

## ALTERNATIVAS VERDES PARA O PREPARO DE AMOSTRA E DETERMINAÇÃO DE POLUENTES FENÓLICOS EM ÁGUA

Guilherme Dias Rodrigues, Luis Henrique Mendes da Silva e Maria do Carmo Hespanhol da Silva\*

Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Av. P. H. Rolfs, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 8/10/09; aceito em 11/3/10; publicado na web em 20/7/10

### GREEN ALTERNATIVES FOR SAMPLE PREPARATION AND DETERMINATION OF PHENOLIC POLLUTANTS IN WATER.

The restricted availability of water sources suitable for consumption and high costs for obtaining potable water has caused an increase of the conscience concerning the use. Thus, there is a high demand for “environmentally safe methods” which are according to the principles of Green Chemistry. Moreover, these methods should be able to provide reliable results for the analysis of water quality for various pollutants, such as phenol. In this work, greener alternatives for sample preparation for phenol determination in aqueous matrices are presented, which include: liquid phase microextraction, solid phase microextraction, flow analysis, cloud point extraction and aqueous two-phase systems.

Keywords: phenols; green chemistry; water.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, devido às consequências negativas do grande crescimento industrial e populacional, que provoca graves danos à saúde humana e à natureza, o aumento da responsabilidade ambiental tem sido visível. Diversos países têm voltado seus esforços para a busca do desenvolvimento auto-sustentável, que pode ser definido como o progresso industrial que atenda às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das futuras gerações de satisfazerem suas próprias necessidades.<sup>1</sup>

Inevitavelmente, essa demanda teve influência decisiva na Química. Pesquisadores têm buscado, cada vez mais, desenvolver novos métodos,<sup>2,3</sup> elaborar novas sínteses,<sup>4,5</sup> criar novas ferramentas,<sup>6,7</sup> que reduzam ou eliminem componentes indesejáveis de uma análise química, como, produção de resíduos, uso de reagentes tóxicos, desperdício de energia em processos industriais, etc.

### Química verde (QV): definição e princípios

A partir da década de 90, surge uma nova tendência em como conduzir as análises químicas, com o intuito de reduzir o impacto ambiental das mesmas. Essa nova visão é denominada *Green Chemistry*, ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto-sustentável. O conceito da química verde, que inclui 12 princípios básicos, é definido como o projeto, desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos com o objetivo de reduzir ou eliminar o uso ou a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente.<sup>8</sup> A partir disso, iniciaram-se diversas pesquisas com o objetivo de desenvolver métodos ambientalmente seguros.

Um dos principais alvos dos estudos envolvendo química verde e preocupação ambiental é o monitoramento da qualidade das águas, haja vista o papel fundamental desempenhado pela água na manutenção de todos outros segmentos da natureza. Para que esse monitoramento (não apenas da água, mas como de outras matrizes, como solos, atmosfera, etc.) fosse realizado de forma eficaz, diversas agências de controle ambiental foram criadas. Dentre elas, destacam-

se a *Environmental Protection Agency* (EPA) que, atualmente, é um dos principais órgãos de controle ambiental do mundo e, em âmbito nacional, o Ministério do Meio Ambiente (MMA), representado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Esses órgãos possuem uma lista, denominada poluentes prioritários,<sup>9</sup> com as substâncias mais nocivas à saúde humana e ao ambiente, que inclui: metais (*e.g.*, Sb, Cu, Pb, Zn, Cd, Cr, Ni, Hg, etc.); agrotóxicos (*e.g.*, DDT); e outras espécies, como CN<sup>-</sup>, benzeno, clorofórmio, etc. Além disso, esta lista inclui uma classe muito importante de poluentes, que tem sido alvo de pesquisas acadêmicas,<sup>10-12</sup> que são os compostos fenólicos.

### Compostos fenólicos

Fenol e seus derivados são substâncias encontradas em diversos processos industriais. Essas substâncias causam uma constante preocupação do ponto de vista ambiental,<sup>13</sup> devido ao alto grau de toxicidade, bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares, mesmo em baixas concentrações e persistência no ambiente.<sup>14-16</sup> A Tabela 1 apresenta os fenóis incluídos na lista de poluentes prioritários. Os 20 compostos fenólicos presentes nesta lista dividem-se em 4 grupos principais, além do próprio fenol: cloro-fenóis; metil-fenóis (cresóis); nitro-fenóis; e outros fenóis que apresentam mais de um tipo de substituinte no anel aromático.

**Tabela 1.** Fenóis incluídos na lista de poluentes prioritários. Adaptada da ref. 9

Grupo	Compostos fenólicos
Fenol	fenol
Cloro-fenóis	2-cloro-fenol; 2,4-dicloro-fenol; 2,6-dicloro-fenol; 2,4,5-tricloro-fenol; 2,4,6-tricloro-fenol; 2,3,4,5-tetracloro-fenol; 2,3,4,6-tetracloro-fenol; 2,3,5,6-tetracloro-fenol; pentacloro-fenol
Cresóis	2-metil-fenol; 3-metil-fenol; 4-metil-fenol; 2,4-dimetil-fenol
Nitro-fenóis	2-nitro-fenol; 4-nitro-fenol; 2,4-dinitro-fenol
Outros	4-cloro-3-metil-fenol; 2-metil-4,6-dinitro-fenol; 2-cicloexil-4,6-dinitro-fenol; 2-sec-butil-4,6-dinitro-fenol (Dinoseb)

\*e-mail: mariacarmo@ufv.br

A Resolução 357 do CONAMA, de 17/3/2005,<sup>17</sup> dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Esta resolução, que segue o método descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*,<sup>18</sup> estabelece que o controle dos teores máximos de compostos fenólicos em corpos de água é sujeito à análise de “fenóis totais”. Conforme mostrado na Tabela 2, a tolerância em relação à concentração de fenóis totais varia de acordo com o tipo de água. Para águas doces e salobras de classe 1, que são destinadas ao consumo humano após tratamento adequado, a tolerância para fenóis é de 3 µg L<sup>-1</sup>. Já para águas que não são destinadas ao consumo humano e/ou utilização direta, a legislação estabelece um teor máximo que varia de 10 a 60 µg L<sup>-1</sup>.

