UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ausberta Jesús Cabezas Garcia

Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenois por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890 original se encontra disponível na secretaria da pós-graduação do IQ-USP

São Paulo
Data do depósito na CPG
08/08/2011

Ausberta Jesús Cabezas Garcia

Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenois por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

2011

Dedico

A Deus, por sua misericórdia e seu infinito amor.

A minha amada família com gratidão em especial a minha mãe Lucinda Garcia e aos meus batalhadores irmãos.

A minha querida e amada irmãzinha, Alma nobre "Marlene Magda Cabezas Garcia" (in memorian).

Ao meu pai Fortunato Cabezas Barrientos (in memorian) que Deus te proteja e te encaminhe em tua nova etapa da vida.

A minha Louvável amiga Maria Alipazaga Sebastian por sua amizade, por toda ajuda e generosidade recebida desde minha vinda aqui em São Paulo até o presente.

Ao Surpreendente Rubén Moreno Moreno com gratidão por toda ajuda e compreensão.

A Marisela Zevallos pela sua dadivosa amizade, nobreza e por sempre me ouvir.

Ao querido professor Luiz Manoel Aleixo (in memorian)

A minha Tristeza que eu sinto de ter me perdido no caminho nestes 5 anos da minha vida, de ter quebrantado a forma que eu escolhi para viver.....de ter me desapaixonado e infringido normas desta sociedade e também do lado espiritual. Por isso dedico:

"Aqueles Seres Humanos que por sobre todas as coisas não traírem os seus princípios e suas formas de pensar sempre se respeitando assim mesmo e respeitando aos demais, já que este respeito engendra amor aquém o pratica".

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Cesar Masini pela paciência, orientação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato S. Freire, pela cessão de equipamento HPLC do Laboratório do Grupo de Pesquisas em Química Ambiental (GPQA).

Ao pessoal de Grupo de Pesquisas em Química Ambiental (GPQA) em especial a Rodrigo, Larissa, Luciana e Bia pela acolhida.

Ao maravilhoso casal de esposos Wanessa e Cleiton pela sua amizade, por tudo apoio, preocupação e ensinamento.

A uma grande amiga e mãe batalhadora Simone Vicente e a seus filhos João e a pequenina, pelo carinho demonstrado.

A técnica Cristina grande amiga pelo incentivo, carinho e afeto.

A minha amiga Colombiana Cristina Cuartas Dominguez por sempre me dar forças e reconforto quando esteve triste e indignada.

A minha amiga Chilena Rosely por suas constantes palavras de apoio

Ao Laboratório de Química Analítica Ambiental (LQAA).

A Cibele e a todos os funcionários do IQUSP por todos os serviços burocráticos prestados que de uma forma ou de outra ajudam a manter esta prestigiosa Instituição.

A CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos já que como bolsista de um órgão publico faço a devida referencia ao povo brasileiro que, através de seus impostos participaram do financiamento desta pesquisa.

Aos amigos Peruanos da USP Nelida,Roxana, Luis, Delia, Adelaide

Aos amigos de empresa Viajar Fácil: Aidee, Soledad, Nelly, Jorge, Harumy, Lida.

Aos meus velhos amigos Brasileiros Milton Batista da Silva, Jamil, Simone, Gláucia, Gela e Carlota, amo vocês por serem pessoas incríveis por estarem sempre presentes na minha vida, vocês representam para mim o Brasil.

Ao maravilhoso povo Brasileiro acolhedor e amigável, muito obrigada por tudo.

RESUMO

Garcia, A.J.C. **Metodologia analítica para determinação de triclosan e clorofenois por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) com uso de coluna monolítica e empacotada. 132** p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Foram desenvolvidas metodologias de cromatografia a líquido de fase reversa baseadas em injeção sequencial (SIC) e em cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) para determinação de triclosan em amostras de produtos de higiene pessoal e em estudos de adsorção em argilominerais naturais e modificados, visando determinar parâmetros de adsorção de triclosan frente a alguns de seus metabólitos. A determinação de triclosan em enxaguadores bucais foi realizada por SIC com eluição isocrática usando fase móvel constituída por acetonitrila: tampão fosfato de trietilamina 70 mM pH 3,5 na proporção 70:30 (v v^{-1}), obtendo-se limites de detecção e de quantificação de 0,22 e 0,72 mg L^{-1}, respectivamente. Taxas de recuperação entre 96 e 98% foram obtidas da aplicação a amostras reais, sendo que os resultados obtidos pelo método proposto não apresentaram evidências de diferenças estatisticamente significativas em comparação a uma metodologia de referência baseada em HPLC com coluna empacotada. A separação de triclosan (TCS), 2-clorofenol (2-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e metiltriclosan (MTCS) foi estudada por SIC, obtendo-se a separação de TCS, 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP com duas etapas de eluição isocrática, a primeira delas com fase móvel 60:40 (v v^{-1}) metanol: tampão acetato de amônio 20 mM (pH 5,5) seguida de eluição com fase móvel 70:30 (v v^{-1}) metanol : tampão acetato de amônio 20 mM (pH 5,5). Nesse caso, os isômeros 2,4,6-TCP e 2,3,4-TCP coeluem. Metiltriclosan, o menos polar desses compostos, pode ser separado de TCS com etapas subseqüentes de eluição. Os métodos foram aplicados para estudar a adsorção de triclosan e seus metabólitos 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e metiltriclosan em montmorilonita homoiônica (K^+) e modificada com sal de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA), observando-se forte adsorção de triclosan e metiltriclosan em comparação a 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP. A incorporação de HDTMA no argilomineral causou significativo aumento da capacidade de adsorção desses metabólitos, determinada a partir do ajuste dos dados experimentais à equação linearizada de Langmuir, observando-se que a ordem de adsorção é 2,4,6-TCP > 2,4-DCP > 2-CP.

Palavras Chave: Triclosan, clorofenois, cromatografia por injeção seqüencial, cromatografia liquida em fase reversa, adsorção, colunas monolíticas.

ABSTRACT

Garcia, A.J.C. Methodologies for the determination of triclosan and chlorophenols by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Sequential Injection Chromatography (SIC) using packed and monolithic columns. 132 p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Reversed-phase liquid chromatography methodologies based on sequential injection (SIC) and high performance liquid chromatography (HPLC) have been developed for determination of triclosan in samples of personal hygiene products and in studies of adsorption on natural and modified clay minerals aiming to determine kinetic and thermodynamic parameters of adsorption of triclosan in comparison with some of its metabolites. The determination of triclosan in oral rinses with SIC was performed by isocratic elution using a mobile phase of acetonitrile : 70 mM triethylamine phosphate buffer pH 3.5 at the ratio 70:30 (v v^{-1}), obtaining limits of detection and quantification of 0.22 and 0.72 mg L^{-1}, respectively. Recovery rates between 96 and 98 % were obtained from the application to commercial samples, and the results obtained by the proposed method showed no evidence of statistically significant differences compared to the reference methodology based on HPLC with packed column. The separation of triclosan (TCS), 2-chlorophenol (2-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), 2,3,4 trichlorophenol (2,3,4-TCP) and methyltriclosan (MTCS) was studied by SIC, resulting in the separation of TCS, 2-CP, 2,4-DCP and 2,4,6-TCP with two isocratic elution steps, the first of them with a mobile phase 60:40 (v v^{-1}) methanol: 20 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5) followed by elution with 70:30 (v v^{-1}) mobile phase of methanol : 20 mM ammonium acetate buffer (pH 5.5). In this case, the isomers 2,4,6-TCP and 2,3,4-TCP coeluted. Methyltriclosan, the less polar of these compounds, can be separated from TCS with subsequent elution steps. The methods were applied to study the adsorption of triclosan and its metabolites 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP and methyltriclosan on homoionic montmorillonite (K^+) as well as in hexadecyltrimethylammonium salt (HDTMA) modified montmorillonite, noticing a stronger adsorption of triclosan and methyltriclosan compared with 2-CP, 2,4-DCP and 2,4,6-TCP. Incorporation of HDTMA in the clay mineral caused significant increase in adsorption capacity of these metabolites. This capacity was determined by fitting the experimental data to the linearized Langmuir equation. The adsorption order was 2,4,6-TCP > 2,4-DCP > 2-CP.

Keywords: triclosan, chlorophenols, sequential injection chromatography, reversed phase chromatography, adsorption, monolithic columns

SUMÁRIO

1. Introdução **7**

1.1 Aspectos gerais de triclosan 7

1.2 Métodos analíticos de referência 14

1.3 Cromatografia Por injeção seqüencial 22

1.4 Adsorção e adsorbentes 30

2. Objetivos **34**

3. Parte experimental **35**

3.1 Materiais utilizados 35

3.2 Equipamentos e acessórios 37

3.3 Análises de amostra de enxágüe bucal 40

3.4 Separação de triclosan e dos clorofenois por SIC 42

3.5 Estudo de adsorção 51

4. Resultados e discussão **53**

4.1 Determinação de triclosan em enxaguadores bucais 53

4.2 Determinação de triclosan na presença de alguns metabólitos 70

4.3 Separação de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, Triclosan e Metiltriclosan em sistema SIC 102

4.4 Adsorção de triclosan em montomorilonita natural e modificada 104

5. Conclusão **123**

6. Bibliografia **124**

7. Anexo **133**

7.1 Súmula curricular 133

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais de triclosan

O triclosan (TCS), 2-(2,4-diclorofenoxi)-5-clorofenol (ou chlorinated biphenyl ether) é um composto fenólico que se apresenta como um pó cristalino, solúvel em muitos solventes orgânicos, com baixa solubilidade na água, da ordem de 10 mg L^{-1} (Silva et al, 2005), não iônico, não volátil, sendo um agente com propriedade bactericida de amplo espectro de ação antimicrobiana e cujo principal sitio de ação é a membrana citoplasmática da bactéria. A estrutura química de triclosan é mostrada na FIGURA 1.1.

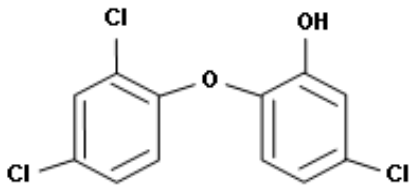

FIGURA 1.1. Estrutura química de triclosan

Devido a suas propriedades anti-sépticas é comumente usado em diversos produtos de higiene pessoal (xampus, sabões, cremes, pasta dentifrícias, desodorizantes, etc.) (Junker e Hay, 2004). Também é usado na medicina, uma vez que possui propriedade antiinflamatória na diminuição da periodontite, inibindo a formação da placa bacteriana. É usado também como aditivo em filmes de embalagem de alimentos para prevenir o crescimento de microorganismos e estender a vida do polímero, mas até o presente, esta ultima forma de aplicação não tem sido legislada na União Européia nem no Brasil (Silva et al. 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Comunidade Econômica Européia estabelecem 0,3 % (m/m) como a máxima concentração autorizada nos produtos de higiene pessoal e cosméticos. O triclosan foi registrado pela Seleção Legislativa (SELEGIS) de previdência, como medicamento mono-droga identificado com tarja vermelha de categoria 1, na seção judiciária do Rio de Janeiro (Piccoli et al. 2002).

No meio ambiente pode causar efeitos adversos, já que é considerado um antibiótico sintético forte, desenvolvido para ser tóxico aos organismos vivos (morte de bactérias). Em despejos contendo estes bactericidas, devido ao tempo longo de retenção no meio ambiente, pode haver aumento do risco de desenvolvimento de resistência microbiana, resultando na diminuição da eficiência de desinfetantes (Junker e Jay, 2004). Estudos revisados pela EPA mostram que o triclosan é extensamente degradado sob condições aeróbicas, desativado também por bactérias de solos e removidos em sistemas de lodos ou lamas ativadas nas plantas de tratamento de águas residuais; além do mais não exerce impacto adverso no processo de tratamento em níveis de concentração de até 2 mg L^{-1} (Silva et al. 2005).

O triclosan apresenta possíveis efeitos de aberração cromossômicos (California Environmental Protection Agency Department of pesticide Regulation Medical Toxicology Banch). Seu mecanismo de ação é baseado na sua permeabilidade através da membrana celular e na inibição da atividade de enzimas tipo tripsina. Esses mecanismos têm sido considerados na formulação dos dentifrícios de múltipla ação, inibindo o crescimento celular. O triclosan reage preferencialmente com a enoil redutase inibindo a função desta enzima na biossíntese de lipídios. (Filho et al. 1997 ; Rule et al. 2005).

Estudos também demonstram a presença de triclosan em leite humano, sendo o nível de triclosan significativamente mais baixo do que o nível medido em plasma, indicando que o infante recebe pequenas doses de triclosan, presente no sistema de circulação da maternal. Outros estudos confirmam alta freqüência da presença de triclosan em plasma humano, com

níveis mais altos em pessoas com idade acima de 31 anos (Dann e Hontela, 2011). Este composto é agudamente tóxico para organismos aquáticos, com uma dose letal de 350 $\mu g\ L^{-1}$ para peixes, e de 1,5 $\mu g\ L^{-1}$ para algas. Também foi demonstrada a ocorrência de transformação destes compostos bioacumulativos de triclosan para metiltriclosan (MTCS), sendo este último de maior acumulação (Lindstrom et al. 2002; Hua et al. 2005). A acumulação de ambos TCS e MTCS é maior em peixes do que em algas, como mostram os valores de fator de bioacumulação de 3700 a 8400 em peixe e 1200 a 1400 em algas (Dann e Hotela, 2011).

A segurança no uso do triclosan tem sido questionada devido aos riscos ao ambiente e à saúde humana. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) registrou o triclosan como um pesticida (Silva et al 2005). A estrutura molecular e formulação química deste composto são similares a alguns dos compostos químicos mais tóxicos conhecidos, relacionando-os com as dioxinas e PCBs (Greyshock e Vikesland 2006; Canosa et al. 2005).

Estudos evidenciaram a formação de clorofórmio e compostos organoclorados mediante a oxidação de triclosan na presença de hipoclorito ou cloro livre (Greyshock e Vikesland, 2006; Canosa et al. 2005). Os compostos clorofenólicos podem ser produzidos durante os processos de cloração (desinfecção) nas unidades de purificação da água potável na presença de substâncias húmicas naturais (Canosa et al. 2005). Devido a seus potenciais toxicológicos e ocorrência no ambiente, 11 fenóis são classificados como poluentes orgânicos persistentes, sendo alguns prioritários para a EPA, tais como o 2-clorofenol, 2-4-diclorofenol, e 2,4,6-diclorofenol (Heberer e Stan, 1997). Uma proposta de rotas de degradação aquática na presença água clorada é apresentada na FIGURA 1.2. Segundo Canosa et al (2005) a formação de 2,4 diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol foi confirmada por GC/MS e HPLC/MS, ao contrário de 2,3,4-TCP, o qual não foi detectado (Ferrer et al. 2004; Wong-Wah-Chung et al. 2007).

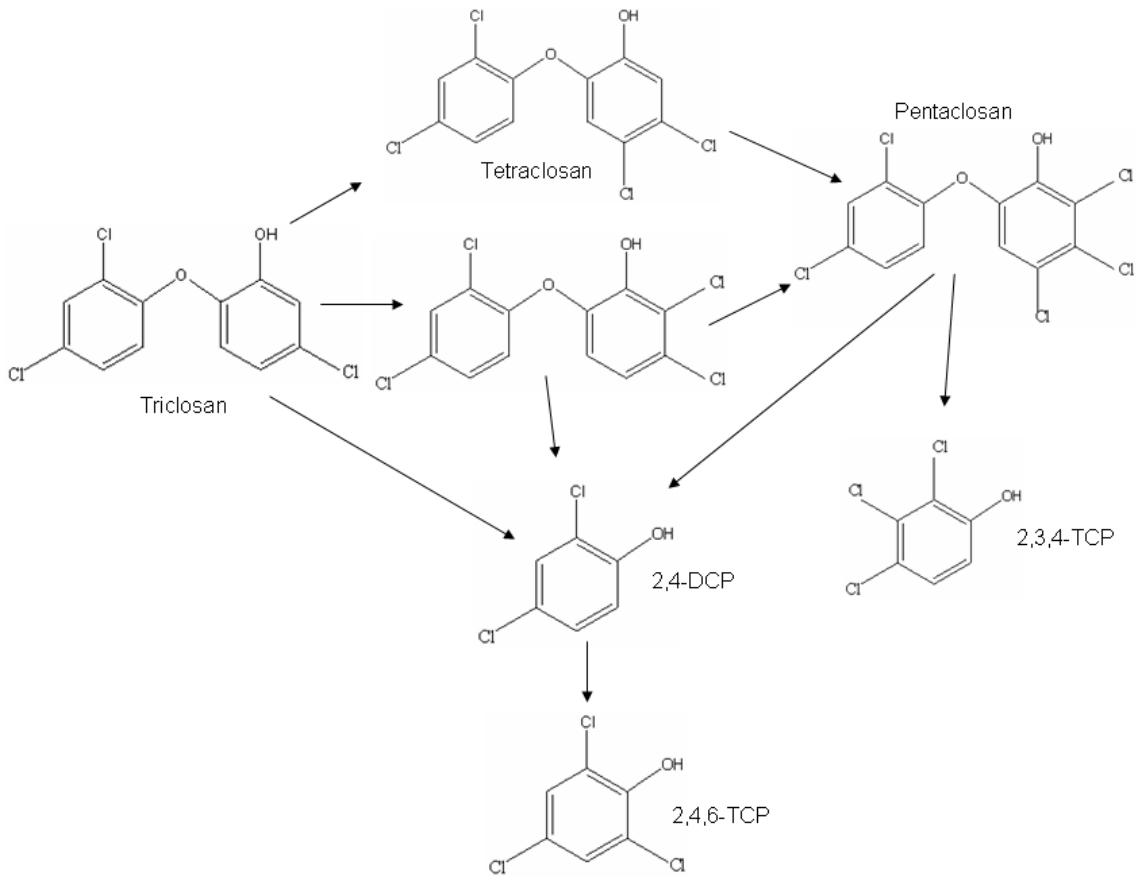

FIGURA 1.2. Rota de degradação aquática de triclosan em água clorada (Adaptado de Canosa et al. 2005), 2,4-DCP = 2,4-diclorofenol, 2,4,6-TCP = 2,4,6 triclorofenol e 2,3,4-TCP = 2,3,4-triclorofenol.

Estudos demonstraram que doses de 2-clorofenol injetadas em peixes induziram geração de espécies altamente reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species) com macromoléculas celulares tais como proteínas, DNA, ácidos poliinsaturados gordurosos, além de estimularem danos oxidativos subseqüentes, podendo ser um mecanismo de toxicidade em organismos aquáticos (Luo et al. 2006). Apesar de sua introdução em 1960,

o uso de triclosan incrementou-se dramaticamente só recentemente nos Estados Unidos e Europa. Na Europa são produzidas 350 toneladas de triclosan para as aplicações comerciais.

Fizeram-se estudos para examinar a ocorrência e destino do triclosan no ambiente aquático. No lago Greifensee (Suíça) foi feito uma medida vertical de perfil de concentração de triclosan em sedimentos que refletem seu incremento nos últimos 30 anos (Singer et al. 2002).

Estudos de fotodegradação em águas naturais doces e oceânicas, além de águas residuais, confirmaram a conversão de triclosan para dioxinas tais como 2,8-diclorodibenzo-p-dioxina (FIGURA 1.3), diclorohidroxidibenzofurano, diclorofenóis. A fotodegradação de triclosan para dioxinas ocorre independentemente do pH da amostra (Aranami e Readman, 2006).

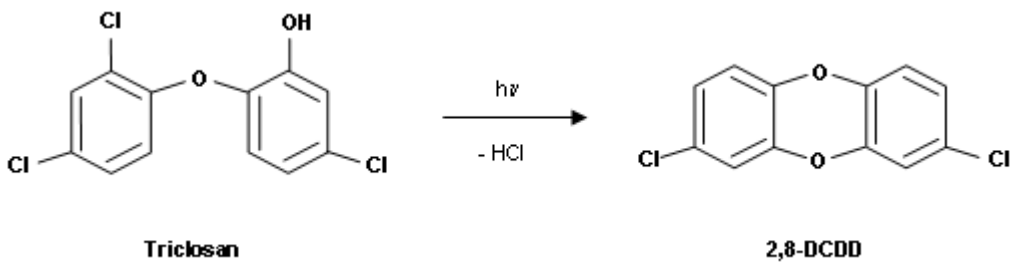

FIGURA 1.3. Fotodegradação de triclosan a dioxina (2,8-diclorodibenzo-p-dioxina)

A foto-degradação, uma das principais rotas de eliminação de triclosan no ambiente aquático, pode ser realizada com luz UV de baixa intensidade (254; 313; ou 365 nm), com simulação de luz solar ou irradiação de luz branca artificial. Em todas as fontes a degradação de triclosan segue uma cinética de primeira ordem (Dann e Hontela, 2011). Na FIGURA 1.4 é mostrada a rota fotoquímica da foto-degradação do triclosan, segundo (Sanchez-Prado et al (2006), indicando a formação de 2,8 diclorodibenzo-p-dioxina, que ocorre independentemente

do pH, mas sendo transformação mais rápida em meio básico. Também foi observada a presença de 2,4 diclorofenol e os isômeros de monoclorofenol.

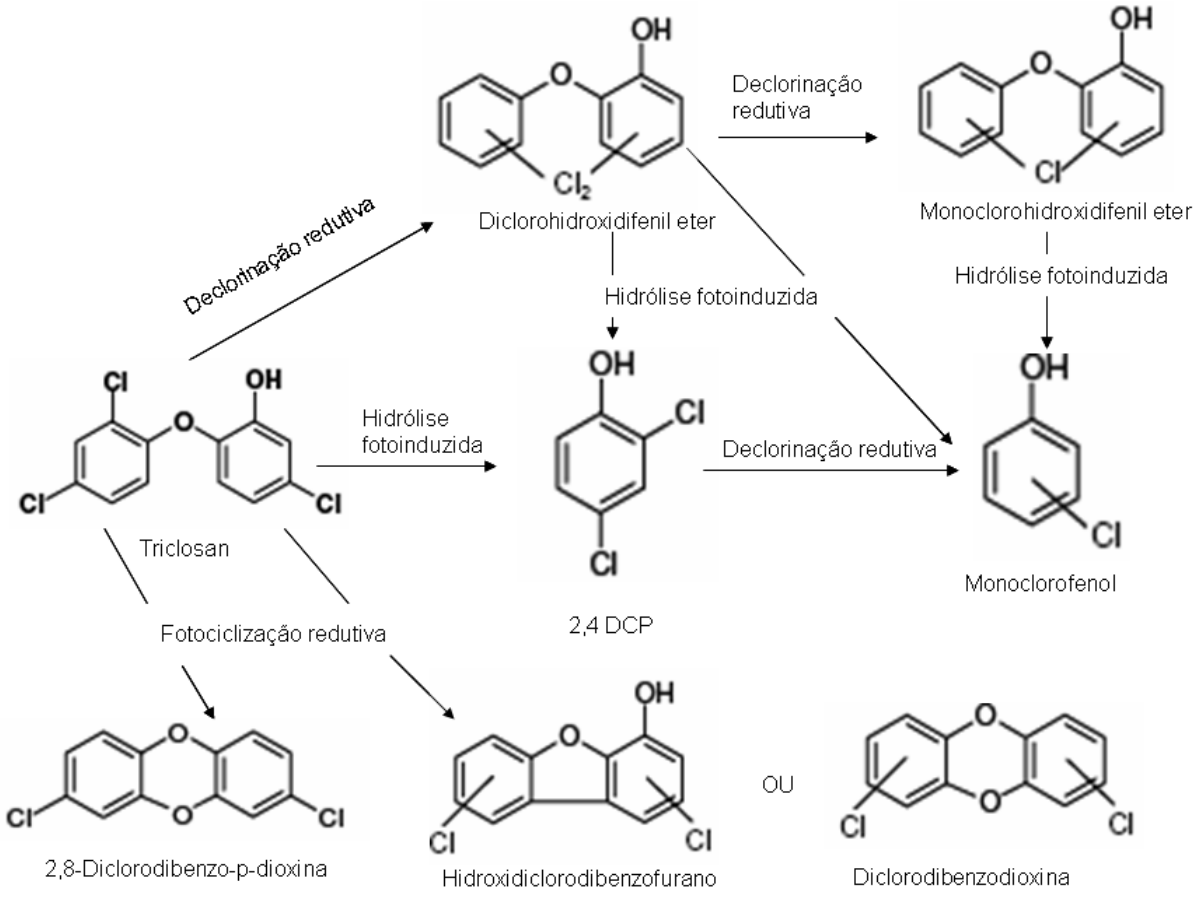

FIGURA 1.4. Rota fotoquímica da foto-degradação do triclosan em água (Adaptado de Sanchez Prado et al 2006), 2,4-DCP = 2,4-diclorofenol.

Na FIGURA 1.5 é mostrado um esquema simplificado do metabolismo do triclosan proposto por Fang et al. (2010), onde o triclosan é metabolizado em seus conjugados glucorónido e sulfato de triclosan, monohidroxilados de triclosan, 4 cloro catecol e 2,4 diclorofenol. A presença de todos estes metabólitos foram confirmados por Tulp et al (1979) em fezes e urina de rato após administração via oral de 500 mg de triclosan por kg massa corporal. Como se pode observar, a metabolização não é sinônimo de inativação dos xenobióticos tóxicos, já que o 2,4 diclorofenol e 4 cloro catecol mostraram-se mais tóxicos do

que triclosan. Mesmo assim todos os compostos metabólitos resultantes de triclosan continuam sendo clorados, comportando-se de modo persistente no meio ambiente. A eliminação deles por incineração gera dioxinas (Kishi et al 2009).

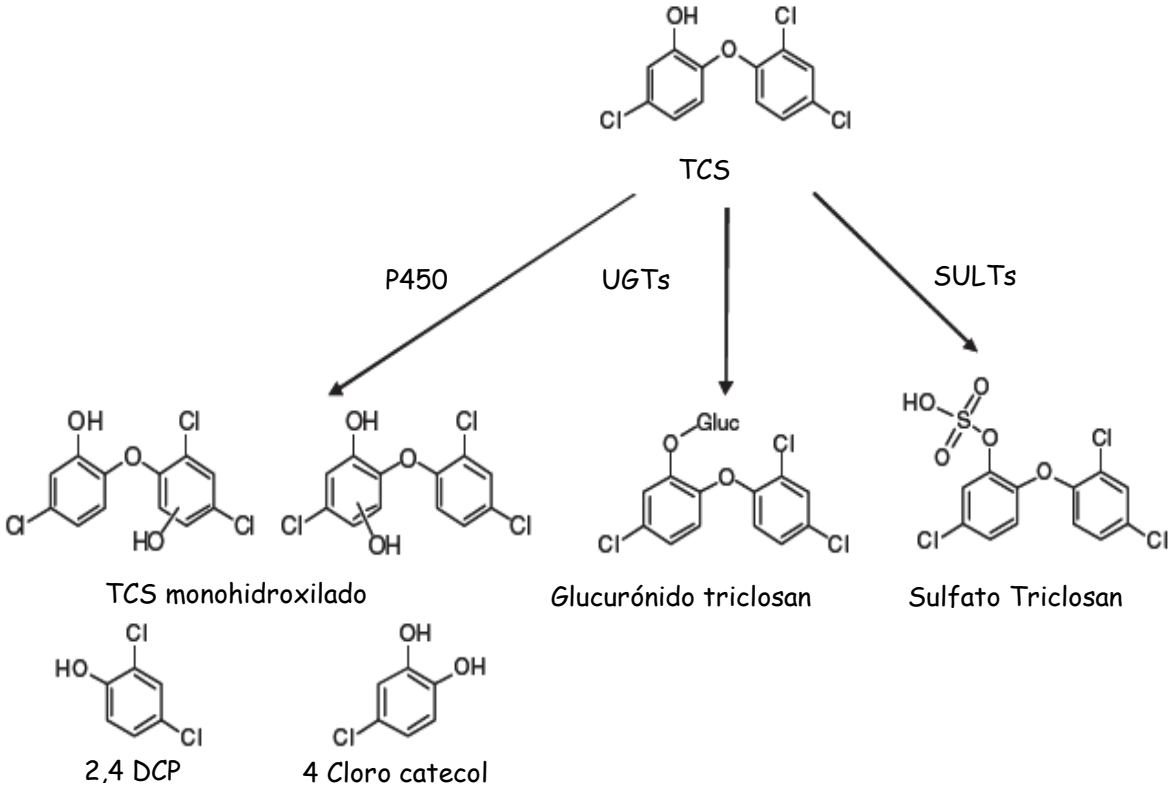

FIGURA 1.5. Rota de Metabolismo de triclosan (Fang et al. 2010), P450 = citocromo P450, UGTs = UDP-glucoroniltransferases, SULTs = sulfotransferases.

O 2,4,6-TCP e pentaclorofenol são disruptores endócrinos (Jung et al.,2004), eles induzem câncer no fígado, linfomas, leucemia e hemangiosarcoma em roedores NCI (1979); NTP (1989). Há também alguma evidência epidemiológica que 2,4,6-TCP e PCP são cancerígenos a seres humanos, assim eles foram classificados pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer como um provável e um possível carcinógeno, respectivamente (IARC

1995). Também foi provado que 2,4,5-TCP e tetraclorofenol podem provocar desordens hepáticas e renais, ao passo que 2,4- diclorofenol (2,4-DCP) pode comprometer o sistema imune (WHO 2003). O 2,4,6-TCP e pentaclorofenol têm sido considerados como subprodutos da desinfecção enquanto outros clorofenois são de menor importância (Michałowicz et al 2011)

1.2. Métodos Analíticos de referência

A metodologia analítica para determinação de triclosan e seus metabólitos (TCS, MTCS, 2-DCP; 2,3,4-TCP; 2,4,6-TCP) em amostras de água são baseados geralmente em uma etapa de pré-concentração, seguida de uma determinação seletiva dos analitos de interesse utilizando cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (Black e Muir, 2003). Os analitos de interesse, para serem analisados por cromatografia a gás, devem possuir as propriedades de serem termicamente estáveis, altamente voláteis e não serem polares; então, é aconselhável a derivatização, para assim contornar o problema da presença de grupo funcional polar R-OH no anel aromático. O grupo R-OH polar reduz a volatilidade do composto tornando o tempo de retenção demasiado longo e, em casos extremos, o composto não é eluido da coluna cromatográfica. Geralmente estes compostos sofrem adsorção na coluna ou no injetor, dificultando a obtenção de dados quantitativos confiáveis. Felizmente, este grupo funcional polar é facilmente convertido a derivados menos polares, os quais são adequados para análise por cromatografia a gás. Isso é feito através das principais classes de reações de derivatização, tais como a esterificação, sililação e acetilação, transformando o R-OH (hidroxila) em R-OCH_3 (metoxi); em R-O-Si$(CH_3)_3$ e em R-O-CO-CH_3, diminuindo-se assim a polaridade, aumentando-se sua volatilidade e reduzindo-se significativamente o tempo de análise. Outra razão para derivatizar um composto é a introdução de grupos

específicos, para os quais detectores mais sensíveis possam ser utilizados. Um exemplo típico é a reação para a introdução de átomos de cloro na molécula de interesse de forma a permitir o uso de detector por captura de elétrons, de elevada sensibilidade. Estes novos compostos formados apresentam como vantagens em relação ao composto de partida as propriedades de serem mais facilmente extraídos e mais facilmente separados cromatograficamente. Além disso, conferem maior sensibilidade, seletividade e, por consequência, maior exatidão ao método analítico (Canosa et al. 2005). Os reagentes propostos para a derivatização são diazometano, o qual apresenta como limitação o fato de que os compostos triclosan e metiltriclosan não podem ser determinados na mesma análise (Canosa et al. 2005). Outras técnicas de derivatização que superam esses inconvenientes são acetilação e sililação (Canosa et al. 2005). As técnicas de pré-concentração comumente empregadas são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida e micro-extração em fase sólida com a finalidade de atingir limites de detecção da ordem de ng L^{-1}. As duas primeiras estratégias requerem grandes volumes de amostra e evaporação do extrato orgânico final (Canosa et al. 2005).

A micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês Solid Phase Micro Extraction) é uma técnica alternativa de preparação da amostra para extração de compostos orgânicos de amostras de água, na qual os processos de extração e pré-concentração ocorrem em uma fibra recoberta ou ligada a um material polimérico acoplada numa seringa para injeção em cromatografia. Após a adsorção os compostos são dessorvidos diretamente no injetor do cromatógrafo pelo efeito térmico (Pires et al. 2000; Gierak et al. 2006).

A micro-extração em fase sólida com irradiação direta na fibra (foto-SPME) seguido com GC/MS permite o trabalho com menores volumes de amostra, evita o uso de solventes orgânicos e minimiza o número de etapas envolvidas na preparação das amostras. Esta técnica de separação é uma ferramenta poderosa e oferece muitas vantagens para realizar estudos fotoquímicos, pois viabiliza a monitoração, as características cinéticas e a geração do sub-

produtos de foto-degradação, permitindo postular um mecanismo de foto-degradação, assim como o destino fotoquímico de um poluente em amostras reais. A técnica (foto-SPME) permite a miniaturização e automação das analises, já que esta técnica integra em único sistema, a extração, derivatização, concentração, irradiação na própria fibra com luz UV (geração dos foto-produto in situ) e a introdução da amostra no sistema cromatográfico. Estas técnicas, quando hifenadas em sistemas analíticos de detecção, tem resultado em análises rápidas, menor exposição aos solventes tóxicos, bem como maior precisão analítica. Também possibilita a reutilização das fibras extratoras (Black e Muir, 2003; Gierak et al. 2006).

A seguir serão descritos brevemente alguns procedimentos da literatura para determinação de triclosan e seus metabólitos.

Rodriguez et al. (2004) otimizaram um procedimento de preparação de amostras para cinco espécies antiinflamatórias em amostras aquosas utilizando SPME seguida por sililação das espécies nativas diretamente sobre a superfície da fibra de poliacrilato com o reagente de derivatização N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)-trifluoroacetamida (MTBSTFA) por GC-MS. Este e outros trabalhos mostram que os analitos podem ser derivatizados e extraídos sobre uma fibra de SPME.

Morales et al. (2005) determinaram triclosan, 2,4-DCP, e 2,4,6-TCP em sedimentos e lodos de uma estação de tratamento de esgoto. A extração dos analitos foi feita por mistura de acetona: metanol (1:1), assistida com microondas; o líquido sobrenadante centrifugado foi alcalinizado com NaOH; os interferentes básicos ou neutros foram removidos com n-hexano; a fase aquosa foi acidificada até pH 2,5. Os concentrados foram retidos em uma fase adsorvente sólida de sílica contida no cartucho OASIS HLB SPE, seguindo-se uma dessorção com 5 mL de acetato de etila, com posterior evaporação dos extratos a 2 mL. Estes analitos concentrados foram derivatizados por sililação com o reagente de derivatização (MTBSTFA). As soluções de calibração foram preparadas com 500 μL dos padrões em meio de acetato de

etila. A determinação foi feita por cromatografia a gás com espectrometria de massa em tandem (GC-MS/MS). Todos os compostos analisados estiveram presentes nas amostras de lodo, sendo que para clorofenóis a faixa de concentrações observada foi 7 a 316 ng g^{-1}, enquanto para triclosan as concentrações foram de 420-5400 ng g^{-1}.

Agüera et al. (2003) desenvolveram métodos analíticos para determinação e quantificação de traços de triclosan e bifenol em águas residuais urbanas e sedimento marinho utilizando GC-MS com ionização química negativa e LC –MS com ionização por electrospray. Estes métodos envolveram diversas técnicas analíticas para a preparação das amostras, tais como extração em fase sólida e extração liquido-líquido pressurizada. O limite de detecção obtido variou na faixa de ppb e ppt. Os resultados mostraram a presença de triclosan em todas as amostras de águas residuais na faixa de concentração de 0,8 a 37,8 $\mu g\ L^{-1}$ e, nas amostras de sedimento, entre 0,27 e 130,7 $\mu g\ kg^{-1}$.

Ferrer et al. (2004) desenvolveram metodologias para determinação de quatro produtos de fotodegradação de triclosan em amostras de água, sendo analisadas em diferentes tempos de irradiação e isoladas das amostras por extração em fase sólida. A separação e detecção dos compostos de degradação foram feitas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa por tempo de vôo (LC/TOF/MS).

