELA 14: CONDIÇÕES DE COMPROMISSO PARA A EXTRAÇÃO DOS CF VIA *TWO-STEP* SME.

Variável	Univariado ^a	Multivariado ^b
Volume de <i>n</i> -octanol (μL)	900	900 (<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr, <i>o</i> -Cr e 2,4-DMF) 900 (Ph)
Concentração de NaOH (mol L ⁻¹)	0,60	0,70
Volume de NaOH (μL)	250	400
% de NaCl (m/v)	20	15
Tempo de agitação (min)	5	5
Concentração de HCl (mol L ⁻¹) ^c	0,01	0,01
Tipo de agitação ^c	Magnética	Magnética
Velocidade de agitação (rpm) ^c	600	600
Temperatura (°C) ^c	20 ± 2	20 ± 2
Solvente extrator ^c	<i>n</i> -octanol	<i>n</i> -octanol

^a*n* = 3; ^b *n* = 2 e ^c avaliadas de forma univariada.

FONTE: O Autor (2015).

Embora a maioria dos parâmetros estudados pelo procedimento multivariado convergiram para os mesmos valores que o estudo univariado, foi possível constatar a possibilidade de empregar 15 % de NaCl, o que é um significativo ganho em menor consumo desse sal. De posse disso foram realizados novos experimentos visando a obtenção das curvas analíticas para os CF empregando menor concentração de NaCl (15 %) e volume de padrão de 50,0 mL.

6.14 Parâmetros de mérito e curvas analíticas

Primeiramente foram construídas curvas analíticas a partir de padrões aquosos dos CF, sem esses terem sido submetidos ao procedimento de microextração por solvente. Estas foram usadas para estimar os valores de EF do método de microextração, realizado nas condições selecionadas a partir dos planejamentos fatoriais relatados anteriormente. Os valores de EF foram calculados pela comparação da concentração dos padrões com a concentração determinada após o procedimento por *two-step* SME, sendo os resultados mostrados na Tabela 17.

TABELA 15: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES INICIAIS E DETERMINADAS EM PADRÕES AQUOSOS APÓS O PROCEDIMENTO DE MICROEXTRAÇÃO.

Analito	Volume de padrão (mL)	C_{inicial} (µg L⁻¹)	C_{final} (µg L⁻¹) após two-step SME	RSD^a (%)	EF^b
Ph	50,00	50,0	1736 ± 98	5	35
<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr	50,00	50,0	2045 ± 173	8	41
<i>o</i> -Cr	50,00	50,0	1041 ± 103	10	22
2,4-DMF	50,00	50,0	1254 ± 95	7	25

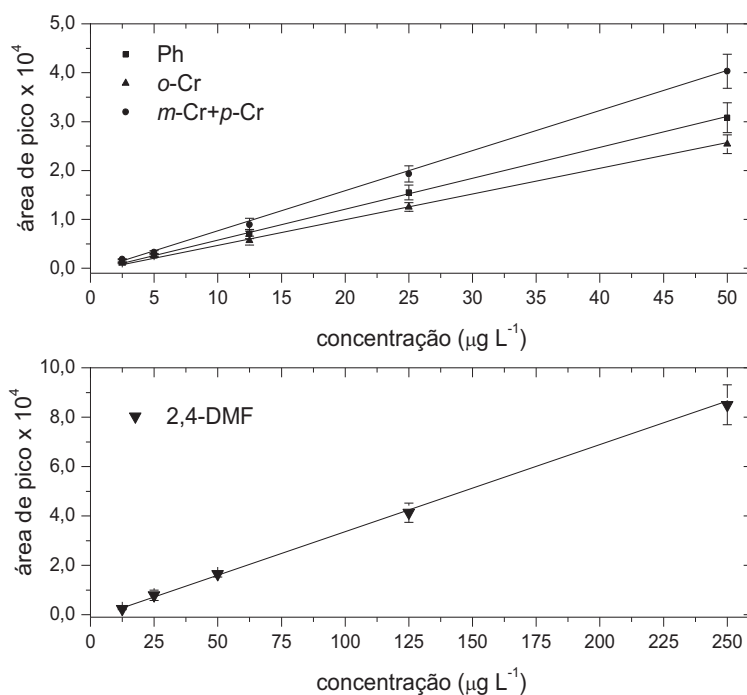
^a RSD: Estimativa de desvio padrão; ^b EF: Fator de enriquecimento; *n* = 3.

FONTE: O Autor (2015).

De acordo com a Tabela 17 constata-se que o procedimento de microextração proporcionou fatores de enriquecimento aproximados na faixa de 25 a 41 vezes. Embora tenha sido utilizada no procedimento proposto a pré-concentração de um volume de 50,00 mL de padrão aquoso para 0,50 mL de solução, o que implicaria em um EF de 100 vezes, nos cálculos desse fator foi considerado que o método de microextração não é exaustivo. Desta forma julgou-se mais adequado comparar os valores de concentração final obtidos, após o procedimento de microextração, com os valores iniciais de concentração (C_{inicial}), sendo o cálculo dos EF realizados pela divisão da C_{final} pela C_{inicial}. Foram observadas também estimativas de desvio padrão menores que 10 %, indicativo de repetitividade adequada.

Considerando que ocorreu aumento dos valores de EF com a mudança de volume de padrão e as novas condições experimentais (planejamentos fatoriais), foram construídas curvas analíticas nas seguintes condições: Volume de padrão de 50,00 mL, volume de *n*-octanol de 900 µL, concentração de NaCl de 15 % (m/v) agitação magnética por 5 minutos, volume e concentração de NaOH de 250 µL e 0,60 mol L⁻¹, respectivamente. As curvas analíticas obtidas sob essas condições são apresentadas na Figura 32.

FIGURA 32: CURVAS ANALÍTICAS, REFERENTES AOS CF, REALIZADAS POR TWO-STEP SME.



FONTE: O Autor (2015).

NOTA: Ph, *m-Cr+p-Cr* e *o-Cr* em concentrações de 2,50 a 50,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2,4-DMF em concentração de 12,50 a 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

De acordo com a avaliação das inclinações das curvas analíticas da Figura 32 é possível constatar maiores sensibilidades para Ph e a mistura *m-Cr+p-Cresol*. Por outro lado, a menor detectabilidade para o 2,4-DMF é devido ao alargamento da base do pico deste composto, que tem o maior tempo de retenção na coluna. De posse das curvas analíticas, foi adotada a faixa de 2,50 a 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Ph, *m-Cr+p-Cresol* e *o-Cr* e 12,5 a 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-DMF, e foram calculados alguns parâmetros de desempenho mostrados na Tabela 18.