Além disso, segundo o CONAMA, os efluentes de quaisquer fontes poluidoras somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, em corpos de água se apresentarem concentrações máximas de fenóis totais de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Atualmente, os efluentes industriais e os seus respectivos locais de descarte são os principais alvos de trabalhos acadêmicos que envolvem determinação de fenóis. As principais fontes industriais de resíduos contendo compostos fenólicos são indústrias de corantes,<sup>19</sup> pesticidas,<sup>20</sup> papel e celulose,<sup>21</sup> petroquímica<sup>22,23</sup> e siderúrgica.<sup>23</sup>

## MÉTODOS ANALÍTICOS AMBIENTALMENTE SEGUROS PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS EM ÁGUA

Diversos procedimentos para determinação de compostos fenólicos estão relatados na literatura, os quais incluem diferentes técnicas analíticas, como voltametria;<sup>24-26</sup> amperometria;<sup>27-29</sup> cromatografia gasosa (CG), acoplada a detectores de ionização em chama (DIC),<sup>30</sup> captura de elétrons (DCE)<sup>31</sup> ou espectrômetro de massas (EM);<sup>32</sup> cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); acoplada a detectores de arranjo de diodo (DAD),<sup>33</sup> eletroquímicos,<sup>34</sup> amperométricos,<sup>35</sup> fluorescência<sup>36</sup> ou espectrômetro de massas (EM);<sup>36-39</sup> eletroforese capilar (EC), com diferentes sistemas de detecção<sup>40-42</sup> e, espectrometria de absorção molecular na região do UV-Visível (UV/Vis).<sup>43-47</sup>

Essas técnicas sempre foram amplamente aplicadas para determinação de fenóis, de modo convencional, isto é, sem a preocupação do impacto gerado ao meio ambiente. Entretanto, com o advento da Química Verde e de toda a demanda em relação à consciência ambiental, novas técnicas foram incorporadas aos procedimentos analíticos convencionais com o objetivo de se desenvolver “métodos limpos”. Dentre essas técnicas, consideradas ambientalmente seguras, destacam-se a microextração em fase líquida (MEFL), microextração em fase sólida (MEFS), análise em fluxo, extração por ponto nuvem (EPN) e sistemas aquosos bifásicos (SABs).

É importante ressaltar que outras técnicas analíticas foram desenvolvidas com características coerentes com os princípios da Química

Verde, como a cromatografia gasosa ultrarrápida e a cromatografia líquida de ultraeficiência. Entretanto, a maioria dos trabalhos relatados na literatura que empregam estas técnicas enfoca o estudo de compostos fenólicos com atividades antioxidantes (*e.g.*, ácidos fenólicos e flavonoides),<sup>48-50</sup> não se referindo à determinação de poluentes fenólicos em amostras de água. Dessa forma, neste trabalho são apresentados métodos alternativos para determinação de poluentes fenólicos em matrizes aquosas empregando técnicas analíticas ambientalmente seguras.

## Microextração em fase líquida

Dentre as técnicas de extração/pré-concentração utilizadas para preparo de amostras e determinação de fenóis, a extração líquido-líquido tradicional (ELT) e a extração em fase sólida (EFS) são certamente as ferramentas mais aplicadas, devido a características como baixo custo, simplicidade e possibilidade de emprego de vários tipos de solventes como, por exemplo, clorofórmio, tetracloreto de carbono, hexano, etc. Entretanto, a ELT e a EFS apresentam diversas desvantagens, como o emprego de grandes quantidades de solventes orgânicos (geralmente, de 10 a 30 mL), que são substâncias tóxicas, cancerígenas e/ou inflamáveis;<sup>51</sup> formação de emulsões; longo tempo de análise e, dificuldade de automação, devido à necessidade de operadores experientes e ao alto custo neste caso em específico.<sup>52</sup>

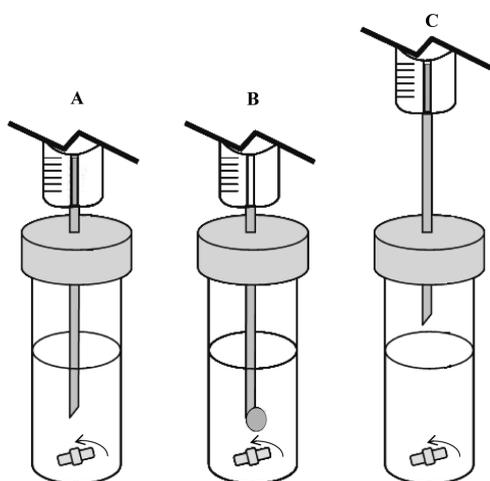
Uma proposta para substituição da ELT e EFS foi introduzida em 1996, por Liu e Dasgupta.<sup>53</sup> Esta técnica é denominada microextração em fase líquida (MEFL) e foi desenvolvida como um pré-tratamento para redução do consumo de solvente orgânico. A MEFL é baseada na distribuição do analito entre uma fase aquosa, contendo o material de interesse, e uma microgota, tipicamente um solvente orgânico, conforme esquematizado na Figura 1.<sup>54</sup> Na prática, uma gota do solvente extrator, suspensa na ponta de uma seringa de alta precisão, é exposta à amostra, por um dado tempo e sob determinada temperatura. Depois da extração, a gota é recolhida e transferida para o instrumento analítico. Esta técnica apresenta vantagens como rapidez, simplicidade e baixo custo e, além disso, inclui princípios da química verde, pois uma quantidade muito pequena de solvente orgânico (1 a 3 µL) é empregada, o que reduz a produção de resíduos (Princípio 1 da QV), a exposição de operadores a substâncias tóxicas e, conseqüentemente, diminui o risco de acidentes (Princípio 12 da QV).<sup>8</sup>

Desde que a MEFL foi introduzida pela primeira vez,<sup>53</sup> diversos procedimentos analíticos, empregando o princípio básico da técnica, foram desenvolvidos para superar eventuais limitações que determinada configuração apresentava. Todos estes métodos foram aplicados na determinação de fenóis em água, incluindo microextração com gota única (MEGU);<sup>55</sup> microextração líquido-líquido dispersiva (MELD);<sup>56,57</sup> microextração em *headspace* (MHS), aplicando solventes orgânicos<sup>58,59</sup> ou soluções aquosas<sup>60</sup> como microfase; e a microextração em fase líquida com fluxo contínuo (MEFC).<sup>30</sup>

**Tabela 2.** Teores máximos de fenóis totais permitidos em água. Adaptada da ref. 17

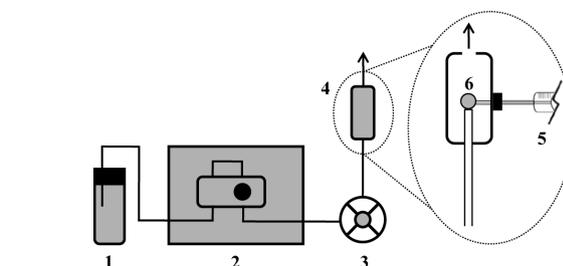
Tipo de água	Descrição	Fenóis totais <sup>a</sup>
Doce - Classe 1	Abastecimento para o consumo humano, após tratamento simplificado; proteção de comunidades aquáticas; recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película.	0,003 mg L <sup>-1</sup>
Doce - Classe 3	Abastecimento para o consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; irrigação de culturas arbóreas, cereíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário; dessedentação de animais.	0,01 mg L <sup>-1</sup>
Salina - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca.	0,06 mg L <sup>-1</sup>
Salobra - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca; abastecimento para o consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto.	0,003 mg L <sup>-1</sup>
Efluente	Quaisquer fontes poluidoras que lançam resíduos em corpos de água.	0,5 mg L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> substâncias que reagem com 4-aminoantipirina