Hua et al. (2005) propuseram um método analítico para determinação de triclosan em águas residuais e águas do rio Detroit, baseado na extração em fase sólida seguida por cromatografia líquida em fase reversa, com coluna C18 acoplada com ionização electrospray em modo negativo (modo negativo por ser o triclosan um ácido fraco) com a espectrometria de massa em tandem quadrupolo (LC-ESI(-)-MS/MS) com operação de monitoramento de reação múltipla (MRM). O tandem envolve dois ou mais estágios de análise de massa separados por uma reação, portanto provoca a redução de ruído químico devido à alta especificidade. O MRM permite a discriminação total entre duas substâncias diferentes com a

mesma massa molecular; esta técnica em seu conjunto é aplicável em amostras complexas e torna possível a quantificação da espécie no nível traço, obtendo-se limite de quantificação na faixa de ppt-ppb, usando-se um padrão interno para a quantificação. As recuperações obtidas nas amostras estiveram na faixa de 104 ± 8 % e 91 ± 10%. Uma amostra de água com concentração 63 ngL^{-1} de triclosan tratada com UV, resultou numa eliminação de mais de 90 % deste analito.

Sánchez-Prado et al. (2006) realizaram estudos de degradação foto induzida de triclosan com radiação ultravioleta (254 nm). Na foto-microextração em fase sólida de triclosan a degradação e foto-degradação foram realizadas sobre a fibra de polidimetilsiloxano. Os foto-produtos gerados foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massa. No total foram identificados oito foto-produtos, evidenciando-se a conversão de triclosan para dioxina (2,8-diclorodibenzo-p-dioxin) durante a degradação.

Foi desenvolvido um método para a determinação dos 24 produtos químicos de usos domésticos com elevado volume de produção (HPV) nos sistemas de esgotos municipais usando extração em fase sólida (SPE), e utilizando as duas análises de cromatografia gasosa e cromatografia líquida, cada um com espectrometria de massa em tandem (GC-MS / MS e LC-MS/MS) (Trenholm et al. 2008). Os compostos estudados incluem pesticidas, antioxidantes, perfumes, plastificantes, agentes conservantes e produtos de higiene pessoal. Os limites de detecção reportados pelo método variaram de 0,1 a 100 ng L^{-1} em água e as recuperações para a maioria dos compostos foram entre 54 e 112%. Os HPVs domésticos foram sistematicamente detectados no esgoto bruto, em três estações de tratamento de águas residuais de grande escala. Compostos, como a vanilina, DEET, benzofenona, ácido 3-indolacético, bisfenol A, triclosan e triclorocarbane foram detectados em todas as águas residuais, tanto em afluentes e efluentes das estações, sendo as concentrações significativamente menores no efluente. Mentol e fenoxietanol apresentaram as maiores

concentrações observadas nas amostras de afluente, variando de 1,5 a 13 mg L^{-1} de mentol, e de 8,8 a 22 mg L^{-1} para o fenoxietanol. MGK-11, methylresorcinol, trifluralina, hexabromododecane, acriflavin e atrazina não foram detectados. O método proposto detecta uma ampla gama de substâncias químicas HPV, com grande sensibilidade e seletividade (Trenholm et al. 2008).

O lodo gerado no processo de tratamento de águas residuais pode ser um importante sumidouro de alguns produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs). A aplicação de lodo de esgoto no solo (na forma de biossólido) pode, portanto, potencialmente introduzir PPCPs para o meio ambiente. Após o tratamento, os biossólidos são frequentemente sujeitos a um período de armazenamento antes da aplicação no solo. No entanto, existe pouca informação disponível no que diz respeito ao destino dos PPCPs no biossólido durante o armazenamento. Chenxi et al. (2008) estudaram a persistência de sete produtos farmacêuticos e um antibacteriano utilizando extração ultra-sônica e cromatografia líquida-espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Os impactos da exposição à luz solar e aeração foram investigados. Durante o experimento, não foi observada eliminação de carbamazepina, triclosan e ciprofloxacina, enquanto que a eliminação foi encontrada para tetraciclina, doxiciclina, clindamicina, eritromicina, e claritromicina. Utilizando um modelo cinético, o tempo de dissipação a 50% foi 37 a > 77 d de tetraciclina, 53 a > 77d para doxiciclina, 1,0-1,6 d para a clindamicina, 1,1-1,9 d para a claritromicina, e 7,0-17 d para eritromicina. Esses compostos foram encontrados em condições anaeróbias mais persistentes do que em condição aeróbia com maior tempo de dissipação de 50% por um fator de 1,5-2. No entanto, observou-se menor impacto devido à exposição à radiação solar (Chenxi et al. 2008).

Como mencionado anteriormente, o triclosan pode agir como um antibiótico e causar resistência de cepas bacterianas. Além disso, a possível formação de clorofórmio também foi descrita quando o triclosan contido no detergente para lavar louça doméstica reage com a

água clorada. Para avaliar os possíveis riscos associados a exposições, as concentrações de triclosan em detergentes domésticos de Taiwan foram determinadas por Shih-Wei et al. (2008). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detector UV a 280 nm foi utilizada para analisar triclosan nas amostras. Fatores que podem afetar as concentrações residuais de triclosan a partir de detergentes em vasilhas e frutas, incluindo as concentrações de detergentes utilizados, a temperatura e tempo de imersão para água antes dos processos de limpeza, e o material da vasilha, foram avaliados sob o modelo experimento ortogonal pelo método de Taguchi. Através da análise de variância, as ordens de importância dos diferentes parâmetros foram determinadas. As concentrações de triclosan em detergentes domésticos encontravam-se na faixa $1,7x10^{-2}$ - $5,6x10^{-1}$ (triclosan/detergente, mg g^{-1}). Para características residuais, a concentração de detergentes utilizados, bem como os materiais de vasilhas, verificaram-se fatores significativos que afetaram as concentrações residuais de triclosan na vasilha. Por outro lado, a concentração de triclosan nos detergentes foi o único fator que afetou as concentrações residuais de triclosan nos frutos. A dose máxima de exposição de triclosan decorrentes da utilização de detergentes domésticos em Taiwan também foi estimada neste estudo (Shih-Wei et al. 2008).

Silva e Nogueira (2008) propuseram a extração adsortiva em barra de agitação e dessorção líquida seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por espectrofotometria de absorção molecular em sistema de arranjo de díodos (SBSE-LDLc - DAD) para a determinação de triclosan em produtos de cuidados pessoais, matrizes biológicas e ambientais, que estão incluídos em listas de prioridade definidas por várias organizações internacionais reguladoras. Testes sistemáticos em 25 mL de amostras de água enriquecidas ao nível de 10,0 µg L^{-1} indicaram que o melhor desempenho analítico para determinação de triclosan foi obtido com barras de agitação revestidas com 126 µL de polidimetilsiloxano, usando-se um tempo de equilíbrio de 1 hora (1000 rpm), seguido de extração com acetonitrila

sob sonicação (60 min). A partir dos dados obtidos, boa recuperação e repetibilidade foram obtidos, proporcionando recuperações experimentais médias (78,5 ± 2,2%), embora ligeiramente inferior ao equilíbrio teórico (99,7%) descrito pelos coeficientes de partição octanol / água (KPDMS / W < KO / W). O desempenho analítico revelou precisão adequada (<3,6%), limites de detecção da ordem de 0,1 g L^{-1} e intervalo dinâmico linear (r^2> 0,9992) de 0,4 a 108,0 g L^{-1}. A aplicação do método para determinar triclosan em matrizes reais comerciais, tais como pasta de dentes, saliva e amostras de águas residuais urbanas, mostrou seletividade apropriada, alta sensibilidade e precisão, usando a metodologia de adição de padrão para quantificação. O método proposto mostrou-se viável e sensível, com uso de pequeno volume de amostra para monitorar triclosan em produtos de cuidados pessoais, matrizes biológicas e ambientais no nível de traço, em cumprimento das diretivas reguladoras internacionais (Silva e Nogueira, 2008).

Zhou et al. (2009) desenvolveram um método para a determinação de triclosan em água usando extração em fase sólida e cromatografia liquida de alta eficiência com detecção ultravioleta a 280 nm. Foram estudados três materiais de extração: MEP (TM, 60 mg, 3 mL) ; LC-18 (500 mg,3 mL) e Envi-18 (500 mg, 3 mL) com três diferentes eluentes, a saber, metanol, acetonitrila e acetato de etila, obtendo-se melhor recuperação com Envi-18 e acetato de etila como eluente. O limite de detecção do método foi 3,91 ng L^{-1} com desvio padrão relativo na faixa 2,02- 4,69%. A recuperação de triclosan foi de 93,68 a 97,42%. Este método foi aplicado a amostras de água de estações de tratamento de águas residuais em Shanghai. Foram determinadas concentrações de triclosan em amostras de águas residuais na faixa de 533 ng L^{-1} a 774 ng L^{-1} e em amostras de efluentes na faixa de 80,14 ng L^{-1} – 249,72 ng L^{-1}. A eficiência de remoção do processo todo variou de 62,59 a 67,74 % (Zhou et al. 2009).

1.3. Cromatografia por Injeção Sequencial

Os métodos analíticos em fluxo com detectores baseados em sistemas óticos ou eletroquímicos podem ser aplicados na determinação de compostos orgânicos que apresentem grupos cromóforos, fluorescentes ou eletroativos, seja na molécula de interesse, ou na molécula obtida após derivatização apropriada. Uma etapa de concentração eficiente viabilizaria a aplicação destes métodos nos níveis de concentração encontrados em águas naturais e de abastecimento, sendo uma alternativa aos métodos baseados em cromatografia a gás ou líquido, que apesar da alta sensibilidade e seletividade, especialmente quando acoplada a espectrômetros de massa como detectores, apresentam um custo elevado. Este custo chega ser proibitivo para laboratórios de países em desenvolvimento, de modo que métodos alternativos são importantes para uma avaliação inicial da qualidade das águas por tais laboratórios. Como exemplo pode-se mencionar um sistema de análise por injeção sequencial configurado pra realizar separações cromatográficas e com detector UV-Vis, cujo custo instrumental é da ordem de U$20,000.00, enquanto cromatógrafos a líquido acoplados a espectrômetros de massa têm custo aproximado de U$ 150,000.00.

Métodos analíticos automatizados ou mecanizados em condições de fluxo contínuo e análise por injeção em fluxo permitem uma elevada freqüência de amostragem, sendo que configurações modernas envolvendo os conceitos de injeção seqüencial (SIA) (Ruzicka, et al. 1990) e multicomutação com amostragem binária (Reis et al. 1994) possibilitam uma grande economia de reagentes, uma vez que as soluções não são mais bombeadas continuamente, mas sim intermitentemente, apenas no instante da análise.

A instrumentação em um sistema SIA consiste de uma bomba de pistão (ou peristáltica), uma única linha de transmissão e uma válvula seletora (FIGURA 1.6.) que é o componente principal do sistema, contendo várias portas (8 no modelo mostrado), existindo

uma porta comum, que tem acesso a cada uma das outras, individualmente, com a rotação da válvula. A ligação da válvula ao sistema de propulsão de líquidos é feita com uma bobina coletora. As outras portas são conectadas a reagentes, amostra, padrões, detector, reservatório para acúmulo de resíduos. Um computador comanda a bomba e a válvula com um software apropriado para controle sincronizado do movimento de ambos, assim como a aquisição de dados do detector.

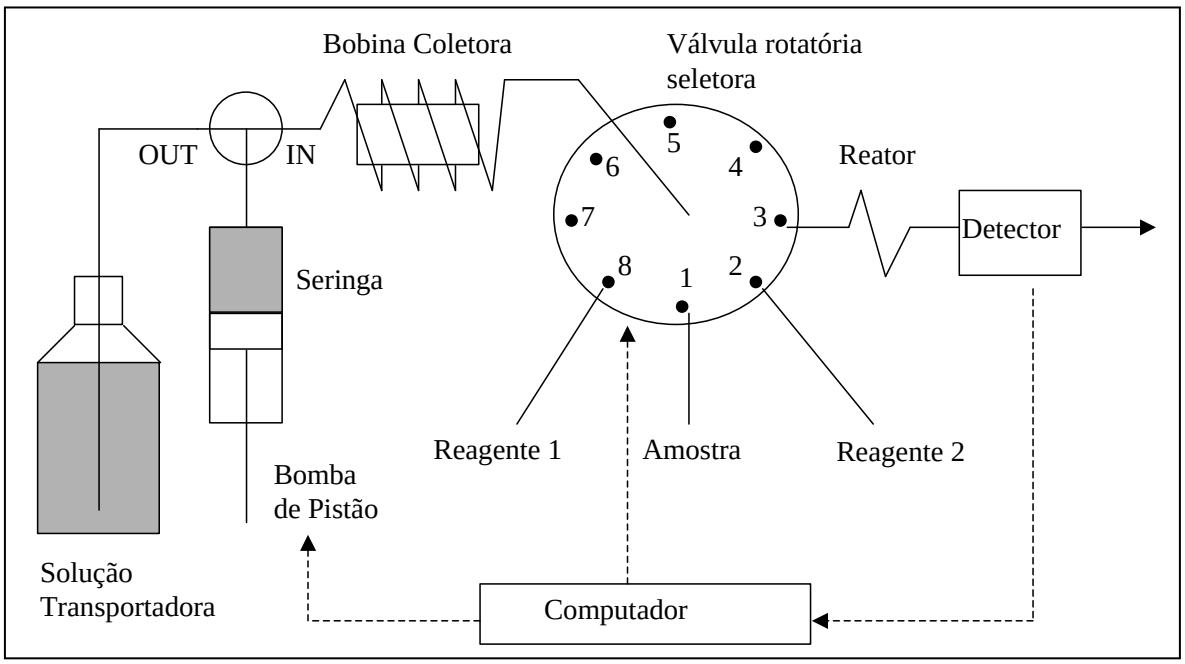

FIGURA 1.6. Sistema típico de análise por injeção seqüencial.

Inicialmente preenche-se a bobina coletora e o reator com a solução transportadora, enquanto os tubos que conectam as portas da válvula rotatória com os frascos de reagentes e amostras são preenchidos com as respectivas soluções. Para início da análise, a válvula da seringa posiciona-se em OUT e o pistão aspira um volume de solução transportadora para dentro da seringa. Este volume deve ser o suficiente para impulsionar a mistura reacional pelo

reator e detector, lavando o sistema para a próxima análise. Em seguida, a válvula da seringa posiciona-se em IN e, com movimentos sincronizados da bomba de pistão e da válvula rotatória, volumes apropriados de reagentes e amostra são seqüencialmente aspirados para dentro da bobina coletora. Finalmente, a válvula rotatória coloca em contato a bobina coletora com o detector (porta 3 na FIGURA1.6), e a bomba de pistão esvazia a seringa. No percurso entre os frascos de reagente, bobina coletora, reator e detector, ocorre a sobreposição das zonas de amostra e de reagentes por dispersão axial e radial, levando a formação do produto da reação que é então detectado na cela de fluxo. A conexão de acessórios às portas da válvula seletora permite a realização de diluições (Oliveira et al. 1998), misturas (Galhardo et al. 2000), adições de padrão (Silva et al. 2003; dos Santos et al. 2005); extrações líquido-líquido (Peterson et al. 1997) ou sólido-líquido (Miro et al. 2005), etc.

A realização de análises simultâneas ou de multicomponentes em sistemas de análise por injeção em fluxo ou injeção sequencial tem sido objetivo de vários grupos de pesquisa (Gomez e Callao, 2007). O acoplamento de técnicas de análise em fluxo com sistemas de separação tem sido descrito visando atingir os objetivos de análises simultâneas e de multicomponentes. A análise por injeção sequencial tem sido acoplada, por exemplo, a eletroforese capilar (Petr e Karlberg, 2009). O acoplamento de análise de injeção seqüencial com a cromatografia liquida de alta eficiência também é possível, sendo que a introdução de amostra é feita depois de extração em fase sólida ou de uma derivatização pré-coluna (Economou, 2005). Nesse caso, entretanto, a função do sistema SIA deve ser o de manusear as soluções nas etapas de pré-concentração e/ou derivatização e injeção da zona de amostra na alça de amostragem do cromatógrafo, pois as colunas recheadas com partículas esféricas de diâmetro < 5 µm, comumente usadas em HPLC, requerem condições de operação de alta pressão, além disso, estas colunas requerem filtros nas extremidades para manter as partículas das fases estacionárias (Martin e Guiochon, 2005; Klodzinka et al. 2006).

Na primeira década dos anos 2000 essas pesquisas se beneficiaram do acoplamento entre sistemas de fluxo de baixa pressão e fases estacionárias monolíticas (Paull e Nesterenko, 2005). Fases estacionárias monolíticas permitem o fluxo de fase móvel sob condições de pressão relativamente baixas, com altas taxas de transferência de massa, sendo constituídas, entre outros, por cilindros contínuos de sílica, ou sílica modificada com octadecilsilano. Colunas monolíticas possuem estrutura bimodal de macro e mesoporos, sendo que os macroporos atuam como canais com cerca de 2 µm de diâmetro que permitem o fluxo de fase móvel sob baixas pressões. Mesoporos tem diâmetros de aproximadamente 13 nm, criando uma área superficial grande e uniforme onde os processos de adsorção ou partição ocorrem (Christian, 2003; Faria et al. 2006). Essa configuração permite separações eficientes sob condições de vazões muito mais elevadas do que aquelas usadas em colunas empacotadas, proporcionando significativa redução dos tempos de análise.

O emprego das colunas monolíticas em HPLC tráz vantagens frente às colunas recheadas com partículas. Uma das principais vantagens é a possibilidade de realizar separações rápidas em vazões elevadas da fase móvel, sem comprometer a resolução cromatográfica. Além de operar em baixas pressões, aproximadamente seis vezes menores do que nas colunas recheadas, permitindo o acoplamento em linha da injeção sequencial com separações cromatográficas de alta eficiência, conseguindo-se desta maneira a automação das etapas de SPE ou da derivatização dos analitos de interesse. Estas vantagens já expostas são um atrativo para laboratórios de análise de rotina (Klodzinka et al. 2006; Faria et al. 2006).

O aparecimento de colunas porosas monolíticas foi considerado um importante avanço no desenvolvimento de fases estacionárias para cromatografia a líquido de alta eficiência (Paull e Nesterenko, 2005), conforme pode ser atestado por um grande número de revisões que tem aparecido na literatura (Siouffi, 2003). Satinsky et al. (2003) propuseram a utilização das colunas monolíticas em sistemas SIA permitindo separações cromatográficas com perfil

similar a de HPLC. Estes autores propuseram então o acrônimo SIC (do inglês Sequential Injection Chromatography) para a nova técnica. Satinsky et al. (2003) demonstraram que a bomba de pistão utilizada nos sistemas de injeção seqüencial é capaz de impulsionar a solução transportadora através de colunas monolíticas de sílica modificada com octadecilsilano usando vazões que possibilitam a separação de componentes de misturas simples. Com isso, a solução transportadora passa a exercer a função de fase móvel, e separações simples podem ser efetuadas. A utilização das colunas monolíticas em sistemas de injeção seqüencial ou em HPLC leva a uma significativa redução de tempo e custo nas análises, principalmente considerando-se a diminuição no consumo de fase móvel em sistemas de HPLC.

Esses estudos abriram um amplo campo de pesquisa no desenvolvimento dos métodos de injeção seqüencial com separação em linha (Chocholus et al. 2006). Uma série de artigos descrevendo aplicações da cromatografia por injeção sequencial à determinação de fármacos foi publicada, sendo descritas, por exemplo, separações de ácido salicílico e éster de metil salicilato (Huclova et al. 2003), ou paracetamol, cafeína, ácido acetil salicilico, ácido benzóico em produtos farmacêuticos (Satinsky et al. 2004). Uma revisão desses trabalhos foi apresentada por Chocholous et al (2007). Os autores argumentam que SIC é uma técnica em evolução e que aumenta as potencialidades dos sistemas de análise por injeção sequencial e de HPLC. Em termos comparativos, a eficiência de métodos baseados em SIC se mostrou similar à de HPLC para os mesmos tipos de coluna. Algumas características vantajosas de SIC seriam a fácil implantação de estratégias de derivatizações pré- e pós-coluna, reduzido consumo de solventes e de geração de resíduos, conseqüência da natureza descontínua do fluxo. Por outro lado, SIC é limitado em termos de disponibilidade de colunas (limita-se a colunas monolíticas), pela baixa capacidade volumétrica das bombas de seringa (5 a 10 mL), bem como por uma menor robustez mecânica. Este último aspecto é principalmente causado por vazamentos de fase móvel pelas válvulas do sistema, decorrentes da pressão necessária para

fazer fluir a fase móvel. Isso se deve ao fato de que as colunas monolíticas foram concebidas para utilização em sistemas convencionais de HPLC a altas vazões. Apesar das pressões serem muito baixas para sistemas cromatográficos convencionais, para os sistemas de análise de injeção em fluxo essa pressão se aproxima ao limite suportado pelo instrumento, causando vazamentos com frequência.

Outra publicação descreve a utilização de um método baseado no acoplamento on-line de um sistema de fluxo multisseringa com uma coluna monolítica para determinação simultânea de hidroclorotiazida e de losartana potássica em comprimidos. O sistema compreendeu um módulo de multisseringa, três válvulas solenóides de baixa pressão, uma coluna monolítica C18 (25 mm x 4,6 mm ID), e um detector foto-diodos. A fase móvel foi de 10 mmol L^{-1} dihidrogenofosfato de potássio (pH 3,1)-acetonitrila-metanol (65:33:2 v / v / v), a uma vazão de 0,8 mL min^{-1}. A detecção por UV foi realizada em 226 nm. O método cromatográfico multisseringa (MSC) com detecção espectrofotométrica UV foi otimizado e validado. O tempo de análise foi de cerca de 400 s. O método foi aplicado a análises rotineiras de ambos compostos em comprimidos. O acoplamento das colunas monolíticas com análise por injeção em fluxo comandado por multisseringa proporciona uma excelente e barata ferramenta para realizar separações, sem uso de instrumentação para HPLC (Obando et al. 2008).

Um sistema de fluxo por multicomutação baseado em tempo é proposto para a adequada seleção e modulação da composição da fase móvel na cromatografia por injeção seqüencial (SI)/ injeção por fluxo (FI). O módulo de análises de fluxo envolve o acoplamento in-line de uma coluna cromatográfica monolítica (25 x 4,3 mm) em fase reversa, com um modo de injeção de fluxo por multisseringa, com um conjunto de válvulas solenóides. A técnica proposta foi aplicada para a determinação espectrofotométrica simultânea de tiamina (B1), piridoxina (B6) e cianocobalamina (B12), que foram tomados como analitos modelo. O

método de separação se baseia em um protocolo de duas etapas de eluição isocrática com a utilização da bomba multisseringa para fornecimento inicial de 50 mmol L^{-1} de acetato de amônio (pH 7,0) por 2,4 minutos seguidos de 50 mmol L^{-1} de acetato de amônio e de metanol (80:20, v / v) por 6,4 min a 0,5 mL min^{-1} e temperatura ambiente. A detecção foi realizada em comprimento de onda máximo para cada vitamina: 280 nm para a vitamina B1, 325 nm para a vitamina B6, e 360 nm para B12. O método de planejamento experimental revelou que a resolução das vitaminas alvo é altamente dependente do pH, da porcentagem de modificadores orgânicos e da interação de segunda ordem entre esses parâmetros. O método de separação em coluna monolítica baseado em fluxo comandado por multisseringa, que seria encarado como uma alternativa de baixo custo em relação à cromatografia líquida de alta resolução, foi aplicado para a separação e determinação das vitaminas B1, B6 e B12 em diferentes formas de dosagens farmacêuticas em menos de 9 min. A comparação estatística dos resultados do procedimento proposto com os obtidos pelo método HPLC adotado pela Farmacopéia dos EUA revelou que não houve diferenças significativas no intervalo de confiança de 95% (Fernandez et al. 2008).

O conceito de cromatografia por injeção seqüencial (SIC) foi explorado por Rigobello-Masini et al. (2008) para automatizar a determinação fluorimétrica de aminoácidos após a derivação pré-coluna com o-ftaldialdeído (OPA) na presença de 2-mercaptoetanol (2MCE) utilizando uma fase estacionária C18 monolítica. O método é de baixo custo, e está baseado em cinco passos de eluições isocráticas. A primeira etapa emprega a mistura de metanol: tetrahidrofurano: 10 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 7,2) na proporção volumétrica de 8:1:91; os outros passos usam metanol: 10 mmol L^{-1} de tampão fosfato (pH 7,2) nas proporções volumétricas de 20:80, 35:65, 50:50 e 65:35. A vazão que permitiu melhor separação foi a de 10 μL s^{-1}. Com a coluna de 25 mm foi possível separar ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (ASN), serina (Ser), glutamina (Gln), soja (Gly),

treonina (Thr), citruline (Ctr), arginina (Arg), alanina (Ala), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), ornitina (Orn) e lisina (Lys), com resolução> 1.2, bem como metionina (Met) e valina (Val), com resolução de 0,6. Sob estas condições isoleucina (Ile) e leucina (Leu) co-eluíram. Todo o ciclo de derivatização de aminoácidos, separação cromatográfica e condicionamento de coluna no final de separação duraram 25 minutos usando vazão de 10 µL s^{-1}. Em uma vazão de 40 µL s^{-1} o tempo foi reduzido para 10 minutos. Os limites de detecção variaram de 0,092 µmol L^{-1} de Tyr para 0,51 µmol L^{-1} para Orn. O método foi aplicado com sucesso na determinação dos aminoácidos livres intracelulares na alga verde *Tetraselmis gracilis* durante um período de sete dias de cultivo. As amostras fortificadas com quantidades conhecidas de aminoácidos resultaram em recuperações entre 94 e 112% (Rigobello-Masini et al. 2008).

Com relação a compostos fenólicos, Ballesta-Claver et al. (2011) propuseram recentemente um método de análise por injeção em fluxo para determinação de floroglicinol, ácido 2,4 dihidroxibenzoico, ácido salicílico, metil parabeno e n-propil galato usando uma coluna monolítica de 5 mm de comprimento (4,3 mm de diâmetro) e fase móvel constituída por tampão pH 3,0 ácido acético/acetato e 5% (v/v) de acetonitrila. A detecção foi baseada em medidas de quimiluminescência provocada pela reação com Ce(IV) e Rodamina 6G. O tempo de análise foi de 280 s, com frequência de amostragem de 13 determinações por hora. Os limites de detecção variaram entre 2,3 x 10^{-8} mol L^{-1} para ácido salicílico e 4,1 x 10^{-6} mol L^{-1} para o n-propil galato, apresentando desvios padrões relativos entre 2,8 % para ácido 2,4-dihidroxibenzóico e 6,8% para o n-propil galato. O método foi aplicado a produtos farmacêuticos observando-se concordância satisfatória com os resultados obtidos por HPLC, usado como método de referência. Em trabalho anterior de determinação de compostos fenólicos (fenol, 2,4-dimetilfenol, 4-cloro 3-metilfenol, 2-fenil fenol e 2-benzil 4-clorofenol), Gomez et al. (2007) utilizaram um sistema SIC acoplado a coluna monolítica de 25 x 4,3 mm, detector de arranjo de diodos e ferramentas quimiométricas (resolução de curvas multivariada

por mínimos quadrados alternados) para contornar a baixa resolução de alguns destes compostos. O método foi aplicado com sucesso na determinação dos compostos em águas naturais e desinfetantes. Até o momento não foram descritos artigos descrevendo a determinação de triclosan por essas técnicas.

1.4. Adsorção e adsorventes

Argilominerais são silicatos de Al, Fe e Mg hidratados, com estruturas cristalinas em camadas ou lamelas, constituídos por folhas contínuas de tetraedros SiO_2, ordenados de forma hexagonal, condensados com folhas octaédricas de hidróxidos de metais tri e bivalentes; a maioria dos argilominerais, naturalmente, é constituída essencialmente por partículas (cristais) com algumas dimensões geralmente abaixo de 2μm, sendo materiais encontrados na natureza (Coelho et al. 2007). Esses sólidos lamelares podem ser constituídos por lamelas neutras, como é o caso da caolinita, ou então formados por lamelas carregadas negativa ou positivamente.

Argilas que possuem lamelas carregadas negativamente apresentam cátions em sua região interlamelar, para compensar as cargas negativas, sendo conhecidas como argilas catiônicas. Exemplos destas são a montmorilonita, a vermiculita e a muscovita. As argilas que apresentam lamelas carregadas positivamente possuem ânions em seu ambiente interlamelar e são chamadas de argilas aniônicas. Entre estas, exemplo mais conhecido é a hidrotalcita (Vaccari, 1998).

Do mesmo modo que em outros sólidos lamelares, as reações de intercalação também podem ser realizadas nas argilas, de tal forma que o íon (ânion ou cátion), originalmente presente na região interlamelar, seja trocado por outras espécies químicas carregadas negativa

ou positivamente (Ferreira et al. 2007). Tal comportamento permite seu emprego como adsorvente para muitos poluentes (Ferreira et al. 2007).

A montmorilonita (FIGURA 1.7) consiste em um grupo de argilominerais do tipo 2:1, ou seja, são formados pela reunião de duas lâminas tetraédricas SiO_2, intercaladas por uma lâmina octaédrica de Al_2O_3 unidas pelos oxigênios dos octaedros (Luchese et al. 2001). Os principais representantes deste grupo de argilominerais são as vermiculitas, smectitas e a montmorilonitas. A vermiculita, devido à capacidade de expandir-se, apresenta faces ativas entre as camadas podendo atingir até 15 Å de espaçamento entre as mesmas, aumentando a superfície de contato e conseqüentemente o poder de adsorção. Já a montmorilonita é ainda mais expansível que a vermiculita chegando atingir até 18 Å entre as camadas (Luchese et al. 2001).

A possibilidade de trocar os cátions existentes entre as camadas dos argilominerais pode propiciar a inserção de espécies que modificam as características originalmente hidrofílicas dos mesmos, gerando um caráter mais organofílico, como no caso da utilização de sais orgânicos (Prost e Yaron, 2001).

Entre os principais modificadores orgânicos existentes, encontram-se os sais de alquil-amônio. O aumento do número de carbonos na cadeia orgânica propicia um caráter mais hidrofóbico ao argilomineral, podendo-se produzir um material cujas características sejam mais seletivas para um dado grupo de poluente. Estudos de adsorção de sais de alquil-amônio em fases minerais mostram não haver aumento na quantidade adsorvida após a capacidade máxima dos minerais, que é restringida pela capacidade de troca catiônica (CTC) dos mesmos (Klapyta et al. 2001; Bartelt-Hunt et al. 2003).

É importante reconhecer que, com o aumento do conhecimento químico dos sólidos lamelares naturais, muitos compostos puderam ser sintetizados por métodos de preparação relativamente simples e que utilizam insumos de baixo custo. Devido às características

químicas e físicas descritas, os materiais lamelares podem ser planejados e sintetizados para que assim venham a ter aplicações ambientais como, por exemplo, na remediação de efluentes, tirando partido tanto das reações de intercalação como da adsorção das espécies químicas pela superfície (Ferreira et al. 2007).

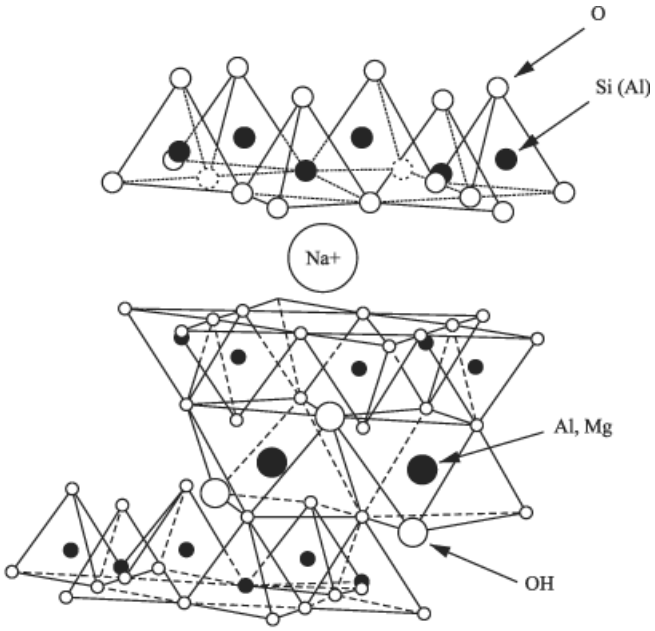

FIGURA 1.7. Representação da estrutura da montmorilonita

Adsorção de triclosan em três adsorventes, carvão ativado, caulinita e montomorilonita foi estudada em função do pH, força iônica e presença de ácidos húmicos. As maiores porcentagens de adsorção foram obtidas em pH baixo, em função principalmente da carga do adsorvente e da ionização do triclosan. Em pH 3,0 o aumento da força iônica aumentou a adsorção de triclosan por fatores de 1,2, 4 e 3,5 vezes, respectivamente, para carvão ativado, caulinita e montmorilonita com o aumento da força iônica de 1,0 x 10^{-3} para 0,50 mol L^{-1}. A adsorção de triclosan na presença de ácido húmico (concentração de 200 mg C L^{-1}) diminuiu cerca de três vezes. Já os argilominerais caulinita e montmorilonita o efeito de ácido húmico foi de difícil interpretação, podendo ser influenciado pela hidrofobicidade do triclosan (log

K_{OW} = 4,76) e pela complexação do triclosan com o ácido húmico (Behera et al. 2010). A diminuição de adsorção de triclosan com o aumento do pH foi também observada em solos. A adição de biosólidos aumentou a capacidade de adsorção provavelmente devido ao aumento dos teores de matéria orgânica, sem entretanto afetar a degradação dos composto (Wu et al. 2009).

Testes de adsorção em batelada em solos para vários compostos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos foram apropriadamente descritos pela equação de Freundlich e a afinidade pelo solo apresentou a seguinte ordem: triclosan > bisfenol > ácido clofíbico > naproxen > diclofenac > ibuprofen. O fator de retenção em solos sugeriu que ibuprofen tem maior potencial de lixiviação pelas águas de percolação enquanto triclosan e bisfenol A mostraram forte retenção no solo, com baixa mobilidade (Xu et al. 2009).

Estudos de adsorção de triclosan e de alguns de seus metabólitos em argilominerais organofilizados, especialmente aqueles obtidos com sais quaternários de alquil amônio (HDTMA), bem como a solos brasileiros ainda não foram descritos na literatura.

O argilomineral montmorilonita tem a característica de possuir lamelas carregadas negativamente, e para compensar esta carga, apresenta cátions em sua região interlamelar. Além disso, esse argilomineral possui elevada capacidade expansível entre as camadas, propiciando a troca do cátion K^+ por moléculas de HDTMA $[CH_3(CH_2)_{15}\text{-}N(CH_3)_3]^+$. Esse modificador é apropriado, pois possui uma cadeia linear com 16 átomos de carbono, propiciando um caráter altamente hidrofóbico à superfície, sendo o material resultante seletivo para remover compostos orgânicos. Esta prática de remoção de contaminantes orgânicos por argilominerais modificados, assim como a preparação simples, se vê justificada pelo uso de insumos de baixo custo (Navarro et al 2009).

2. OBJETIVOS

Essa tese teve como objetivos o desenvolvimento de metodologias de cromatografia a líquido baseadas em injeção sequencial (SIC) e em cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) para determinação de triclosan em amostras de produtos de higiene pessoal e em estudos de adsorção em argilominerais naturais e modificados, visando determinar parâmetros de capacidade e força de adsorção de triclosan e de alguns de seus metabólitos. Para atingir esses objetivos gerais, os objetivos específicos a seguir foram estabelecidos:

- Desenvolver e aplicar metodologia SIC para determinação de triclosan em amostras de enxaguadores bucais.
- Desenvolver metodologias baseadas em SIC e HPLC para separação de triclosan e alguns de seus principais metabólitos, tais como 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol e metiltriclosan
- Investigar a adsorção dos compostos descritos no item anterior em montmorilonita em sua forma monoiônica de K^+
- Modificar a montmorilonita com o reagente organofílico brometo de hexadeciltrimetil amônio (HDTMA) e caracterizar algumas propriedades do material modificado.
- Investigar as propriedades adsortivas da montmorilonita organofilizada frente ao triclosan e seus metabólitos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais utilizados

3.1.1. Reagentes

Foram usados no preparo das soluções: ácido fosfórico concentrado 85% da Merck; Trietilamina ≥ 99,5 % Sigma Aldrich; triclosan (99,7%) Sigma Aldrich; metanol e acetonitrila de grau HPLC (Merck ou J.T. Baker). Padrões analíticos de 2,4 diclorofenol; 2,3,4 triclorofenol; 2,4,6 triclorofenol e metiltriclosan foram adquiridos da Sigma Aldrich; acetato de amônio de grau HPLC da Fluka foi usado no ajuste de pH de soluções de fase móvel.