TABELA 16: PARÂMETROS MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS VIA TWO-STEP SME

CF	Intercepto	Inclinação	Faixa	LOQ	LOD	r^2
				$\mu\text{g L}^{-1}$		
Ph	- 857 \pm 88	637 \pm 21	2,50 – 50,0	1,4	0,4	0,9980
<i>m-Cr+p-Cr</i>	- 688 \pm 101	816 \pm 38	2,50 – 50,0	1,2	0,4	0,9981
<i>o-Cr</i>	- 333 \pm 64	512 \pm 14	2,50 – 50,0	1,2	0,4	0,9950
2,4-DMF	- 1254 \pm 365	345 \pm 12	12,5 – 250,0	10,6	3,2	0,9971

$n = 3$

FONTE: O autor (2015).

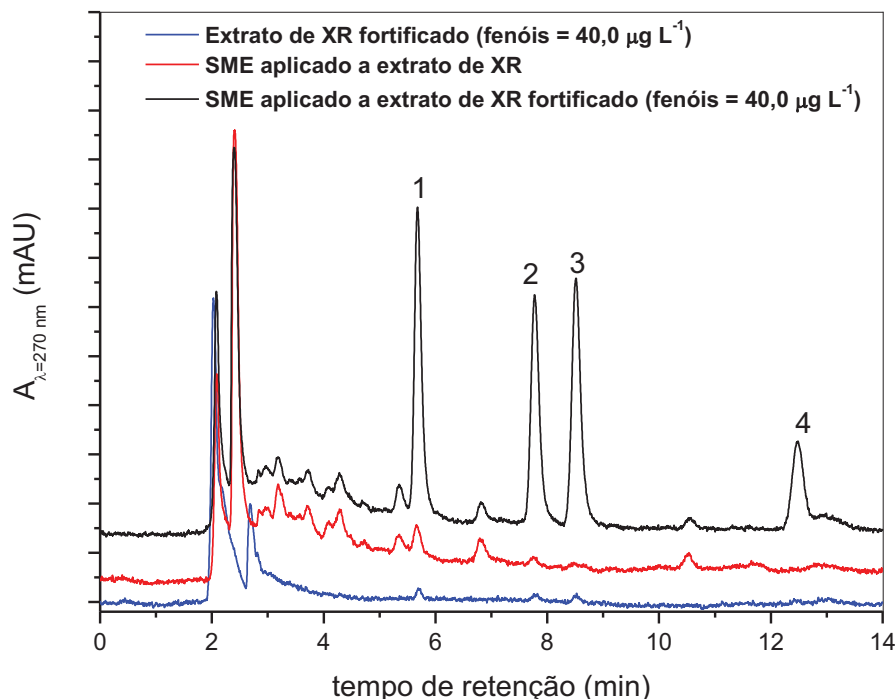
Conforme Tabela 18 é possível observar baixos valores de estimativa de desvio padrão para os valores de sensibilidade (inclinação), sendo todos os valores de RSD inferiores a 4,6 %, indicando uma adequada repetitividade. Cabe ressaltar que cada uma das três repetições das curvas foi preparada em dias diferentes. Considerando os valores de RSD satisfatórios, foram calculados os valores de LOQ e LOD do método, conforme Brasil (2017), equações 6 e 7.

Os valores de LOQ calculados foram compatíveis ao primeiro ponto das curvas analíticas. Também foram calculados os valores de RSD das áreas de pico ($n = 3$), referentes ao primeiro ponto das curvas analíticas obtidas para cada composto fenólico. No que se refere ao ponto de concentração $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ph e cresóis os valores de RSD foram inferiores a 8 % e para o composto 2,4-DMF o valor determinado para concentração de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ foi de 9 %, sendo ambos os valores RSD considerados satisfatórios. Em relação à linearidade, avaliada pelo coeficiente de determinação r^2 , foram observados valores superiores a 0,99 sendo considerado indicativo de correlação linear adequada (BRASIL, 2017).

Cabe informar que inicialmente o estudo foi efetuado incluindo um ponto em concentração de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$, entretanto, foi constatada uma grande dificuldade de integração da área dos picos, inviabilizando a confiabilidade do método, sendo esse ponto descartado das curvas analíticas. Adicionalmente os demais pontos inferiores a $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2,4-DMF apresentaram o mesmo problema, implicando em valores de RSD superiores a 30 %, impedindo o uso desses pontos nas curvas.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 16 foi testado o procedimento de microextração em extratos de XR fortificados com os quatro compostos em concentração de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e em extrato aquoso de XR não fortificado. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 33.

FIGURA 33: CROMATOGRAMAS DOS CF (1) Ph, (2) *m*-Cr+*p*-Cr, (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF, OBTIDOS POR TWO-STEP SME:



FONTE: O Autor (2015).

NOTA: determinação direta em extrato de XR fortificado com CF em concentração de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$; determinação dos CF em extrato de XR sem fortificação e determinação dos analitos em extrato de XR fortificado com os CF em concentração de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Conforme pode ser constatado na Figura 33, o procedimento utilizado proporcionou um considerável incremento nos valores de áreas de picos dos CF na concentração avaliada. É possível observar no cromatograma da amostra de extrato de XR (A) fortificado com fenóis em concentração de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ que os picos referentes a essa concentração apresentam valores de área pequenos. Por outro lado, o procedimento de microextração aplicado ao mesmo extrato e ao extrato que não recebeu fortificação mostrou-se adequado para aumentar os valores de sinais dos analitos destes CF, contudo um pico possivelmente interferente surgiu ao lado do composto Ph. Isso pode ser observado onde aparece um pico próximo ($t_r = 5,7$ min) ao composto Ph ($t_r = 5,9$ min), nesse caso a integração poderia ser comprometida devido à proximidade do interferente. Por outro lado, na concentração testada, as integrações dos picos foram satisfatórias propiciando a condução de estudos de recuperação em soluções padrão, amostras aquosas naturais, extratos de XR e de solo condicionado com XR.

6.15.1 Ensaios de recuperação em amostras aquosas

A escolha das amostras foi aleatória tendo como objetivo a validação e aplicação do método proposto, bem como realizar as determinações em águas de diversas procedências e ambientes distintos. Não foi encontrado nenhum relato na literatura de que nessas regiões ocorreu ou ocorre contaminação pelos analitos.

Tendo como objetivo a validação do método de microextração foram conduzidos ensaios de recuperação em amostras de águas naturais, extratos aquosos de solo condicionado com XR e extrato aquoso de XR. Para tal, foram conduzidas determinações em três níveis de concentração, sendo um dos padrões em concentração próximo ao primeiro ponto das curvas analíticas de fenóis e cresóis. Além disso, buscou-se avaliar o efeito de diferentes matrizes nas recuperações e na precisão do método proposto. Os resultados dos ensaios de recuperação em extratos de solo são mostrados na Tabela 19.