**Figura 1.** Configuração básica das etapas principais de um sistema de MEFL. Sistema antes da injeção da microgota, sob agitação (A); injeção da microgota e extração do analito (B); recolhimento da microgota para análise (C). Adaptada da ref. 5

Um exemplo de trabalho aplicando a MEFL para determinação de fenóis é o método desenvolvido por Chen *et al.*,<sup>30</sup> no qual um sistema de MEFC é utilizado como pré- etapa de extração à análise cromatográfica via CG-DIC. Conforme esquematizado na Figura 2, neste método, uma microgota de solvente orgânico (3  $\mu\text{L}$  de acetato de pentila) é injetada em uma câmara de extração, através de uma seringa e mantida na saída de um tubo de teflon. A solução contendo a amostra (30 mL) é propulsionada, com o auxílio de uma bomba peristáltica, para a câmara de extração onde ocorre a transferência do fenol da fase aquosa para a fase orgânica, através de um processo de partição. Em seguida, o fluxo de amostra pela câmara é interrompido pelo fechamento do injetor, e a gota é coletada e injetada no cromatógrafo a gás. Devido ao pequeno volume da fase extratora e ao contato contínuo com a amostra no sistema em fluxo, o método apresenta altos fatores de pré-concentração, alcançando limites de detecção (LOD) inferiores a 3,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Além disso, este trabalho apresenta melhorias em relação às análises cromatográficas tradicionais, como redução do uso de solventes orgânicos que, por sua vez, diminui a possibilidade de



**Figura 2.** Esquema do sistema de MEFC, composto pelo recipiente com amostra (1), bomba peristáltica (2), injetor (3), e câmara de extração (4). Esta é detalhada com seringa (5) e microgota de solvente orgânico (6). Adaptada da ref. 30

acidentes; diminuição do erro de análise devido à diminuição de operação humana pelo uso de um sistema em fluxo.

A Tabela 3 apresenta as principais características deste trabalho e de outros métodos que empregam a MEFL para determinação de poluentes fenólicos em água. Detalhes sobre o tipo de matriz, tipos de fenóis estudados, técnica de detecção e as principais figuras de mérito, como limite de detecção (LOD) e faixa linear, estão descritos na Tabela 3.

Um aspecto importante apresentado na Tabela 3, que é uma tendência geral em trabalhos que envolvem determinação de fenóis, é o fato de os cloro-fenóis serem um dos principais alvos de análise em amostras aquosas, pois a presença de fenóis clorados em águas utilizadas para fins potáveis gera um sabor reconhecidamente desagradável, além de danos à saúde.<sup>61</sup>

Entretanto, é importante ressaltar que a legislação estabelece um controle de fenóis totais em água e não apenas de espécies individuais; logo, é importante e necessário o desenvolvimento de procedimentos para determinação de compostos fenólicos totais.

### Microextração em fase sólida

Outra proposta para superar as desvantagens e limitações, do ponto de vista analítico e ambiental, apresentadas pela ELT e EFS é a microextração em fase sólida (MEFS). A MEFS foi descrita, pela primeira vez, por Arthur e Pawliszyn no início da década de 90<sup>62</sup> e tem sido largamente aplicada em preparo de amostras, especialmente

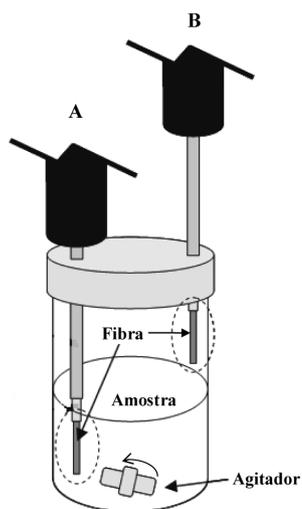
**Tabela 3.** Sumário de alguns trabalhos relevantes aplicando MEFL para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas

Técnica	Fenóis <sup>a</sup>	Matriz	Deteção <sup>b</sup>	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ref.
MEGU	F; 2CF; 4CF; 2NF; 4NF; 24DCF; 24DMF; 246TCF; 4C2MF; 24DMF; 2M46DNF; PCF	Rio Destilada	CG-EM	0,004 – 0,061	0,04 – 51	55
MELD	2CF; 3CF; 4CF; 26DCF; 25DCF; 24DCF; 35DCF; 23DCF; 34DCF; 246TCF; 236TCF; 235TCF; 245TCF; 234TCF; 345TCF; 2356TeCF; 2346TeCF; 2345TeCF; PCF	Torneira Rio	CG-DCE	0,010 – 2,0	0,02 – 400	56
ELD	2CF; 3CF; 4CF; 26DCF; 25DCF; 24DCF; 35DCF; 23DCF; 34DCF; 246TCF; 236TCF; 235TCF; 245TCF; 234TCF; 345TCF; 2356TeCF; 2346TeCF; 2345TeCF; PCF	Torneira Rio	CG-DEC	0,0005 – 0,100	0,001 – 20,000	57
MHS	24DMF; 246TMF; 2CF; 24DCF; 2NF	Drenagem	EC-UV/Vis	1 – 3	5 – 5000	58
MHS	F; 2MF; 4MF	Lagoa	CLAE-UV/Vis	450 – 590	1000 – 30000	58
MHS	24DCF; 246TCF; 2346TeCF; PCF	Lixiviado de aterro	CG-DEC	0,04 – 0,7	0,5 – 100	59
MFC	F; 2MF; 3MF; 24DMF; 23DMF; 34DMF	Coqueria	CG-DIC	1,37 – 2,95	4 – 10000	30

<sup>a</sup> F: fenol; 2MF: 2-metil-fenol; 3MF: 3-metil-fenol; 4MF: 4-metil-fenol; 23DMF: 2,3-dimetil-fenol; 24DMF: 2,4-dimetil-fenol; 34DMF: 3,4-dimetil-fenol; 246TMF: 2,4,6-trimetil-fenol; 2CF: 2-cloro-fenol; 3CF: 3-cloro-fenol; 4CF: 4-cloro-fenol; 23DCF: 2,3-dicloro-fenol; 24DCF: 2,4-dicloro-fenol; 25DCF: 2,5-dicloro-fenol; 26DCF: 2,6-dicloro-fenol; 34DCF: 3,4-dicloro-fenol; 35DCF: 3,5-dicloro-fenol; 234TCF: 2,3,4-tricloro-fenol; 235TCF: 2,3,5-tricloro-fenol; 236TCF: 2,3,6-tricloro-fenol; 245TCF: 2,4,5-tricloro-fenol; 246TCF: 2,4,6-tricloro-fenol; 345TCF: 3,4,5-tricloro-fenol; 2345TeCF: 2,3,4,5-tetracloro-fenol; 2346TeCF: 2,3,4,6-tetracloro-fenol; 2356TeCF: 2,3,5,6-tetracloro-fenol; PCF: pentacloro-fenol; 2NF: 2-nitro-fenol; 4NF: 4-nitro-fenol; 4C2MF: 4-cloro-2-metil-fenol; 2M46DNF: 2-metil-4,6-dinitro-fenol. <sup>b</sup> CG: cromatografia gasosa; EM: espectrometria de massas; DCE: detector por captura de elétrons; EC: eletroforese capilar; UV/Vis: Ultravioleta/Visível; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DIC: detector por ionização em chama.