Montmorilonita K10 (28152-2), com área superficial de 220-270 m^2 g^{-1} e capacidade de troca catiônica 0,59 mmol g^{-1}, foi fornecida pela Aldrich. Brometo de hexadeciltrimetil amônio (HDTMA) foi adquirido da Merck.

3.1.2. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada em destilador de vidro (Marconi, SP) e desionizada até resistividade > 18,2 MΩ cm em um sistema Simplicity 185 da Millipore acoplado a uma lâmpada UV para fins de esterilização. O pH das soluções, quando necessário, foi ajustado por adição de soluções de ácidos ou bases fortes, monitorando-se o pH com um eletrodo de vidro combinado (Ag/AgCl, KCl 3 mol L^{-1}) acoplado a um pH-metro Metrohm 654, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0, 7,0 ou 9,0 adquiridos da Merck.

Todas as soluções de fase móvel foram preparadas com água desionizada e filtradas em membrana de acetato de celulose regenerado (Sartorius) com diâmetro de poro de 0,45 µm e desaeradas em banho de ultrassom por 30 min, seguida de purga com He de alta pureza (Air Products) por 15 min, imediatamente antes das análises. Solução tampão estoque 1 mol L^{-1} de TEA (trietilamina) foi acidificada com ácido fosfórico até um pH 3,5.

Foram preparadas, a partir do tampão estoque 1 mol L^{-1} TEA-fosfato, várias fases móveis de tampão TEA-fosfato 70 mmol L^{-1} em um pH 3,5 com diferentes proporções volumétricas de acetonitrila.

Soluções estoque de triclosan, 2,4 diclorofenol; 2,4,6 triclorofenol e 2,3,4 triclorofenol e metiltriclosan de concentração 2000 mg L^{-1} foram preparadas em metanol grau HPLC e estocadas em refrigerador em frascos âmbar para proteção contra incidência de luz. As soluções de referência desses compostos foram preparadas por diluições apropriadas dessas soluções estoque em balões volumétricos, usando-se a própria fase móvel para completar o volume e acertar o menisco.

Solução tampão de estoque de acetato de amônio 1 mol L^{-1} foi preparada a partir do sal sólido, com ajuste de pH a um valor de 3,5 ou 5,5 usando solução de HCl.

Soluções tampão de acetato de amônio 20 mmol L^{-1} foram preparadas a partir da solução tampão estoque 1 mol L^{-1}, ajustando-se o pH a 5,5 em alguns casos.

Fases móveis foram preparadas com diferentes proporções de metanol e solução aquosa de acetato de amônio 20 mmol L^{-1} a pH = 5,5.

Fases móveis de limpeza da coluna e dos instrumentos de cromatografia foram preparadas nas proporções metanol: água 80:20 (v v^{-1}) e 5:95 (v v^{-1}), respectivamente. As colunas cromatográficas foram estocadas em acetonitrila: água 60: 40 (v v^{-1}).

3.2. Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, modelo H10, METTLER, sensível ao nível de 0,1 mg;

- Medidor de pH, modelo 654, METROHM;

-Banho de ultrassom 2510 Branson

-Misturador do tipo vortex com controle de velocidade 500 – 2500 rpm (Heidolph Reax)

-Centrifuga Excelsa Fanem modelo 206 BL

-Sistema de filtração Hengod T&D com bomba de sucção

-Membrana de filtração de 0,45 µm LCR de PTFE modificada ou acetato de celulose regenerado Millipore ou Sartorius para filtração de solventes orgânicos e aquosos, 100/cx.

-Filtro para seringa com poros de 0,45 µm e diâmetro de 13 mm não estéril LCR de PTFE modificado Millipore para filtração de solventes orgânicos e aquosos 100/cx.

-Micropipetas de capacidades para 20, 100,1000 e 5000 µL H-T modelo Labmate +

-Câmara incubadora Marconi, modelo MA-832, com agitação e controle de temperatura para estudos de adsorção.

As determinações por HPLC foram feitas com um cromatógrafo Shimadzu modelo LC 9A (Tóquio, Japão) equipado com o detector UV, modelo SPD 6 AV para medidas de absorbância. O controle do cromatógrafo e o tratamento de dados foram feitos com a versão 1.64 do software LC Workstation Class-LC 10 da Shimadzu. Injeção da amostra foi feita usando uma válvula rotatória Rheodyne (Rohnert Park, CA, EUA) com uma alça de amostragem de 20 µL. Colunas monolíticas Onyx C_{18} foram adquiridas da Phenomenex (Torrance, CA, EUA) com as dimensões 100 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro e usando uma coluna guarda do

mesmo material e fornecedor com dimensões de 5 x 4,6 mm. Foi também utilizada a coluna cromatográfica C_{18} Synergi™ 4 µm Fusion-RP 80 Å da Phenomenex, com partículas de 4 µm e dimensões de 150 x 4,6 mm, também protegida por coluna guarda do mesmo fabricante.

Sistema de cromatografia liquido acelerada SIChrom ™ foi fornecido pela FIAlab® Instruments (Bellevue, WA, EUA). O sistema de injeção seqüencial é esquematizado na FIGURA3.1, onde PP é uma bomba de pistão modelo S17 PDP da Sapphire Engineering™ (Pocasset, MA, EUA) com capacidade de 4,0 mL, construída em ULTEM® e pistão (P) de cerâmica, acoplada a uma válvula seletora (SV) de 10 portas da Valco (Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, EUA). Conforme mostrado na FIGURA 3.1, as portas 9 e 10 de SV são conectadas internamente e permitem o preenchimento da bomba de pistão com a fase móvel de eluição inicial e condicionamento da coluna (MP_1), o que é feito pela porta traseira (RP_1) do corpo da bomba. A porta frontal de PP (FP) é conectada com a porta central da SV através da bobina coletora (HC), a qual é feita com tubo de Teflon de 4 m de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno (capacidade de 2 mL). Na parte traseira do sistema de bombeamento ainda há uma porta (RP_2) conectada a uma válvula de alívio de pressão (RV), que abre quando a pressão no sistema se torna maior do que 500 psi. A cada uma das portas de SV é atribuída uma solução ou dispositivo, sendo que a porta 2 é conectada ao sistema de separação e detecção, constituído pela coluna guarda (GC), coluna monolítica (MC) Onyx (Phenomenex) de 25 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro, sistema de detecção (D) e descarte (W). A conexão da porta 2 até ao detector foi feita com tubo de PEEK de 0,25 mm de diâmetro interno.

O sistema de detecção espectrofotométrico é constituído por:

-Fonte de radiação de deutério e halogênio Uv-Vis-Nir (DH-2000-Mikropack)

-Detector CCD (dispositivo de carga acoplado) (USB 4000-Uv-Vis Ocean Optics)

-Celas de 1- e 4-cm de caminho óptico com janelas de quartzo (FIAlab Instruments)

-Fibras ópticas de 600 µm foram usadas para transmissão de radiação da fonte para a cela de fluxo e desta para o detector.

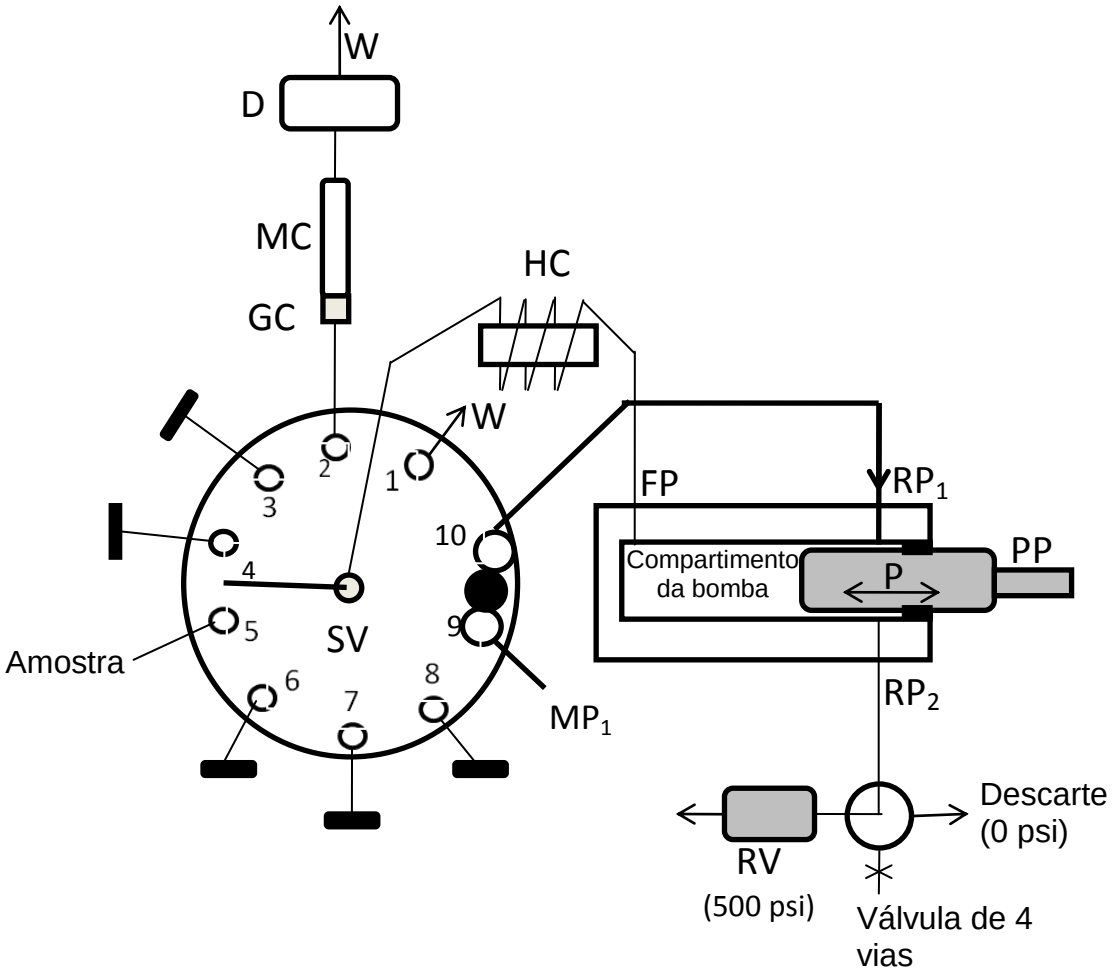

FIGURA 3.1. Esquema do sistema de cromatografia por injeção seqüencial para determinação de triclosan. (MC=coluna monolítica; GC= pré-coluna; SV= válvula seletora com 10 portas; MP_1= fase móvel; HC=bobina coletora; W=descarte; PP= bomba de pistão tendo um P= pistão cerâmico para dispensar ou aspirar soluções; RP_1 e RP_2 = portas traseiras; FP=porta frontal; RV válvula de alivio. Na figura o circulo preenchido negro representa um ranhura interna que permite conectar as porta 9 e 10 da válvula, através das quais a fase móvel é introduzida no compartimento (reservatório) da bomba. Nessa posição, a ranhura reta é mostrada entre as portas 4 e 5, ou seja, quando o pistão aspira fase móvel através da porta 9, as demais soluções conectadas à válvula seletora não são aspiradas para a bobina coletora. Em qualquer outra posição de SV a ranhura circular não conecta portas adjacentes.

3.3. Análise de Amostras de Enxaguadores Bucais

Amostras de enxaguadores bucais cujo rótulo indicava a presença de triclosan foram adquiridos em farmácias e mercados locais. Antes das análises, alíquotas das amostras foram filtradas em filtros de seringa, pipetando-se volumes apropriados da amostra filtrada (250; 500; 1000 µL) para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume até a marca com a fase móvel em estudo.

3.3.1. Procedimento de injeção sequencial para determinação de triclosan nas amostras

Para essas análises a detecção foi feita na região ultravioleta usando dois comprimentos de onda, de 230 e 280 nm, e uma cela de fluxo de 1 cm de caminho óptico. A composição da fase móvel otimizada foi 67,5: 32,5 (v v^{-1}) ACN: tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH =3,5. O sistema é controlado pelo software FIAlab for Windows. Antes de começar a análise a coluna foi condicionada com a fase móvel de trabalho. As etapas do procedimento automatizado da análise são mostradas na TABELA3.1, baseando-se no esquema do instrumento apresentado anteriormente na FIGURA3.1.

Na TABELA3.1 o procedimento começa com a etapa 1, na qual é executado o preenchimento do compartimento da bomba (FIGURA3.1) com a fase móvel, seguido pelas etapas 2 e 3 que consistem na limpeza da linha de amostragem com amostra a ser analisada e descarte do excesso que foi aspirado para a bobina coletora. Por último, a etapa 4, compreende a amostragem, injeção e transporte da amostra pela fase móvel na coluna onde ocorre a separação para posterior detecção do analito de interesse. O tempo empregado no processo total foi 2,5 min. Os estudos para a otimização da vazão não requerem mudanças adicionais no programa. Por outro lado os estudos do volume de amostra requerem pequenas

modificações de tal forma a garantir que os volumes totais, aspirados e dispensados, sejam iguais.

TABELA3.1. Seqüência de etapas do programa SIC para determinação de triclosan

Etapa	Componente	Comando	Valor do parâmetro	Descrição
1	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 9 (MP_1) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 3500 µL	Preenchendo o compartimento da bomba com MP_1
2	SV Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 5 (solução de referência/amostra) Aspira Espera finalizar	 100 µL	Preenchendo a linha de amostragem com padrão ou amostra
3	SV Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 1(descarte) Dispensa Espera finalizar	 300 µL	Descartando o excesso de amostra da bobina coletora HC
4	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 5 (solução de referência/amostra) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 50 µL	Amostragem para a análise
	SV Detector Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão Detector	Porta 2 (MC) Inicia a aquisição de dados Vazão Dispensa Espera finalizar Finaliza aquisição de dados	 30 μLs^{-1} 3350 µL	Injetando a amostra na coluna para realizar a separação e detecção
		Fim do ciclo		

3.3.2. Procedimento adotado como método de referência por HPLC-UV

Piccoli et al. (2002) propuseram a determinação de triclosan em produtos de higiene pessoal por cromatografia liquida em fase reversa com eluição isocrática. As condições experimentais descritas foram: fase móvel acetonitrila- fosfato de trietilamina (70 mM a pH = 3,5) na relação de 55:45 (v v^{-1}); coluna C18 (150 x 3 µm x 3 mm d.i) com detecção ultravioleta em 230 nm e 280 nm; volume de amostra de 20 µL; vazão da fase móvel 0,4 mL min^{-1}. Estas condições foram alteradas por não se possuir coluna com as mesmas características. A vazão da fase móvel foi mudada já que com este valor o tempo de eluição do triclosan seria muito longo (40 min). As medições foram feitas em comprimentos de onda de 240 nm e 280 nm a uma vazão de 1,0 ml min^{-1}, mantendo-se a composição da fase móvel como usado no artigo de referência.

3.4. Separação de triclosan e clorofenois por cromatografia por injeção sequencial (SIC)

Para a determinação de triclosan (TCS) na presença de alguns de seus clorofenois relacionados, tais como 2,4 diclorofenol (2,4 DCP), 2,3,4 triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,4,6 triclorofenol (2,4,6 TCP) foi necessário a implantação da eluição passo a passo com duas etapas de eluição isocráticas e recondicionamento da coluna no final do ciclo de análise. A configuração instrumental é semelhante àquela mostrada na FIGURA3.1, mas com a inclusão de uma fase móvel adicional na porta 7 da válvula seletora (SV). Em virtude do expressivo aumento do custo da acetonitrila e da dificuldade de sua aquisição durante o ano de 2009, a composição da fase móvel foi alterada em relação àquela apresentada no item anterior dessa tese. No presente estudo, a fase móvel MP_1 foi constituída por metanol (MeOH): tampão

acetato de amônio 20 mmol L^{-1} pH 5,5 na proporção 60:40 (v v^{-1}). A fase móvel MP_2 foi composta por MeOH: tampão acetato de amônio 20 mmol L^{-1}, pH 5,5, na proporção 70:30 (v v^{-1}). A detecção foi feita na região ultravioleta usando o comprimento de onda de trabalho de 240 nm com referência a 350 nm e uma cela de fluxo de 4 cm de caminho óptico. O procedimento de injeção de amostra e separação é descrito em detalhes na TABELA3.2.

O procedimento começa com a etapa 1 (TABELA3.2) onde é executado o preenchimento da bomba com a fase móvel MP_1, seguido pelas etapas 2 e 3 que consistem na limpeza da linha de amostragem com amostra a ser analisada. A etapa 4 compreende a amostragem e a primeira etapa de eluição isocrática com 2,7 mL da fase móvel 1 (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). O menor conteúdo de modificador orgânico (MeOH) na fase móvel da primeira etapa isocrática favorece a eluição dos clorofenois mais polares, retendo os menos polares. As etapas 5 e 6 correspondem a preparação do sistema para executar a 2ª etapa de eluição isocrática. Assim, na etapa 5, aspira-se MP_1 para o compartimento da bomba, deixando ainda espaço (2 mL) para que essa fase móvel, ainda contida na bobina coletora, preencha todo o compartimento da bomba quando, na etapa 6, forem aspirados 2 mL de MP_2 para o interior da bobina coletora. Na etapa 7 ocorre a segunda eluição isocrática com 2mL MP_2 (70:30; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) seguida do recondicionamento da coluna com 2 mL MP_1 (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). Em conjunto, as etapas 5, 6 e 7 representam a eluição com mais conteúdo orgânico para eluir os compostos mais apolares, com um tempo de retenção menor. O tempo empregado no processo total foi 4,95 min. Os estudos para a otimização da vazão não requerem mudanças adicionais no programa.

TABELA 3.2. Sequência de etapas para separação e determinação de TCS, 2,4-DCP, 2,3,4-TCP e 2,4,6-TCP por cromatografia por injeção seqüencial

Etapa	Componente	Comando	Valor do Parâmetro	Execução
1	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 9 (MP_1) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 3900 µL	Preenchendo o compartimento da bomba com MP_1
2	SV Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 5 (solução de referência/amostra) Aspira Espera finalizar	 100 µL	Preenchendo a linha de amostragem com padrão ou amostra
3	SV Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 1(descarte) Dispensa Espera finalizar	 300 µL	Descartando o excesso de amostra da bobina coletora HC
4	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 5 (padrão ou amostra) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 20 µL	Amostragem para a analise
	SV Detector Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 2 (MC) Inicia a aquisição de dados Vazão Dispensa Espera finalizar	 30 μLs^{-1} 2720 µL	Injeção de amostra e 1ª etapa de eluição e detecção
5	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 9 (MP_1) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 1000	Aspirando MP_1 dentro do compartimento da bomba
6	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão	Porta 7 (MP_2) Vazão Aspira Espera finalizar	 100 μLs^{-1} 2000 µL	Aspirando e preenchendo a bobina coletora com MP_2
7	SV Bomba de pistão Bomba de pistão Bomba de pistão Detector	Porta 2 (MC) Vazão Dispensa Espera finalizar Finaliza a aquisição de dados Fim do ciclo	 30 µL s^{-1} 4000	2ª etapa de eluição e recondicionamento da coluna

3.4.1. Separação de triclosan e clorofenois, incluindo metiltriclosan, em sistema SIC com válvula de alta pressão

Por problemas de vazamento na válvula e devido à inclusão do metabolito metiltriclosan a configuração do sistema foi alterada com o propósito de contornar estes inconvenientes para a conclusão dos trabalhos. O sistema de cromatografia a líquido por injeção sequencial modificado é esquematizado na FIGURA3.2. No esquema da Fig 3.1, VS é uma válvula seletora rotatória de 10 portas com capacidade para suportar pressões de até 5000 psi, construída em aço inoxidável, fornecido pela Valco Instruments (Houston, TX, EUA). A bomba de pistão modelo PDP S17 é fornecida pela Sapphire Engineering™ (Pocasset, MA, EUA) e tem capacidade de 4000 µL (volume do reservatório de FM_1). O corpo da bomba e seu interior, que fica em contato com a fase móvel, é construído em ULTEM®. A bomba tem um pistão (embolo) de cerâmica para a propulsão e aspiração de solução. Uma porta frontal na parte superior do corpo da bomba conecta o reservatório de solvente com a porta central da VS através da bobina coletora, que é feita de 4 m de tubo de Teflon com 0,8 mm de diâmetro interno (capacidade de 2000 µL). Uma porta na parte superior traseira no corpo da bomba está ligada ao frasco de solvente (FM_1) através de uma "check-valve" (CV) e uma válvula solenóide de 2-vias (FIGURA3.2). Uma porta adicional na parte traseira inferior do corpo da bomba é conectada, através de uma válvula de 4 vias, a uma válvula de alívio (VA) da Up-Church Científic (Oak Harbor, WA, EUA) que se abre a uma pressão > 1000 psi. A porta 10 de VS está conectada a um filtro de linha com 10 µm de porosidade, que por sua vez se conecta a uma coluna guarda monolítica C_{18} de 5 mm de comprimento por 4,3 mm de diâmetro e a uma coluna monolítica de fase reversa C_{18} Chromolith Flash de 25 mm de comprimento por 4,3 mm, ambas da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A saída da coluna é conectada à cela de fluxo com 40 mm de caminho óptico, que

por sua vez está conectada a uma fonte de Deutério/Tungstênio Halogênio DH 2000 (Mikropack GmBH, Alemanha). A transmissão da radiação da fonte para a cela de fluxo e desta para o espectrômetro foram feitas com cabos de fibra óptica de 600 µm de diâmetro e 51 cm de comprimento

As conexões da porta 10 de VS até a entrada da cela de fluxo é feita com tubo de PEEK (polímero de polieteretercetona) com 0,25 mm de diâmetro interno. Todas as outras conexões são feitas com tubos de Teflon de 0,5 mm de diâmetro interno. Os movimentos da bomba e das válvulas (VS e 2-vias) são sincronizados com a aquisição de dados do detector, sendo controladas pelo software FIAlab5.0 for Windows.

Na continuação se apresenta a descrição detalhada do procedimento do desenvolvimento do método com a nova configuração da FIGURA3.2.

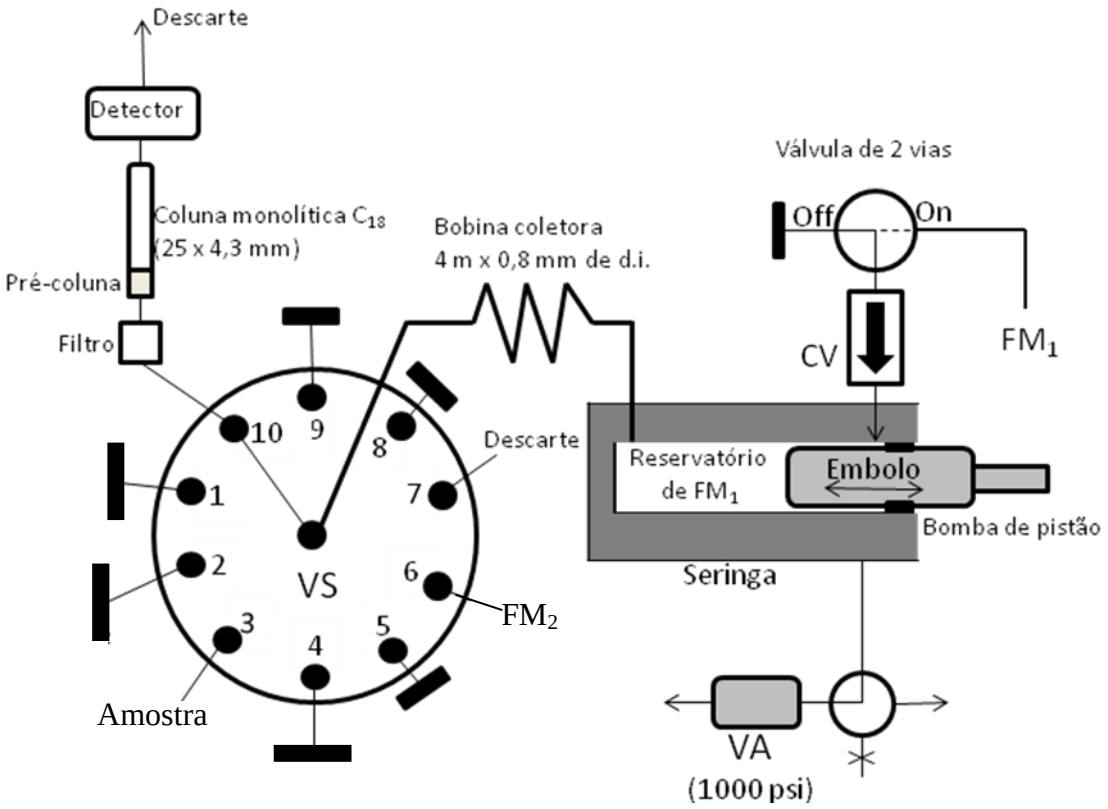

FIGURA 3.2. Esquema para determinação de triclosan, clorofenois e metabolito com o sistema SIChrom^{TM} de cromatografia a liquido por injeção seqüencial com válvula seletora (VS) de alta pressão (5000 psi) acoplada na bomba de pistão (capacidade de 4,0 mL e pressões de até 1000 psi) pela bobina coletora. A conexão da bomba com a Fase Móvel (FM_1) é feita através de uma check-valve (CV) e uma válvula de duas vias. Retângulos pretos representam que as portas de SV estão fechadas com tubo de Teflon sólido. As composições das fases móveis são: FM_1 = metanol (MeOH): tampão acetato de amônio 20 mmol L^{-1} pH 5,5 na proporção 60:40 (v v^{1}), FM_2 = (70:30; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). A detecção foi feita em 240 nm.

O funcionamento do equipamento esquematizado na FIGURA3.2 é resumidamente descrito como:

1. Para preencher o reservatório da bomba (ou seringa) com a fase móvel (FM_1):

Seleciona-se a porta 9 de VS, fechada com Teflon sólido, e a válvula de 2-vias é ligada (posição “on”). Ao se enviar o comando de encher a seringa, o êmbolo do pistão retrai e a

solução do frasco de fase móvel (FM_1) entra no reservatório através da válvula de 2-vias e da check-valve.

2. **Aspirar amostra ou reagentes na bobina coletora**:

A válvula de 2-vias é desligada (posição "off"), de modo que para aspirar soluções para o interior da bobina coletora, aciona-se a porta desejada de VS e envia-se o comando de aspiração para a bomba. Como a válvula de 2-vias na posição "off" fecha o contato com o frasco de fase móvel (FM_1), essa não é aspirada para o interior do reservatório da bomba.

3. **Injeção de amostra e fase móvel em reatores ou coluna**

Seleciona-se a porta desejada e envia-se o comando de injetar um determinado volume a uma determinada vazão. Quando se deseja fazer a separação cromatográfica, injeta-se a amostra na coluna; durante essa etapa a pressão aumenta, mas a check-valve (CV) impede que a solução de fase móvel retorne ao frasco de origem (a válvula de 2-vias nesse caso não resistiria à pressão). Na eventualidade de um aumento de pressão a valores > 1000 psi, a fase móvel é desviada para uma válvula de alívio (VA) acoplada ao corpo da bomba.

3.2. Procedimento de eluição passo a passo de triclosan e metabólitos (2-clorofenol, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e metiltriclosan no sistema SIChrom™ com a configuração da FIGURA 3.2

Preenchimento do reservatório da bomba com a fase móvel: Seleciona-se a porta 9 de VS, aciona-se a válvula de 2-vias (on) e aspira-se 3900 µL de FM_1 a 100 µL s^{-1}.

Limpeza da linha de amostragem com solução representativa da amostra*:* Seleciona-se a porta 3 de VS, desliga-se a válvula de 2-vias e aspira-se 100 µL a 100 µL s^{-1} de amostra para o interior da bobina coletora.

Descarte do excesso de amostra na bobina coletora*:* Seleciona-se a porta 7 (descarte) e dispensa-se 300 µL a 100 µL s^{-1}, incluindo aí o excesso de amostra e um pouco de fase móvel.

Aspiração da mistura de triclosan e metabólitos na bobina coletora e primeira etapa de eluição com FM_1: Através da porta 3 aspira-se 100 µL de amostra a uma vazão de 100 µL s^{-1}. Em seguida, aciona-se a aquisição de dados do detector, seleciona-se a porta 10 da VS e injeta-se mistura na coluna, procedendo-se a eluição com 2800 µL de FM_1 a uma vazão de 30 µL s^{-1}. Nesta etapa são eluídos os compostos 2-clorofenol, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP.

Preenchimento do reservatório da bomba*:* Seleciona-se a porta 9 de VS, liga-se a válvula de duas vias (on) e aspira-se 1000 µL de FM_1 a 100 µL s^{-1}. Após o final da operação a válvula de 2-vias é desligada.

Primeira etapa de eluição com FM_2: Seleciona-se a porta 6 de VS. Em seguida aspira-se 2000 µL de FM_2 para o interior da bobina coletora a uma vazão de 100 µL s^{-1}. Com isso, o volume de FM_1 que estava contido na bobina coletora é deslocado para o interior do reservatório da seringa. Ao final da etapa, posiciona-se a VS na porta 10 e injeta-se 2000 µL de FM_2 na coluna à vazão de 30 µL s^{-1}, promovendo a eluição de triclosan.

Segunda etapa de eluição com FM_2*:* Seleciona-se a porta 6 de VS. Em seguida aspira-se 2000 µL de FM_2 para o interior da bobina coletora a uma vazão de 100 µL s^{-1}. Ao final da etapa, posiciona-se a VS na porta 10 e esvazia-se o reservatório da bomba com uma vazão de 30 µL s^{-1}. Com isso a solução de FM_2 que estava contida na bobina coletora (2 mL) promove a eluição de metiltriclosan e a solução de FM_1 inicia o recondicionamento da coluna

Recondicionamento da coluna*:* Para finalizar o ciclo de análise, seleciona-se a porta 9 de VS e liga-se a válvula de duas vias, aspirando-se 4000 µL de FM_1 para o interior do reservatório da seringa à vazão de 100 µL s^{-1}. Desliga-se a válvula de duas vias, seleciona-se a porta 10 de VS e dispensa-se 4000 µL de FM_1 na coluna à vazão de 30 µL s^{-1}. Ao final dessa

etapa a coluna encontra-se recondicionada e o sistema está pronto para a realização de nova análise.

3.4.2. Separação de triclosan e metabólitos por HPLC com colunas monolítica e empacotada (Synergi 4u 80Å RP)

A Separação de triclosan, clorofenois e o metabolito metiltriclosan por HPLC com emprego de colunas monolitica realizou-se com eluição por gradiente, a dimensão da coluna usada foi de 100x4,6 mm. Foram estudadas diversas fases moveis: acetonitrila/tampão fosfato; metanol/ acetato de amônio, metanol/agua e por ultimo, Acetonitrila/tampão trietilamina fosfato (20 mM a pH = 3,5). A detecção foi feita por absorção de radiação UV a 220 nm.

Na separação de triclosan e metabolitos com emprego de coluna empacotada Synergi com grupo polar embutido, a separação foi realizada por eluição por gradiente com coluna de dimensão de 150x4,6 mm, com partículas de 4 µm. Neste caso também foram estudadas diversas fases móveis. A seleção da fase móvel foi escolhida em função da sua robustez ao longo de várias corridas. A programação escolhida foi em função do melhor desempenho cromatográfico como fator de retenção; número de pratos, assimetria dos picos cromatográficos; resolução e fator de separação obtida que será mostrado na parte de discussão de resultados.

3.5. Estudos de Adsorção

3.5.1. Modificação da montmorilonita com sal de hecadeciltrimetil amônio (HDTMA)

Foi adicionada suspensão de montmorilonita na forma homoiônica de K^+, KMT, sob intensa agitação a um volume de solução de HDTMA 10 mmol L^{-1}, de forma a atingir 100% da capacidade de troca catiônica (CTC). A suspensão formada foi mantida sob agitação a 120 rpm durante 21 dias a temperatura ambiente. Em seguida a fase sólida foi separada por centrifugação a 2300 rpm durante 10 minutos, sendo efetuadas cinco lavagens com 40 mL de água desionizada entre cada etapa de centrifugação. O produto obtido foi seco a 40°C por 48 h em estufa a vácuo. O material obtido foi mantido em dessecador, sendo denominado HDTMA-MT.

3.5.2. Procedimento Para Realização dos Estudos de Adsorção

Antes de iniciar os estudos de adsorção foi conferido o pH dos adsorventes, para isso foi pesado 0,10011 g de montmorilonita natural adicionando-se 10 ml de água MilliQ sendo esta mistura agitada com ajuda de um vortex por 10 min a 3500 rpm resultando um pH = 3,23; o mesmo procedimento se realizou com 0,10060 g de montmorilonita modificada sendo o pH = 3,817. Portanto estes valores de pH são apropriados para nosso estudo garantindo a forma não iônica dos analitos em estudos sem a necessidade de acidificar as suspensões.

Foram usadas massas de adsorvente (montmorilonita natural na forma homoiônica de K^+, montmorilonita modificada com HDTMA) de 0,10 g (± 0,1 mg) para estudar a adsorção de triclosan, clorofenois e metiltriclosan com concentrações entre 0,50; 2,0; 5; 8; 10 e 20 mgL^{-1} após um tempo de contato de 48 h. O volume de solução nos ensaios foi de 10,0 mL. As suspensões foram mantidas sob agitação em câmara incubadora a 26 ± 1 ^{o}C. Após o tempo

de contato as soluções foram centrifugadas 3500 rpm por 15 min e filtradas em filtros de porosidade de 0,45 µm para em seguida efetuar a análise cromatográfica dos adsorbatos remanescentes em solução.

Após a remoção da solução sobrenadante, o sólido foi tratado com 10,0 mL de água por 24 h para avaliar a dessorção, sendo que a separação das fases novamente foi feita por centrifugação e filtração antes das análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de triclosan em enxaguadores bucais

Para efetuar as determinações de triclosan por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta pela técnica de cromatografia de injeção seqüencial foram realizadas avaliações dos parâmetros: composição da fase móvel, vazão e volume de amostra. Foi então obtida a curva analítica, realizando-se o cálculo do limite de detecção, quantificação, avaliação de repetividade e aplicação a amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas por eluição isocrática.

4.1.1. Determinação do comprimento de onda

Na FIGURA 4.1 são apresentados os espectros de absorção de uma solução 2 mg L^{-1} de triclosan em diferentes meios. Tanto a solução estoque como a solução de referência foram preparadas na mesma fase móvel de acetonitrila : 140 mM TEA-NaH_2PO_4 acidificado com acido clorídrico a pH = 3,5 (55:45). Em outro caso a solução de referência 2 mg L^{-1} em triclosan foi preparada em metanol. Os espectros de absorção de triclosan em diferentes meios possuem dois máximos de absorção bem definidos em 205 nm e 280 nm, com um patamar intermediário entre 230 e 240 nm, de modo que é necessário o emprego de uma fonte de radiação de deutério no sistema de detecção. O comprimento de onda de 205 nm é o que apresenta maior absortividade e que, portanto, forneceria maior sensibilidade ao método. Entretanto, por limitações do espectrômetro empregado, que apresentou ruído eletrônico

elevado nesse comprimento de onda, o monitoramento teve que ser feito em 230 nm e 280 nm.