TABELA 17: PERCENTUAIS DE RECUPERAÇÃO (R) DOS COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS, EXTRATOS DE XR E DE SOLO CONDICIONADO COM XR, DETERMINADOS POR TWO-STEP SME.

Análito	Concentração de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Água de Torneira		Água de Mar		Água de Poço		Água de Rio		Extrato de XR		Extrato aquoso de solo ^b	
		R	RSD ^a	R	RSD ^a	R	RSD ^a	R	RSD ^a	R	RSD ^a	R	RSD ^a
Ph	3	104,3	1,5	107,1	9,0	89,9	3,4	114,1	6,1	136,5	5,6	86,1	7,1
	15	108,2	1,7	72,5	2,4	108,9	1,9	95,8	2,3	108,0	2,4	95,0	2,2
	40	103,5	2,6	86,8	5,1	103,9	2,8	86,2	2,6	97,2	2,9	93,3	2,2
<i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr	3	109,6	6,2	118,5	4,6	82,9	7,5	93,5	5,8	132,4	1,7	90,3	3,8
	15	104,8	2,3	102,8	4,7	87,6	3,9	79,6	6,5	117,0	1,7	106,8	2,4
	40	98,3	2,5	103,8	5,1	84,1	4,0	80,4	4,7	99,9	0,8	99,0	0,3
<i>o</i> -Cr	3	94,4	5,2	123,8	5,4	100,0	5,0	100,7	10,5	121,8	2,2	104,6	4,6
	15	99,6	3,3	91,0	5,0	110,0	5,8	95,8	10,7	112,5	1,3	108,9	3,3
	40	91,1	2,9	93,4	4,8	96,0	3,6	92,4	5,1	86,7	2,0	88,1	0,4
2,4-DMF	15	118,1	5,5	96,8	4,7	100,5	4,2	73,5	7,6	111,2	5,1	92,0	8,0
	40	107,6	5,2	92,2	2,8	93,8	6,3	82,9	3,0	116,5	3,1	86,9	11,5

^a RSD: desvio padrão relativo ($n = 3$); ^b Extrato de solo condicionado com XR contendo a maior dose de XR acumulado (15000 kg ha⁻¹).

FONTE: O Autor (2015).

As recuperações listadas na Tabela 19 situaram-se entre 72 a 124 % para as amostras de águas naturais e 86 e 136 % para os extratos de solo e XR, sendo tais resultados considerados satisfatórios em termos de exatidão. Na amostra de água da torneira foi necessário a adição de solução de 50,0 mg L⁻¹ de Na₂S₂O₃ (BRASIL, 2011; RIBEIRO, 2012; SURSYAKOVA *et al.*, 2015) visando à redução do hipoclorito a cloreto. Este procedimento foi utilizado, pois a amostra de água de torneira apresenta cloro residual decorrente do processo de tratamento da mesma conforme recomenda a normativa do MS 2914/2011 (BRASIL, 2011). Este cloro residual, na forma de hipoclorito, dependendo das condições de pH, temperatura e da presença de outros compostos no meio, pode reagir com a matéria orgânica ou neste caso os analitos fenólicos formando outras espécies como clorofenóis (SANEPAR, 2017).

Em termos de precisão os resultados foram considerados adequados, sendo que o maior valor de RSD observado foi de 11,5 % para o 2,4-DMF em extratos de solo e na concentração de 40,0 µg L⁻¹. Nos ensaios para as amostras de águas naturais, sem fortificação, não foram detectados picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos analitos, sugerindo a ausência desses compostos, considerando os níveis de detectabilidade obtidos. Nos extratos aquosos de amostras de solo condicionados com as maiores doses de XR, ou seja, 15000 toneladas de XR por hectare de solo (Tratamento 4 da Tabela 5), também não foram detectados os CF estudados neste trabalho. Adicionalmente, estudos realizados para quantificação dos analitos em extratos de solo e que não receberam nenhuma dose de XR, na amostra testemunha de adubação (T1) e testemunha absoluta (T5) ambas descritas na Tabela 5 (material e métodos) também não exibiram picos cromatográficos em tempos de retenção próximos aos determinados para os CF deste trabalho. Isso sugere que os CF existentes no XR tenham sido degradados, e devido a isso não foram detectados nos extratos, ou que tenham formado resíduos de difícil extração da matriz de solo pelo contato com água.

Em relação aos extratos de XR foram determinadas recuperações para Ph de 136,5 % e de 132,4 % para *m*-Cr+*p*-Cr. Aparentemente, a quantificação desses analitos, no menor nível (3,0 µg L⁻¹) foi influenciada pela presença de interferentes na matriz. Por outro lado, nos outros dois níveis de concentração avaliados a interferência pareceu menor. Baseado nos espectros de absorção do pico em 5,9 min e tempo de retenção comparado ao pico de padrão de Ph, bem com as fortificações realizadas, é possível inferir que o composto observado tem chance de ser também Ph, no entanto essa confirmação carece de estudo por outras técnicas de quantificação, por exemplo, LC-MS/MS.

Nas amostras de extratos de XR, sem fortificação, foram determinadas concentrações médias de Ph de 5,1 ± 0,5 µg L⁻¹. Para *m*-Cr+*p*-Cresol e *o*-Cr só foi possível integrar as áreas

de picos, mediante correção da linha de base e integração manual dos picos, no entanto os valores de área de pico obtidos ficaram inferiores ao primeiro ponto das curvas analíticas ($2,50 \mu\text{g L}^{-1}$) fora da faixa linear de estudo. A integração manual não foi possível para o composto 2,4-DMF indicativo de que não foi detectado nas condições avaliadas. Em vista disso, sugere-se que pode ter ocorrido dessorção de Ph e cresóis (*m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr) do XR na água após esse material ser submetido aos ensaios em condições controladas.