a partir de 1993, quando as primeiras fibras foram introduzidas no mercado. A MEFS é rotineiramente utilizada principalmente em combinação com CG e CLAE na análise de vários compostos (voláteis, semivoláteis ou não voláteis) em amostras ambientais, biológicas e alimentícias.

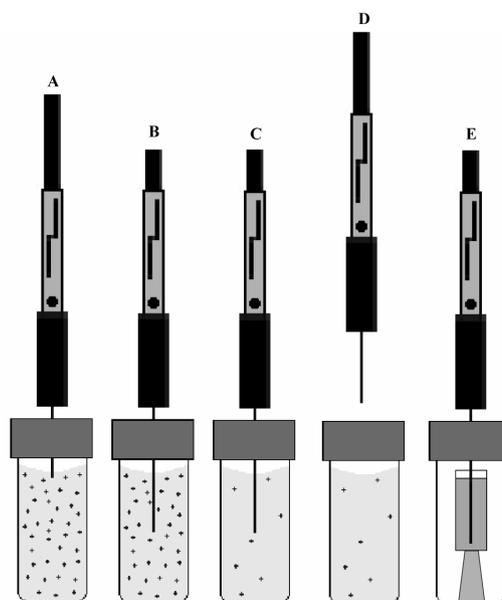
A técnica é baseada na partição do analito entre a amostra e uma fibra de sílica fundida revestida com um filme de um material sorvente, e na posterior dessorção do analito concentrado na fase sólida em um instrumento analítico. Durante a exposição da fibra à fase vapor acima da amostra (técnica de *headspace* (HS)) ou imersão direta (ID) na solução, conforme esquematizado na Figura 3, um processo de transferência de matéria entre as fases ocorre e o analito é concentrado na fase sólida. Neste momento, a fibra é retirada do contato com a amostra e o composto de interesse é dessorvido para o instrumento adequado para fornecer o sinal analítico.



**Figura 3.** Esquema do sistema de MEFS, em modo de extração por imersão direta (A) e *headspace* (B). Adaptada da ref. 54

A MEFS é uma técnica que certamente está de acordo com os princípios da química verde. Em relação ao processo convencional de extração em fase sólida, em uma microextração o volume de solvente orgânico utilizado é extremamente reduzido ou eliminado, o que gera um menor risco de acidentes (Princípio 12 QV) e menor produção de resíduos (Princípio 1 QV).<sup>8</sup> Além disso, como esta técnica engloba extração, pré-concentração e introdução de amostra em duas etapas, a MEFS oferece uma alta frequência de amostragem e facilidade de automação.

A MEFS é extensamente aplicada em procedimentos para determinação de compostos fenólicos em matrizes de interesse ambiental, principalmente em amostras de água.<sup>20,53-69</sup> Todos os trabalhos reportados na literatura apresentam modificações peculiares no processo de extração com o objetivo de melhorar a análise e os resultados. Um exemplo é o método analítico descrito por Santana *et al.*,<sup>66</sup> no qual a MEFS com dessorção em meio micelar foi aplicada para determinação de cloro-fenóis em amostras de esgoto tratado e águas subterrâneas, utilizando CLAE e um detector com arranjo de diodos (DAD). As etapas básicas do procedimento são representadas na Figura 4. O processo de dessorção do analito, da fibra para a solução, quando realizado em meio micelar, oferece vantagens em relação ao processo de MEFS convencional, pois o uso de uma solução de surfatante substitui o emprego de solventes orgânicos e, segundo os autores do trabalho, previne limitações como o efeito de memória nas fibras e a sobreposição de picos no cromatograma, devido à maior eficiência no processo de eluição.



**Figura 4.** Esquema do procedimento de MEFS com dessorção em meio micelar: Amostra contendo composto fenólico (A); exposição da fibra à amostra, por imersão direta (B); extração e pré-concentração do analito na fibra (C); recolhimento da fibra para o interior do suporte (D); exposição da fibra em meio micelar para dessorção do analito (E). Adaptada da ref. 66

A Tabela 4 apresenta as principais características deste trabalho e de outros procedimentos importantes que empregam a MEFS para determinação de fenóis em água. Detalhes sobre o tipo de matriz, natureza de fenóis estudados, tipo de fibra, técnica de detecção e as principais figuras de mérito, como limite de detecção (LOD) e faixa linear, estão descritos na Tabela 4.

Apesar da MEFL e da MEFS serem técnicas amplamente aplicadas, de modo ambientalmente seguro, para análise de compostos fenólicos e apresentarem diversas vantagens, é importante ressaltar que ainda apresentam alguns aspectos a serem desenvolvidos e melhorados, os quais geram limitações do ponto de vista analítico. Dentre eles pode-se destacar: vida útil curta (principalmente em extração por imersão direta (ID)) e alto custo de algumas fibras utilizadas em MEFS; emprego de solventes orgânicos, em alguns casos, mesmo que em volume reduzido e, ainda, impossibilidade de se empregar esses métodos para análise *in situ*, ou seja, aplicar o procedimento no próprio local de coleta da amostra, verificar se existe fenol presente e determinar a concentração do mesmo.

#### Análise em fluxo

Atualmente, os métodos analíticos, de modo geral, estão bem estabelecidos para monitoramento ambiental. Todavia, a maioria dos procedimentos empregados para investigar problemas ambientais gera resíduos químicos e, conseqüentemente, grande impacto ambiental.<sup>72</sup> Em alguns casos, esses resíduos são mais tóxicos que os próprios poluentes em análise.