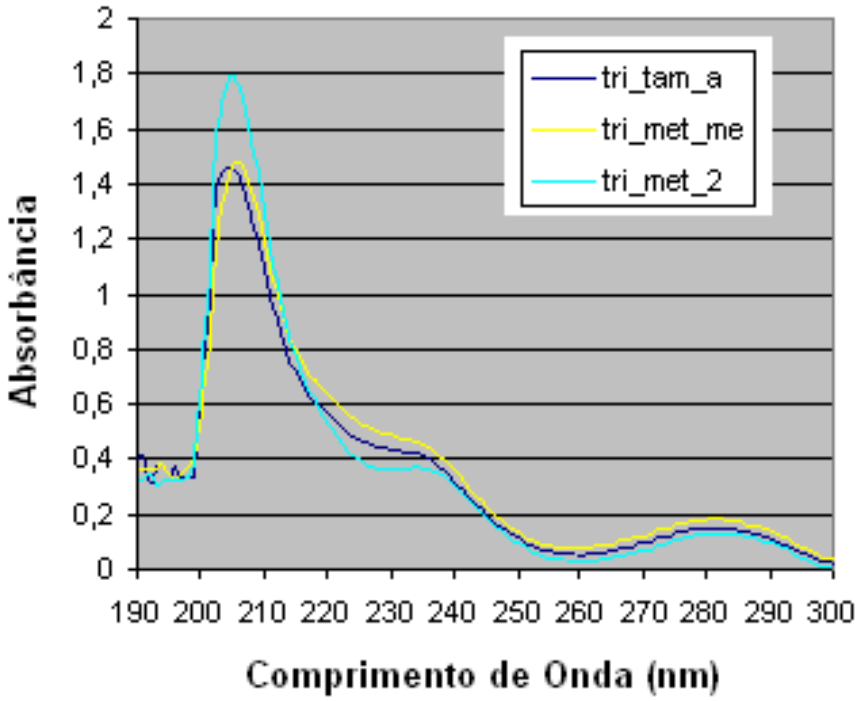

FIGURA 4.1. Espectros de absorção de uma solução 2 mg L^{-1} de triclosan em diferentes meios (tri_tam_a = fase móvel de acetonitrila - 140 mM TEA-NaH_2PO_4 (55:45); tri_met_me e tri_met_2 = triclosan em metanol)

4.1.2. Composição da fase móvel

Foi feito um estudo da composição da fase móvel a partir de diferentes proporções de acetonitrila e tampão fosfato-TEA 70 mM (pH =3,5), cujos cromatogramas são mostrados na FIGURA 4.2. Observa-se que o maior tempo de retenção do triclosan (entre 74 e 75 s) foi obtido com a fase móvel constituída por acetonitrila : tampão fosfato-TEA na proporção 55 : 45 (v v^{-1}). O triclosan numa fase móvel com maior proporção de fase aquosa, ou mais polar, tem aumentado o seu tempo de retenção na coluna, o contrário sucedendo numa fase móvel

menos polar, o que é consistente com o esperado para cromatografia em fase reversa. O tempo de volume morto em ambos os casos se encontra entre 15 e 20 segundos. Isso significa que as separações do analito podem ser feitas acima deste tempo.

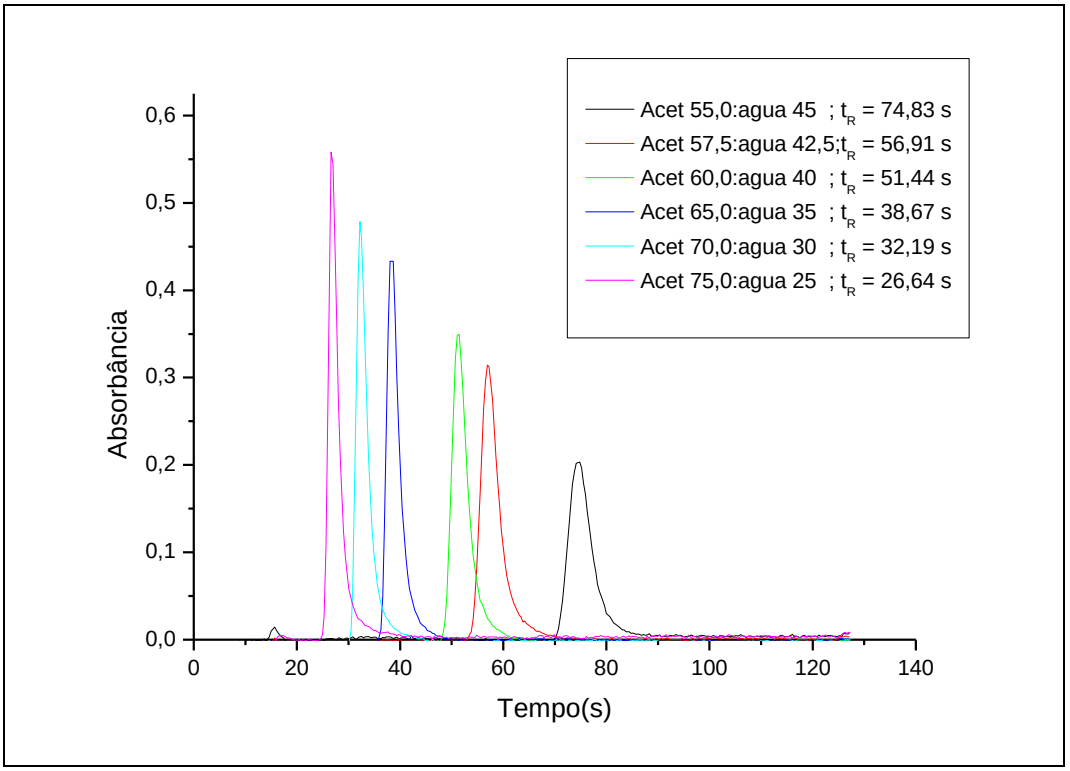

FIGURA 4.2. Influência da composição da fase móvel no perfil cromatográfico de uma solução de triclosan 40 mg L^{-1} dissolvido de acetonitrila: tampão fosfato-TEA 70 mM na proporção 65 : 28 (v v^{-1}). As composições das fases móveis são dadas na inserção da figura, onde "Acet" representa acetonitrila, "água" representa tampão fosfato-TEA 70 mM, pH 3,5 e "t_R" os tempos de retenção obtidos. Vazão = 20 µL s^{-1} volume amostra = 20 µL. Comprimento de onda = 240 nm.

4.1.3. Estudo da vazão

As vazões estudadas variaram entre 10 e 40 µL s^{-1}, como mostrado na FIGURA 4.3. Como mencionado na parte introdutória dessa tese, colunas monolíticas permitem que a

eluição seja feita em vazões muito maiores do que aquelas utilizadas em colunas empacotadas. No entanto, bombas de pistão com seringas de vidro, empregadas em sistemas de análise por injeção sequencial convencionais não permitem explorar essa potencialidade das colunas monolíticas. Nos primeiros trabalhos de cromatografia por injeção sequencial as vazões ficaram limitadas na faixa de 0,48-1,2 mL min^{-1} (8-20 µL s^{-1}). Esta limitação é causada principalmente por vazamentos de fase móvel na válvula da seringa (válvula de 2 – vias, posições IN e OUT na FIGURA 1.6). Gomez et al. 2007 empregaram uma vazão de 2,0 mL min^{-1} (33,3 µL s^{-1}) em um sistema semelhante ao utilizado no presente trabalho, em que a válvula da seringa não é mais usada e a conexão entre a fase móvel e a bomba é feita através de duas portas da válvula seletora.

Obviamente, um aumento da vazão diminui o tempo de análise (FIGURA 4.3), mas o uso de vazões maiores do que 40 µL s^{-1} levaram a vazamentos de fase móvel através de portas não selecionadas da válvula seletora após pouco tempo de uso das pré-colunas. Alturas de pico e resoluções não foram afetadas pela vazão, ao contrário das áreas de pico. A área do pico de triclosan para vazão de 10 µL s^{-1} é duas vezes maior do que o obtido para uma vazão de 20 µL s^{-1}, mas a análise é duas vezes mais demorada, observando-se tempos de retenção de 90 e 45 s, respectivamente.

O sinal obtido para a vazão de 30 µL s^{-1} (t_R = 30 s), em área, foi 0,69, enquanto para a vazão de 40µL s^{-1} (t_R = 23 s) foi 0,64, não apresentando ganho significativo que compensasse o risco de vazamentos. Então, foi escolhida uma vazão de 30 µL s^{-1} como uma solução de compromisso entre o tempo de analise em função do tempo de retenção na separação e a sensibilidade em função da área do sinal, bem como para evitar vazamentos.

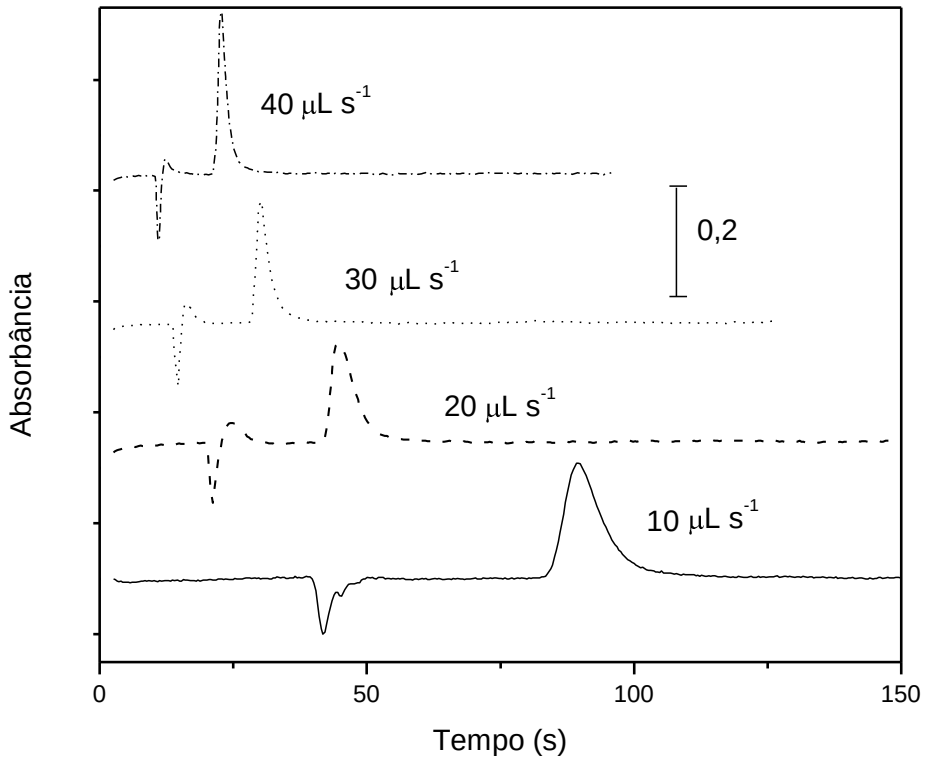

FIGURA 4.3. Influência da vazão na determinação de triclosan com uma solução padrão de triclosan 40 mg L^{-1} numa fase móvel composta por acetonitrila : tampão TEA - fosfato 70 mM (pH 3,5) na proporção 77:23 (v v^{-1}); volume de amostra = 20 µL. Comprimento de onda = 240 nm.

4.1.4. Volume de amostra

Fixando a vazão em 30 µL s^{-1} no programa foram realizados os estudos de volume de amostra na faixa entre 10 e 50 µL. Este estudo requer pequenas modificações no programa de modo que o volume total aspirado seja igual ao volume total dispensado. Na FIGURA 4.4 observa-se que incrementos no volume de amostra aumentam o sinal, ou seja, melhoram a sensibilidade. O tempo de retenção obtido foi de 30,1 ± 0,3 s. Um volume de amostra maior que 50 µL pode gerar distorção do sinal devido à uma possível diminuição da solubilidade e

maior dificuldade na etapa de limpeza. Na FIGURA 4.5 se observa o perfil dos cromatogramas obtidos na faixa de volume de amostra estudados.

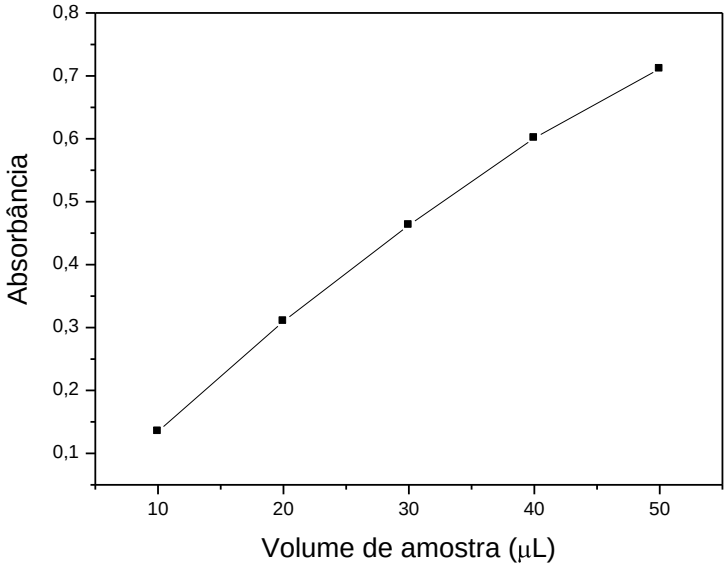

FIGURA 4.4. Influência do volume de amostra enviado à coluna na determinação de triclosan com uma solução padrão de triclosan de 40 mg L^{-1} numa fase móvel constituída por acetonitrila : tampão TEA - fosfato 70 mM (pH 3,5) na proporção 77:23 (v v^{-1}); vazão = 30 µL s^{-1}.

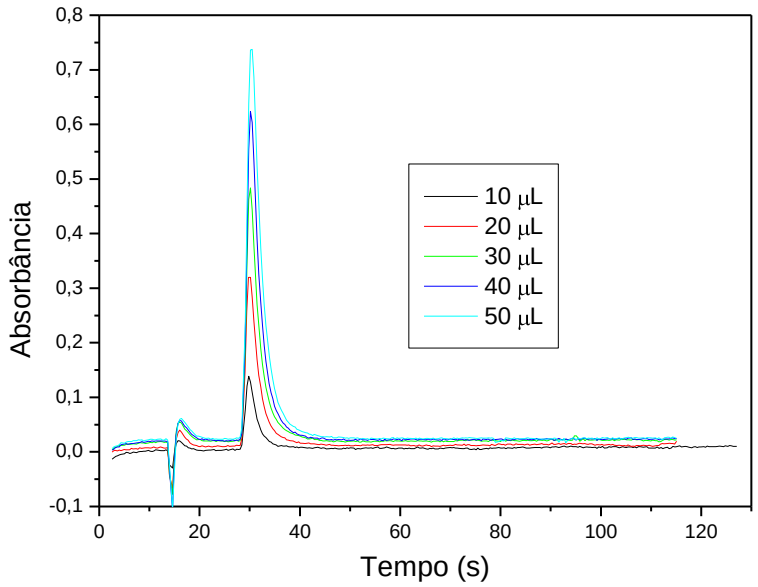

FIGURA 4.5. Perfil dos cromatogramas na faixa de volumes da amostra estudados com uma solução padrão de triclosan de 40 mg L^{-1} numa fase móvel constituída por acetonitrila : tampão TEA - fosfato 70 mM (pH 3,5) na proporção 77:23 (v v^{-1}); vazão = 30 µL s^{-1}. Comprimento de onda = 240 nm.

4.1.5. Curva analítica

Os parâmetros otimizados de fase móvel com composição acetonitrila : tampão TEA-fosfato 70 mM, pH 3,5 na proporção 70:30 (v v^{-1}), vazão de 30 µL s^{-1}; volume de amostra 50 µL foram adotados no programa e se seguiu a seqüência de etapas mostrada na TABELA 3.1 (Parte Experimental).

Os cromatogramas obtidos para a construção da curva analítica são mostrados na FIGURA 4.6

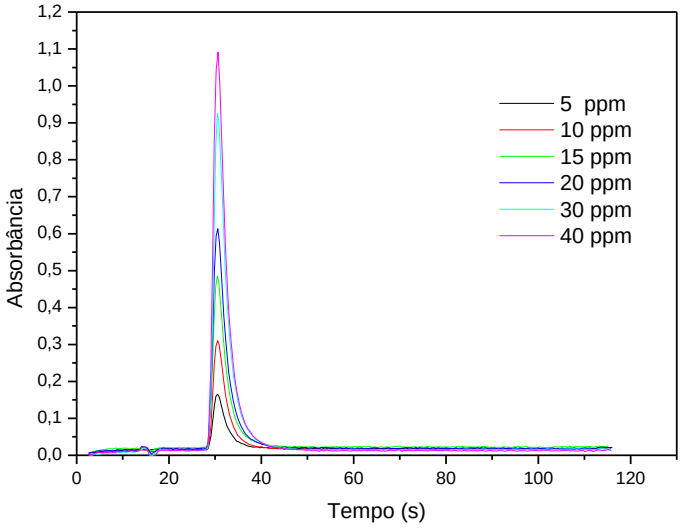

FIGURA 4.6. Perfil dos cromatogramas utilizados para a obtenção da curva analítica nos parâmetros otimizados: fase móvel acetonitrila : tampão TEA-fosfato 70 mM, pH 3,5 na proporção 70:30 (v v^{-1}), vazão de 30 µL s^{-1}; volume de amostra = 50 µL. Comprimento de onda = 240 nm.

A relação linear entre área de pico e concentração de triclosan é mostrada na FIGURA 4.7, sendo os dados ajustados por regressão linear à equação:

$Y = (0{,}003 \pm 0{,}008) + (0{,}1056 \pm 0{,}0005)X$ com coeficiente de correlação

$R^2 = 0{,}99995$, onde Y é a área de pico e X a concentração de triclosan em mg L^{-1}.

A partir dos dados estatísticos coeficiente angular e coeficiente linear obtidos da regressão linear da curva analítica pode-se estimar o limite de detecção de 0,22 mg L^{-1} de triclosam, considerando-se a definição de limite de detecção como 3xSd/m, onde Sd é o desvio padrão do coeficiente linear e "m" o coeficiente angular da curva analítica. O limite de quantificação foi calculado como 10xSd/m = 0,72 mg L^{-1} (Thompson et al 2002).

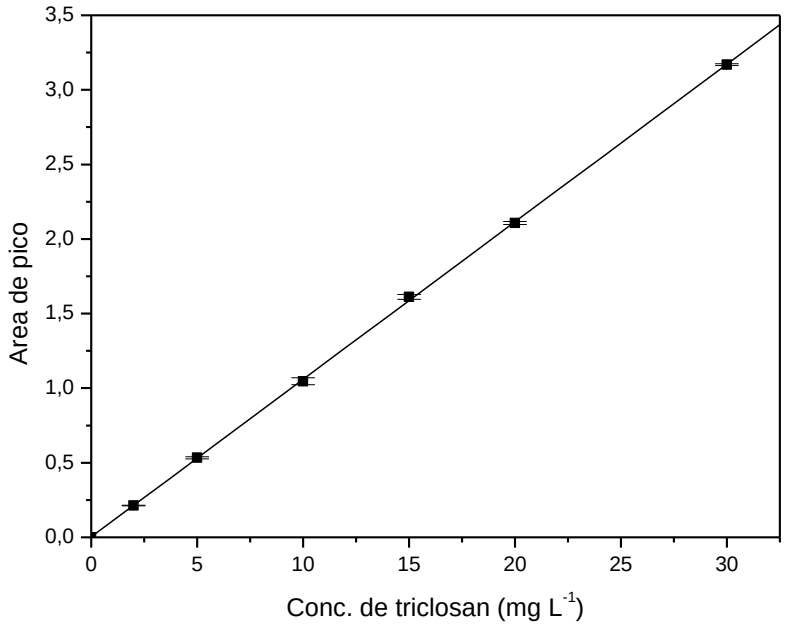

FIGURA 4.7. Curva analítica obtida com área de pico em função da concentração de triclosan com fase móvel acetonitrila : tampão TEA-fosfato 70 mM, pH 3,5 na proporção 70:30 (v v^{-1}). Volume de amostra = 50 µL. Vazão = 30 µL s^{-1}.

Foi feito o estudo da repetividade para uma amostra de triclosan 2 mg L^{-1} obtendo-se um desvio padrão relativo 2,1% para dez injeções nas condições otimizadas.

Na TABELA 4.1 são mostradas as características analíticas do método proposto em comparação com o método descrito na literatura por Piccoli et al. (2002). O tempo total de análise é de 2,5 min, incluindo nesse tempo as etapas de preenchimento da bomba com fase móvel, limpeza da linha de amostragem, aspiração e injeção da amostra. O tempo de corrida cromatográfica é de 118 s (1,97 min). O tempo total de análise implica em uma frequência de amostragem de 24 análises por hora, frequência essa significativamente maior do que a apresentada pelo método de Piccoli et al (2002), de cerca de quatro análises por hora. Vários fatores influenciam nesse tempo de análise. O método proposto usa uma vazão de fase móvel de 30 µL s^{-1} (1,8 mL min^{-1}) e uma coluna de 25 mm de comprimento (4,3 mm de diâmetro) enquanto o método de referência baseado em HPLC usa uma vazão de 0,4 mL min^{-1} e uma

coluna empacotada C18 de 150 mm de comprimento (3 mm de diâmetro e partículas de 3 µm) que limita o uso de vazões maiores devido a aumento de pressão no sistema. Além disso, o método proposto usa fase móvel com maior força de solvente (70:30 acetonitrila: tampão TEA fosfato) enquanto o método de Piccoli et al (2002) usa uma proporção volumétrica de 55:45 (v v^{-1}) dos mesmos componentes, ou seja com maior retenção do analito para a mesma fase estacionária apolar, levando a um tempo total de análise de 16 min. Também da TABELA 4.1 se pode inferir que no método proposto há uma redução de 45 % no volume total de resíduo gerado, bem como reduções de 25 e 61% nos consumos de acetonitrila e TEA, respectivamente. Portanto, uma considerável economia de solventes é conseguida com o método SIC proposto.

TABELA 4.1 Comparação das características analíticas de método proposto e de referência

Parâmetros analíticos	Método proposto	Método referência
Freqüência de amostragem (h^{-1})	104	4
Limite de detecção (mg L^{-1})	0,22	2
Limite de quantificação (mg L^{-1})	0,72	6,19
Faixa de resposta (mg L^{-1})	2-60	8-60
Volume da amostra (µL)	50	20
Volume de resíduo (µL)	3500	6400
Volume de Acetonitrila (µL)	2450	3300
Massa de TEA (mg)	7,4	19
Pratos (N)	154	5041

Por outro lado, uma comparação do número de pratos calculados para o pico referente ao triclosan com a coluna empacotada e a coluna monolítica revela um número

significativamente maior para a coluna empacotada, o que é função também das diferenças de comprimento entre as duas colunas (150 x 25 mm). Em consequência a seletividade do método de referência deve ser melhor do que a do método proposto, especialmente no caso de amostras complexas.

4.1.6. Estudo de amostra de enxaguador

Foi feito estudo de adição de padrão na amostra de enxaguador bucal para verificar possíveis interferências de matriz e eliminar algumas delas. Foi construída a curva analítica com os padrões de branco; 2; 10; 15; 30 mg L^{-1}, avolumadas com a fase móvel (67,5: 32,5) ACN: tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH =3,5. A curva de adição de padrão foi construída tomando 0,50 mL da amostra em 5 balões, adicionando-se em cada um deles concentrações crescentes de triclosan. As curvas analíticas obtidas na presença e na ausência da amostra são apresentadas na FIGURA 4.8. Na FIGURA 4.9 são apresentados os cromatogramas obtidos para construção da curva analítica na ausência da amostra (calibração externa).

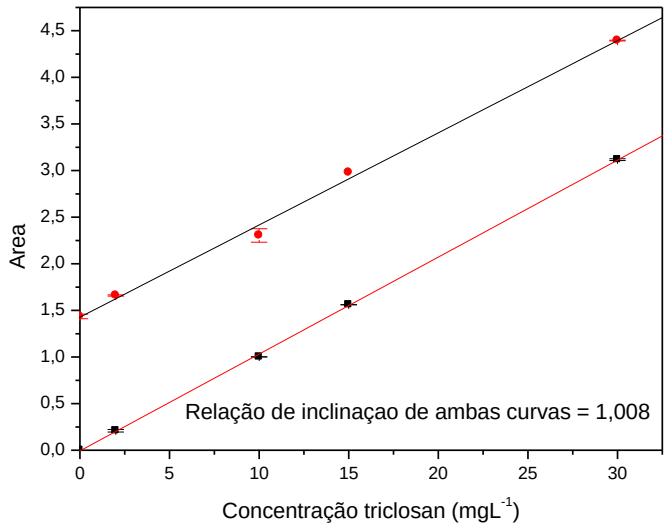

FIGURA 4.8. Curva analítica em comparação com curva de adição padrão para amostra de enxaguador bucal para determinação de triclosan. Fase móvel (67,5: 32,5) ACN: tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH =3,5)

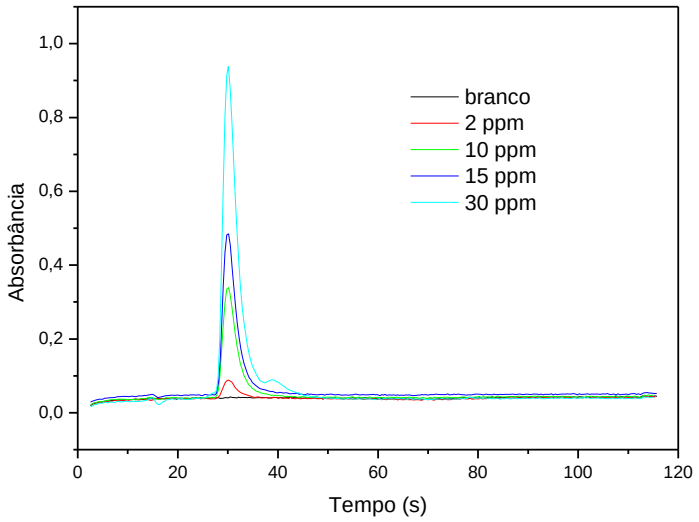

FIGURA 4.9. Perfil do cromatograma da curva analítica na ausência da amostra nas condições usadas para a amostra de enxaguador bucal para determinação de triclosan. Fase móvel (67,5: 32,5) ACN: tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH =3,5). Vazão = 30 µL s^{-1}. Comprimento de onda = 240 nm. Volume de amostra = 50 µL.

As equações obtidas foram:

Equação da curva analítica

$Y = (-0{,}007 \pm 0{,}013) + (0{,}09882 \pm 0{,}0008) * X$
$R=0{,}9999$ $SD=0{,}01956$ $N=5$ $P<0.0001$

Equação da curva adição padrão

$Y = (1{,}43 \pm 0{,}05) + (0{,}098 \pm 0{,}003) * X$
$R=0{,}99837$ $SD=0{,}07858$ $N=5$ $P<0.0001$

A relação dos coeficientes angulares das curvas foi de 1,008, indicando que os efeitos de matriz não foram significativos após a diluição da amostra na fase móvel, de modo que a quantificação pode ser feita tanto por calibração externa, como por adição de padrão.

As FIGURAS 4.10, 4.11 e 4.12 apresentam cromatogramas de três amostras diluídas, sobrepostos aos respectivos brancos e aos cromatograma da amostra na mesma diluição, mas com a adição do padrão de triclosan.

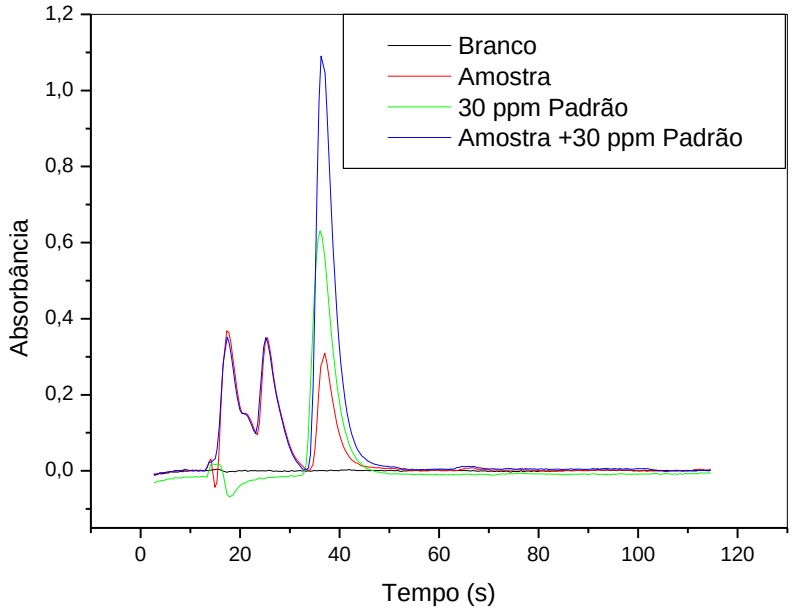

FIGURA 4.10. Cromatograma da amostra A de enxaguador bucal diluído na razão de 1:20 (v v^{-1}) em fase móvel 67,5:32,5 (v v^{-1}) de acetonitrila : tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH=3,5 sobreposto aos cromatogramas do branco analítico, de uma solução de triclosan 30 mg L^{-1} e da solução de amostra na mesma diluição, mas a qual foi adicionado padrão de triclosan (30 mg L^{-1}). Condições cromatográficas similares às descritas na legenda da FIGURA 4.9.

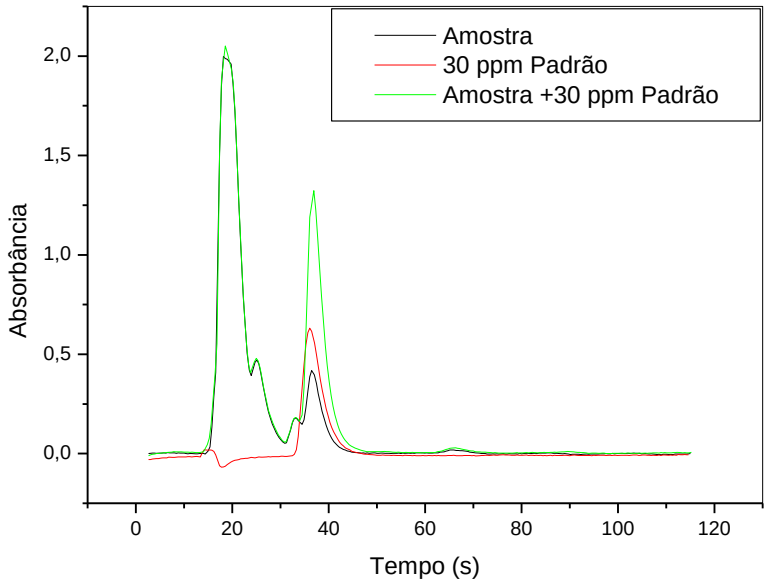

FIGURA 4.11. Cromatograma da amostra B de enxaguador bucal. Condições experimentais e cromatográficas similares às descritas na legenda da FIGURA 4.10.

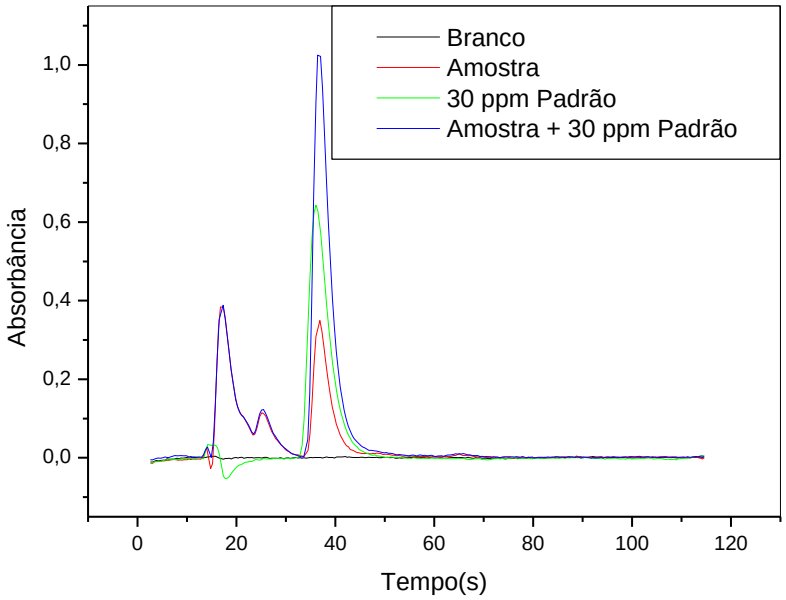

FIGURA 4.12. Cromatograma da amostra C de enxaguador bucal. Condições experimentais e cromatográficas similares às descritas na legenda da FIGURA 4.10.

Na FIGURA 4.13 é mostrado um perfil cromatográfico de uma amostra de enxaguador, no qual se observa uma resolução de 1,64 em relação ao pico adjacente devido a algum componente da amostra. Entre esses componentes pode-se mencionar a possível presença de sacarina sódica (pKa = 2,32 para o ácido livre) (Bourlakis e Weightman, 2006) e benzoato de sódio (pKa = 4,2) (Petruci e Cardoso, 2011), cuja presença foi detectada e confirmada por Piccoli et al (2002), daí a importância do ajustar a acidez a pH 3,5 com tampão –fosfato de trietilamina 70 mM. Nesse pH a sacarina está predominantemente ionizada, apresentando pouca interação com a fase estacionária apolar. Já o ácido benzoico apresenta-se predominantemente na forma protonada (não ionizada), apresentando maior retenção na fase estacionária. Assim, o pH da fase móvel é um parâmetro importante que pode ser explorado na melhora de seletividade da metodologia no caso de aplicações a amostras que possuam potenciais interferentes que coeluam com o triclosan

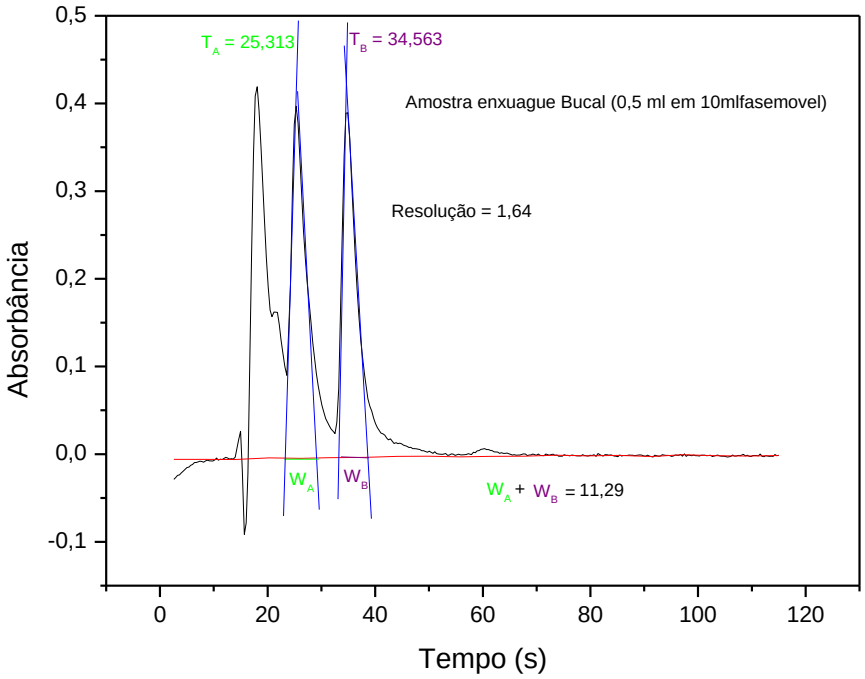

FIGURA 4.13. Cromatograma de uma amostra de enxaguador bucal diluída na proporção 1:20 (v v^{-1}) na fase móvel (67,5: 32,5) acetonitrila : tampão trietilamina-fosfato 70 mM a pH = 3,5. Volume de amostra = 50 µL, Vazão = 30 µL $s^{-1.}$ Volume de amostra = 50 µL, Comprimento de onda =230 nm.

Foram analisadas diversas amostras de enxaguadores bucais visando demonstrar a viabilidade do método e do sistema proposto. Os resultados desse estudo são mostrados na TABELA 4.2 em comparação com aqueles obtidos por um método de referência baseado em HPLC (Piccoli et al, 2002) para avaliar a precisão e a exatidão dos resultados. Para avaliar a precisão foi usado o teste F para comparação das estimativas de desvios padrões obtidos pelos dois métodos para as sete amostras, considerando que cada amostra foi analisada em triplicata, tanto por HPLC como por SIC. Para essa situação o valor tabelado de $F_{2,2}$ para P = 0,05 é 19 (Miller e Miller, 1988). Fazendo-se os cálculos a partir da expressão $F_{2,2} = {(s_1)^2}/{(s_2)^2}$, onde s_1 e s_2 são as estimativas de desvio padrão que apresentaram maior e menor valor, respectivamente, obtém-se valores entre 1,5 (amostra 7) e 12,3 (amostra 4). Como para todas as amostras o valor de $F_{2,2}$ foi sempre menor do que o valor tabelado,

conclui-se que a precisão do método SIC não é estatisticamente melhor do que a precisão obtida pelo HPLC no nível de confiança de 95%. Os maiores valores de desvio padrão relativo foram encontrados para a amostra 7, de 4,5% pelo HPLC e de 5,1% pelo método proposto. Para avaliação da exatidão foi aplicado o teste t-pareado (Miller e Miller, 1988) usando-se a expressão $t = \bar{x}_d \frac{\sqrt{n}}{s_d}$ onde $\bar{x}_d$ é a média das diferenças entre os resultados obtidos por HPLC e SIC, n é o número de amostras (7) e s_d é o desvio padrão das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos. O valor de t assim calculado usando os resultados na TABELA 4.2 foi -0,62. Como esse valor é menor do que os valores críticos tabelados para 6 graus de liberdade e intervalos de confiança de 90 e 95% de 1,90 e 2,45, respectivamente, conclui-se que para esses graus de confiança não existem evidências de diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos por HPLC e SIC para o conjunto de amostras estudado.