Em relação aos resultados obtidos empregando o procedimento de microextração em duas etapas, foram constatados fatores de enriquecimento na faixa 22 a 41. Outros trabalhos na literatura (ZHAO e LEE, 2001; ZHANG *et al.*, 2011) obtiveram EF para Ph e cresóis acima de 290 ou mais. Esta diferença provavelmente está relacionada com maior volume de amostra e com a diluição final do extrato a ser quantificado, que tende a ser menor quando utilizado sistema de injeção manual com seringa e válvula no LC. Além disso, esses autores realizaram a injeção direta da solução receptora de NaOH, o que por um lado é vantajoso por não ser feita a diluição da amostra, mas por outro lado pode causar diminuição da vida útil da coluna cromatográfica, caso essa não suporte valores de pH superiores a 7,0. O procedimento de microextração desenvolvido neste trabalho propiciou LOQ entre $2,50$ a $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para os CF avaliados, bem como recuperações entre 83 e 136 % e repetitividades satisfatórias de até 11 % ($n = 3$). Esses parâmetros foram similares aos obtidos por Zhang e colaboradores (2011) ou em alguns casos melhores, como menor tempo de agitação e volume de amostra. Além disso, o método desenvolvido se mostrou versátil para a determinação em amostras aquosas ambientais e em matrizes mais complexas como extratos aquosos de XR e solo. De acordo com esses resultados considera-se que o método poderia ser aplicado na determinação dos cinco CF em amostras aquosas e de extratos de solo (argissolo vermelho distrófico) condicionados com XR, tendo, contudo, a limitação de não propiciar a separação dos compostos meta e para-cresol.

Por fim o método proposto foi comparado com outros métodos por SME mostrados na literatura, fazendo uso de cromatografia a líquido e detecção na região do UV, de acordo com a Tabela 20.

TABELA 18: COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM OUTROS MÉTODOS SME PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS AQUOSAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDO E DETECÇÃO NA REGIÃO DO UV.

Análitos	Método	Matriz aquosa	Tempo de extração (min)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	EF ^g	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	R (%)	Referência
2,4-DMF, Ph, Clorofenóis e nitrofenóis	DLLME	Efluentes	15	0,1–200 5–500	30–373	0,01–1,3	2,6–16,6	65,5–108,3	SARAJI <i>et al.</i> , 2010.
Ph, nitrofenóis e clorofenóis	^c SM-LLME	Torneira, poço e rio	45	0,1–0,5	42,0–98,7	0,08–0,45	1,3–8,0	86–120	ALCUDIA-LEÓN, 2011.
Nitrofenóis	^f SMS-LLME	Efluente, rio e lagoa	30	2,0–1000	160–166	0,26–0,58	6,5–10,7	90,6–98,2	YANG <i>et al.</i> , 2013.
Ph, nitrofenóis, e <i>p</i> -clorofenol	<i>Two-step</i> SME	Torneira e lago	10	1–500 10–1000	296–954	0,3–3,0	2,3–7,1	93,0–102,7	ZHANG <i>et al.</i> , 2011a.
Cresóis e clorofenóis	LPME-BE ^b	Torneira e reservatório	30	1–1000 5–1000	>100	0,5 – 2,5	5,4–11,5	73,7–105,3	ZHAO e LEE, 2001.
Alquilfenóis, nitrofenóis e clorofenóis	^e HF-LPME	Efluente, rio e mineral	20	0,45–60 0,95–60	30–308	0,14–0,29	1,1–4,3	67,1–104,4	VILLAR-NAVARRO, 2012.
2,4-DMF, nitrofenol, bisfenol e naftol	^a IL-DLLME	Torneira, rio e efluente	2	4–400 20–400	ND ^h	0,68–10	1,9–4,8	94,9–108,2	FAN <i>et al.</i> , 2009.
Ph e benzenodiolis	DLLME	Torneira, lago e efluentes	0,5	0,05–100 0,1–100	ND ^h	7,0–29	2,1–13,1	83,2–117,8	HU <i>et al.</i> , 2010.
Clorofenóis	DLLME-SDME	Chuva, torneira e lago	12	0,2–250 1,0–250	67–309	0,016 –0,084	2,5–7,0	90,1–104,7	LI <i>et al.</i> , 2013.
4-nitrofenol, 2-naftol e bisfenol	DLLME-SFO ^d	Torneira, rio e nascente	1	5–1000	ND ^h	0,1–1,5	3,2–5,3	85,0–110,0	HOU <i>et al.</i> , 2013.
Ph, 2,4-DMF e clorofenóis	LPME	Torneira e mineral	15	0,3–870 5–300	ND ^h	0,05–3,0	4,5–10,3	84,6–102,4	FARAJI, 2010.
Ph, <i>o</i> -Cr, <i>m</i> -Cr+ <i>p</i> -Cr e 2,4-DMF	<i>Two-step</i> SME	Torneira, poço, rio, mar e solo	5	2,50–50,0 12,5–250	22–41	0,3–3,5	0,3–11,5	72,5–123,8	Este trabalho.

^a IL: ionic liquid, ^b BE: back extraction, ^c SM: stir membrane, ^d SFO: solidified floating organic droplets, ^e HF: hollow fiber, ^f SMS: supramolecular solvent, ^g EF: fator de enriquecimento, ^h ND: não divulgado.

FONTE: O Autor (2015).

A maior parte dos estudos mostrados na Tabela 20 foi utilizada para os clorofenóis mais apolares e também nitrofenóis. No presente trabalho, o principal objetivo foi a quantificação de CF polares em amostras de água e em extrato de solo. Como pode ser visto a maioria dos valores de parâmetros de mérito foram comparáveis a outros trabalhos empregando outros modos de SME, que utilizaram tempo de extração da fase doadora de 5 min. É importante notar que os valores de EF foram relativamente menores do que os outros métodos, provavelmente devido à elevada polaridade dos compostos; mas, apesar disto foram obtidos intervalos lineares e LOQ adequados, mesmo usando comprimento de onda menos sensível em 270 nm, o qual foi escolhido para minimizar possíveis interferências, em especial para o extrato de solo. Estas duas figuras de mérito estão de acordo com aquelas em cujos trabalhos foram empregados comprimentos de onda similares, entre 274 e 290 nm

Além disso, no estudo de recuperação foram observados valores entre 72,5 e 123,8 % e valores de RSD entre 0,3 e 11,5%, sugerindo exatidão e precisão adequadas e semelhantes a outros métodos.

Apesar dos valores de LOQ obtidos serem compatíveis com outros procedimentos da literatura outras estratégias analíticas poderiam ser avaliadas para a obtenção de maiores sinais analíticos. Dentre essas se destaca a injeção de maiores volumes de amostra, injeção direta de fase orgânica, injeção direta de *n*-octanol e solução receptora de NaOH e determinação dos analitos em comprimentos de onda com melhor detectabilidade como 220 nm. Cabe informar que o comprimento de onda de 270 nm foi adotado, visando minimizar interferências.