A análise em fluxo abrange um amplo grupo de métodos aplicados em rotina e pesquisa.<sup>73</sup> O desenvolvimento desta técnica trouxe uma nova perspectiva à química analítica verde, pois permite medições rápidas (Princípio 11 da QV), mínimo de intervenção de analistas (Princípio 12 da QV) e mínima geração de resíduos (Princípio 1 da QV).<sup>8</sup>

Na maioria dos trabalhos de determinação de poluentes fenólicos em água, empregando análise em fluxo, a espectrometria de absorção UV/Vis (EAM-UV/Vis), comumente conhecida como espectrofotometria, é a técnica utilizada para detecção dos analitos. Diferentes

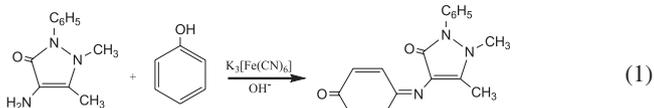
**Tabela 4.** Sumário de alguns trabalhos relevantes aplicando MEFS para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas

Fenol <sup>a</sup>	Matriz	Fibra <sup>b</sup>	Deteção <sup>c</sup>	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	Faixa linear (µg L <sup>-1</sup> )	Ref.
F; 2CF; 4CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 4C3MF; 4C35DMF	Esgoto	CW/LEP	CLAE-DAD	0,5 – 20	1,1 – 5,9	66
2MF; 3MF; 4MF; 26DCF; 245TCF; 2346TeCF; 2M46DNF	Rio Mar	Pt/DS-PP	CG-DIC	0,57 – 1,82	2 – 100	63
246TCF; PCF; 246TBF	Rio	NiTi/ZrO <sub>2</sub>	CG-DCE	0,21 – 0,30	0,5 – 30	64
F; 2CF; 4CF; 24DCF; 26DCF; 245TCF; 246TCF; 2346TeCF; PCF; 4C3MF	Superficial	Sílica/PA	CG-EM	0,052 – 9,1	0,042 – 79	20
F; 2MF; 3MF; 4MF; 3NF; 2,4DNF; 2,5DNF; 2,6DNF; 34DNF; PCF; 2M3NF; 3M2NF; 3M4NF; 4M2NF; 5M2NF; 4M26DNF; Dinoseb	Chuva	Sílica/PA	CG-EM	0,20 – 34,00	n.r. <sup>d</sup>	65
F; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 2NF; 4NF; 24DNF; 24DMF; 4C3MF; 2M46DNF	Esgoto	Sílica/PA	CG-DIC	0,610 – 32000	2 – 8000	67
2CF; 24DCF; 2346TeCF; PCF	Lixiviado de aterro	PA	CG-EM	0,0005 – 0,040	0,1 – 100	68
2CF; 4CF; 24DCF; 234TCF; 235TCF; 2346TeCF; 4C3MF	Rio Subterrânea	PA e CW/PDS	CG-EM	0,2 – 50	n.r. <sup>d</sup>	69
F; 2NF; 4NF; 24DNF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 2M46DNF; 4C3MF	Rio	PA	CLAE-UV/Vis	0,4 – 23	2 – 30000	70
F; 2NF; 4NF; 24DNF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 2M46DNF; 4C3MF	Rio	PA	CLAE-DE	0,013 – 15	0,05 – 100	70
F; 2NF; 4NF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 4C3MF	Rio	CW	CLAE-DAD	1 – 10	10 – 1000	71

<sup>a</sup>4C3MF: 4-cloro-3-metil-fenol; 4C35DMF: 4-cloro-3,5-dimetil-fenol; 246TBF: 2,4,6-tribromo-fenol; 24DNF: 2,4-dinitro-fenol; 25DNF: 2,5-dinitro-fenol; 26DNF: 2,6-dinitro-fenol; 34DNF: 3,4-dinitro-fenol; 2M3NF: 2-metil-3-nitro-fenol; 3M4NF: 3-metil-4-nitro-fenol; 4M2NF: 4-metil-2-nitro-fenol; 5M2NF: 5-metil-2-nitro-fenol; 4M26DNF: 4-metil-2,6-dinitro-fenol; ver restante na Tabela 3. <sup>b</sup>(suporte/filme) CW/LEP: carbowax/lauril éter polioxido de etileno; Pt/DS-PP: Pt/dodecilsulfato dopado com polipirrol; PA: poliacrilato; PDS: polidimetilsiloxano. <sup>c</sup>CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DAD: detector com arranjo de diodos; CG: cromatografia gasosa; DIC: detector por ionização em chama; DCE: detector por captura de elétrons; EM: espectrometria de massas; UV/Vis: Ultravioleta/Visível; DE: detecção eletroquímica. <sup>d</sup>nr: não reportado

abordagens de sistemas em fluxo são propostas, incluindo análise por injeção em fluxo (FIA - *flow injection analysis*);<sup>74-77</sup> análise em fluxo segmentado (AFSEG);<sup>78</sup> sistemas em fluxo baseados em multicomutação (SFMC);<sup>47,79</sup> análise por injeção sequencial (AISEQ);<sup>80</sup> análise por injeção em fluxo baseados em multi-seringas (AIFMS);<sup>43,81</sup> e análise em fluxo contínuo (AFC).<sup>82</sup>

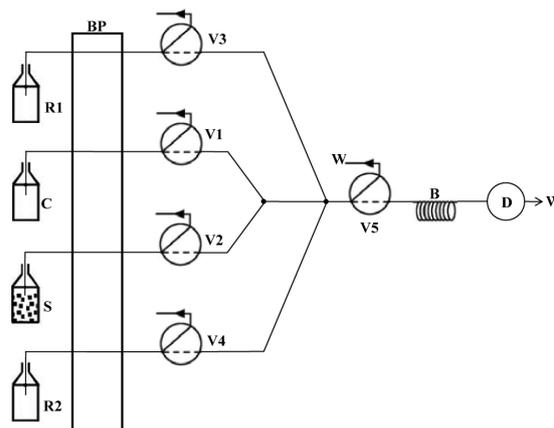
Essa tendência de métodos de determinação espectrofotométrica de poluentes fenólicos em água é justificada pelo fato de esta técnica ser empregada no método padrão de análise de fenol, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*,<sup>18</sup> desde 1965. O método é baseado em uma reação de acoplamento oxidativo, em meio alcalino, entre fenol e o reagente 4-aminoantipirina (4AAP) na presença do oxidante K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], conforme representado pela Equação 1. O produto formado apresenta coloração avermelhada e absorção molecular máxima em 500 nm. Esta reação foi descrita pela primeira vez por Edgard Emerson, em 1943,<sup>83</sup> e, a partir disso, foi extensivamente estudada para a determinação das condições experimentais ótimas (pH, concentração dos reagentes, interferentes, etc.) e parâmetros, como sensibilidade e seletividade.<sup>84,85</sup>



O método padrão, apesar de possuir vantagens reconhecidas, apresenta uma grande deficiência para detectar teores de fenol abaixo de 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Para permitir a determinação de fenol em concentrações normalmente presentes em ambientes aquáticos (< 100 µg L<sup>-1</sup>), uma etapa de pré-concentração é necessária, a qual emprega ELT utilizando clorofórmio. Outro aspecto importante é o elevado consumo de reagentes neste procedimento, que pode alcançar 550 mL por amostra analisada. Além disso, esta reação é muito sensível a variações de pH do meio reacional e o procedimento possui tempo de análise alto, o que não é interessante para trabalhos de rotina. Várias dessas desvantagens estão em contradição com os princípios da química verde e, devido a essa

nova tendência de métodos ambientalmente seguros, diversos trabalhos para determinação de fenol, envolvendo a reação com a 4AAP, foram desenvolvidos para superar essas deficiências relatadas no método padrão.