TABELA 4.2 Valores de concentração de triclosan obtidos em diversas amostras de enxaguador bucal

Amostra[a]	**HPLC (mgL^{-1})**	**SIC (mgL^{-1})**	**Erro Relativo**[b] **(%)**
1	291 ± 3	280 ± 1	-3,8
2	303 ± 1	291 ± 2	-4,0
3	301 ± 4	285 ± 3	-5,3
4	315 ± 7	333 ± 2	+5,7
5	318 ± 6	290 ± 2	-8,8
6	297 ± 2	292 ± 6	-1,7
7	310 ± 14	332 ± 17	7,1

[a] Concentração nominal = 300 mg L^{-1}

[b] Calculado como: $Erro = \left(\frac{Conc._{SIC} - Conc._{HPLC}}{Conc._{HPLC}} \right).100$

4.2. Determinação de Triclosan na Presença de Alguns Metabólitos

Para a determinação de triclosan e seus derivados clorofenólicos por absorção molecular no ultravioleta explorando a técnica de cromatografia por injeção seqüencial foram realizadas avaliações para ajustar a composição da fase móvel, vazão e volume de amostra. A partir dessas condições efetuou-se a construção da curva analítica, o cálculo dos limites de detecção e quantificação, bem como uma avaliação de repetitividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Diversos estudos foram realizados adequando-se os programas para a separação de triclosan e seus derivados usando eluição com uma única etapa isocrática, com diferentes

condições de polaridade da fase móvel. Como será discutido, os melhores resultados de separação foram obtidos adotando-se duas ou três etapas de eluição isocrática usando duas ou três fases móveis gerando-se uma eluição com perfil de gradiente com incrementos discretos de modificador orgânico, possibilitando a separação de analitos com grau de polaridade diferenciada. O modo de operação de separação usado em fase reversa se baseia no uso de uma fase estacionária monolítica não polar de octadecilsilano (C_{18}) quimicamente ligado à sílica e fases móveis polares com misturas de fase aquosa (tampões ácido acético/acetato de amônio) e metanol. A retenção nesta forma de cromatografia é governada, em grande extensão, pela hidrofobicidade do soluto. Quanto maior a polaridade dos analitos em estudo, maior será sua afinidade pela fase móvel polar e menor o tempo de retenção. Solutos não polares possuem comportamento inverso. Quanto maior a proporção do solvente orgânico, menor será o fator de retenção (k); quanto maior a proporção de água, maior será a retenção (maior k). Propriedades físico-químicas tais como as capacidades doadoras (OH^-) ou aceptoras (Cl^-) dos clorofenois e o os seus momentos dipolares determinam o tipo e a magnitude da interação dos analitos com a fase estacionária e com a fase móvel, afetando o processo de partição e, por conseqüência, a seletividade do sistema.

No caso de compostos ionizáveis, como no caso do triclosan (TCS), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,3,4-triclofenol (2,3,4-TCP), e 2,4,6-triclorofenol (2,3,4-TCP), a cromatografia a líquido em fase reversa é viável quando se consegue suprimir a ionização dos analitos, pois em sua forma ionizada são poucos retidos em fase estacionária e, neste caso, o simples controle da seletividade e da força de solvente estimado pelo triângulo de Snyder et al (1997) não apresentam resultados satisfatórios, sendo mais comum a alteração no pH e a força iônica do solvente controlando a ionização. Algumas propriedades físico-químicas de TCS, 2,4-DCP, 2,3,4-DCP e 2,4,6- TCP, incluindo seus valores de pKa, são mostradas na TABELA 4.3. O menor valor de pKa entre os compostos estudados é 6,51, para o composto 2,4,6-TCP.

Para reprimir a ionização dos compostos optou-se pela utilização de uma fase móvel com pH de pelo menos uma unidade menor do que o pKa do ácido mais forte, no caso o 2,4,6-TCP. Assim, foi utilizado como fase aquosa uma solução tampão de acetato de amônio/ácido acético 20 mmol L^{-1} ajustado a pH 5,5, mantendo, tanto o triclosan, como os seus derivados predominantemente em sua forma não ionizada.

TABELA 4.3 Propriedades físico-químicas de triclosan e alguns de seus metabólitos

Composto	**Massa molar ($g\ mol^{-1}$)**	**Solubilidade em água (mgL^{-1})**	**pKa**	**Log K_{ow}**
2 CP	128,6	11300	8,56	2,12
2,4 DCP	163,01	4600	7,7	2,75
2,3,4 TCP	197,45	< 1000	7,10	3,49
2,4,6 TCP	197,45	800	6,51	3,60
TCS	289,54	4,62	7,9	4,76
MTCS	303,57	N.D	N.D	5,23

4.2.1. Composição da fase móvel

4.2.1.1. Determinação de tempo de retenção de triclosan e seus derivados em corridas isoladas de cada analito em uma mesma condição cromatográfica por eluição isocrática

Observando-se os cromatogramas individuais de cada analito mostrados na FIGURA 4.14, obtido com uma fase móvel composta por metanol : tampão ácido acético/acetato de amônio 20 mM ajustado a pH 5,5 na proporção 70:30 (v v^{-1}), verifica-se que o triclosan apresentou maior interação por ser mais hidrofóbico, ficando mais tempo retido na fase ligada

C_{18} da fase estacionária, com tempo de retenção de 79,06 s e com fator de retenção 2,45 (TABELA 4.4). Também na TABELA 4.4, observa-se que 2,4-DCP possui uma fator de retenção baixo (k = 0,28), indicando que este análito interage fracamente com a fase estacionária. Nos cromatogramas mostrados na FIGURA 4.14 observa-se que os isômeros 2,4,6-TCP e 2,3,4-TCP apresentam praticamente o mesmo tempo de retenção e fator de retenção de, 37 s e 0,5, respectivamente, não sendo separados. Como regra geral, valores de k entre 2 e 5 costumam gerar separações com boa resolução em tempos de análise suficientemente curtos . Os valores de fator de retenção obtidos para os clorofenois em estudo estão muito abaixo de dois, significando que os compostos apresentam baixa retenção na fase estacionária. No caso de triclosan o fator de retenção foi adequado. Destes estudos conclui-se que é preciso melhorar a retenção dos clorofenois. Portanto, deve-se aumentar a polaridade do solvente usado para eluição destes analitos com aumento da proporção da fase aquosa, ou seja, diminuindo a força de eluição da fase móvel (menos solvente orgânico).

TABELA 4.4. Compostos estudados, comprimento de onda de detecção e parâmetros cromatográficos de triclosan e seus derivados clorofenois na concentração 0,33 mM

Analito	**λ (nm)**	**t_M (s)**	**t_R (s)**	**k**	**Área**
2,4-DCP	285	23,475	30,125	0,283	2,09
2,3,4-TCP	292,5	23,234	36,984	0,592	1,98
2,4,6-TCP	293	22,938	36,688	0,599	2,04
Triclosan	280	22,922	79,063	2,449	3,25

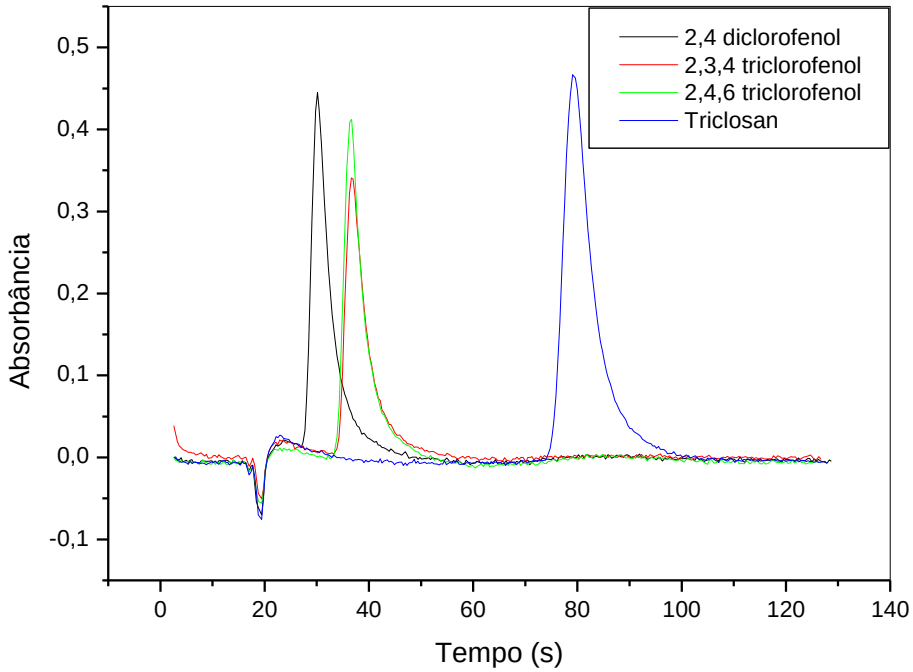

FIGURA 4.14. Cromatogramas individuais de triclosan e seus derivados a uma mesma concentração de 0,33 mM em 33 % (v v^{-1}) MeOH e eluição isocrática (70:30, v v^{-1}, MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5); volume amostra = 20 µL e vazão = 30 µLs^{-1}. Comprimentos de onda de detecção de acordo com TABELA 4.4

4.2.1.2. Corrida cromatográfica da mistura de padrões de triclosan e seus derivados clorofenois por eluição isocrática

A FIGURA 4.15 mostra os cromatogramas da mistura de triclosan e seus derivados clorofenois obtidos por eluição isocrática. Foram selecionados três comprimentos de onda de trabalho, 220; 230; 235 nm para monitoramento simultâneo da absorbância e um comprimento de onda de referência de 350 nm. Como se pode observar da FIGURA 4.15 as leituras nestes comprimentos de onda estão sujeitas a ruídos eletrônicos, dificultando a determinação precisa dos parâmetros como tempo de retenção, fator de retenção e tempo morto. Observa-se também que com o aumento do comprimento de onda ocorre uma diminuição do ruído. Assim, para contornar o problema de ruído, sem perda de sensibilidade, optou-se pelo comprimento de onda de estudos cinéticos 240 nm.

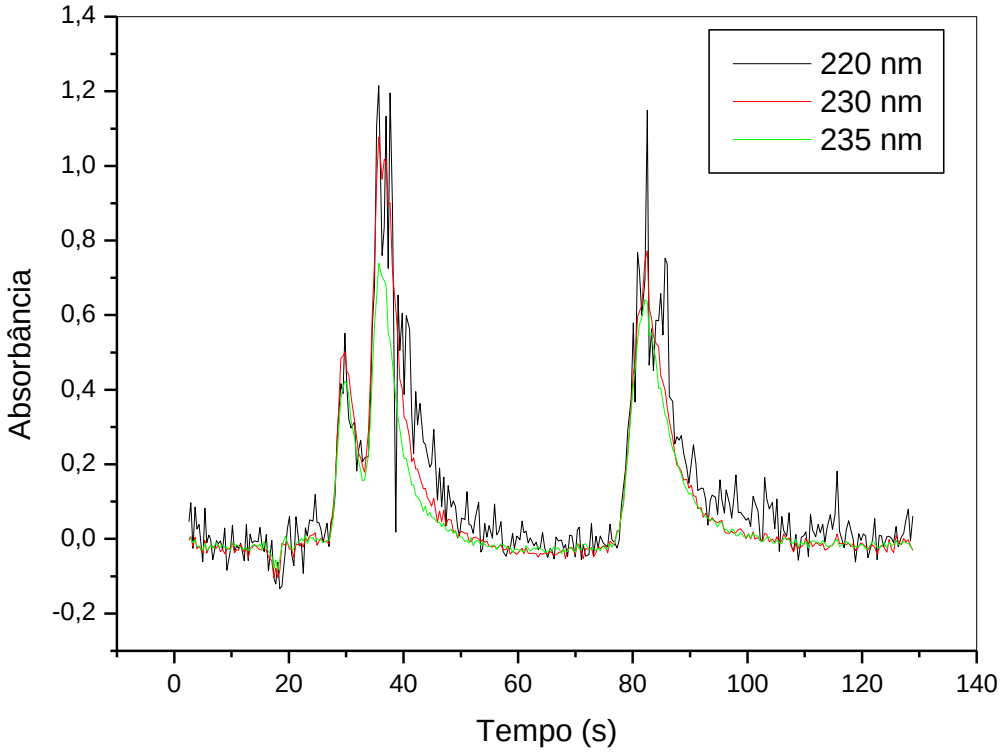

FIGURA 4.15. Cromatogramas da mistura de triclosan e seus derivados clorofenois com concentração 0,132 mM em 52,8 % (v v^{-1}) MeOH por eluição isocrática com 70:30 (MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5); volume amostra = 20 µL e vazão=30µL s^{-1}

Nas FIGURAS 4.16 e 4.17 são mostrados os cromatogramas obtidos por eluição isocrática das misturas de triclosan e seus derivados clorofenois com diferentes concentrações de metanol, mantendo-se a fase aquosa constituída por tampão CH_3COONH_4 20 mM em pH 5,5. As composições das fases móveis de MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH= 5,5 foram 40:60; 60:40 e 70:30. Na FIGURA 4.16, a fase móvel 40:60 (MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH= 5,5) foi usada com a finalidade de aumentar o fator de retenção dos analitos clorofenois buscando-se uma melhor separação entre eles. Como se pode observar no cromatograma (FIGURA 4.16) foi obtido um único pico alargado correspondente ao 2,4-DCP. Em relação ao cromatograma obtido com a fase móvel 70 : 30, o resultado obtido é esperado, uma vez que a fase móvel com maior proporção de solvente aquoso faz com que o tempo de retenção aumente de 23,5 a 68,9 s, com um aumento do fator de retenção de 0,28 a 2,35. Como se pode

ainda observar na FIGURA 4.16, a corrida finalizou em 127 s sem eluir os isômeros TCP e triclosan, indicando que o uso dessa composição de fase móvel é inapropriado devido ao longo tempo de análise e alargamento dos picos cromatográficos. Para a fase móvel 70:30 (MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH= 5,5) nas mesmas condições de concentração e comprimento de onda se visualizam três picos correspondentes ao 2,4 DCP, isômeros clorofenois (2,4,6- e 2,3,4-TCP) e triclosan, os quais eluem em menores tempos de retenção em picos mais estreitos e altos, sugerindo melhor seletividade e menores limites de detecção. Por outro lado, ainda persiste a sobreposição parcial dos sinais correspondente aos clorofenois, sendo que para este par crítico deve-se encontrar uma fase móvel com força intermediária entre aquelas estudadas visando obter a separação.

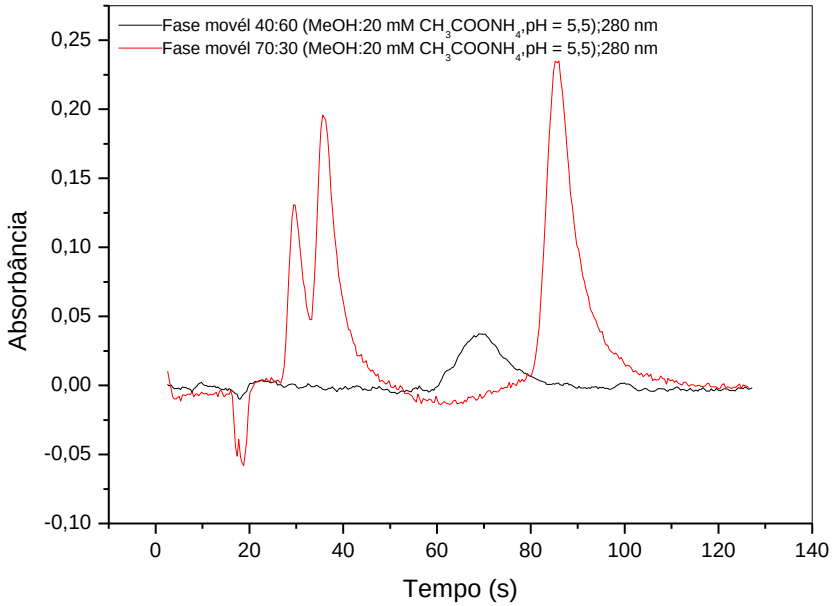

FIGURA 4.16. Cromatogramas obtidos por eluição isocrática de uma mistura de triclosan e seus derivados a uma mesma concentração 0,132 mM em 52,8 % (v v^{-1}) de MeOH em duas fases móvel diferentes: (70:30 ; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5) e (40:60; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5) ; volume amostra = 20 µL; vazão = 30 μLs^{-1}

Na FIGURA 4.17 é mostrado o cromatograma correspondente a mistura dos analitos obtido com uma fase móvel de força intermediária de 60:40 (MeOH: 20mM CH_3COONH_4 a

pH =5,5) conseguindo-se obter a separação do par critico (2,4-DCP e isômeros TCP) com uma resolução de 1,95 (acima do mínimo recomendado de 1,5). Os fatores de retenção dos sinais obtidos nesta fase móvel foram melhores do que aqueles obtidos com as outras fases móveis já estudadas, sendo o seu valor de 1,6 e 2,92 para 2,4-DCP e isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP, respectivamente. Na TABELA 4.5 são mostrados os parâmetros cromatográficos deste estudo. Nessas condições a magnitude dos sinais de 2,4-DCP e dos isômeros TCP, expressa em área, são melhores do que as obtidas com a fase móvel 70:30 (MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). O cromatograma obtido com a fase móvel 60:40 (v v^{-1}) finaliza em 127 s, porém sem eluir o triclosan. Portanto, para se obter melhor separação dos compostos com resolução aceitável e sem alargamento dos picos seria necessário o uso de eluição por gradiente linear. Como no sistema SIC, constituído por uma única bomba, isso não é possível, é necessário se adotar uma estratégia de um incremento discreto da concentração da fase orgânica explorando a disponibilidade de portas na válvula seletora do sistema. Em função dos resultados obtidos até aqui, conclui-se que uma fase móvel com composição 60:40 (MeOH: tampão) resolve o par 2,4-DCP e isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP, bem como o par isômeros TCP e TCS. Com isso, a eluição com a fase móvel 60:40 (v v^{-1}) seria uma condição apropriada para o início da análise. Após a obtenção do pico referente aos isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP, pode-se fazer uma comutação da válvula seletora de modo que essa permitisse então fazer a eluição de TCS com a fase móvel 70:30 MeOH : tampão. Caso fosse necessário uma eluição de TCS com menor tempo de retenção, ou ainda uma limpeza de coluna no caso de amostras complexas, poderia ser usada uma fase móvel com concentração ainda maior de modificador orgânico, por exemplo, 80:20 MeOH:tampão. Cabe mencionar que todo estudo realizado até esse ponto foi baseado em uma única etapa de eluição isocrática obedecendo a sequência de etapas de programação mostrada na TABELA 3.1.

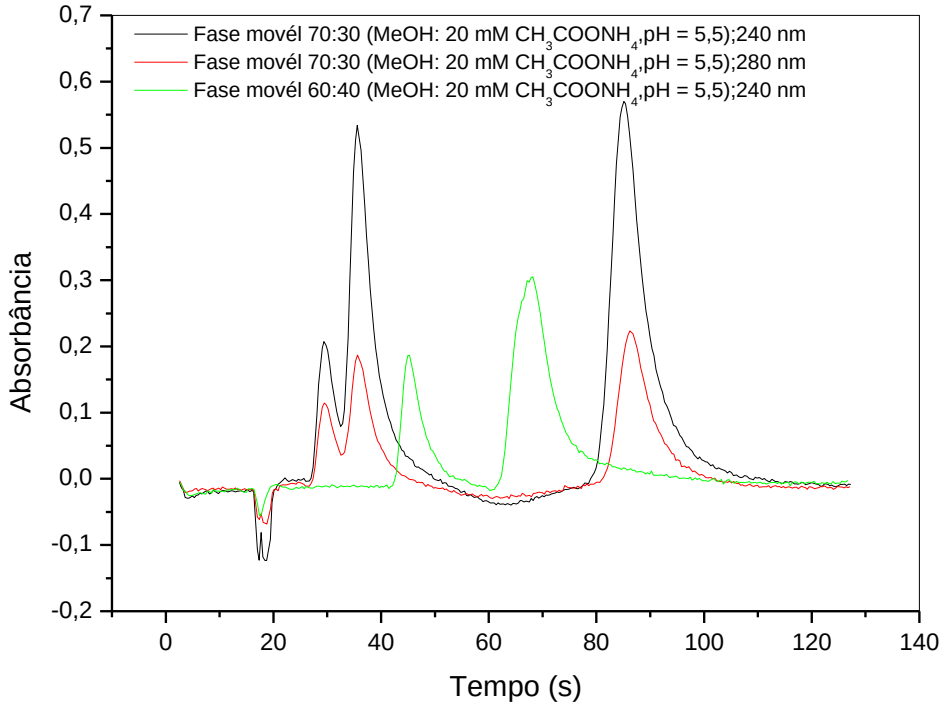

FIGURA 4.17. Cromatogramas obtidos por eluição isocrática de uma mistura de triclosan e seus derivados a uma mesma concentração 0,132 mM em 52,8 % (v v^{-1}) MeOH em duas fases móveis diferentes obtidos em 240 ou 280 nm; volume de amostra = 20 µL; vazão = 30 μLs^{-1}

A TABELA 4.5 mostra as características cromatográficas obtidas com as distintas fases móveis, dentro das quais está o fator de retenção, os quais foram muito baixos, no intervalo ($0 \leq k < 1$), para a separação dos analitos 2,4 DCP e isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP na fase móvel 70:30 (v v^{-1}), enquanto para fase móvel 60:40 (v v^{-1}) esses valores foram aumentados para 1,6 e 2,92 para estes mesmos analitos. No caso de triclosan estes parâmetros foram adequados (> 1), requerendo unicamente um aumento no tempo da corrida de separação cromatográfica da mistura da amostra dentro do programa de fluxo.

Como se pode observar dos valores mostrados na TABELA 4.5, a composição da fase móvel em relação aos componentes da amostra na coluna monolítica de fase C_{18} nestas condições não fornece seletividade adequada para a separação dos isômeros 2,4,6-TCP e 2,3,4-TCP, já que estes coeluem, sendo seu fator de separação $\alpha = 1$ e resolução $R = 0$.

TABELA 4.5. Parâmetros cromatográficos da mistura de triclosan e seus clorofenois com uma etapa isocrática de eluição para diversas relações de metanol e acetato de amônio.

Analito	λ (nm)	t_M (s)	t_R	k	Área	Resolução	Fase móvel
Triclosan			85,575	3,65	2,11	4,13	
Isômeros	280	18,411	35,735	0,94	0,93	0,72	70:30
2,4 DCP			29,422	0,61	0,43	-	
Isômeros	240	17,399	68,172	2,92	3,35	1,95	60:40
2,4 DCP			45,282	1,6	1,04	-	
Triclosan			85,094	3,69	5,18	3,71	
Isômeros	240	18,145	35,594	0,96	2,80	0,68	70:30
2,4 DCP			29,406	0,62	0,74	-	
Triclosan			82,109	3,63	7,63	3,39	
Isômeros	220	17,718	36,625	1,07	6,93	0,62	70:30
2,4 DCP			29,765	0,68	0,71	-	

4.2.1.3. Modificação do programa de eluição incluindo duas e quatro etapas de eluição isocrática

Como vimos nos estudos anteriores a eluição com uma etapa isocrática não resolve a separação da mistura de uma amostra contendo 2,4-DCP, isômeros de 2,4,6- e 2,3,4-TCP e triclosan num tempo curto. Uma forma de conseguir a separação destes analitos é através do emprego de diferentes misturas com mais de duas etapas isocráticas de eluição. A FIGURA 4.18 mostra os cromatogramas obtidos com duas e três etapas isocráticas de eluição com diferentes forças de solvente. Foram feitos estudos com fases móveis constituídas por diferentes composições de metanol e tampão acetato de amônio 20 mM a pH=5,5 como uma mistura nas relações (50:50;80:20); (60:40;80:20); (50:50; 60:40; 80:20) e baseados nos estudos experimentais de composição de fases moveis já discutidas anteriormente.

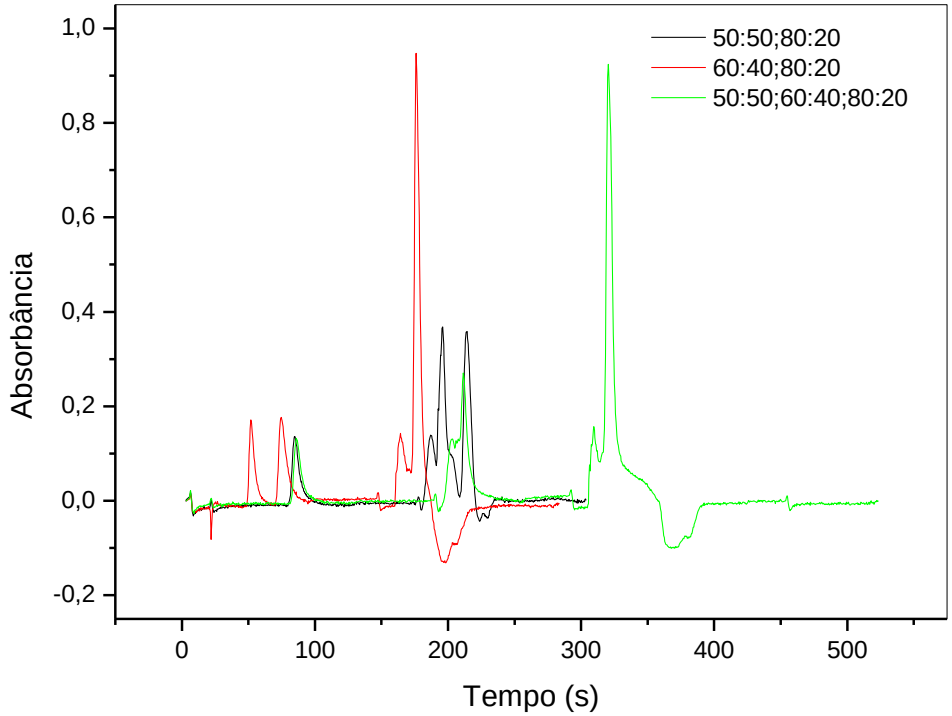

FIGURA 4.18. Cromatogramas com duas ou mais etapas de eluições isocráticas de uma mistura de triclosan e seus derivados a uma mesma concentração 0,132 mM em MeOH 52,8 % (v v^{-1}). Cromatograma vermelho = (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) + (80:20; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); cromatograma verde = (50:50; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) + (80:20; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5) + (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); cromatograma preto (50:50; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) + (80:20; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) ;volume amostra = 20 µL; vazão = 30 μLs^{-1}

Para estes estudos que envolvem mais de duas etapas de eluição isocrática com solventes diferentes, sempre será colocada a mistura de fase móvel com a menor força do solvente na porta 9 da válvula seletora (ver FIGURA 3.1). Essa fase móvel é que ficará sempre no interior do compartimento da bomba, servindo como fase móvel para etapa inicial de eluição e na etapa final de recondicionamento da coluna após o final da análise. Além disso, serve como propulsora das fases móveis de maior concentração de solvente orgânico que são aspiradas para a bobina coletora através das outras portas da válvula seletora. Essas fases móveis com maior força de solvente podem ser colocadas indiferentemente em qualquer

porta disponível da válvula seletora. As diversas combinações das diferentes forças de solvente das fases móveis foram aspiradas de forma seqüencial das diferentes portas. Pode ocorrer interpenetração das zonas da região de contato entre elas, criando pequenos gradientes de concentração. Entretanto, como os volumes aspirados são grandes, geralmente próximos da capacidade da bobina coletora, ou seja, 2 mL, o coeficiente de dispersão dessas zonas tende a 1 (volume infinito) e a variação da concentração do solvente na coluna é abrupta, de modo que a eluição pode ser melhor descrita como sendo baseada em incrementos discretos da força de solvente, do que por um gradiente linear.

O cromatograma em vermelho na FIGURA 4.18 é obtido em duas etapas sequenciais de eluição isocrática, a primeira delas com a fase móvel de relação metanol: tampão 60:40 (v v^{-1}) seguida pela fase móvel 80:20, com forças de solvente de 1,56 e 2,08, respectivamente. Então, a eluição pode ser descrita como:

Primeira etapa isocrática: 2,7 mL da fase móvel 60:40;

Segunda etapa isocrática: 1,0 mL fase móvel 80:20 + 3,0 mL fase móvel 60:40

Estudo anteriores com as mesmas composições de fase móvel, mas com a diferença que a primeira etapa de eluição foi efetuada com 3,7 mL de fase móvel 60:40, o que levou o aparecimento do pico de triclosan em 215,75 s, enquanto que com 2,7 mL da mesma fase móvel o tempo de retenção do triclosan é reduzido para 166 s sem afetar os tempos de retenção dos clorofenois em ambos casos. Isso ocorre simplesmente porque a eluição com 2,7 mL da fase móvel 60:40 é finalizada logo após a eluição dos isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP, iniciando-se então a eluição com a fase móvel 80:20 que elui o triclosan. Portanto, este volume menor ajuda a reduzir o tempo total do processo de análise a 4,953 min. Como podemos visualizar do cromatograma, os analitos 2,4-DCP e isômeros 2,4,6- e 2,3,4-TCP foram bem resolvidos, sendo que seus tempos de retenção foram 51,8 e 74,6 s e seus fatores de retenção 1,10 e 1,98, respectivamente. O sinal do triclosan ainda apresenta ligeira distorção

que se deve ao fato do composto ser eluído com uma fase móvel de homogeneização incompleta, ou seja, na zona de interdispersão entre as fases móveis 60:40 e 80:20. A composição variável da mistura dos solventes com força muito diferenciada origina uma variação de índice de refração (efeito Schlieren) que se manifesta com uma parte do sinal com absorbância negativa. O triclosan elui com tempo de retenção 176,12 s e fator de retenção 6,045.

Como mostrado na FIGURA 4.18, o eluente que gerou o cromatograma representado pela linha preta foi obtido com uma primeira etapa de eluição com fase móvel 50:50 (v v^{-1}) MeOH: tampão, seguido por eluição com fase móvel 80:20 (v v^{-1}), cujas forças de solvente são 1,3 e 2,08, respectivamente. Então, a eluição foi formada por duas etapas isocráticas sequenciais, com monitoramento de absorbância em 240 nm, conforme descrito abaixo:

Primeira etapa isocrática: 3,7 mL fase móvel (50:50).

Segunda etapa isocrática: 1,0 ml fase móvel (80:20) + 3,0 ml fase móvel (50:50)

O cromatograma representado pela linha verde na FIGURA 4.5 foi obtido com três etapas sequenciais de eluição isocrática, iniciando-se com a fase móvel 50:50 (v v^{-1}) MeOH : tampão CH_3COONH_4 20 mM, pH 5,5, seguida por eluição com fase móvel 60:40 e então 80:20, antes do recondicionamento com a fase móvel 50:50, conforme descrito abaixo:

Primeira etapa isocrática: 3,7 ml fase móvel 50:50.

Segunda etapa isocrática: 2,0 mL da fase móvel 60:40.

Terceira etapa isocrática: 2,0 mL fase móvel 80:20 + 2,0 mL da mistura da fase móvel 50:50.

Na etapa final injeta-se mais 2,0 mL da fase móvel 50:50 para efetuar o recondicionamento da coluna.

Nessas condições o cromatograma apresenta resolução aceitável, mas ainda há presença de distorção do sinal dos isômeros 2,4,6- e 2.3.4-TCP e triclosan. O tempo do processo total foi de 10,1 min.

A FIGURA 4.19 mostra os cromatogramas obtidos para uma mistura de triclosan e seus derivados clorofenois com adição e sem adição de 2,3,4-TCP. Como mencionado anteriormente, em nenhuma das composições estudadas foi possível separar totalmente os isômeros 2,3,4-TCP e 2,4,6-TCP. A US-EPA considera o 2,4,6-TCP na lista de poluentes prioritários, ao contrário de 2,3,4 TCP (Heberer e Stan, 1997). Canosa et al (2005) verificaram, por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, a formação significativa de 2,4,6-TCP em águas cloradas contendo triclosan. Por outro lado, esses autores não detectaram a presença de 2,3,4-TCP (L.Q. = 0,01 ng mL^{-1}) em diversas amostras de águas residuais com amostragem em diferentes meses do ano. Por outro lado altas concentrações de 2,4,6-TCP foram determinadas nessas amostras, na faixa entre 0,25 e 1,0 ng mL^{-1} Canosa et al (2005). Assim, devido ao fato de que o 2,3,4-TCP não fazer parte da rota principal de degradação do triclosan, e de que sua contribuição em concentração frente aos outros clorofenois é desprezível (Quintana e Ramos, 2008; Michalowicz et al 2011), esse composto foi excluído da mistura em estudo, dando-se maior importância ao 2,4,6-TCP. O tempo de processo total de análise neste caso foi 4,703 min.

Todos estes experimentos seguem a seqüência de etapas do programa SIC mostrado na TABELA 3.2. Destes estudos se pode concluir que devido à forma dos picos obtidos, ainda é necessário uma melhor avaliação das composições de fase móvel e dos volumes usados, procurando evitar que os picos dos analitos sejam eluídos justamente nas zonas de interpenetração de uma fase móvel na outra, o que produz um pronunciado efeito de gradiente de índice de refração que provoca distorções nos picos cromatográficos. Picos distorcidos geram problemas na quantificação, na perda da resolução cromatográfica e dificulta o

entendimento dos múltiplos mecanismos que contribuem na separação, mas principalmente, dificultam a integração para cálculo de área, o que pode acarretar em imprecisão e inexatidão do método.

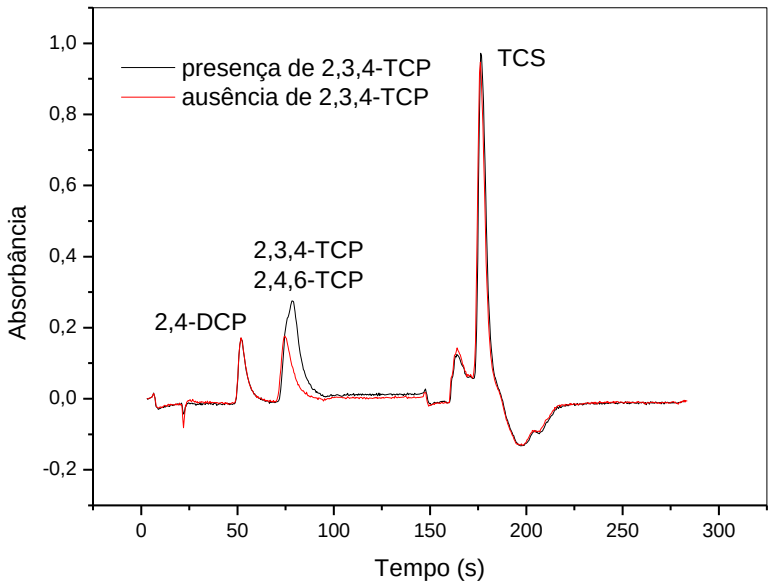

FIGURA 4.19. Cromatogramas de misturas de triclosan (TCS) e seus derivados 2,4-DCP; 2,4,6-TCP e 2,3,4-TCP com e sem adição de 2,3,4-TCP usando em ambos os casos eluição com duas etapas isocráticas. Os compostos estão em uma mesma concentração de 0,132 mM em MeOH 52,8 % (v v^{-1}). A eluição foi feita com uma primeira etapa usando 2,7 mL (60:40; MeOH : 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5) seguida da etapa com 1 mL de (80:20; MeOH : 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5) + 3 mL (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH =5,5). Volume amostra = 20 µL; vazão = 30 µL s^{-1}

No trabalho original em que foi proposta a eluição passo a passo com incrementos discretos da concentração de modificador orgânico (Rigobello-Masini et al, 2008) os autores usaram detecção por fluorescência, que não é suscetível ao aparecimento do efeito Schlieren causado pelo gradiente de índice de refração. No caso de detecção espectrofotométrica, Chocholous et al (2010) propuseram uma nova estratégia de eluição usando duas colunas acopladas a portas diferentes da válvula seletora. Nesse caso cada coluna é eluída de maneira isocrática com fases móveis de composições distintas. Os compostos mais fortemente retidos são eluídos em uma coluna de 10 mm de comprimento, enquanto os menos retidos são

analisados em uma coluna de 30 mm. Com isso, os gradientes de concentração são evitados, obtendo-se duas linhas de base estáveis, uma para cada coluna. Entretanto, a otimização dessa metodologia é mais complexa, principalmente no que concerne a limpeza da coluna maior com uma fase móvel com baixa força de solvente. Gradiente com variação contínua da composição da força do solvente em sistema SIC foi proposto recentemente por Koblova et al (2011). Apesar da simplicidade da proposta, essa é limitada pelo pequeno volume da bobina coletora, o que faz com somente pequenos volumes apresentem o perfil de gradiente de concentrações, limitando-se assim à separação de dois ou três compostos.