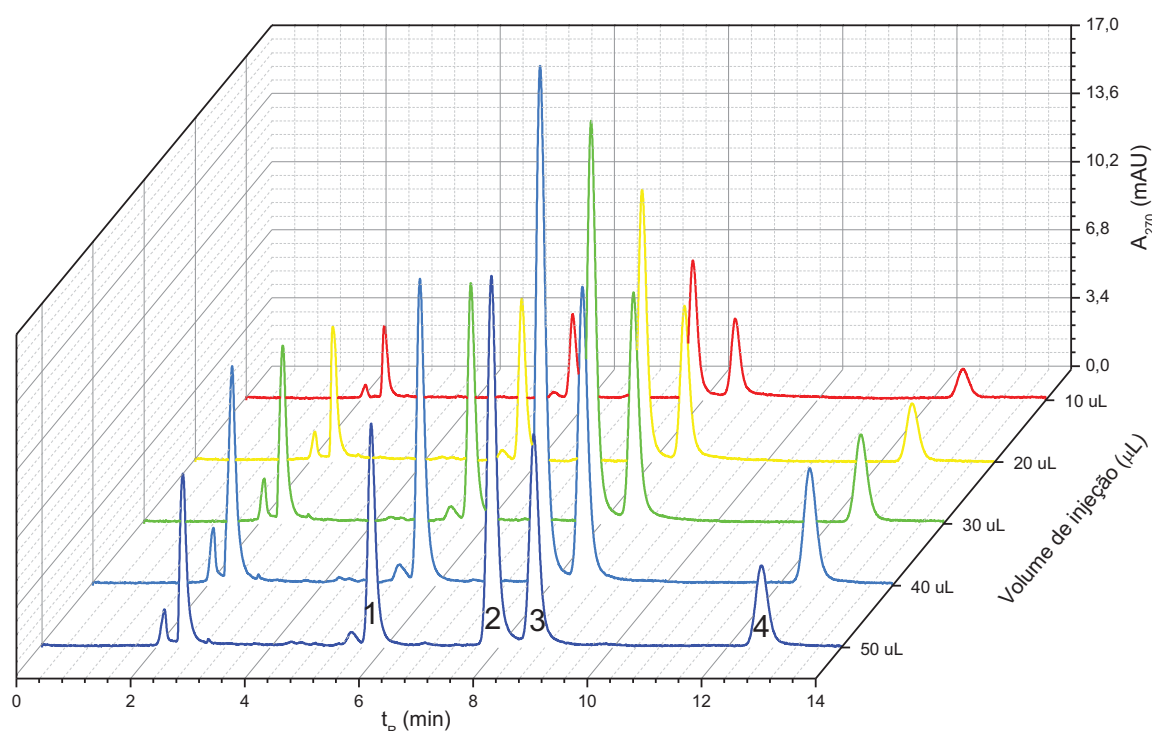
A injeção direta de *n*-octanol foi realizada por Zhang *et al.* (2011b) na determinação de compostos orgânicos presentes em filtros solares UV 4-hidroxibenzofenona, 2,4-dihidroxibenzofenona, benzofenona e 2-hidroxi-4-metóxi-benzofenona. Isso só foi possível, provavelmente devido as condições favoráveis da fase móvel empregada (CH₃OH:CH₃COOH 1 %, 60:40, v/v), não sendo relatado pelo grupo a formação de fase em solução entre o *n*-octanol e fase móvel.

Em outro trabalho do mesmo grupo Zhang *et al.* (2011a) realizaram a injeção direta de solução receptora de NaOH em concentração 0,10 mol L⁻¹ sem mencionarem etapa para neutralização. Com essa estratégia os autores relataram elevados EF de até 900 vezes. No entanto, esse procedimento não foi usado no presente trabalho, devido a coluna analítica não suportar valores de pH superiores a 7,0 conforme manual do fabricante. Outro fator é que somente a adição de ácido acético ao meio não foi suficiente para o preparo da amostra, pois devido a viscosidade e turbidez observadas na amostra foi necessária adição de 200 µL de CH₃CN para ajuste da viscosidade e diminuição da turbidez.

Outros comprimentos de onda foram utilizados na quantificação dos compostos fenólicos, porém foram observados desvios grandes ($RSD = 85\%$, $C = 5 \mu\text{g L}^{-1}$ para $n = 3$). Além disso, de acordo com a literatura para alguns dos compostos fenólicos o comprimento de onda próximo a 270 nm tende a fornecer menores LOQ (SURSYAKOVA *et al.*, 2015).

O volume de injeção foi avaliado e na Figura 34 é apresentada a influência dos volumes de padrão injetados nas áreas de pico dos CF.

FIGURA 34: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO VOLUME DE INJEÇÃO NOS VALORES DE ÁREAS DE PICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: O Autor (2015).

NOTA: (1) Ph; (2) *m*-Cr+*o*-Cr; (3) *o*-Cr e (4) 2,4-DMF; volumes de injeção testados entre 10 A 50 µL; CF em concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ após o procedimento de microextração.

Como poder ser constatado na Figura 34 o aumento de área de pico é proporcional ao volume de injeção da amostra na faixa de 10 a 40 µL. No entanto, foi constatado que ocorre incremento nos sinais de interferentes ($t_r = 5,4$ min), como o que aparece ao lado esquerdo do pico de Ph. Volumes maiores que 50 µL não foram estudados, pois houve redução da área de pico. Por outro lado, o volume de injeção de 40 µL permitiria um aumento de área e uma redução do LOQ, o que poderia ser utilizado, caso fosse necessário para a quantificação dos

CF em concentrações, possivelmente próximas a 1,0 para Ph, *m*-Cr+*p*-Cr e *o*-Cr e 6,0 µg L⁻¹ para 2,4-DMF.

7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições cromatográficas por LC-DAD obteve-se separação dos analitos, exceto os isômeros *m*-cresol e *p*-cresol. Em relação aos procedimentos de SME avaliados (SDME, DSDME e SD-LPME), estes originalmente desenvolvidos para determinações usando GC, foram feitas adaptações para compatibilizá-los a quantificação por cromatografia a líquido. Constatou-se que a extração direta dos cinco CF sem derivatização e usando solventes pouco polares não foi adequada, mesmo em meio ácido ou empregando aumento da força iônica dos padrões aquosos, devido à alta polaridade dos compostos.

A derivatização dos CF aos seus respectivos ésteres se mostrou viável, no entanto esse procedimento aumentou o número de etapas do procedimento analítico. Isso devido à necessidade de volatilização do solvente orgânico e ressolubilização dos ésteres fenólicos, para quantificação via LC, o que causou perdas consideráveis dos analitos. Portanto, optou-se por modos de microextração com compatibilidade a cromatografia a líquido.