Um exemplo desses trabalhos, empregando análise em fluxo, é o método proposto por Lupetti *et al.*,<sup>47</sup> o qual emprega a reação entre fenol e 4AAP para determinação de fenóis utilizando um SFMC. Este sistema consiste no emprego de dispositivos de comutação (válvulas solenoides, por exemplo). Estes dispositivos são controlados por um microcomputador, o que permite que todas as etapas do processo, inclusive a adição de reagentes, sejam realizadas de forma independente. A Figura 5 apresenta o sistema em fluxo descrito por Lupetti *et al.*<sup>47</sup> Um ponto importante neste procedimento é que o sistema de detecção empregado trata de um dispositivo de fibra óptica, cujo caminho óptico é de 100 cm, o que oferece uma alta sensibilidade ao método, permitindo a detecção de quantidades traço de fenol (LOD = 1 µg L<sup>-1</sup>).



**Figura 5.** Esquema do sistema utilizado para determinação de fenóis. BP: bomba peristáltica; V: válvulas solenoides de três vias; B: bobina de reação (80 cm); D: detector com cela em fluxo de longo caminho (100 cm); C: carreador (água); S: amostra; R1: 4AAP em tampão pH 10,0; R2: K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; W: descarte. Adaptada da ref. 47

**Tabela 5.** Trabalhos relevantes aplicando análise em fluxo para determinação de fenóis em água.

Sistema <sup>a</sup>	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	Faixa linear (µg L <sup>-1</sup> )	FA <sup>b</sup> (h <sup>-1</sup> )	VR <sup>c</sup> (mL)	Ref.
FIA	900	1000 - 50000	5	29,3	74
FIA	10	100 - 1500	60	4,23	75
FIA	900	19000 - 190000	26	n.r. <sup>d</sup>	76
FIA	30	50 - 15000	40 - 60	4,8	77
AFC	1	100 - 10000	39	n.r. <sup>d</sup>	82
SFMC	1	10 - 100	90	4,0	47
SFMC	13	50 - 3500	65	1,6	79
AIFMS	42 - 448	140 - 17655	11	n.r. <sup>d</sup>	46
AIFMS	4,2 - 15	> 1600	3,16	n.r. <sup>d</sup>	81
AFSEG	0,3	< 10	10	60	78
AFSEQ	100	500 - 25000	12	10	80

<sup>a</sup> FIA: análise por injeção em fluxo; AFC: análise em fluxo contínuo; SFMC: sistema em fluxo com multi-comutação; AIFMS: análise por injeção em fluxo com multi-seringas; AFSEG: análise em fluxo segmentado; AFSEQ: análise por injeção sequencial. <sup>b</sup> FA: frequência de amostragem. <sup>c</sup> VR: volume de resíduo (estimado por determinação). <sup>d</sup> n.r.: não reportado.

A Tabela 5 apresenta características de diversos sistemas em fluxo utilizados para determinação de fenóis em água, empregando detecção espectrofotométrica. Alguns parâmetros obtidos por análise em fluxo como tipos de sistema em fluxo, frequência de amostragem (FA), volume de resíduo gerado (VR) e figuras de mérito, estão descritos na Tabela 5. Como os trabalhos tratam de métodos espectrofotométricos, com a utilização de reagentes cromóforos, as concentrações descritas na Tabela 5 correspondem a fenóis totais, assim como o descrito na legislação.<sup>17</sup>

### Extração por ponto nuvem

Outro tipo de técnica aplicada para determinação de fenóis, utilizando inclusive a reação do método padrão, é a extração por ponto nuvem (EPN), ou *cloud point extraction*. A EPN foi introduzida, em 1976, por Watanabe e Tanaka<sup>86</sup> como uma nova técnica de separação e extração, alternativa ao uso de solventes orgânicos e, apesar de ser utilizada inicialmente para pré-concentração de metais, foi aplicada para diversos tipos de analitos, como compostos fenólicos.<sup>87-92</sup>

O potencial da EPN está relacionado à utilização de substâncias com propriedades surfatantes. A molécula de um surfatante é constituída por uma região hidrofílica, denominada cabeça polar, e uma região hidrofóbica, denominada cauda apolar. Em solução aquosa e em baixas concentrações, os surfatantes se encontram sob a forma de monômeros; entretanto, sob determinadas condições de temperatura e pressão e acima de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), as moléculas se agregam espontaneamente, formando micelas.<sup>93-95</sup> Tais micelas, em meio aquoso, são constituídas por um núcleo hidrofóbico, constituído principalmente por interações cauda apolar/cauda apolar e uma coroa hidrofílica, constituída pela porção hidrofílica do surfatante. De acordo com o tipo de surfatante e condições do meio, as micelas podem adotar diversos tipos de formas, desde esféricas a bicamadas.<sup>96</sup>

O princípio da técnica de EPN é baseado na partição preferencial de espécies afins (como, por exemplo, o produto da reação entre fenol e 4AAP) para o interior hidrofóbico das micelas presentes em solução. Esta partição gera um alto fator de concentração e, conseqüentemente, um ganho de sensibilidade do método. Usualmente, o sistema é submetido a um aquecimento, através do qual ocorre um processo de segregação de fases, originando duas fases distintas: uma fase aquosa e uma fase rica em surfatante (sob a forma de micelas) e com o produto de interesse.

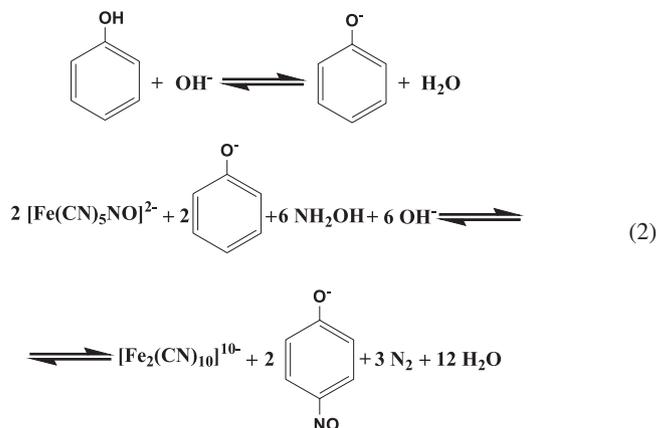
A EPN inclui diversas vantagens, inclusive do ponto de vista ambiental, como utilização de solventes auxiliares, em substituição

aos orgânicos (Princípio 5 da QV);<sup>8</sup> capacidade de concentrar diversos analitos com recuperação quase quantitativa; baixo custo e fácil aquisição dos reagentes e, simplicidade.