O efeito Schlieren em análise por injeção em fluxo foi revisado por Rocha e Nóbrega (1996) sendo que um dos principais cuidados para evitar o aparecimento de distorções pronunciadas nos picos é a compatibilização da composição das soluções de amostra e solução transportadora. No caso da eluição passo a passo isso é impossível, pois a variação da força do solvente implica em variações significativas de composição. Entretanto, evitando-se variações muito bruscas de concentração de modificador orgânico consegue-se minimizar o efeito Schlieren, ou pelo menos controlar a retenção dos compostos para que estes não sejam eluídos já nos primeiros elementos de fluido de fase móvel com maior teor orgânico que deixa a coluna em direção ao detector. Isso porque tais elementos de fluido se referem à zona de interpenetração entre as duas soluções de fase móvel com maior e menor concentração de fase móvel, gerando os gradientes de índice de refração.

4.2.1.4. Otimização da fase móvel

A condição de eluição que se mostrou mais apropriada para obtenção de picos cromatográficos bem resolvidos e com tempos de retenção afastados da zona de interpenetração de fases móveis com diferentes composições, sujeita ao efeito Schlieren, foi

obtida usando duas etapas de eluição isocráticas. A primeira delas foi feita usando 2,7 mL da "fase móvel 1", composta por mistura 60:40 (v v^{-1}) de MeOH : 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5, enquanto a segunda etapa foi feita com 2,0 mL da "fase móvel 2", composta por mistura 70:30 (v v^{-1}) de MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5 seguida de mais 2,0 mL da "fase móvel 1" (recondicionamento da coluna). O menor conteúdo orgânico do eluente da primeira etapa isocrática favorece a separação dos clorofenois mais polares que têm apenas um anel benzênico na estrutura, retendo na coluna o triclosan, de menor polaridade que contém dois anéis benzênicos. Na segunda etapa de eluição, a maior concentração de metanol diminui a polaridade da fase móvel e favorece a eluição dos compostos mais apolares como o triclosan ou mesmo o metil triclosan, como será discutido futuramente.

4.2.2 Estudo da vazão

As vazões estudadas estiveram na faixa de 10 - 40 µL s^{-1}. Estes estudos foram feitos usando um volume fixo de amostra de 30 µL. As mudanças nas vazões foram feitas nas etapas 4 e 7 (ver TABELA 3.2), quando se envia o eluente através da porta 2 para a coluna e detector. Nas FIGURAS 4.20 e 4.21 se observa que as maiores vazões de fase móvel diminuem drasticamente o tempo de análise, diminuindo também a área dos picos, uma vez que esses se tornam mais estreitos.

O tempo de análise da metodologia estará limitado ao analito mais hidrofóbico (o triclosan) que elui com maior tempo de retenção, sempre que os outros analitos menos apolares já foram eluídos com resolução adequada. O sinal de triclosan expresso em área, para uma vazão de 10 µL s^{-1}, é duas vezes maior do que o obtido para uma vazão de 20 µL s^{-1}. Por outro lado, a análise é 1,81 vezes mais demorada, observando-se tempos de retenção de

513,19 e 283,03 s, respectivamente, para vazões de 10 e 20 µL s^{-1}. Além disso, os picos obtidos com vazões menores são muito alargados.

O sinal do triclosan obtido para a vazão de 30 µL s^{-1} (t_R = 209,53 s) em área foi 6,10 s, enquanto para a vazão de 40 µL s^{-1} (t_R = 173,26 s) foi 4,94 s com ganho de 23,48 %. A FIGURA 4.21 mostra a influência da variação da vazão nas áreas de pico, podendo-se observar que os valores obtidos para vazões de 10 e 20 µL s^{-1} estão sujeitos a desvios padrões relativos de até 7,4 % para 2,4-DCP e triclosan. Já para as vazões de 30 e 40 µL s^{-1} os desvios padrões relativos foram menores do que 2,7 %. A FIGURA 4.22 mostra a influência da vazão nos sinais de altura de pico, expressos em absorbância. Observa-se que para 2,4-DCP e 2,4,6-TCP nas vazões de 20, 30 e 40 µL s^{-1} não houve diferenças significativas. No caso de triclosan foi obtido um ligeiro ganho de 3,27 % do sinal em absorbância para vazões de 30 µL s^{-1} em relação ao obtido em 40 µL s^{-1}.

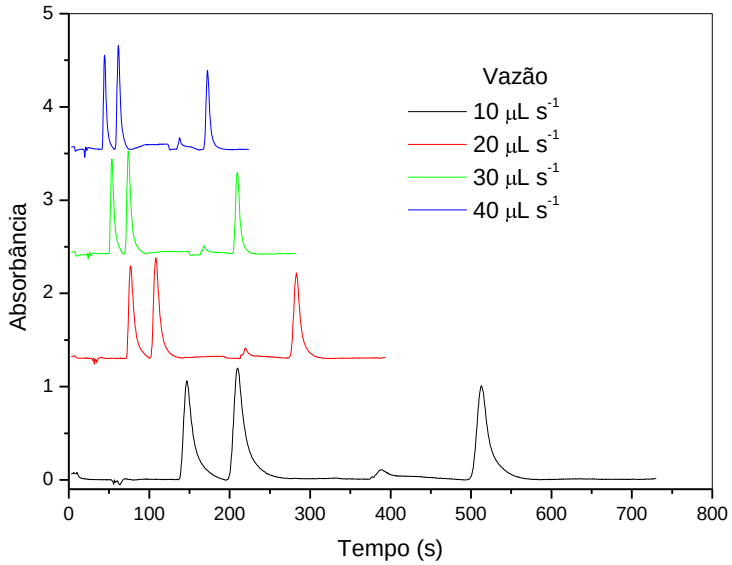

FIGURA 4.20. Influência da vazão nos cromatogramas de uma mistura contendo triclosan, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP com concentrações de 36, 100, 100 mg L^{-1}, respectivamente, em metanol 20% (v v^{-1}). Eluentes: primeira etapa isocrática = 2,7 mL da fase móvel 1 = (60:40; MeOH : 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); segunda etapa isocrática = 2 mL da fase móvel 2 (70:30; MeOH : 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5 + 2 mL da fase móvel 1 (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5).Volume de amostra = 30 µL.

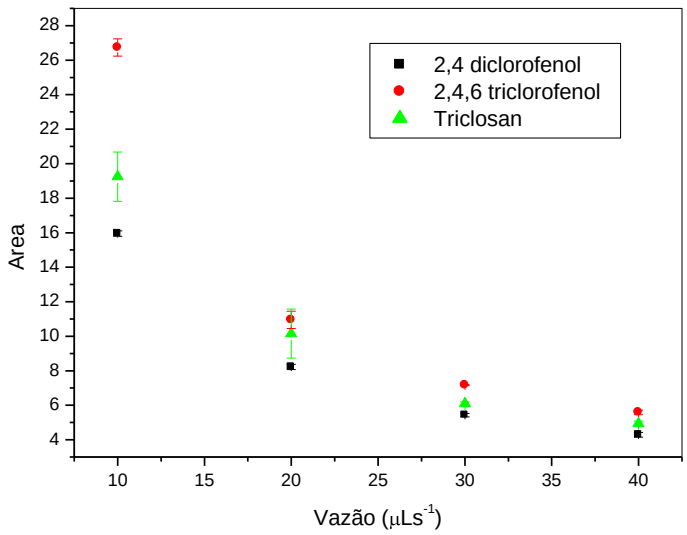

FIGURA 4.21. Influência da vazão no sinal analítico expresso em áreas de picos obtidos nos cromatogramas de uma mistura de amostra contendo triclosan, 2,4 DCP, e 2,4,6 TCP com concentrações de 36, 100, 100 mg L^{-1}, respectivamente. Condições experimentais dadas na legenda da FIGURA 4.20.

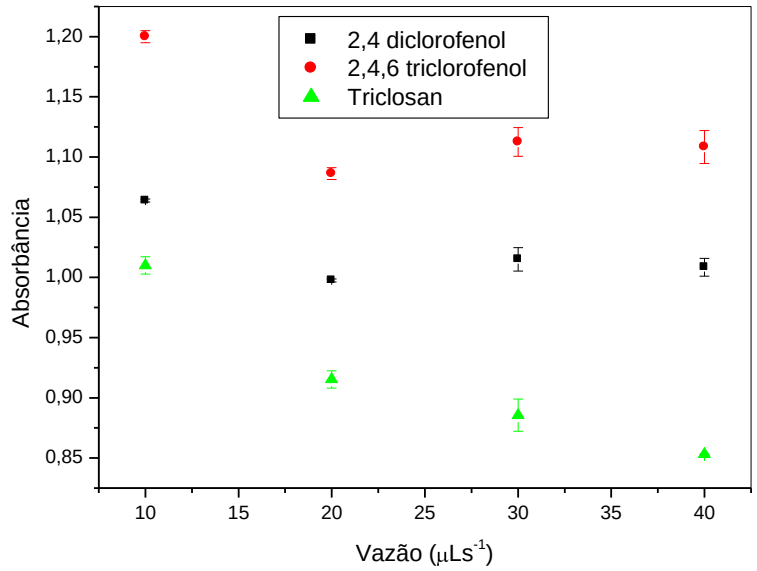

FIGURA 4.22. Influência da vazão no sinal analítico expresso em absorbância lida em 240 nm em cromatogramas de mistura de triclosan, 2,4-DCP, e 2,4,6-TCP com concentrações de 36, 100, 100 mg L^{-1}, respectivamente. Condições experimentais dadas na legenda da FIGURA 4.20.

No estudo da influência de vazão, entretanto, o mais importante é encontrar a solução de compromisso entre tempo de análise e resolução cromatográfica, mantendo a atenção aos problemas de vazamento que podem surgir em decorrência do aumento de pressão a vazões mais elevadas. A TABELA 4.6 apresenta os valores de resolução obtidos na separação dos picos de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e TCS.

TABELA 4.6. Influência da vazão na resolução dos picos de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e triclosan

Pares	**Vazão (µL s^{-1})**			
	10	**20**	**30**	**40**
	Resolução			
2,4-DCP x 2,4,6-TCP	2,23	1,83	1,83	1,63
2,4,6-TCP x triclosan	7,2	7,35	9,5	10,6

O que se observa em termos de resolução, especialmente para o par 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, cujos tempos de retenção não são influenciados pelo tempo de recarregar o compartimento da bomba, é que a vazão tem muito pouca influencia na resolução. Esse fato é coerente com a teoria da eficiência de separação para colunas monolíticas demonstrado por Cabrera (2004). De acordo com Cabrera (2004) a altura de prato teórico é pouco influenciada pela velocidade linear média de fluxo, que por sua vez é diretamente relacionado com a vazão da fase móvel para uma mesma coluna. Com isso, comparativamente a colunas empacotadas com partículas porosas de 5 µm de diâmetro, os picos são pouco alargados com o aumento da vazão. Ainda segundo a autora (Cabrera, 2004) o perfil de variação de altura de prato (H) em função da velocidade linear de fluxo para colunas monolíticas é similar àquele obtido para

colunas empacotadas com partículas de sílica esférica com diâmetro de 3,5 µm. Fases estacionárias monolíticas fornecem altas taxas de transferência de massa com pouco aumento de pressão, permitindo separações muito mais rápidas (vazões possíveis de serem aplicadas em colunas monolíticas não poderiam ser impostas a colunas recheadas com partículas de 3,5 µm). Siouffi (2006) compilou dados experimentais de H em função da velocidade linear média de fluxo em colunas monolíticas com ênfase no termo "C" de transferência de massa da equação de van Deemter, verificando que colunas de sílica monolíticas do tipo C_{18} apresentam baixíssimos valores do termo "C", e que esses valores variam muito pouco dentro de uma ampla faixa de vazões.

Então, foi escolhida uma vazão de 30 µL s^{-1} como uma solução de compromisso entre fatores como resolução, tempo de analise, sensibilidade e robustês instrumental. O tempo total de análise para cada vazão 10; 20; 30 e 40 µL s^{-1} foi 12,42; 6,82; 4,95 e 4,02 min, respectivamente. Em princípio, a vazão de 40 µL s^{-1} poderia ter sido escolhida, pois com ela se obtém o menor tempo de análise sem prejudicar a resolução ou sem implicar em perda significativa de sensibilidade, mas nessa vazão, assim como observado nos estudos anteriores, as pré-colunas precisam ser trocadas com muita frequência para evitar vazamentos de fase móvel por portas não selecionadas da válvula seletora.

4.2.3. Influência do Volume de Amostra

Fixando a vazão de 30 µL s^{-1} foram realizados os estudos de volume de amostra entre 5 e 100 µL. Na FIGURA 4.23 observa-se que os incrementos no volume de amostra aumentam linearmente o sinal analítico, expresso em área, ou seja, melhoram a sensibilidade. O tempo de retenção (em s) obtido para 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e triclosan foram: t_R = 52,07

(±0,44), t_R = 72,23 (±0,62), t_R = 207,55 (±0,29). Estes valores de tempo de retenção se mantêm para volume de amostra ≤ 20 µL Acima destes valores começa a manifestar-se deslocamento no tempo de retenção destes analitos.

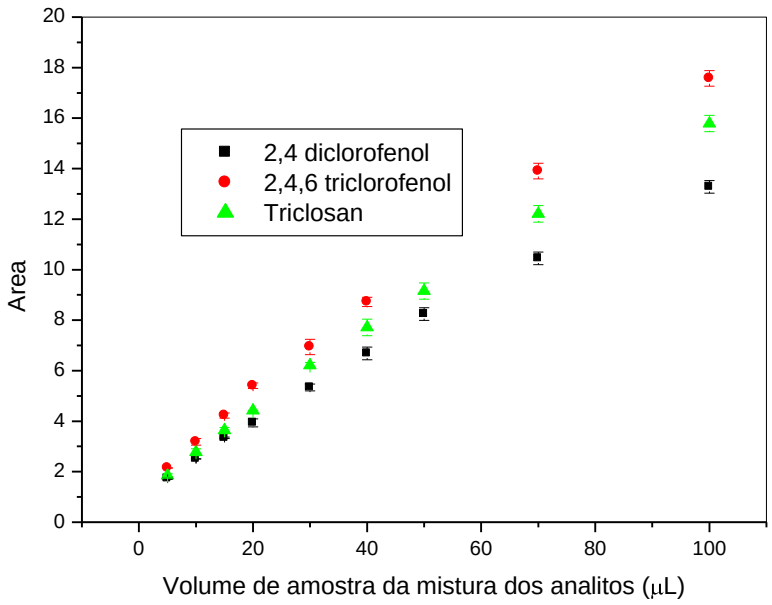

FIGURA 4.23. Influência do volume de amostra nas áreas de pico. Os cromatogramas foram obtidos injetando-se uma mistura de triclosan, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP com concentrações de 36, 100 e 100 mg L^{-1}, respectivamente, em metanol 21 % (v v^{-1}). Condições de eluição: 1ª etapa isocrática = 2,7 mL da "fase móvel 1" = (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); 2ª etapa isocrática = 2mL de "fase móvel 2" (70:30; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5 + 2 mL "fase móvel 1" (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). Vazão = 30 µL s^{-1}

A FIGURA 4.24 mostra os estudos da influência da variação do volume de amostra no sinal analítico lido como absorbância no máximo de pico, observando-se que incrementos no volume de amostra na faixa de 5-100 µL aumentam o sinal de forma linear numa faixa estreita de 5 a 40 µL. Porém, o valor da absorbância correspondente aos volumes de amostra de 30 e 40 µL resultam em absorbâncias maiores de 1. Então o volume de amostra de 20 µL foi escolhido, já que nestas condições os analitos tem uma absorbância próximos de 1, evitando erros devido a desvios da lei de Beer (Skoog et al, 1996), mas principalmente por se tratar de

um volume de amostra que não causa saturação da fase estacionária com, conseqüente distorção e alargamento de pico, além de perda de resolução (Snyder et al, 1997).

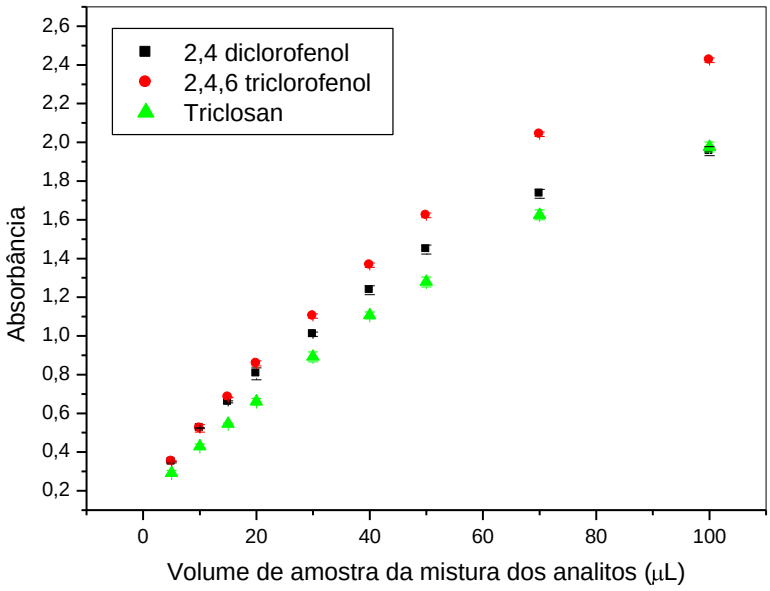

FIGURA 4.24. Influência do volume de amostra nas alturas de pico, expressa em valores de absorbância. Os cromatogramas foram obtidos injetando-se uma mistura de triclosan, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP com concentrações de 36, 100 e 100 mg L^{-1}, respectivamente, em metanol 21 % (v v^{-1}). Condições de eluição: 1ª etapa isocrática = 2,7 mL da "fase móvel 1" = (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); 2ª etapa isocrática = 2 mL de "fase móvel 2" (70:30; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5 + 2 mL "fase móvel 1" (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). Vazão = 30 μL s^{-1}

Na FIGURA 4.25 se mostram os cromatogramas obtidos no estudo da influência dos volumes de amostra. Como podemos visualizar, dentro da faixa de variação de volume de amostra de 10 a 50 μL os três picos foram bem resolvidos. Volumes de amostra maiores que 20 μL, com alta absorbância, implicaram também em maior dificuldade na etapa de limpeza, acarretando em efeitos de memória.

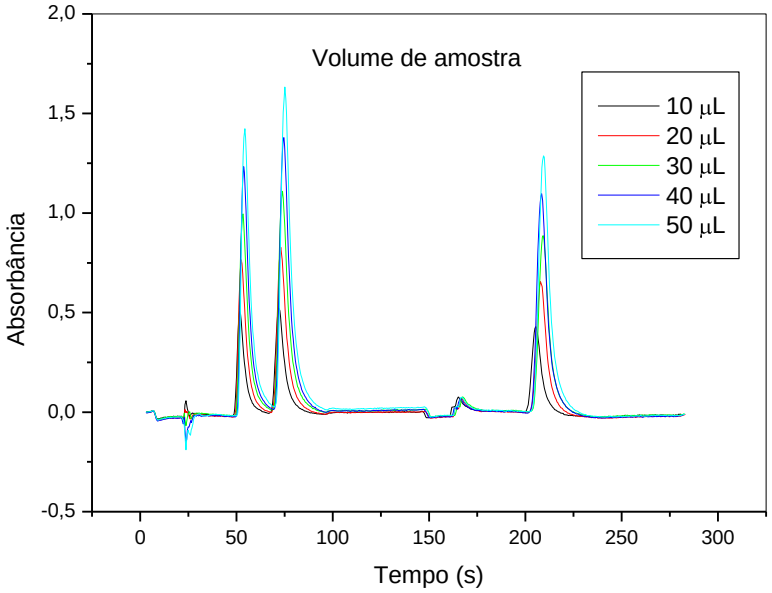

FIGURA 4.25. Cromatogramas obtidos no estudo de influência do volume de amostra.Condições cromatográficas semelhantes àquelas descritas nas legendas das FIGURAS 4.23 e 4.24.

4.2.4. Resolução e Eficiência

As características cromatográficas gerais do método desenvolvido podem ser resumidas na TABELA 4.7. A seletividade de triclosan em relação ao 2,4,6-triclorofenol foi de 3,72 e a seletividade de 2,4,6-triclorofenol em relação ao 2,4-diclorofenol foi de 1,62, sendo estes valores adequados. A resolução foi calculada em relação ao pico adjacente do analito com menor tempo de retenção. Foi obtida separação efetiva entre estes analitos, com resolução $R \geq 1,5$. Fatores de retenção foram $k \geq 1,44$.

TABELA 4.7. Características cromatográficas do método otimizado para separação de uma misturas de 2,4 diclorofenol; 2,4,6 triclorofenol e triclosan.

Análito	**λ (nm)**	**t_M (s)**	**t_R (s)**	**k**	**Área**	**Resolução**	**Fase Móvel**
Triclosan			52,438	8,66	3,82	10,9	(60 : 40)
2,4,6 TCP	240	21,51	71,641	2,33	6,01	1,68	+
2,4 DCP			207,719	1,44	4,40	-	(70 : 30)

A eficiência da coluna para realizar separação foi obtida experimentalmente para os componentes da mistura contendo o triclosan, 2,4,6-triclorofenol e 2,4-diclorofenol com valores de número de pratos teóricos 4110; 576 e 309, respectivamente, considerando os tempos de retenção e comprimento de 25 mm para a coluna monolítica. Portanto, as alturas de prato (HEPT) experimentais obtidos para o triclosan, 2,4,6 triclorofenol e 2,4 diclorofenol foram 0,006; 0,04 e 0,08 mm, respectivamente. Valores de HEPT < 0,06 indicam uma eficiência excelente, o que se aplica a triclosan e 2,4-DCP. Todos estes parâmetros com valores adequados a critérios de eficiência cromatográfica asseguram adequada separação dos analitos, podendo-se concluir que a coluna monolítica curta e a programação de eluição proporcionada pelo sistema SIC se mostram, efetivos para a separação de uma mistura contendo estes analitos.

4.2.5. Curvas analíticas obtidas na separação de uma mistura de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e triclosan

Os parâmetros otimizados das composições de fase móvel e a sequência de etapas de eluição adotando-se uma vazão de 30 µL s^{-1} e um volume de amostra de 20 µL foram usados para avaliar a linearidade de resposta, bem como os limites de detecção e de quantificação do método proposto. Os cromatogramas desse estudo são mostrados na FIGURA 4.26.

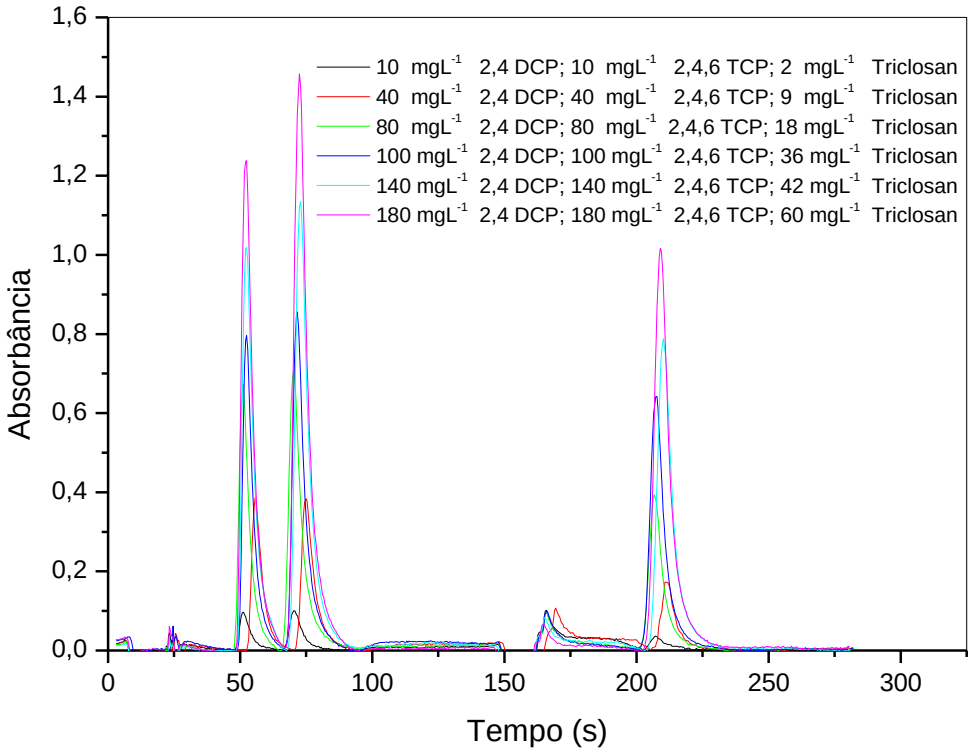

FIGURA 4.26. Cromatogramas obtidos para construção de uma curva analítica para determinação de 2,4 DCP (10 a 180 mg L^{-1}); 2,4,6 TCP (10 a 180 mg L^{-1}) e triclosan (2-60 mg L^{-1}) sendo os analitos originalmente presentes em metanol 21 % (v v^{-1}). Condições de eluição: 1ª etapa isocrática = 2,7 mL da "fase móvel 1" = (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5); 2ª etapa isocrática = 2mL de "fase móvel 2" (70:30; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5 + 2 mL "fase móvel 1" (60:40; MeOH: 20 mM CH_3COONH_4 a pH = 5,5). Volume de amostra = 20 µL; vazão = 30 µL/s

As áreas de pico foram calculadas por integração dos picos usando o programa Origin 6.0 e colocadas em gráfico em função da concentração dos analitos, conforme mostrado na FIGURA 4.27.

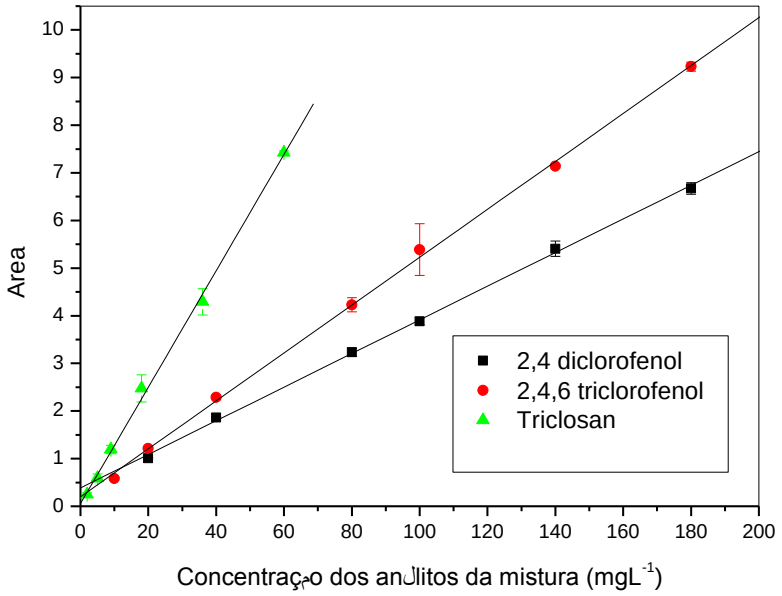

FIGURA 4.27. Curvas analíticas obtidas a partir das áreas de pico em função das concentrações de 2,4 DCP; 2,4,6 TCP e triclosan obtidas a partir das condições cromatográficas descritas na legenda da FIGURA 4.26. As barras de erro correspondem a estimativa de desvio padrão de triplicatas.

A FIGURA 4.28 mostra os gráficos de curvas analíticas obtidas a partir da determinação de absorbâncias nos máximos de pico em função da concentração de 2,4-DCP. 2,4,6-TCP e TCS

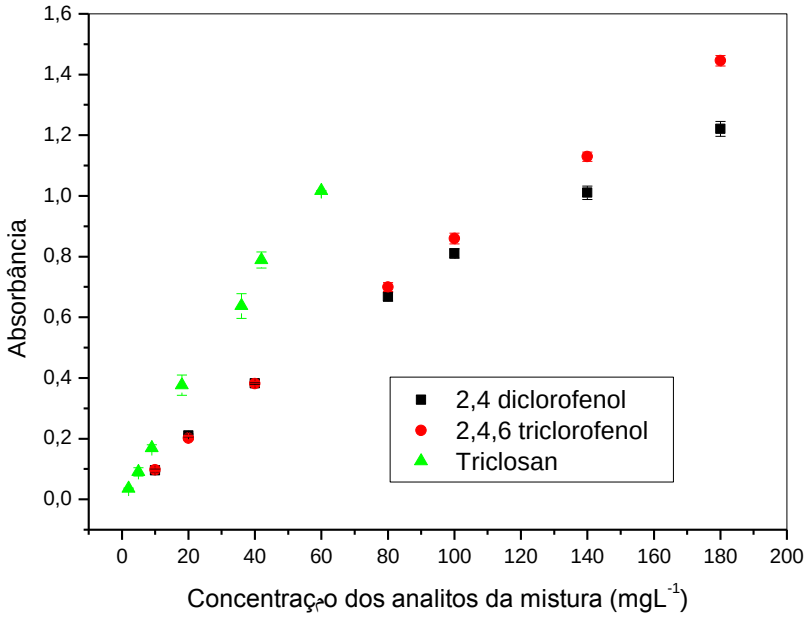

FIGURA 4.28. Curvas analíticas obtidas a partir das absorbâncias lidas no máximo de pico em função das concentrações de 2,4 DCP; 2,4,6 TCP e triclosan obtidas a partir das condições cromatográficas descritas na legenda da FIGURA 4.26. As barras de erro correspondem a estimativa de desvio padrão de triplicatas.

As Tabelas 4.8 e 4.9 apresentam os calores de faixa de resposta linear, coeficientes angular, linear e de correlação, além dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os valores de LD foram estimados a partir da expressão $LD = \frac{3S_{y/x}}{m}$ onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão dos resíduos de y no ajuste de regressão linear entre as áreas de pico e concentrações de analitos. O termo *m* é o coeficiente linear da reta ajustada (Miller e Miller, 1988). O limite de quantificação foi estimado como três vezes o valor de LD.

TABELA 4.8. Parâmetros de faixa de resposta linear e equações das curvas analíticas obtidas para 2,4-DCP. 2,4,6-TCP e Triclosan baseando-se nas áreas de picos

Composto	Faixa Linear (mg L^{-1})	Coeficiente Angular (L mg^{-1})	Coeficiente Linear	Coeficiente de correlação	LD (mg L^{-1})	LQ (mg L^{-1})
2,4-DCP	20 – 180	0,0353 ± 0,0006	0,38 ± 0,06	0,998	6,4	19
2,4,6-TCP	10 – 180	0,0503 ± 0,0007	0,20 ± 0,07	0,998	2,6	7,9
Triclosan	2 – 60	0,122 ± 0,003	0,06 ± 0,09	0,997	0,81	2,4

TABELA 4.9. Parâmetros de faixa de resposta linear e equações das curvas analíticas obtidas para 2,4-DCP. 2,4,6-TCP e Triclosan baseando-se nas absorbâncias lidas nos máximos de pico

Composto	Faixa Linear (mg L^{-1})	Coeficiente Angular (L mg^{-1})	Coeficiente Linear	Coeficiente de correlação	LD (mg L^{-1})[a]	LQ (mg L^{-1})[a]
2,4-DCP	20 – 180	$(6,6\pm0,3)\times10^{-3}$	0,09 ± 0,03	0,98	4,8	14,3
2,4,6-TCP	10 – 180	$(7,8\pm0,2)\times10^{-3}$	0,05 ± 0,02	0,997	2,4	7,4
Triclosan	2 – 60	$(17,2\pm0,6)\times10^{-3}$	0,02 ± 0,02	0,991	0,28	0,85

[a] Estimados a partir dos três primeiros pontos da curva

Avaliando-se os gráficos das FIGURAS 4.27 e 4.28, assim como os coeficientes de correlação das TABELAS 4.8 e 4.9, fica claro que as medidas de área são as mais recomendáveis, dada a melhor linearidade. As estimativas de LD e LQ obtidas por medidas de altura de pico foram até menores do que aquelas obtidas a partir das áreas, mas isso só foi possível pelo fato de o calculo ter sido feito com os primeiros pontos da curva (10, 20 e 40 mg L^{-1} para 2,4-DCP e 2,4,6-TCP; 2, 5, 9 mg L^{-1} para triclosan), que apresentam melhor linearidade.

Os limites de detecção e de quantificação do método proposto são elevados para o monitoramento desses compostos em águas naturais, o que requereria extensas etapas de pré-concentração. Por outro lado, o método pode encontrar potenciais aplicações em estudos de processos onde estes poluentes se encontrem na ordem mg L^{-1}, que podem ser desde estudos de adsorção em diferentes sólidos (argilominerais, solos, substâncias húmicas, carvão ativo, etc) ou ainda em processos de degradação biológica, ou ainda mineralização por processos oxidativos avançados, especialmente em amostras de lodo e esgoto com possível aplicação na agricultura em forma de biosólidos. Estes estudos em geral visam a sustentabilidade e qualidade do ecossistema, para entender a maneira pela quais as espécies químicas se distribuem entre os diferentes compartimentos e, sobretudo em ter uma percepção dos mecanismos reguladores de sua concentração.

4.2.6. Repetitividade

Foram feitos estudos da repetividade a três níveis de concentrações da mistura contendo 2,4-DCP; 2,4,6-TCP e triclosan: nível 1 = (10;10 e 2 mg L^{-1}); nível 2 = (20; 20 e 5 mg L^{-1}) e nível 3 = (100; 100; 36 mg L^{-1}). Na TABELA 4.10 se mostram os valores obtidos

para estes estudos; o desvio padrão relativo (RSD %) do tempo de retenção dos analitos em estudo se encontram na faixa de 0,02 a 0,87 %; os desvios padrões relativos em relação às concentrações para os clorofenois foram na faixa de 0,82 a 2,76 % e para o triclosan na faixa de 3,83 a 6,65 %. Os valores de RSD mais altos para o triclosan em relação aos dos outros analitos são devido ao fato de que o triclosan é eluído numa segunda etapa de eluição, após mudança na composição da mistura do solvente na fase móvel, com força orgânica maior, originando uma variação do índice de refração, gerando assim o efeito Schlieren no sistema, provocando ligeira distorção do sinal, o que aumenta a imprecisão na integração das áreas. Os baixos valores de RSD, especialmente em relação aos tempos de retenção, comprovam a eficiência do sistema SIC para criar uma condição bastante reprodutível de incrementos de modificador orgânico nas diferentes etapas de eluição, assim como no recondicionamento da coluna no final da análise.

TABELA 4.10. Estudo da repetividade a três níveis de concentração.

	Análito	**Área**	**RSD%**	**t_R (s)**	**RSD%**
Nível 1	2,4-DCP	0,47	2,13	52,56	0,42
	2,4,6-TCP	0,59	1,45	73,23	0,02
	Triclosan	0,17	6,22	207,46	0,03
Nível 2	2,4-DCP	1,02	2,76	52,29	0,10
	2,4,6-TCP	1,20	0,82	72,17	0,20
	Triclosan	0,63	6,65	207,34	0,03
Nível 3	2,4-DCP	3,94	1,56	51,13	0,67
	2,4,6- TCP	5,10	2,21	70,58	0,87
	Triclosan	4,47	3,83	207,45	0,56

4.3. Separação de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, Triclosan e Metiltriclosan em sistema SIC

Após a reconfiguração do sistema SIC, com instalação da válvula seletora de altas pressões, fez-se um estudo exploratório a respeito da inclusão de outros metabólitos de triclosan (2-clorofenol e metiltriclosan), bem como o uso de um volume elevado de amostra (100 µL) buscando uma melhora dos limites de detecção e de quantificação. A FIGURA4.29 mostra uma sequência de três cromatogramas de uma mistura desses compostos nas concentrações 0,20, 0,50 e 1,0 mg L^{-1}. O composto 2-clorofenol é eluido com a fase móvel contendo a relação 60:40 (v v^{-1}) MeOH: tampão acetato de amônio 20 mM, pH 5,5, com tempo de retenção menor do que 2,4-DCP. Entretanto, a absortividade desse composto em 240 nm foi muito baixa, sendo que o mesmo não foi detectado nesses experimentos. Triclosan e metiltriclosan podem ser separados com a fase móvel 70:30 MeOH : acetato de amônio 20 mM, pH 5,5. Entretanto, a eluição de triclosan ocorre no final de uma etapa de injeção de 2 mL da fase móvel contida na bobina coletora,cuja capacidade é de 2 mL. Por isso, para eluição de metiltriclosan é necessário uma nova etapa de preenchimento da bobina com essa fase móvel antes das etapas finais de eluição e de recondicionamento da coluna, conforme descrito no item 3.4.1.