Os procedimentos usando microextração em três fases (LLLME) e em duas etapas (*two-step* SME) exibiram resultados favoráveis na extração das cinco espécies fenólicas, sendo que o modo em duas etapas, desenvolvido neste trabalho apresentou precisão e exatidão, com LOQ próximos a outros métodos semelhantes relatados na literatura.

Usando o procedimento *two-step* SME, foi observado que o solvente *n*-octanol apresentou o desempenho adequado para a extração dos analitos. Foi demonstrado que através do estudo das variáveis relacionadas ao procedimento destinado a microextração de CF, baixo volume de solvente foi utilizado, em tempo de extração curto, usando vidrarias simples e de baixo custo. O método desenvolvido exibiu parâmetros de desempenho atrativos, mesmo para a extração de compostos fenólicos de alta polaridade como fenol e cresóis. Devido a essas características o método proposto, foi empregado com sucesso para a determinação de analitos em matrizes como água da torneira, água de rio, águas subterrâneas, água do mar e extratos aquosos de solo, solo condicionado com xisto retortado e XR. Os resultados de recuperação e RSD sugerem exatidão e precisão adequada. Além disso, o método pode ser considerado como um tipo de procedimento de limpeza, pois a segunda etapa de extração promove seletividade para a extração dos analitos mais polares e/ou ionizáveis. Por outro lado, o estudo foi realizado de modo univariado e julgou-se pertinente investigar se ocorreriam interações entre as diversas variáveis do método proposto.

As possíveis interações foram estudadas utilizando planejamento fatorial fracionário. Essa estratégia foi escolhida considerando-se o conhecimento prévio do sistema adquirido nos estudos univariados e também visando a possibilidade de melhoria nas condições de extração (volume de solvente, tempo de agitação, concentração e volume de solução receptora e concentração de sal no meio), bem como estudar interações entre os fatores. Constatou-se que não ocorrem interações significativas entre as variáveis avaliadas. De modo geral a concentração menor de sal no meio foi relevante para aumentar a extração dos compostos, ao contrário do que é relatado na literatura. Outras variáveis também tiveram destaque como o maior volume e menor concentração de NaOH, ambas favorecendo a extração dos CF, exceto o fenol. Cabe ressaltar que as respostas geradas pelos planejamentos fatoriais contribuíram para aperfeiçoar algumas condições de extração, refletindo em menores valores de LOQ. De posse desses parâmetros de desempenho, foi realizada a validação do método *two-step* SME.

Foram constatadas linearidades adequadas das curvas analíticas, robustez frente às mudanças de temperatura, bem como valores satisfatórios de exatidão e precisão. O método foi aplicado para a quantificação dos analitos em amostras ambientais de água e extratos de solos condicionados com XR e XR “puro”. Com base nos valores de LOQ, precisão e exatidão obtidos, pode-se inferir que o método de microextração investigado tem potencial para ser aplicado na quantificação de CF nas faixas de concentração estudadas em amostras de águas e extratos de solo. Esse aspecto é de grande importância, pois permite atender ao valor de LOQ citado na legislação brasileira.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T.; DA MOTA, R. V.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 27, 394-400, 2007.
- ALCUDIA-LEÓN, M. C. *et al.* Determination of phenols in waters by stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with ultraviolet detection. **J. Chromatogr. A**, 1218, 2176–81, 2011.
- ALVAREZ, M. F.; LLOMPART, M.; LAMHAS, J.P.; LORES, M.; GARCIA-JARESA, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography. **J. Chromatogr. A** 1188, 154-163, 2008.
- ANASTAS, P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development, **Crit. Rev. Anal. Chem.** 29, 167-165, 1991.
- ANDRUCH, V.; KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. S.; ŠKRLÍKOVÁ, J. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques. **Microchem J.** 102, 1-10, 2012.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 34, 193-200, 2013.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. **Green Anal. Chem.** 27, 497–511, 2008.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Anal. Chem.** 62, 2145-2148, 1990.
- BAGHERI, H.; SABER, A.; MOUSAVI, S. R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography–mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1046, 27-33, 2004.
- BIRKETT, A. M.; JONES, G.P.; MUIR, J.G. Simple high-performance liquid chromatographic analysis of phenol and p-cresol in urine and feces. **J. Chromatogr. B**, 674, 187-191, 1995.
- BRASIL - MS 2914/11. **PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011.** Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro, 2011.
- BRASIL: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Solos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema brasileiro de classificação de Solos**, 3ª Edição 978-85-7035-198-2 Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- BRASIL: **Guia Nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos.** São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.
- BRASIL: ANVISA RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. **Ministério da Saúde – MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.
- BRUNETTE, C. S.; ALBERO, B.; TADEO, J.L. **Determination of Pesticides in Soil.** Citado em *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples.* Editado por José L. Tadeo, CRC Press, 2008.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; CASS, Q. B. New trends in sample preparation in Brazil: An overview of bioanalytical applications by liquid chromatography. **J. Braz. Chem. Soc.**, 25, 9–19, 2014.

- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Ed. da Unicamp, 2006.
- CONAMA 396/2008** - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO 396, de 03 de Abril de 2008.
- CONAMA 397/2008** - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO 397, de 03 de Abril de 2008.
- CONAMA 420/2008** - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO 420, de 28 de dezembro de 2009, alterada pela CONAMA no 460/2013, 2009.
- D'AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (K_d) de benzo(a)pireno em solo por isotermas de sorção. **Quim. Nova**. 29, 657-661, 2006.
- DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **J. Chromatogr. A**, 1152, 54–69, 2007.
- DEC, J. BOLLAG, J-M. Dehalogenation of Chlorinated Phenols during Oxidative Coupling. **Environ. Sci. Technol.** 28, 484-490, 1994,
- DUAN, C.; SHEN, Z.; WU, D.; GUAN, Y. Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation. **Trend. Anal. Chem.** 30, 1568-1574, 2011.
- EEC 80/778 - COUNCIL DIRECTIVE of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption. 1–19, 1995,
- ENVIRONMENT AGENCY. Review of the Fate and Transport of Selected Contaminants in the Soil Environment. **Environment Agency: Draft Technical Report P5- 079/TR1**. Rio House, Bristol, 2003.
- EPA method 604, Phenols in Federal Register, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 58-66, 1984
- ES-HAGHI, A.; BAGHERNEJAD, M.; BAGHERI, H. In situ solid-phase microextraction and post on-fiber derivatization combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of phenol in occupational air. **Anal. Chim. Acta**, 742, 17–21, 2012.
- FAN, Y. C.; CHENC, M. L.; SHEN-TUC, C.; ZHU, Y. A Ionic Liquid for Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Phenols, **J. Anal. Chem.**, 64, 1017–1022, 2009.
- FARAJI, H.; TEHRANI, M. S.; HUSAIN, S. W. Pre-concentration of phenolic compounds in water samples by novel liquid-liquid microextraction and determination by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216, 8569–8574, 2009.
- FIAMEGOS, Y.C.; STALIKAS, C.D. In-drop derivatisation liquid-phase microextraction assisted by ion-pairing transfer for the gas chromatographic determination of phenolic endocrine disruptors. **Anal. Chim. Acta**, 597, 32-40, 2007.
- FUNG, Y. S.; LONG, Y. H. Determination of phenols in soil by supercritical fluid extraction–capillary electrochromatography. **J. Chromatogr. A**, 907, 301–311, 2001.
- GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Anal. Chem.** 50, 78–84, 2013.
- GEERDINK, R. B.; NIESSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. TH. Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. Review. **J. Chromatogr. A**, 970, 65-93, 2002.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, M. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. Review. **J. Med. Plants Res.** 31, 6697-6703, 2011.