O potencial da EPN na determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos foi demonstrado por Katsaounos *et al.*,<sup>91</sup> ao aplicarem a técnica para a extração/pré-concentração do produto da reação entre fenol e 4AAP. Parâmetros como concentração dos reagentes (4AAP e K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) e concentração de surfatantes (Triton X-100 e Triton X-114) foram otimizados. Alguns parâmetros analíticos do método foram determinados, como fator de pré-concentração, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e precisão, obtendo-se valores de 50; 0,5; 1,6 µg L<sup>-1</sup> e 3,11%, respectivamente. Além disso, o método foi aplicado para análises da presença de poluentes fenólicos em água de lagoa, efluente de esgoto e estações de tratamento de resíduos de água. Dessa forma, a EPN possibilita a realização de uma análise espectrofotométrica de poluentes fenólicos em água em baixas concentrações (LOD = 0,5 µg L<sup>-1</sup>), as quais estão abaixo do estabelecido por agências de controle ambiental.<sup>9,17</sup>

### Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa de extração líquido-líquido ambientalmente segura para determinação de fenóis

Um interessante método para determinação de fenol foi descrito Nagaraj *et al.*<sup>97</sup> e aprimorado por Kang *et al.*<sup>98</sup> Baseia-se em uma reação eletrofílica aromática entre fenol, nitroprussiato de sódio (NPS) e hidrocloreto de hidroxilamina (HL), em meio alcalino, conforme representado pela Equação 2. Em meio alcalino, o fenol é convertido a fenolato, o que torna o anel aromático mais reativo devido ao aumento da densidade eletrônica com par de elétrons adicional no oxigênio. Com a adição do grupo ao anel aromático, ocorre a formação do ânion complexo [Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>10</sub>]<sup>10-</sup>, de coloração verde e absorção molecular máxima em 715 nm. Logo, determinando-se a concentração de complexo formado é possível realizar a quantificação de fenol.



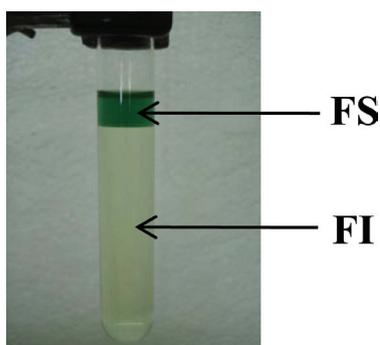
Este método apresenta vantagens em relação ao método padrão, como o não emprego de solventes orgânicos e, sob estas condições, oferece maior sensibilidade na análise. Entretanto, existem algumas limitações devido a não adequação do método para determinação de quantidades traço de fenóis (LOD = 50 µg kg<sup>-1</sup>) e, ainda, à interferência de algumas espécies como os ânions sulfato e fosfato.<sup>97,98</sup>

Com o objetivo de superar as limitações relacionadas por Kang *et al.*<sup>98</sup> para determinação de fenóis totais e substituir o procedimento utilizado no método padrão, uma nova estratégia foi proposta em 2010 por Rodrigues *et al.*<sup>99</sup> Neste trabalho, os autores propõem a utilização de sistemas aquosos bifásicos (SAB)<sup>100,101</sup> como técnica de extração líquido-líquido ambientalmente segura para posterior determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos. Os SAB podem ser formados pela mistura entre soluções aquosas de um eletrólito e de um polímero,<sup>102-104</sup> ou

de dois polímeros solúveis em água;<sup>105</sup> ou de dois tipos de sais,<sup>106</sup> sob determinadas condições termodinâmicas. O sistema resultante consiste em duas fases imiscíveis, com uma fase superior rica em polímero (ou rica em sal), e uma fase inferior rica em sal (ou rica em outro polímero ou sal). Além disso, o componente majoritário dos SAB é a água, o que elimina o uso de solventes orgânicos no processo de extração, atendendo a um dos princípios da química verde (Princípio 5).<sup>8</sup> Outras vantagens apresentadas pelos SAB são simplicidade; baixo custo; rápido processo de separação de fase e, possibilidade de reciclagem dos componentes do sistema, que em alguns casos são biodegradáveis (Princípios 6 e 7).<sup>3,8</sup>

No trabalho de Rodrigues *et al.*,<sup>99</sup> um SAB composto pelo polímero poli(óxido de etileno) massa molar média igual a 1500 g mol<sup>-1</sup> (PEO1500) + sal (Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KOH) + água foi utilizado como meio reacional, de extração e pré-concentração. O ânion decacianodiferrato ([Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>10</sub>]<sup>10-</sup>) formado a partir da reação entre fenol, NPS e HL (Equação 2) apresentou partição preferencial para a fase superior (FS) do sistema.

A Figura 6 mostra um SAB constituído por PEO1500+Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O, no qual foi realizada a reação entre NPS, HL e fenol contido em uma amostra de efluente do forno de coqueria. Pode-se observar que o ânion [Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>10</sub>]<sup>10-</sup> se concentra na fase superior do sistema (fase rica em polímero), fornecendo a esta uma coloração verde típica. O alto valor de coeficiente de partição do decacianodiferrato obtido ( $K = 66,2$ ) torna o método muito sensível para determinação espectrofotométrica de poluentes fenólicos em amostras de água. As figuras de mérito do método foram determinadas, apresentando faixa linear de 1,00 a 500 µg kg<sup>-1</sup>; LOD = 1,27 µg kg<sup>-1</sup>; LOQ = 4,22 µg kg<sup>-1</sup> e volume de resíduo gerado de 24,0 mL por amostra. Além disso, foi obtida recuperação variando de 95,7 a 107% para amostras de água (destilada, rio, estações de tratamento de água, água industrial e efluente de coqueria) sendo que o método proposto apresentou alta correlação com o método padrão (95% de confiabilidade, segundo o Teste-*t*). Estes resultados permitiram a aplicação do SAB para determinação de fenóis em água, de acordo com as exigências estabelecidas pela lei<sup>9,17</sup> e dentro dos princípios da química verde.<sup>8</sup>



**Figura 6.** Sistema aquoso bifásico (PEO1500 + Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + água) utilizado para determinação de fenol em água. FI: fase inferior (rica em sal e água) contendo a amostra com fenol; FS: fase superior (rica em polímero e água) contendo o ânion [Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>10</sub>]<sup>10-</sup> (coloração verde) concentrado

## CONCLUSÃO

Atualmente é alta a demanda em desenvolver métodos eficientes, economicamente viáveis e que atendam aos princípios da química verde para a determinação de poluentes fenólicos em matrizes aquosas, haja vista que estes compostos são considerados poluentes prioritários por órgãos de controle ambiental.