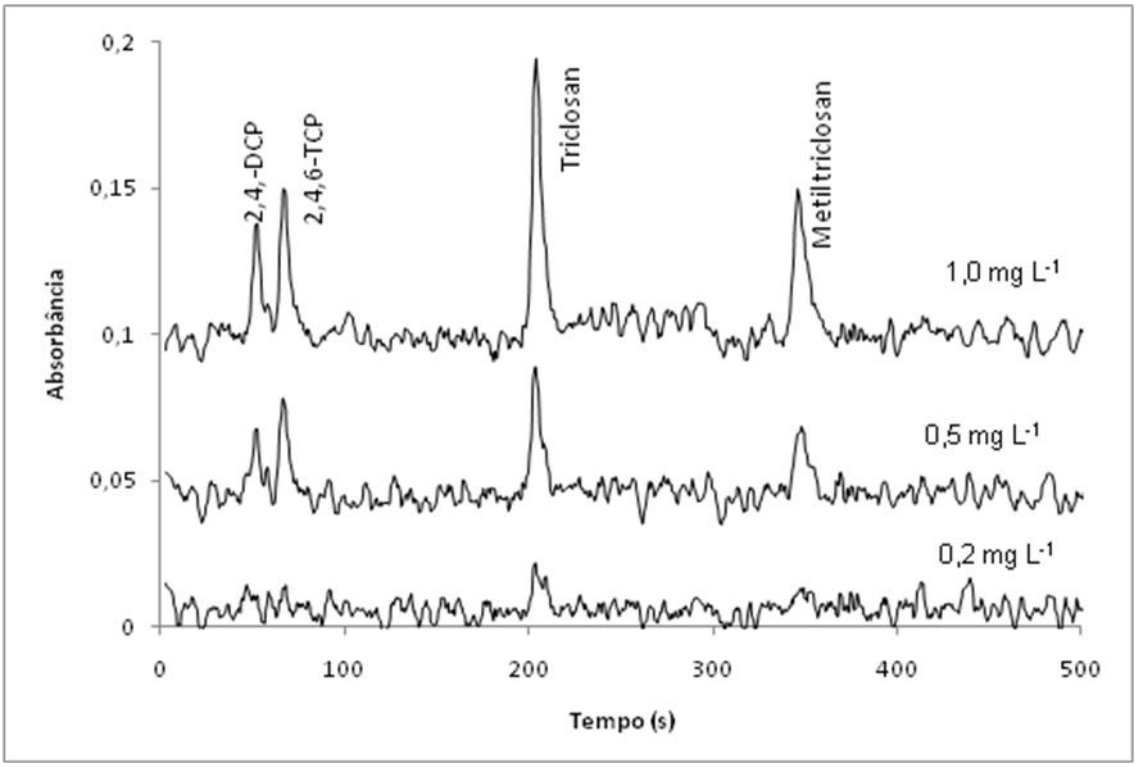

FIGURA 4.29. Cromatogramas subtraídos do branco de uma mistura de 2-clorofenol, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, Triclosan e Metiltriclosan usando três etapas de eluição: etapa inicial com 2800 µL de FM_1 60:40 (MeOH: 20 mM tampão acetato de amônio pH5,5) para eluir 2-clorofenol (não detectado), 2,4-DCP e 2,4,6-TCP; seguida de duas etapas de 2000 µL com FM_2 70:30 (MeOH: 20 mM tampão acetato de amônio pH5,5). Volume de amostra = 100 µL, Comprimento de onda = 240 nm; Vazão nas etapas de eluição = 30 µL s^{-1}.

Para estimar os limites de detecção e quantificação nesse caso usou-se a relação sinal/ruído, considerando-se o LD como a concentração que gere uma altura de pico maior ou igual a 3 vezes o desvio padrão do ruído lido na linha de base no tempo de retenção correspondente a cada analito. O limite de quantificação foi estimado para concentrações que gerassem a altura de pico 10 vezes maior que o desvio padrão do ruído na linha de base. Nesse caso, os valores de LD para 2,4-DCP, 2,4,6-TCP, Triclosan e Metiltriclosan foram 0,15, 0,11, 0,063 e 0,11 mg L^{-1}, respectivamente, ao passo que os valores de LQ para os mesmos compostos foram 0,45, 0,33, 0,19 e 0,33 mg L^{-1}. Observa-se uma significativa melhora nesses valores em relação aos estudos anteriores, muito embora para aplicações em amostras de água, etapas de pré-concentração ainda seriam necessárias. Um incoveniente

observado com o aumento de cinco vezes no volume de amostra (20 → 100 μL) foi a perda de resolução entre 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, além de sérias deformações nos picos de triclosan e metiltriclosan para concentrações maiores do que 5 mg L^{-1} (não mostrado na FIGURA 4.29).

Com isso conclui-se que é possível separar eficientemente triclosan e metiltriclosan, bem como melhorar os limites de detecção com o emprego de maiores volumes de amostra, tendo-se em mente que essa estratégia pode comprometer a resolução para concentrações mais elevadas.

4.4. Adsorção de triclosan em montomorilonita natural e modificada

4.4.1. Método analítico

Atapattu e Poole (2010) estudaram os fatores que afetam a seletividade em coluna de fase reversa Synergi. Os autores argumentam que os principais mecanismos de retenção que governam as interações do soluto com a fase estacionária são dominados pelo tamanho do soluto e a basicidade de ligação hidrogênio. Muitos mecanismos com diferentes retenções são explorados na cromatografia de fase reversa com a finalidade de reter e separar analitos alvos. As colunas Synergi com suporte de silica ultrapura foram desenvolvidas pela Phenomenex para separar misturas de compostos hidrofóbicos e polares. Tentamos aproveitar as características da coluna modelo Fusion-RP, já que essa possui um ligante hidrofóbico C18 que fornece uma boa seletividade e retenção hidrofóbica, enquanto o grupo polar embutido melhora a retenção de compostos polares, além de possuir capeamento com TMS que assegura as formas dos picos. Foi usada a coluna Synergi Fusion-RP aproveitando a sua fase dual que equilibra a retenção e a resolução de compostos polares, ácidos, básicos e hidrofóbicos. Esta fase estacionária foi testada já que os analitos em estudo têm características

polares (2 clorofenol e o 2,4 diclorofenol) e não polares (triclosan e metiltriclosan) para tentarmos conseguir uma combinação adequada de seletividade.

4.4.2 Curvas analíticas

Foram realizados a separação por eluição por gradiente, se otimizou a programação, sendo a fase móvel B composta por acetonitrila (ACN) pura e a fase móvel A por tampão fosfato de trietilamina 20 mM a pH 3,5.

A programação otimizada é descrita como:

Estabelecendo-se 1,30 mL min^{-1} como vazão total do sistema, a eluição é feita com uma primeira etapa isocrática em 50 % de B até 2 min. Após isso se estabelece um gradiente linear até 90% de B, o que é atingido aos 10 min de tempo de corrida. Mantém-se a eluição isocrática em 90% de B até 12 min, retornando-se à condição inicial (50% de B) no tempo de 15 min. Para recondicionamento, mantém-se a condição isocrática (50% de B) por mais 2 min, totalizando um tempo total de análise de 17 min. O comprimento de onda para detecção da absorbância foi ajustado em 220 nm.

A curva analítica compreendeu a faixa de concentrações de 0 a 20 mgL^{-1}. A TABELA 4.11 mostra como foram preparados os padrões. Foi usada uma solução 30 mg L^{-1} de Anthrone como padrão interno conforme proposto por Piccoli et al, 2002, sendo esta concentração inapropriada, já que esta concentração satura o detector quando lida a 220 nm. A concentração apropriada do padrão interno foi de 7,5 mg L^{-1}.

TABELA 4.11. Preparo dos padrões da curva analítica

Conc. Analito [a] (mgL^{-1})	**Volume do estoque[a] (µL)**	**Volume TEA-fosfato (mL)**	**Volume de Anthrone (mL)**	**Volume de MeOH (µL)**	**Volume de ACN (mL)**
0	0	6	1	2000	1
0,5	50	6	1	1950	1
0,8	80	6	1	1920	1
1	100	6	1	1900	1
2	200	6	1	1800	1
4	400	6	1	1600	1
5	500	6	1	1500	1
6	600	6	1	1400	1
8	800	6	1	1200	1
10	1000	6	1	1000	1
20	2000	6	1	0	1

a:pertence a mistura dos padrões 100 mg L^{-1}

Na continuação são mostradas as curvas analíticas nas FIGURAS 4.30; 4.31; 4.32; 4.33 e 4.34 para os analitos estudados. Os parâmetros calculados a partir das curvas analíticas, tais como coeficientes angulares, lineares e de correlação, assim como os limites de detecção e de quantificação são apresentados na TABELA 4.12

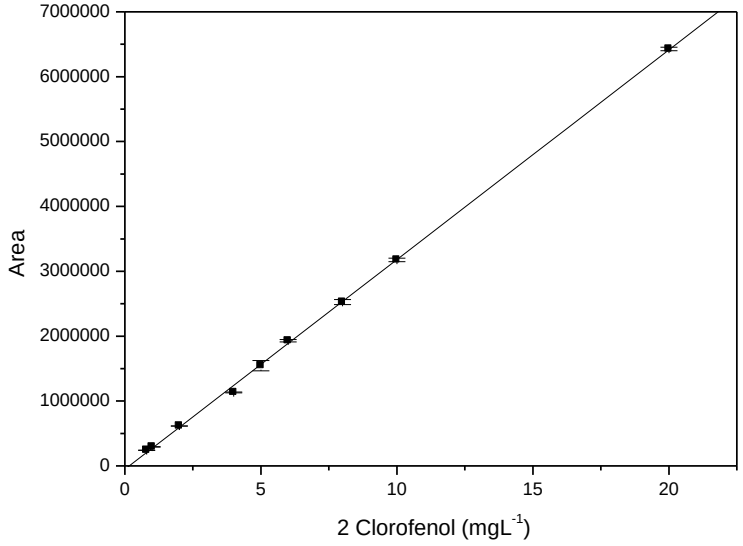

FIGURA 4.30. Curva analítica de 2- clorofenol

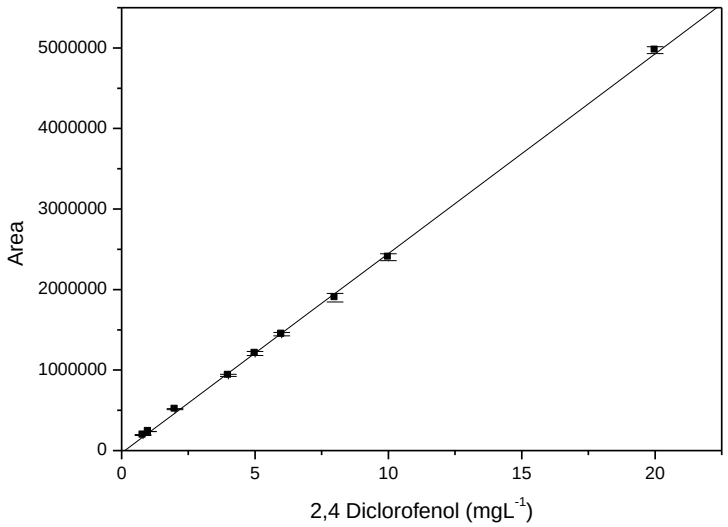

FIGURA 4.31. Curva analítica de 2,4 diclorofenol

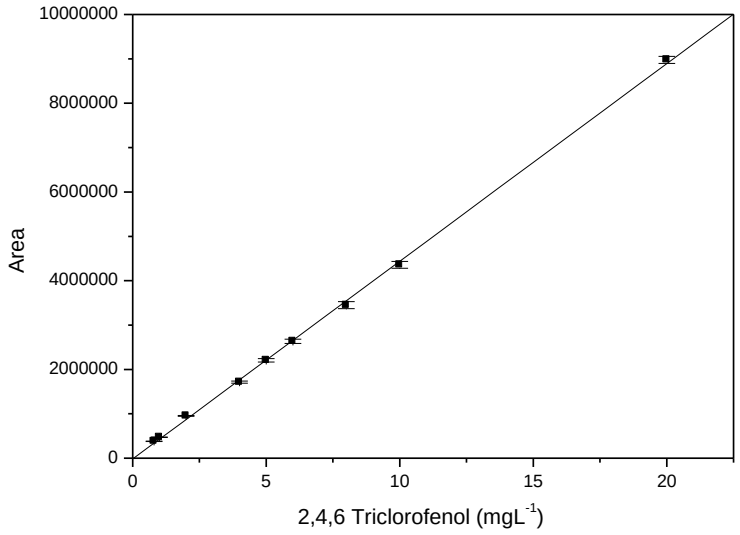

FIGURA 4.32. Curva analítica de 2,4,6 triclorofenol

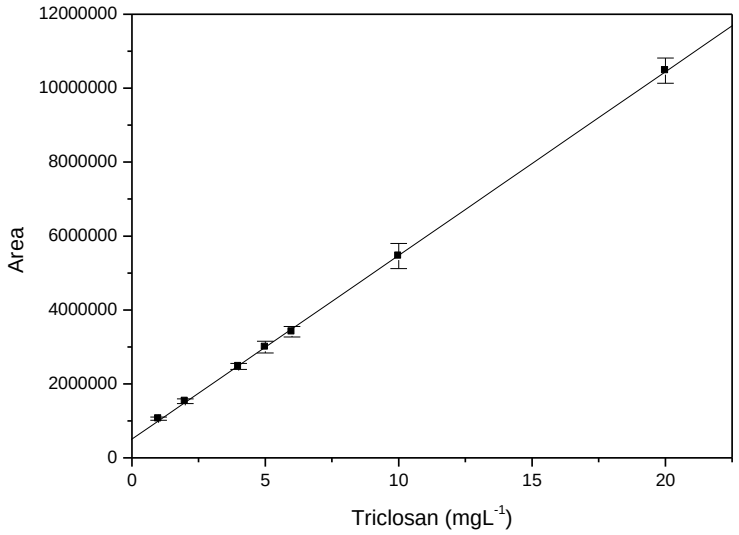

FIGURA 4.33. Curva analítica de Triclosan

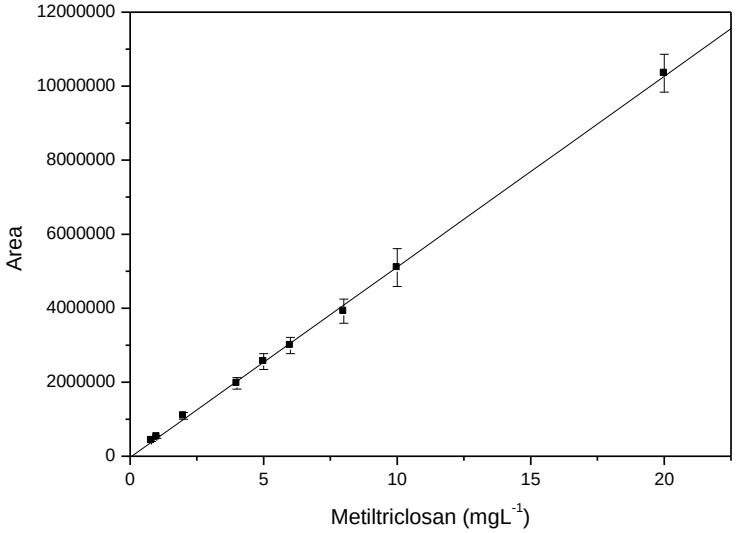

FIGURA 4.34. Curva analítica Metiltriclosan

Foram construídas diversas curvas analíticas com os padrões da mistura dos analitos dissolvidos em diversos meio de dissolução como: $CaCl_2$ 0,01 M; meio metanólico; 50% ACN e 50% aquoso; aquoso, não se observando diferenças significativas em seus coeficientes angulares de suas respectivas curvas analíticas, com exceção do analito metiltriclosan.

TABELA 4.12. Parâmetros de faixa de resposta linear e equações das curvas analíticas obtidas para 2-CP, 2,4-DCP. 2,4,6-TCP, Triclosan,MTCS baseando-se nas áreas de picos.

Composto	**Faixa linear (mg L^{-1})**	**Coeficiente Angular (Lmg^{-1})**	**Coeficiente Linear**	**Coeficiente de Correlação**	**LD (mgL^{-1})**	**LQ (mgL^{-1})**
2-CP	0,5-20	$(32,3 \pm 0,3)x10^4$	$(-5\pm 2)x10^4$	0,999	0,22	0,74
2,4-DCP	0,5-20	$(24,7 \pm 0,2)x10^4$	$(-3\pm 2)x10^4$	0,999	0,24	0,81
2,4,6-TCP	0,5-20	$(44,6 \pm 0,4)x10^4$	$(-2 \pm 4)x10^4$	0,999	0,24	0,81
TCS	0,5-20	$(49,7 \pm 0,3)x10^4$	$(5 \pm 3)x10^5$	0,999	0,16	0,55
MTCS	0,5-20	$(51,5 \pm 0,5)x10^4$	$(-3 \pm 4)x10^4$	0,999	0,26	0,87

A equação da curva analítica do metiltriclosan na mesma faixa de concentração de 0,5 a 20 mg L^{-1} dissolvidos em $CaCl_2$ 0,01M resultou.

$Y = (-10 \pm 3)x10^4 + (16,0 \pm 0,5)\ x10^4\ X$
R = 0,99804; SD = 39537,10736; N = 6; P< <0.0001 ; L.D = 0,47 mg L^{-1}.

Na TABELA 4.13 são mostrados os desvios padrões relativos do tempo de retenção a diferentes níveis de concentração, sendo os valores obtidos considerados como adequados para as análises. Os desvios padrões relativos do método usado a diferentes níveis de concentração (0,8-20 mg L^{-1}) em relação às áreas foram: 2-CP (0,83-0,88%); 2,4-DCP (1,03-2,7 %); 2,4,6-TCP (0,91-2,3 %); TCS (3,84-4,16%) e MTCS (6-7%)

TABELA 4.13. Desvio padrão relativo do tempo de retenção a diferentes níveis de concentração

	Desvio Padrão Relativo %				
C(mgL^{-1})	**2-CP**	**2,4-DCP**	**2,4,6-TCP**	**TCS**	**MTCS**
0,5	0,32	0,42	0,41	0,23	0,12
0,8	0,07	0	0,01	0,05	0,04
1	0,40	0,44	0,33	0,17	0,16
2	1,38	1,51	1,16	0,26	0,10
4	1,38	1,52	1,16	0,25	0,10
5	1,64	1,78	1,35	0,29	0,10
6	0,55	0,64	0,48	0,14	0,06
8	2,58	2,74	2,21	0,56	0,22
10	0,12	0,20	0,16	0,06	0,03

Na FIGURA 4.35 é mostrado um perfil de cromatograma onde se indica os tempos de retenção correspondentes a cada análito estudado. Como se pode visualizar, o 2-clorofenol elui primeiro num tempo de retenção de 2,844 min, enquanto o metiltriclosan, por ser mais hidrofóbico, elui por último com um tempo de retenção 10,267 min

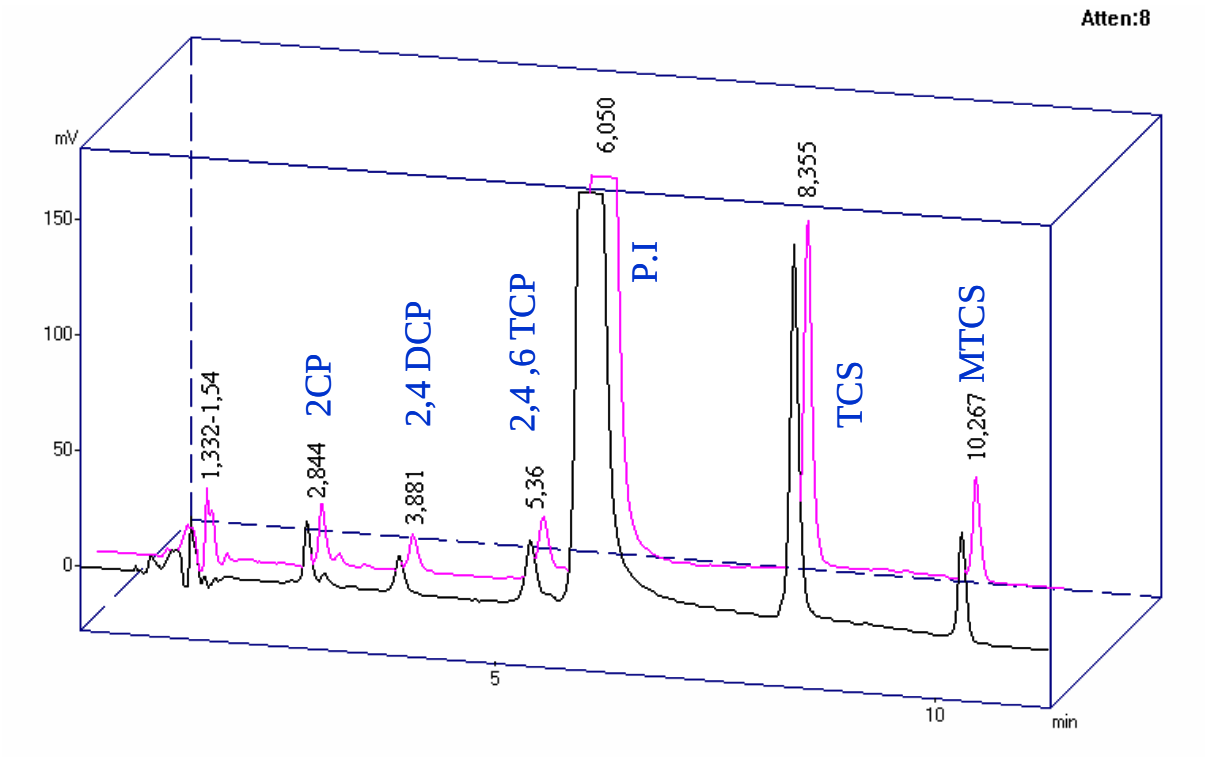

FIGURA 4.35 Cromatogramas da separação de uma mistura dos analitos em duplicata com seus respectivos tempos de eluição

Na FIGURA 4.36 se mostra os cromatogramas correspondente a três níveis de concentrações que correspondem às curvas analíticas de 8 ; 10 e 20 mg L^{-1}.

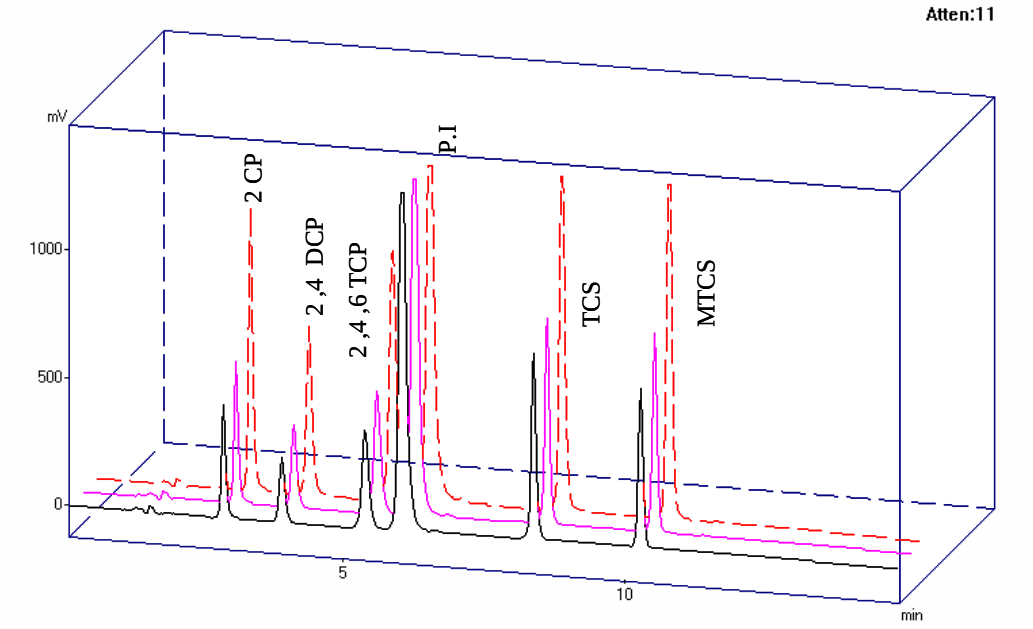

FIGURA 4.36. Cromatogramas a três níveis de concentração 8; 10 e 20 mg L^{-1}

A FIGURA 4.37 mostra dois cromatogramas correspondentes a uma solução padrão de 5 mg L^{-1} dos compostos em estudo, antes e após tratamento com o adsorvente montmorilonita homoniônica na forma de K^{+}. Como se pode visualizar da comparação de ambos cromatogramas, não se observa o sinal analítico de metiltriclosan após da adsorção indicando que esse analito foi fortemente adsorvido no sólido adsorvente. Em relação ao triclosan é obtido um sinal muito pouco intenso, sugerindo também forte adsorção nas partículas de montmorilonita. Por outro lado os clorofenois são fracamente adsorvidos em comparação com TCS e MTCS. Portanto, de ambos cromatogramas concluímos qualitativamente a ordem da capacidade de adsorção: metiltriclosan > triclosan> 2,4,6 TCP > 2,4 DCP > 2 clorofenol . Na TABELA 4.14 se mostra o desempenho da coluna usada no método.

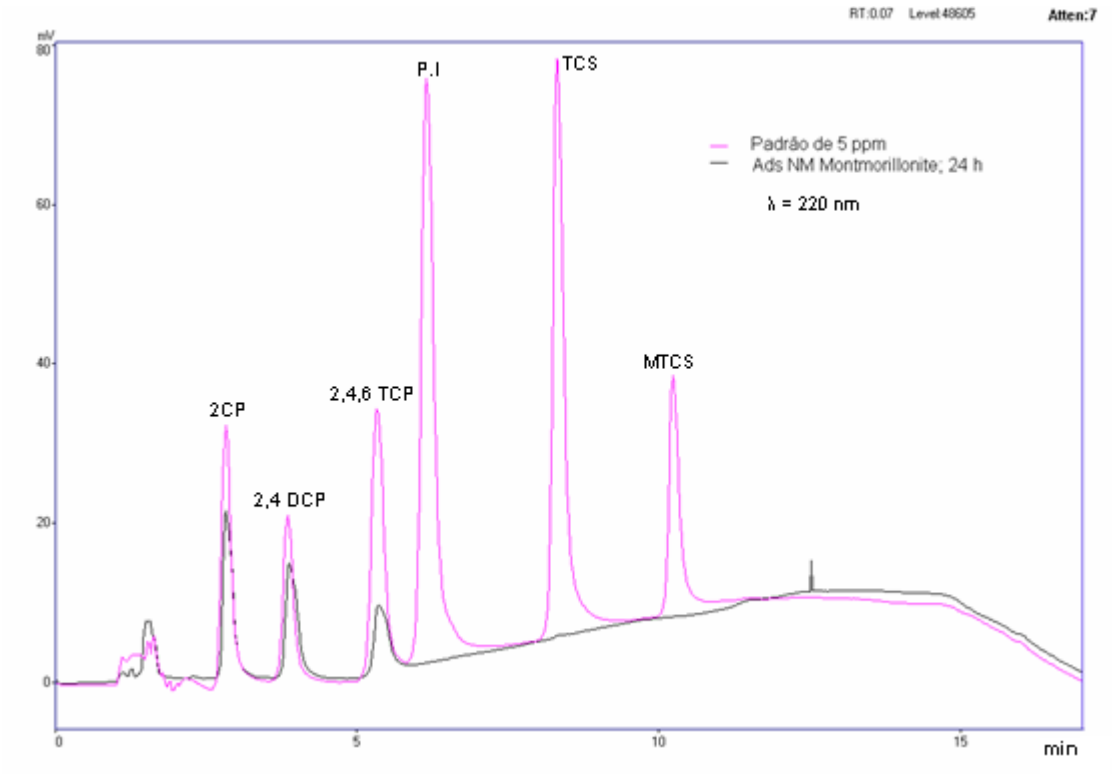

FIGURA 4.37. Comparação de cromatogramas de uma mistura de 2-CP, 2,4-DCP. 2,4,6-TCP, TCS e MTCS, todos na concentração de 5 mg L^{-1}, antes e após tratamento (24 h) com 0,05 g montmorilonita–K em meio 1,23 %(v v^{-1}) de metanol.

TABELA 4.14. Desempenho da Coluna Synergi para um mistura dos padrões de triclosan, clorofenois e metiltriclosan com concentações de 5 mg L^{-1}

	t_R (min)	K	Assimetria	Resolução	Fator separação
Tm	1,082	0	0,87		
2-CP	2,802	1,59	1,55	8,04	0,0
2,4-DCP	3,827	2,54	1,40	3,38	1,60
2,4,6-TCP	5,306	3,9	1,28	4,36	1,54
TCS	8,29	6,66	1,76	8,70	1,71
MTCS	10,207	8,43	1,79	6,15	1,27

4.4.3. Estudos de adsorção

Os estudos de adsorção foram feitos comparando dois tipos de material: (1) montmorilonita homoiônica em K^+ (denotada como K-MT) e (2) montmorilonita modificada com sal quaternário de amônio, hexadeciltrimetilamônio (HDTMA), denotada como HDTMA-MT.

A montmorilonita homoiônica na forma de K^+ (K-MT) foi modificada com brometo de hexadeciltrimetilamônio levando em consideração a capacidade de troca catiônica do argilomineral (0,59 mmol g^{-1}). Ou seja, cada grama do argilomineral não modificado tem capacidade de trocar 0,59 mmol de íons. Baseando-se nesse preceito foram tomados 0,59 mmol do brometo de HDTMA para cada grama de (K-MT). A suspensão foi agitada até que o equilíbrio fosse atingido. Durante este tempo foram realizadas medidas de difração de raios-X até que o espaço basal da montmorilonita modificada não apresentasse variação.

Foi determinada uma expansão do espaçamento basal de 16,7 Å na K-MT para 19,6 Å na HDTMA-MT, indicando que houve ocupação do sal de HDTMA entre as camadas do argilomineral por íons. Os resultados de análise elementar (TABELA 4.15) confirmam a incorporação de C, N e H na estrutura do argilomineral. No argilomineral sem modificar, os valores para % C e % N são 0,10 % e 0,18 %, respectivamente. Então, teoricamente, quando se incorpora o $HDTMA^+$, $[CH_3(CH_2)_{15}\text{-}N(CH_3)_3]^+$, com massa molar 284 $gmol^{-1}$ e com composição elementar %C; %H e %N de 80,28; 14,78 e 4,93, respectivamente, ao argilomineral modificado, a composição de %C e %N se deve unicamente ao $HDTMA^+$. Portanto, a composição elementar de C e N no material modificado deveria guardar a mesma relação daquela esperada para o $HDTMA^+$; então para 11,48 %C obtido no argilomineral modificado deveríamos ter 0,70 % N, mas somente obtivemos 0,31 % N. Esta perda do nitrogênio provavelmente se deve à quebra da estrutura, podendo ocorrer uma reação de hidrólise.

O estudo de área superficial realizado por BET indicou que a área superficial da montmorilonita modificada com o sal de HDTMA (52,9 ± 0,5 m² g^{-1}) foi menor que a obtida para a montmorilonita em sua forma natural (254,2 ± 0.5 m² g^{-1}). Uma vez que a área superficial é medida a partir da adsorção de N_2 na superfície do material, e como a montmorilonita modificada possui a inserção de moléculas grandes do HDTMA no espaço interlamelar, isso dificulta o acesso do N_2 na superfície interna do argilomineral, gerando menor área superficial. Abate e Masini (2005) e Bartelt-Hunt et al (2003), também verificaram diminuição da área superficial do material modificado durante a inserção do HDTMA em vermiculita e bentonita, respectivamente.

TABELA 4.15. Resultados de análise elementar para K-MT e HDTMA-MT

Material	%C	%H	%N
KMT	0,10	0,98	0,18
HDTMA-MT	11,48	2,39	0,31

Os estudos de adsorção demonstraram que triclosan e metiltriclosan são fortemente adsorvidos nesses materiais. Assumindo um limite de detecção de 0,20 mg L^{-1}, e que para as concentrações iniciais de triclosan de até 8,0 mg L^{-1} não foi detectado sinal do analito na solução sobrenadante após 24 h de tempo de contato, pode-se inferir em uma porcentagem de adsorção maior do que 97,5% para essa condição. Para uma concentração inicial de triclosan de 20 mg L^{-1}, a porcentagem de adsorção média foi de 75 ± 8%. Para metiltriclosan também se observou forte adsorção nos materiais, muito embora a avaliação mais rigorosa da adsorção desse metabólito seja prejudicada pelo fato de sua adsorção ocorrer também nas paredes dos tubos de polipropileno empregados e nas membranas de filtração.

A adsorção de 2-CP, 2,4-DCP e de 2,4,6-TCP em K-MT e em HDTMA-MT foi ajustada a equação linearizada de Freundlich (FIGURAS 4.38, 4.39 e 4.40), descrita por:

$$\log Q_e = K_f + \frac{1}{n}\log C_e$$

Onde Q_e é a quantidade de adsorbato adsorvido por massa de adsorvente (expresso em mg kg^1), C_e é a concentração de adsorbato determinado na solução sobrenadante após um dado tempo de contato (em mg L^{-1}), K_f é um constante relacionada a capacidade de adsorção ($mg^{1-n}L^n kg^{-1}$) e *1/n* é um termo relacionado com a intensidade de adsorção, variando de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo a 1, mais próximo ao modelo de partição se ajusta o processo de adsorção.

Os dados experimentais foram ajustados também pela equação linearizada de Langmuir:

$$\frac{1}{Q_e} = \frac{1}{K_L Q_0}.\frac{1}{C_e} + \frac{1}{Q_0}$$

Onde Q_e e C_e têm os mesmos significados daqueles descritos para a equação de Freundlich. O termo Q_0 refere-se à capacidade máxima de adsorção e o termo K_L é relacionado com a energia livre da adsorção.

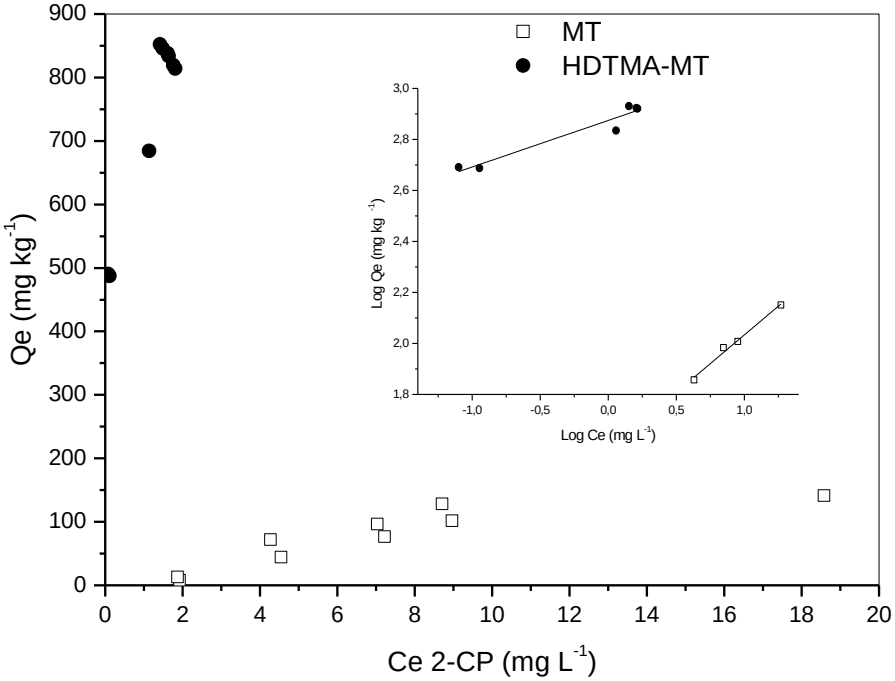

FIGURA 4.38. Isotermas de adsorção de 2-CP em K-MT e HDTMA-MT. A inserção mostra o ajuste dos dados experimentais à equação linearizada de Freundlich

Os valores de K_f e de *1/n* são apresentados na TABELA 4.16. É marcante o aumento da capacidade de adsorção da montmorilonita modificada com HDTMA, o que pode ser verificado tanto pelos gráficos das isotermas de adsorção (FIGURAS 4.38 a 4.40), como pelos valores de K_f. O comportamento observado é coerente com um elevado grau de hidrofobicidade dos compostos estudados, ou seja, apresentaram uma maior afinidade pelo adsorvente organofilizado. O composto 2,4,6-TCP foi, em comparação a 2-CP e 2,4-DCP, foi o que apresentou maior afinidade pelo argilomineral, bem como o maior aumento de adsorção após a modificação com HDTMA.