- GUILARDUCI, S. V. V.; MESQUITA, P. J.; MARTLLI, B.,P.; GORGULHO, F. H. Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino. **Quim. Nova**, 29, 1226-1232, 2006.
- HÄTTENSCHWILER, S.; VITOUSEK, P. M. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. Review. **TRENDS ECOL EVOL**, 15, 238-243, 2000.
- HÄTTENSCHWILER, S.; VITOUSEK, P. M. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. **Trends Ecol. Evol.**, 15, 238–243, 2000.
- HE, H.; LIU, S.; MENG, Z.; HU, S. Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of phenols by acetonitrile stacking coupled with sweeping-micellar electrokinetic chromatography with large-volume injection, **J. Chromatogr. A**, 1361, 291-298, 2014.
- HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. Á. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trend Anal. Chem.**, 29, 728-751, 2010.
- HINSMANN, P.; ARCE, L.; RIOS, A.; VALCARCEL, M. Determination of pesticides in Waters by automatic on-line solid-phase extraction-capillary eletrophoresis. **J. Chromatogr. A**, 866, 137-146, 2000.
- HOU, F.; DENG, T.; JIANG, X. Dispersive liquid-liquid microextraction of phenolic compounds using solidified floating organic droplets, and their determination by LC, **Microchim. Acta**, 180, 341-346, 2013.
- HU, X.; HU, Y.; LI, G. Development of novel molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber and its application for the determination of triazines in complicated samples coupled with high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 1147, 1-9, 2007.
- IPCS - INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY: **CRESOLS - HEALTH AND SAFETY GUIDE**. Health and Safety Guide. 100, 1996.
- JAIN, A.; VERMA, K. K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. **Anal. Chim. Acta**, 706, 37-65, 2011.
- JARDIM, I. C. S. F.; MALDANER, L. ULC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Sci. Chromatogr.** 197, 197-207, 2012.
- JEANNOT, M. A.; PRZYJAZNY, A.; KOKOSA, J. M. single drop microextraction-development, applications and future trends. **J. Chromatogr. A**, 1217, 2326-2336, 2010.
- KAHRU, A.; MALOVERJAN, A.; SILLAK, H.; PÖLLUMA, L. The Toxicity and Fate of Phenolic Pollutants in the Contaminated Soils Associated with the Oil Shale Industry. First Baltic Symposium - Research Articles. **ESPR - Environ Sci & Pollut Res**, 1, 27-33, 2002.
- KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I. S.; ANDRUCH, V. Solvent microextraction: A review of recent efforts at automation. **Microchem. J.**, 110, 599–607, 2013.
- KOKOSA, J. M. Advances in solvent-microextraction techniques. **Trend Anal. Chem.**, 43, 2–13, 2013.
- LAMBROPOULOU, D. A.; KONSTANTINOOU, I. K.; ALBANIS, T. A Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices. **J. Chromatogr. A**, 1152, 70-96, 2007.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. Editora Rima: São Carlos, SP, 2004.
- LAW, A. M. e KELTON, W.D. **Simulation modeling and analysis**. 3rd. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.
- LEE, C-W.; LEE, J.; LEE, J.; EOM, H. Y.; KIM, M. K.; SUH, J. H.; YEOM, H.; KIM, U.; YOUM, J-R.; HAN, S. B. Rapid LC Method for the Simultaneous Determination of Eight Urinary Metabolites of Toluene, Xylene and Styrene. **Bull. Korean Chem. Soc.** 30, 2021-2026, 2009.

- LEONG, M-I.; FUH, MING-REN.; HUANG, S-D. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. **J. Chromatogr. A**. 1335, 2–14, 2014.
- LI, X.; XUE, A.; CHEN, H.; LI, S. Low-density solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction combined with single-drop microextraction for the fast determination of chlorophenols in environmental water samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. **J. Chromatogr. A** 1280, 9-15, 2013.
- MAHUGO S. C. *et al.* Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: new approaches. **Molecules**, 14, 298–320, 2009.
- MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; TORRES-PADRÓN, M. E.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. **Trend Anal. Chem.** 5, 731-748, 2011.
- MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. 2003.
- MORADI, M. *et al.* Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples. **Talanta**, 82, 1864–1869, 2010.
- MORADI, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A.; SEIDI, S. Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples. **Talanta**, 82, 1864-1869, 2010.
- MORAIS, P. de; STOICHEV, T.; BASTO, M. C. P.; VASCONCELOS, M. T. S. D. Extraction and preconcentration techniques for chromatographic determination of Chlorophenols in environmental and food samples. Review. **Talanta**, 89, 1-11, 2012.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. Editora: Bookman; Ed.: 4, 2010.
- NGUYEN, M. T.; KRYACHKO, E. S.; VANQUICKENBORNE, L. G. The chemistry of phenols. Ed. ZVI RAPPOPORT. John Wiley & Sons Ltd. 2003.
- OECD: **GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method. OECD/OCDE 106 Adopted: 21st January 2000.
- OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M.; Biodisponibilidade de Ácidos Fenólicos. **Quim. Nova**, 6, 1051-1056, 2011.
- PADILLA-SÁNCHEZ, J. A *et al.* Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 85, 2397–404, 2011.
- PADILLA-SÁNCHEZ, J. A.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; BARCO-BONILLA, N.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L.; GARRIDO-FRENICH, A. Simultaneous analysis of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in wastewater effluents, using solid phase extraction and further determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry, **Talanta** 85, 2397–2404, 2011.
- PHAM, T. P. T.; Cho, C-W.; Yun, Y-S.; Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. **Water Research** 44, 352–372, 2010.
- PUIG, D. e BARCELÓ, D.. Determination of phenolic compounds in water and waste water. **TRAC Trend anal chem.**, 15, 362-374, 1996.
- REGUEIRO, J.; BECERRIL, E.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M. Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, 1216, 4693-4702, 2009.

- REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEI, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J. Chromatogr. A**, 1116, 1–9, 2006.
- RIBEIRO, M. C. M. Nova Portaria de Potabilidade de Água: Busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil. **DAE**, 189, 16–25, 2012.
- ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.
- RODRÍGUEZ, I.; LOMPART, M.P.; CELA, R. Solid-phase extraction of phenols. Review. **J. Chromatogr. A**, 885, 291-304, 2000.
- RUBAN, V. F.; POKHVOSHCHEV, Y. V. Determination of cresol isomers in aqueous solutions by microscale LC using a two-detector recording system. **J. Anal. Chem.**, 62, 463–465, 2007.
- SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. Review. **J. Chromatogr. A**, 885, 217-236, 2000.
- SANTANA, C. M.; FERRERA, Z. S.; PADRÓN, M. E. T.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. **Trends Anal. Chem.**, 30, 731-728, 2011.
- SANTANA, C.M.; FERRERA, Z.S.; PADRÓN, M.E.T.; RODRÍGUEZ, J.J.S. Methodologies for the Extraction of Phenolic Compounds from Environmental Samples: New Approaches. Review. **Molecules**, 14, 298-320, 2009.
- SANEPAR: http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/v17/FORMACAO_DE_TRIHALOMETANOS.htm acesso em janeiro de 2017.
- SARAFRAZ-YAZDI, A.; AMIRI, A. Liquid-phase microextraction. **Trends Anal. Chem.**, 29, -14, 2010.
- SARAJI, M.; BAKHSHI, M. Determination of phenols in water samples by single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography–mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. A**, 1098, 30-36, 2005.
- SARAJI, M.; MARZBAN, M. Determination of 11 priority pollutant phenols in wastewater using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography - diode-array detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, 396, 2685-2693, 2010.
- SERONERO, L. C.; LAESPADA, M. E. F.; PAVÓN, J. L. P.; CORDERO, B. M. Cloud point preconcentration of rather polar compounds: application to the high-performance liquid chromatographic determination of priority pollutant chlorophenols. **J. Chromatogr. A**, 897, 171-176, 2000.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Organic Chemistry**. Ed 10, 2009.
- SPEIGHT, J. G. Origin and Properties of Oil Shale em: **Shale Oil Production Processes**. Ed. Gulf Professional Publishing, 2012.
- SURSYAKOVA, V. V.; BURMAKINA, G. V.; RUBAYLO, A. I. Optimization of the Conditions of Phenol Determination in Natural and Potable Waters by LC with Sorption Preconcentration. **J. Anal. Chem.**, 70, 98–105, 2015.
- TAKAGAI, Y.; HINZE, W. L. Cloud Point Extraction with Surfactant Derivatization as an Enrichment Step Prior to Gas Chromatographic or Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis. **Anal. Chem.**, 81, 7113-7122, 2009.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, Um tutorial. **Quim. Nova**, 29, 338-350, 2006.

- TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J. Rocío-Bautista, P.; Pino V.; Afonso, A. M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trend Anal. Chem.**, 51, 87–106, 2013.
- TURKIA, H., SIRÉN, H., PENTTILÄ, M., PITKÄNEN, J.-P., Capillary electrophoresis for the monitoring of phenolic compounds in bioprocesses. **Journal of Chromatography A** 1278, 175–180, 2013.
- US-EPA - **U.S. Environmental Protection Agency**. 2011 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 820-R-11-002. January 2011.
- VEERESH, G. S.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Treatment of phenol and Cresols in upflowanaerobic blanket (UASB) process: A review. **Water Res.**, 39, 154-170, 2005.
- VERA-AVILA, L. E. *et al.* Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples. **Anal. Chim. Acta**, 805, 60–69, 2013.
- VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; PÉREZ-BERNAL, J. L.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; BELLO-LÓPEZ, M.Á. Application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the simultaneous LC determination of phenol substituting compounds (alkyl-, chloro- and nitrophenols), **Talanta**, 99, 55-61, 2012.
- WANG, K-D. CHEN, P-S, HUANG, S-D. Simultaneous derivatization and extraction of chlorophenols in water samples with up-and-down shaker-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometric detection, **Anal. Bioanal. Chem.**, 406, 2123-2131, 2014.
- WANG, Q.; QIU, H.; LI, J.; LIU, X.; JIANG, S. On-line coupling of ionic liquid-based single-drop microextraction with capillary electrophoresis for sensitive detection of phenols. **J. Chromatogr. A**, 1217, 5434-5439, 2010.
- WEI, W.; YIN, X.-B.; HE, X.-W. pH-mediated dual-cloud point extraction as a preconcentration and clean-up technique for capillary electrophoresis determination of phenol and m-nitrophenol. **J. Chromatogr. A**, 1202, 212–215, 2008.
- XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. **J. Chromatogr. A**, 1152, 2007.
- YANG, Q.; CHEN, X.; JIANG, X. Liquid–Liquid Microextraction of Nitrophenols Using Supramolecular Solvent and Their Determination by LC with UV Detection, **Chromatographia**. 76, 1641-1647, 2013.
- YANG, Z.-H. *et al.* Development of a home-made extraction device for vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction with lighter than water organic solvents. **J. Chromatography. A**, 1300, 58–63, 2013.
- YANGCHENG, L.; QUAN, L.; GUANGSHENG, L.; YOUYUAN, D. Directly suspended droplet microextraction. **Anal. Chim. Acta**, 566, 259-264, 2006.
- YOSHIKAWA, M.; YASUKO, T.; ARASHIDANI, K.; KODAMA, Y. Determination of cresols in urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 425-429, 362, 1986.
- ZHANG, P.; SHI, Z.; FENG, Y. Determination of phenols in environmental water samples by two-step liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, 85, 2581-2586, 2011a.
- ZHANG, P.-P.; SHI, Z.-G.; FENG, Y.-Q. Determination of phenols in environmental water samples by two-step liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta**, 85, 2581–2586, 2011b.

- ZHAO, L.; LEE, H. K. Determination of phenols in water using liquid phase microextraction with back extraction combined with high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 931, 95-105, 2001.
- ZHAO, R-S.; CHENG, C-G.; YUAN, J-P.; JIANG, T.; WANG, X.; LIN, J-M. Sensitive measurement of ultratrace phenols in natural water by purge-and-trap with in situ acetylation coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.** 387, 687-694, 2007.