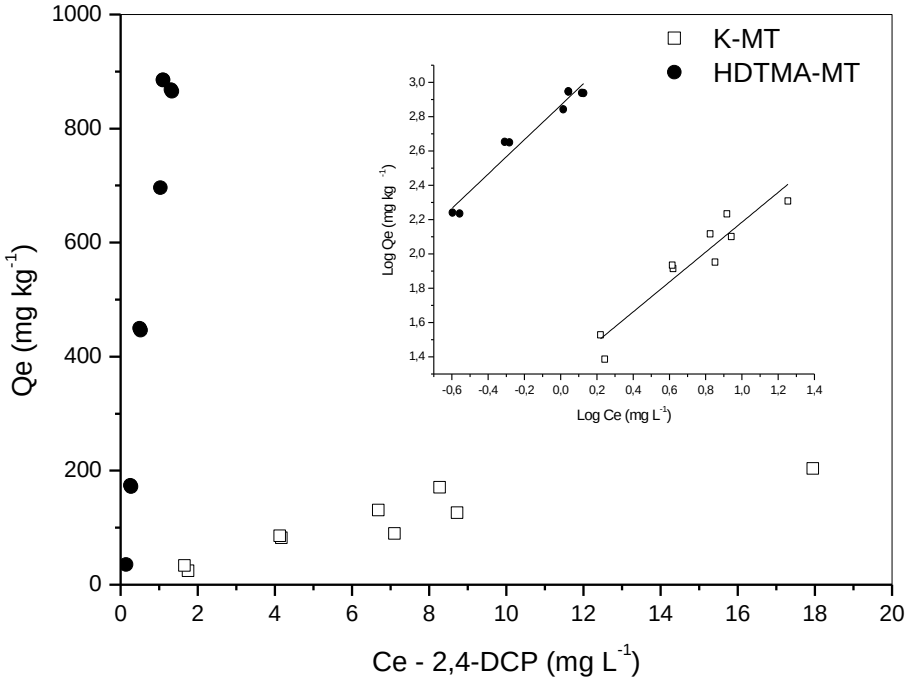

FIGURA 4.39. Isotermas de adsorção de 2,4-DCP em K-MT e HDTMA-MT. A inserção mostra o ajuste dos dados experimentais à equação linearizada de Freundlich

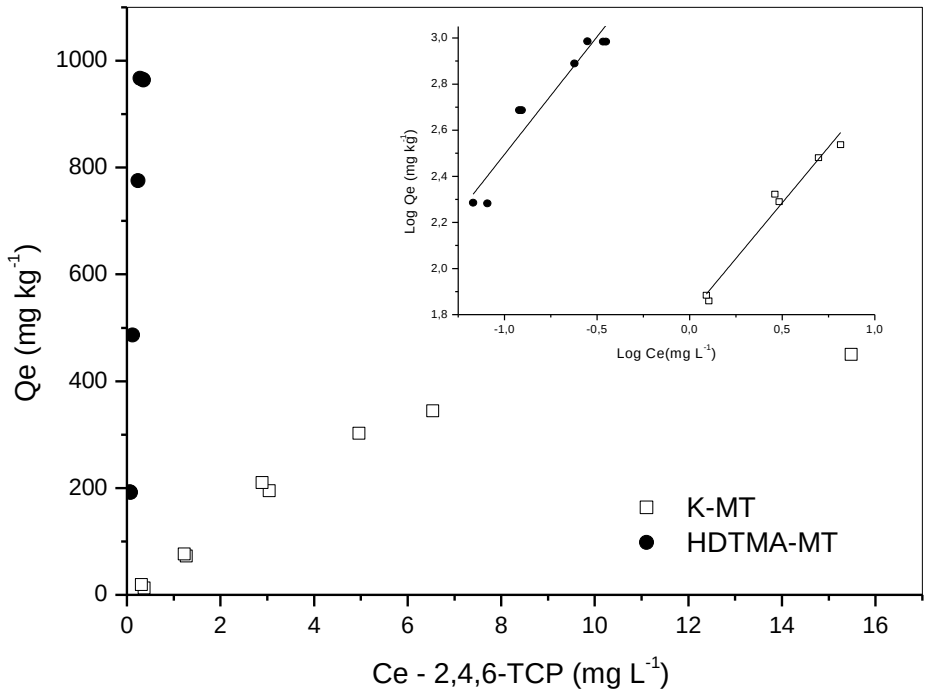

FIGURA 4.40. Isotermas de adsorção de 2,4,6-TCP em K-MT e HDTMA-MT. A inserção mostra o ajuste dos dados experimentais à equação linearizada de Freundlich

TABELA 4.16. Valores de K_f, 1/n e r^2 ajustados pela equação de Freundlich linearizada para a adsorção de 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP em K-MT e HDTMA-MT

Adsorbato	**K-MT**			**HDTMA-MT**		
	1/n	***K_f* (mg^{1-n}L^{n}kg^{-1})**	**R^2**	***1/n***	***K_f* (mg^{1-n}L^{n}kg^{-1})**	**R^2**
2-CP	0,45 ± 0,03	38 ± 4	0,98	0,19 ± 0,08	755 ± 50	0,94
2,4-DCP	0,9 ± 0,1	21 ± 5	0,90	1,0 ± 0,08	734 ± 24	0,95
2,4,6-TCP	0,97 ± 0,08	63 ± 5	0,96	1,0 ± 0,1	(3,2 ± 0,7)x10^3	0,92

TABELA 4.17 Valores de Q_0, K e r^2 ajustados pela equação de Langmuir linearizada para a adsorção de 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP em K-MT e HDTMA-MT

Adsorbato	***K-MT***			***HDTMA-MT***		
	Q_0 (mg kg^{-1})	**K_L (L kg^{-1})**	**R^2**	**Q_0 (mg kg^{-1})**	**K_L (L kg^{-1})**	**R^2**
2-CP	(1,9 ± 0,1)x10^2	0,14 ± 0,03	0,98	(8,3 ± 0,4)x10^2	15 ± 2	0,91
2,4-DCP	(5 ± 1)x10^2	0,04 ± 0,02	0,97	(1,3 ± 0,1)x10^3	1,0 ± 0,1	0,99
2,4,6-TCP	(6 ± 1)x10^2	0,14 ± 0,05	0,96	(2,5 ± 0,3)x10^3	2,0 ± 0,3	0,98

O processo de adsorção para 2,4-DCP e 2,4,6-TCP se aproxima do modelo de partição ($1/n \rightarrow 1$), tanto para K-MT quanto para HDTMA-MT, ao passo que para 2-CP os valores de 1/n indicam que a adsorção deve ocorrer em sítios específicos. Os baixos valores de 1/n para 2-CP pode indicar também uma heterogeneidade de sítios de adsorção ocorrendo por interações específicas na superfície do argilomineral ou por partição na fase de HDTMA.

Os parâmetros ajustados com a equação linearizada de Langmuir (TABELA 4.17) são consistentes com a discussão acima, ou seja, a incorporação de HDTMA leva a um significativo aumento da capacidade de adsorção e da energia de adsorção em relação ao argilomineral não modificado (K-MT). A ordem de capacidade de adsorção é 2,4,6-TCP > 2,4-DCP > 2-CP, lembrando, porém, que triclosan e metiltriclosan possuem maior afinidade por ambos K-MT e HDTMA-MT, mas cujos dados experimentais não puderam ser tratados pelas equações de Langmuir ou Freundlich.

Um estudo mais detalhado sobre a adsorção de triclosan deveria usar uma técnica analítica mais sensível do que aquela aqui proposta, como descrito por XU et al (2009), que estudaram a adsorção de triclosan e outros produtos de higiene pessoal em solos de agricultura por CG-MS, verificando uma tendência geral de que a adsorção aumenta com o aumento do teor de matéria orgânica no solo e com a diminuição do pH.

Os estudos de dessorção de triclosan e metiltriclosan em água foram dificultados pela alta afinidade dos compostos pelos adsorventes e pelos limites de detecção do método que não atingiram valores suficientemente baixos para a determinação nas soluções sobrenadantes. As porcentagens de dessorção não excederam 13 e 15% para metiltriclosan e triclosan, respectivamente, em K-MT e HDTMA-MT. Para os compostos 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP as dessorções em K-MT são mais significativas, variando de 35 a 70% para 2-CP, de 38 a 96% para 2,4-DCP e de 29 a 50% para 2,4,6-TCP. A dessorção de HDTMA-MT apresenta um caráter mais irreversível, sendo que para 2-CP as porcentagens de dessorção variaram

entre 8 e 17%, para 2,4-DCP entre 5 e 13% e para 2,4,6-TCP, cuja adsorção apresentou maior grau de irreversibilidade em água, as porcentagens variaram entre 1 e 8%, mas com vários sobrenadantes apresentando concentrações menores do que o limite de detecção.

5. CONCLUSÃO

O método proposto de cromatografia por injeção sequencial mostrou-se apropriado para determinação de triclosan em amostras de enxaguadores bucais, dispensando tratamentos da amostra demorados, sendo esta técnica uma alternativa promissora e de baixo custo frente às técnicas convencionais de CG e HPLC que são empregadas para determinação de triclosan.

Foi desenvolvida a metodologia para separação e determinação de triclosan, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e metiltriclosan por cromatografia por injeção sequencial explorando a eluição passo a passo com incrementos discretos do conteúdo de modificador orgânico. Duas composições de fase móvel (com 60 e 70%, v v^{-1} de metanol) foram necessárias para essa separação em três etapas de eluição. Essa estratégia é também uma alternativa promissora e de baixo custo frente às técnicas convencionais de CG e HPLC. Esta metodologia requer uma etapa de pré-concentração para atingir os limites de detecção necessários para monitorar os níveis permitidos para estes analitos em amostras de águas.

A metodologia baseada em HPLC permitiu estudar a adsorção de triclosan, metiltriclosan, 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP em montmorilonita natural (K-MT) e modificada com sal de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA-MT). Adsorção de triclosan e metiltriclosan foi muito forte e predominantemente irreversível tanto em K-MT e HDTMA-MT. A organofilização de K-MT levou a um significativo aumento da capacidade de adsorção de 2-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, sugerindo que esses materiais encontram potencial aplicação no tratamento de efluentes, visando a remoção de produtos de higiene pessoal e seus possíveis metabólitos de amostras aquosas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; MASINI, J. C. Adsorption of atrazine, hydroxytarazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto Fe(III) polyhydroxy cations intercalated vermiculite and montmorillonite. Journal Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 1612-1619, 2005.

ABATE, G., MASINI, J. C. Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropylatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite. Journal of Brazilian. Chemistry Society, v. 16, p. 936, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA).Resolução RDC n° 79, (DOU 31/08/00) de 28 de agosto de 2000.

AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R.; PIEDRA, L.; MÉSCUA, M.; GÓMEZ, M. J. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 480, p. 193-205, 2003.

ARANAMI, K.; READMAN, J. W. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. Chemosphere, v. 66, p. 1052-1056, 2007.

BALLESTA-CLAVER, J.; VALENCIA, M. C.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Analysis of phenolic compounds in health care products by low-pressure liquid chromatography with monolithic column and chemiluminescent detection. Luminescence, v. 26, p. 44 – 53, 2011.

BARTELT-HUNT, S. L.; BURNS, S. E.; SMITH, J. A. Nonionic organic solute sorption onto two organobentonites as a function of organic-carbon content. Journal of Colloid and Interface Science, v. 266, p. 251- 258, 2003.

BEHERA, S. K.; OH, S-Y.; PARK, H-S. Sorption of triclosan onto activated carbon, kaolinite and montmorillonite: effects of pH, ionic strength, and humic acid. Journal of Hazardous Materials, v. 179, p. 684 -691, 2010.

BLACK, R. M.; MUIR, B. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. Journal of Chromatography A, v. 1000, p. 253-281, 2003.

BOURLAKIS, M.A.; WEIGHTMAN, P. W. H. Food Supply Chain Management first edition, Blackwell Publishing Ltd, 2006.

BUCHELI T. D.; MULLER, S. R.; REICHMUCH, P.; HADERLEIN, S. B.; SCHWARZENBACH, R. P. Spherical clay conglomerates: A novel stationary phase for solid phase extraction and reversed phase liquid chromatography. Analytical Chemistry, v. 71, p. 2171-2178, 1999.

CABRERA, K., Application of sílica-base HPLC monolithic column, Journal of Separation Science v. 27, p. 27, 843 – 852, 2004.

CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY DEPARTAMENT OF PESTICIDE REGULATION MEDICAL TOXICOLOGY BRANCH. Summary of toxicology data 5-chloro -2-(2,4,-dichloro-phenoxy)phenol. DPR.Medical toxicology v. T50110, p, 1-13 2005.

CANOSA, P.; MORALES, S.; RODRIGUEZ, I.; RUBI, E.; CELA, R.; GÓMEZ, M. Aquatic degradation of triclosan and formation of toxic chlorophenols in presence of low concentrations of free chlorine. Analytical Bionalytical Chemistry, v. 383, p. 1119-1126, 2005.

CANOSA, P.; RODRIGUEZ, I.; RUBÍ, E.; CELA, R. Optimization of solid-phase microextration conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. Journal of Chromatography A, v. 1072, p. 107-115, 2005.

California Environmental Protection Agency Departament of Pesticide Regulation Medical Toxiclogy Branch "Summary of toxicology data 5-chloro-2-(2,4-d ichloro-phenoxy)phenol. Revised 1/25/05.

CHENXI, W.; SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere, v. 73, p. 511-518, 2008.

CHOCHOLOUS, P.; SATÍNSKY, D.; SOLICH P. Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography. Talanta, v. 70, p. 408-413, 2006.

CHOCHOLOOUS, P., SOLICH, P., SATINSKY, D. An overview of sequential injection chromatography. Analytica Chimica Acta, v. 600, p. 129 – 135, 2007.

CHOCHOLOUS, P.; SATINSKY, D.; SKLENAROVA, H.; SOLICH, P. Two-column sequential injection chromatography- New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient chromatography. Analytica Chimica Acta, v. 668, p. 61 – 66, 2010.

COELHO, A. C. V.; SANTOS P. S.; SANTOS, H. S. Argilas especiais: argilas quimicamente modificadas - uma revisão. Química Nova, v. 30, p. 1282 – 1294, 2007.

DANN, A.B. HONTELA, A.Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. Journal of Applied Toxicology, v. 31, p. 285-311, 2011.

DOS SANTOS, L. B. O.; SILVA, M. S. P.; MASINI, J. C. Developing a sequential injection-square wave voltammetry (SI-SWV) method for determination of atrazine using a hanging mercury drop electrode. Analytica Chimica Acta, v. 528, p. 21-27, 2005.

ECONOMOU, A. Sequential-injection analysis (SAI): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. Trends in Analytical Chemistry., v. 24, p. 416-425, 2005.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases Estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. Química Nova, v. 29, p. 300-309, 2006.

FERNÁNDEZ, M.; MIRÓ, M..; GONZÁLEZ, H. M.; CERDA, V. Modulation of mobile phase composition in flow-injection/sequential-injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 391, p. 817-825, 2008.

FERREIRA, O. P.; ALVES, O. L.; MACEDO, J. S.; GIMENEZ, I. F.; BARRETO, L. S. Ecomateriais: desenvolvimento e aplicações de materiais porosos funcionais para proteção ambiental. Química Nova, v. 30, p. 464-467, 2007.

FERRER, I.; MEZCUA, M.; GOMEZ, M. J.; THURMAN, E.M.; AGUERA, A.; HERNANDO, M. D.; FERNANDEZ-ALBA, A.R.; Liquid chromatography/time –of-flight massa spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater sample. Rapid Communications In Mass Spectrometry, v.18, p. 443-450, 2004.

FILHO, G. R. N.; TOLEDO, S.; CURY, J. A. Avaliação do efeito de um dentifrício contendo triclosan-gantrez?-zinco-pirofosfato na gengivite experimental em humanos. Revista Periodontia, v. 6, p. 20-24, 1997.

GALHARDO, C. X.; MASINI, J. C. Spectrophotometric determination of phosphate and silicate by sequential injection using molybdenum blue chemistry. Analytica Chimica Acta, v. 417, p. 191-200, 2000.

GIERAK, A.; SEREDYCH, M.; BARTNICKI, A. The preparation, properties and application of carbon fibers for SMPE. Talanta, v. 69, p. 1079-1087, 2006.

GOMEZ, V.; CALLAO, M.P. Multicomponent analysis using flow systems. TrAC, Trends Analytical Chemistry, v. 26, p. 767 – 774, 2007.

GOMEZ, V.; MIRÓ, M.; CALLAO, M. P.; CERDÁ, V. Coupling of sequential injection analysis with multivariate curve resolution alternating least square for enhancement of peak capacity. Analytical Chemistry, v. 79, p. 7767 – 7774, 2007.

GREYSHOCK, A. E.; VIKESLAND, P. J. Triclosan Reactivity in Chloramines Waters. Environmental Science Technology, v. 40, p. 2615-2622, 2006.

HATSIS, P.; LUCY, C. A. Ultra-fast HPLC separations of common anions using a monolithic stationary phase. The Analyst, v. 127, p. 451-454, 2002.

HEBERER, T.; STAN, H. J. Detection of more than 50 substituted phenols as their t-butyldi-methylsilyl derivatives using gas chromatography –mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, v. 341, p. 21-34, 1997.

HUA, W.; BENNETT, E. R; LETCHER, R. J. Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid Chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. Environment International, v. 31, p. 621-630, 2005.

HUCLOVA, J.; SATINSKY, D.; KARLICEK, R. Coupling of monolithic columns with sequential injection technique A new separation approach in flow methods. Analytica Chimica Acta, v. 494, p. 133-140, 2003.

IARC: Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. In: Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals, Vol. 63. International Agency for Research Cancer, Lyon, France, 1995.

JIANG, J-Q.; COOPER, C.; OUKI, S. Comparison of modified montmorillonite adsorbents: Part I: preparation, characterization and phenol adsorption. Chemosphere, v. 47, p. 711-716, 2002.

JUNG, J.; ISHIDA, K.; NISHIHARA, T. Anti-estrogenic activity of fifty chemicals evaluated by in vitro assays. Life Sciences v.74, p. 3065–3074, 2004.

JUNKER, L. M.; HAY, A. G. Effects of triclosan incorporation into ABS plastic on biofilm communities. J Antimicrob Chemother, v. 53, p. 989-996, 2004.

KATSUMATA, H.; FUJII, A.; KANECO, S.; SUZUKI, T.; OHTA, K. Determination of simazine in water samples by HPLC after preconcentration with diatomaceous earth. Talanta, v. 65, p. 129-134, 2005.

KISHI, T.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M.; KAWAKAMI, T.; ONODERA, S. Influence of experimental conditions on the formation of PCDD/Fs during the thermal reactions of 2,4,6-trichlorophenol. Chemosphere v. 76, p. 205-211, 2009

KLAPYTA, Z.; FUJITA, T.; IYI, N. Adsorption of dodecyl- and octadecyltrimethylammonium ions on a smectite and synthetic micas. Applied Clay Science, v. 19, p. 5-10, 2001.

KLODZINSKA, E.; MORAVCOVA, D.; JANDERA, P.; BUSZEWSKI, B. Monolithic continuous beds as a new generation of stationary phase for chromatographic and electro-driven separations. Journal of Chromatography A, v. 1108, p. 51-59, 2006.

KOBLOVA, P., SKLENAROVA, H., CHOCHOLOU, P., POLASEK, M., SOLICH P. Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolituic column. Talanta, v. 84, p. 1273-1277, 2011.

LINDSTROM, A.; BUERGE, I. J.; POIGER, T.; BERGQVIST, P. A; MULLER, M. D.; BUSER, H. R. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and Its Methyl derivative in surface waters. Environmental Science Technology, v. 36, p. 2322-2329, 2002.

LUCHESE, E. B.; FÁVERO, L. O. B.; LENZI, E. Fundamentos da química do solo. Freitas Bastos editora, 2001.

LUO, Y.; SU, Y.; LIN, R. Z.; SHI, H. H.; WANG, X.R. 2-chlorophenol induced ROS generation in fish Carassius auratus based on the EPR method. Chemosphere, v. 65, p. 1064-1073, 2006.

MAI, T. D.; HAUSER, P. C. Pressure assisted capillary electrophoresis for cation separations using sequential injection analysis manifold and contactless conductivity detection. Talanta, v. 84, p. 1228 – 1233, 2011.

MARTIN, M.; GUIOCHON, G. Effects of high pressure in liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v. 1090, p. 16-18, 2005.

McBRIDE, M. B. Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press, New York. 1994.

MEZCUA, M.; GÓMEZ, M. J.; FERRER, I.; AGUERA, A.; HERNANDO, M. D; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. Analytica Chimica Acta, v. 524, p. 241-247, 2004.

MICHALOWICZ, J.; STUFKA-OLCZYK, J.; MILCZAREK, A.; MICHNIEWICZ, M. Analysis of annual fluctuations in the content of phenol, chlorophenols and their derivatives in chlorinated drinking.Waters Environmental Science and Pollution Research. v.18, p. 1174-1182, 2011

MIRO, M.; HANSEN, E. H. Miniaturisation and automation of metal fractionation schemes applied to environmental solid samples by sequential injection microcolumn extraction procedures. Analytical Bioanalytical Chemistry, v. 382, p. 878-880, 2005.

MORALES, S.; CANOSA, P.; RODRIGUEZ, I.; RUBI, E.; CELA, R. Microwave assisted extraction followed by gás chromatography with tamdem mass spectrometry for the determination of triclosan and two related chlorophenols in sludge and sediments. Journal of Chromatography A, v. 1082, p. 128-135, 2005.

National Cancer Institute (NCI), Bioassay of 2,4,6-trichlorophenol for possible carcinogenicity. Bethesda, MD, (NCI-CG-TR-155), 1979.

National Toxicology Program (NTP), Toxicology and carcinogenesis, Studies of two pentachlorophenol technical-grade mixtures (CAS),1989.

NAVARRO, A. E.; LAZO, J. C.; CUIZANO, N. A.; SUN-KOU, M. R.; LLANOS, B. P. Insights into Removal of Phenol from Aqueous Solutions by Low Cost Adsorbents: Clays Versus Algae. Separation Science and Technology, v. 44, p. 2491-2509, 2009.

OBANDO, M. A.; ESTELA, J. M.; CERDA, V. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column. Analytical Bioanalytical Chemistry, v. 391, p. 2349-2356, 2008.
OLIVEIRA, P. C. C.; MASINI, J. C. Sequential injection determination of chromium(VI) by transient oxidation of brucine with spectrophotometric detection and in-line dilution. Analyst, v. 123, p. 2085-2090, 1998.

PAULL, B.; NESTERENKO, P. N. New possibilities in íon chromatography using porous monolithic stationary phase media. Trends Analytical Chemistry, v. 24, p. 295-303, 2005.

PERGHER, S. B. C.; CORMA, A.; FORNES, V. Materiales Laminares pilareados: preparación y propriedades. Quimica Nova, v. 22, p. 693-709, 1999.

PETERSON, K. P.; LOGAN, B. K.; CHRISTIAN, G. D.; RUZICKA, G. D. Sequential-injection extraction for sample preparation. Analytica Chimica Acta, v. 337, p. 99-106, 1997.

PETR, K; KARLBERG, B. Flow/sequential injection sample treatment coupled to capillary electrophoresis. Analytica Chimica Acta, v. 648, p. 129 – 145, 2009.

PETRUCI, J.F.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de benzoato, sorbato, metil e propilparabenos em produtos alimentícios utilizando a eletroforese capilar. Química Nova, v. 34, p. 1177-1181, 2011.

PICCOLI, A.; FIORI, J.; ADRISANO, V.; ORIOLI, M. Determination Of triclosan in personal health care products by liquid chromatography (HPLC). II Farmaco, v. 57, p. 369-372, 2002.

PIRES, A. L. P.; AUSGUSTO, F. Microextração por fase sólida. Química Nova, v. 23, p. 523-530, 2000.

PROST, R.; YARON, B. Use of Modified Clays for Controlling Soil Environmental Quality. Soil Science, v. 166, p. 880 – 895, 2001.

QUINTANA, M.C.; RAMOS, L. Sample preparation for the determination of chlorophenols.Trends in Analytical Chemistry, v. 27, p. 418-436, 2008.

REIS, B. F.; GINE, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. Multicommutation in flow-analysis.1. Binary sampling - concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. Analytica Chimica Acta, v. 293, p. 129-138, 1994.

RICHARDSON, S. Water analysis: emerging contaminants and current issues. Analytical Chemistry, v. 75, p. 2831-2857, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; PENTEADO, J. C. P.; LIRIA, C. W.; M. MIRANDA, T. M.; MASINI, J. C. Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography

for fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae *Tetraselmis gracilis*. Analytica Chimica Acta, v. 628, p. 123–132, 2008.

ROCHA, F. R. P., NOBREGA, J. A. Efeito Shlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. Quimica Nova, v. 19, p. 636 – 640, 1996.

RODRIGUEZ, I.; CARPINTEIRO, J.; QUINTANA, J. B.; CARRO, A. M.; LORENZO, R. A.; CELA, R. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. Journal of Chromatography A, v. 1024, p. 1-8, 2004.

RULE, K. L.; EBBETT, V. R.; VIKESLAND, P. J. Formation of chloroform and Chlorinated Organics by Free-Chlorine-Medited Oxidation Of Triclosan. Environmental Science Technology, v. 39, p. 3176-3185, 2005.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection-a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. Analytical Chimica Acta, v. 232, p.329-343, 1990.

SÁNCHEZ-PRADO, L.; LLOMPART, M.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C.; BAYONA, J. M.; CELA, R. Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. Chemosphere, v.66, p. 1338-1347, 2006

SÁNCHEZ-PRADO, L.; LLOMPART, M.; LORES, M.; FERNÁNDES-ALVAREZ, M.; GARCIA-JARES, C.; CELA, R. Further research on the photo-SPME of triclosan. Analytical and Bionalytical Chemistry, v. 384, p. 1548-1557, 2006.

SATINSKY, D.; SOLICH, P.; CHOCOLOUS, P.; KARLICEK, R. Monolithic columns-a new concept of a separation in the sequential injection technique. Analytical Chimica Acta, v. 499, p. 205-214, 2003.

SATINSKY, D.; SOLICH, P.; CHOCHOLUS, P.; KARLICEK, R. Monilithic colums – a new concept of separation in the sequential injection technique. Analytica Chimica Acta, v. 499, p. 205-214, 2003.

SATINSKY, D.; NETO, I.; SOLICH, P.; SKLENÁROVA, H.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO B. S. M.; ARAÚJO, A. N. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets. Journal of Separation Science, v. 27, p. 529-536, 2004.

SHIH-WEI, TSAI, MEI-WEN, SHIH, YI-PING, PAN. Determinations and residual characteristics of triclosan in household food detergents of Taiwan. Chemosphere, v. 72, p. 1250–1255, 2008.

SIOUFFI, A.,-M., About the *C* term in the van Deemter's equation of plate height in monoliths. Journal of Chromatography A, v. 1126, p. 86 – 94, 2006.

SILVA, M. S. P.; GALHARDO, C. X.; MASINI, J. C. Application of sequential injection-mono segmented flow analysis (SI-MSFA) to spectrophotometric determination of sulfide in simulated waters-samples. Talanta, v. 60, p. 45-52, 2003.
SILVA, A. S.; GARCIA, R. S.; HERNANDES, J. L.; LOSADA, P. P. Determination of triclosain foodstuffs. Journal of Separation Science, v. 28, p. 65-72, 2005.

SILVA, A. R. M., NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. Talanta, v. 74, p. 1498–1504, 2008.

SINGER, H.; MULLER, S.; TIXIER, C.; PILLONEL, L. Triclosan: Ocorrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field Measurement in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. Environmental Science Technology, v. 36, p. 4998-5004, 2002.

SIOUFFI, A. M. Silicagel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures. Journal of Chromatography A, v. 1000, p. 801-818, 2003.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; JAMES HOLLER, F. Fundamentals of Analytical Chemistry 7th Ed. Saunders College Publishing, 1996.

SNYDER, L. R.; KIRLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. second edition, John Wiley & Sons, New York, 1997.

THOMPSON, M.; ELISSON, S. L. R.; WOOD,R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Applied chemistry, v.74, N° 5, p. 835-855, 2002

TRENHOLM, R. A.;VANDERFORD, B. J.; DREWES, J. E.; SNYDER, S. A. Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v. 1190, p. 253-262, 2008.

TULP, M. T.; SUNDSTROM, G.; MARTRON, L.B;HUNTZINGER, O. Metabolism of chlorodiphenylethers and Irgasan DP 300. Xenobiotica, v.9, p. 65-77 , 1979

VACCARI, A. Preparation and catalytic properties of cationic and anonic clays. Catalysis Today, v. 41, p. 53 – 71, 1998.

WHO, Chlorophenols in drinking water, Background Document for Preparation of WHO Guidelines for Drinking Water Quality, WHO/SDE/WSH/03.04/47. World Health Organization, Geneva, 2003

WONG-WAH-CHUNG, P.; RAFQAH, S.; VOYARD, G.; SARAKHA, M. Photochemical behaviour of triclosan in aqueous solutions: kinetic and analytical studies. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. v. 191, p. 201–208, 2007.

WU, C.; SPONGBERG, A. L.; WITTE, J. D. Adsorption and Degradation of Triclosan and Triclocarban in Soils and Biosolids-Amended Soils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, p. 4900 – 4905, 2009.

XIONG, LI.; ZHANG, R.; REGNIER, F. E. Potential of silica monolithic columns in peptide separations. Journal of Cromatography A, v. 1030, p. 187-194, 2004.

XU, J.; WU, L.; CHANG, A. C. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. Chemosphere, v. 77, p. 1299 -1305, 2009.

ZHOU, X. F.; ZHOU, S. B.; ZHANG, Y. L.; SHI, L. Determination of Triclosan in Wastewater Using Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Ultra-Violet detection. 2009.

7. **ANEXO**

Súmula Curricular

Dados pessoais:

Nome: Ausberta Jesús Cabezas Garcia

Local e data de Nascimento: Lima –Peru; 25 de Dezembro de 1970
Educação:

Graduação: Universidad Nacional de Ingeniería, Lima-Perú, Bacharelado em Química (2000).

Pós-Graduação: Universidade de São Paulo Instituto de Química de São Carlos, Mestre em Ciências, área de concentração: Química Analítica (2005)

Formação Complementar

- Congreso Iberoamericano de Química curso "Cromatografia Liquida y PAD/MS para la caracterización de productos naturales" Asistente, Cusco-Perú (14-17 de Octubre 2008, 8 horas)
- Seminario Realizado pela Phenomenex & Allcrom "Seminario Técnico de Cromatografía Liquida,Gasosa e SPE, Asistente, São Paulo (20 Julho 2010, 8 horas)
- Congreso Iberoamericano de Química curso "Taller de Validación de Metodologías Analíticas y calculo de la Incertidumbre" Asistente, Cusco-Perú (13-17 de Octubre 2008)
- Seminário Realizado Vertex Technics " Preparación de muestras para análisis" assistente, Valencia-España (24 de Setembro 2009, 6 horas)
- Instituto Internacional de Cromatografia curso Teoria e Prática "Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas: GC/MS & GC/MS/MS- Teoria e Prática em laboratório" Assistente, São Carlos (SP) (22-25 Junho 2010, com 20 horas de teoria e 12 horas praticas)
- Instituto Internacional de Cromatografia curso Teoria e Prática "Preparo de Amostras (Sample Preparation) Teoria e Prática em Laboratório" Assistente, São Carlos (SP) (27-29 setembro de 2010) com 16 horas de teóricas e 8 horas práticas.
- Instituto Internacional de Cromatografia curso Teoria e Prática "Como Desenvolver e Otimizar um Método em HPLC" Assistente, São Carlos (SP) (23-24 Novembro 2010) com 8 horas teóricas e 8 horas práticas.
- Instituto Internacional de Cromatografia curso Teoria e Prática "Como Desenvolver e Otimizar um Método em HPLC" Assistente, São Carlos (SP) (23-24 Novembro 2010) com 8 horas teóricas e 8 horas práticas.
- Instituto Internacional de Cromatografia curso Teoria e Prática "Como prever, evitar e resolver problemas em LC:TS (Teoria e Prática) Assistente, São Carlos (SP) (25-26 Novembro 2010) com 8 horas teóricas e 8 horas práticas
- Instituto Internacional de Cromatografia curso "Validação de Métodos Cromatográficos de Analise" Assistente, São Carlos (SP) (14-15 abril 2011) com 16 horas

- IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO 2010), curso "LC/MS & LC/MS/MS" Campos do Jordão (SP), (13 setembro).
- 13^0 ENQA-ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA. 1^0CIAQA, CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE QUIMICA ANALITICA Curso "Estratégias no Preparo de Amostras Enfocando a Determinação de Biomoléculas", Assistente Niterói-Rio de Janeiro (12-16 Setembro 2005, 06 horas)

Ocupação

- Bolsa de mestrado, CNPq, 2002/05
- Bolsa de doutorado, CAPES, 2006/10

Publicação e congressos

- **GARCIA, A.J.C**.; REIS, B.F. "Instrumentation and Automated Photometric Titration Procedure for Total Acidity Determination in Red Wine Employing a Multicommuted Flow System" Journal of Automated Methodos and Management in Chemistry p.1-8, 2006.
- **GARCIA, A.J.C**.; **MASINI, J.C;** "Método Para a determinação de triclosan e seus clorofenois por cromatografia de injeção sequencial" SIMCRO, Campos do Jordão (SP), 14-16 setembro 2010.
- **GARCIA, A.J.C**.; **CORDOVA, C.M.I.; MASINI, J.C.** "Determinação de triclosan em cosméticos" COLACRO XII, Florianópolis, 28-30 de outubro 2008.
- **GARCIA, A.J.C**.; **MASINI, J.C.** "Desenvolvimento Automático por cromatografía de Inyección Seqüencial para la determinación de triclosan" Congresso Iberoamericano de química, Cusco-Perú, 13-17 de outubro 2008.
- LAVORANTE, A.F.; NERY, R.E.; **GARCIA, A.J.C**.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M.; REIS, B.F. "Desenvolvimento de Procedimento Espectrofotométrico para a Determinação de Tensoativos Catiônicos em Águas Naturais Empregando Mini-bombas para a Propulsão de Fluídos" 28^0 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUIMICA, Poços de Caldas, 2005. Anais, p. QA-197
- VIERA, G.P.; **GARCIA, A.J.C**.; REIS, B.F. "Desenvolvimento de Procedimento Analítico Automático Para Determinação Espectrofotométrica de Cromo em Fármacos Empregando Multicomutação em Fluxo 28^0 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUIMICA, Poços de Caldas, 2005. Anais, p. QA-200
- PIRES, C.K.; **GARCIA, A.J.C**.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA de, M.; LIMA, J.L.F.C ; ZAGATO, E.A.G.; REIS, B.F. "Desenvolvimento de Procedimento em Fluxo Para a Determinação de Carbaril em Águas Naturais Explorando Multicomutação e Detecção Quimiluminescente" 28^0 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUIMICA, Poços de Caldas, 2005. Anais, p. QA-215
- **GARCIA, A.J.C**.; REIS, B.F. "Instrumentação e Procedimento para Determinação de Acidez em Vinho Tinto Empregando Multicomutação em Fluxo e Titulação Fotométrica" 13^0 ENQA-ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA. 1^0CIAQA, CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE QUIMICA ANALITICA Niterói-Rio de Janeiro, 2005. Anais, p 46 C-053.