Devido a essa demanda, métodos analíticos que eram utilizados de maneira convencional, passaram por melhorias, com o objetivo de se tornarem “métodos limpos”. Assim, novos procedimentos foram

desenvolvidos, os quais empregam principalmente microextração em fase líquida (MEFL), microextração em fase sólida (MEFS), análise em fluxo, extração por ponto nuvem (EPN) e, mais recentemente, sistema aquoso bifásico (SAB).

MEFL e MEFS são usualmente aplicadas ao preparo de amostras para posterior determinação via CG ou CLAE, com diferentes sistemas de detecção. Este tipo de extração se encaixa dentro dos princípios da química verde devido principalmente ao baixo consumo (ou eliminação) de solventes orgânicos, quando comparado às técnicas convencionais de extração, como ELT e EFS.

O desenvolvimento de método empregando análise em fluxo para determinação de compostos fenólicos em água, em diferentes configurações, trouxe uma grande contribuição à química ambientalmente segura, devido principalmente, à mínima geração de resíduos, alta velocidade de análise e minimização (ou eliminação) da intervenção de analistas.

A técnica de EPN possibilita a determinação de fenóis em água utilizando como meio reacional uma solução de micelas, no interior das quais os analitos são concentrados. Esta característica oferece ao método alta sensibilidade. Além disso, o emprego de surfatantes substitui o uso de solventes orgânicos no processo de extração, o que está de acordo com os princípios da química verde.

Os SAB foram recentemente aplicados à determinação de poluentes fenólicos em água. Estes sistemas apresentam grande potencial como técnica de extração líquido-líquido, tanto do ponto de vista analítico como ambiental, pois o componente majoritário destes sistemas é água; os demais constituintes são recicláveis e/ou biodegradáveis; a técnica é simples, apresenta baixo custo e rápido processo de separação de fases.

Além disso, a análise em fluxo, EPN e SAB são aplicadas juntamente com detecção espectrofotométrica, com o objetivo de superar limitações apresentadas pelo método padrão de determinação de fenóis totais em água e diminuir os custos da análise em relação a CG ou CLAE.

## REFERÊNCIAS

- da Silva, F. M.; Lacerda, S. B.; Jones Junior, J.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 103.
- Zhu, L.; Ding, L.; Zhang, Q.; Wang, L.; Tang, F.; Liua, Q.; Yao, S.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 132.
- Rodrigues, G. D.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. D.; *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *62*, 687.
- Ni, J.; Yu, W.; He, L.; Sun, H.; Cao, Y.; He, H.; Fan, K.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 756.
- Desset, S. L.; Reader, S. W.; Cole-Hamilton, D. J.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 630.
- Temtem, M.; Pompeu, D.; Barroso, T.; Fernandes, J.; Simões, P. C.; Casimiro, T.; do Rego, A. M. B.; Aguiar-Ricardo, A.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 638.
- Sánchez, R.; Franco, J. M.; Delgado, M. A.; Valencia, C.; Gallegos, C.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 686.
- Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 123.
- U. S. Environmental Protection Agency; <http://www.epa.gov/greenchemistry>, acessada em Dezembro de 2009 e Junho 2010.
- Harnly, J. M.; Bhagwat, S.; Lin, L.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 47.
- Santana, C. M.; Ferrera, Z. S.; Padrón, M. E. T.; Rodríguez, J. J. S.; *Molecules* **2009**, *14*, 298.
- Nistor, C.; Emnéus, J.; *Waste Manage.* **1999**, *19*, 147.
- Kringstad, K. P.; Lindstrom, E.; *Sci. Technol.* **1984**, *18*, 236A.
- Puig, D.; Barceló, D.; *Trends Anal. Chem.* **1996**, *19*, 362.
- Nielson, A. H.; Allard, A. S.; Hynning, P. A.; Rememberger M.; *Toxicol. Environ. Chem.* **1991**, *30*, 3.

16. Ohlenbusch, G.; Kumke, M. U.; Frimmel, F. H.; *Sci. Total Environ.* **2000**, 253, 63.
17. Conselho Nacional do Meio Ambiente; <http://www.mma.gov.br/conama>, acessada em Dezembro de 2009 e Junho 2010.
18. Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D.; *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>th</sup> ed., American Public Health Association: Washington DC, 1999.
19. Sarnaik, S.; Kanekar, P.; *J. Appl. Microbiol.* **1995**, 79, 459.
20. Simões, N. G.; Cardoso, V. V.; Ferreira, E.; Benoliel, M. J.; Almeida, C. M. M.; *Chemosphere* **2007**, 68, 501.
21. Barreto-Rodrigues, M.; Aguiar, C. M.; Cunha, M. A. A.; *J. Hazard. Mater.* **2009**, 164, 1556.
22. Steevensz, A.; Al-Ansari, M. M.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; Biswas, N.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, 84, 761.
23. Ahmaruzzaman, M.; Sharma, D. K.; *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 287, 14.
24. Gutiérrez, J. M.; Gútes, A.; Céspedes, F.; del Valle, M.; Muñoz, R.; *Talanta* **2008**, 76, 373.
25. Khachatryan, K. S.; Smirnova, S. V.; Torocheshnikova, I. I.; Shvedene, N. V.; Formanovsky, A. A.; Pletnev, I. V.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 464.
26. El Mhammedi, M. A.; Achak, M.; Bakasse, M.; Chtaini, A.; *J. Hazard. Mater.* **2009**, 163, 323.
27. Korkut, S.; Keskinler, B.; Erhan, E.; *Talanta* **2008**, 76, 1147.
28. Kochana, J.; Gala, A.; Parczewski, A.; Adamski, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 1275.
29. Santos, W. J. R.; Lima, P. R.; Tarley, C. R. T.; Kubota, L. T.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 389, 1919.
30. Chen, X.; Zhang, T.; Liang, P.; Li, Y.; *Microchim. Acta* **2006**, 155, 415.
31. Estevinho, B. N.; Martins, I.; Ratola, N.; Alves, A.; Santos, L.; *J. Hazard. Mater.* **2007**, 143, 535.
32. Vichi, S.; Romero, A.; Tous, J.; Tamames, E. L.; Buxaderas, S.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1211, 1.
33. Oliveira, H. M.; Segundo, M. A.; Lima, J. L. F. C.; Cerdà, V.; *Talanta* **2009**, 77, 1466.
34. Bennett, B.; Bowler, B. F. J.; Larter, S. R.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3697.
35. Terashima, C.; Rao, T. N.; Sarada, B. V.; Tryk, D. A.; Fujishima, A.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 895.
36. Meyer, J.; Liesener, A.; Gtz, S.; Hayen, H.; Karst, U.; *Anal. Chem.* **2003**, 75, 922.
37. Wissiack, R.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 896, 159.
38. Schmidt, T. C.; Buetehorn, U.; Steinbach, K.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 926.
39. Hofmann, D.; Hartmann, F.; Herrmann, H.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 161.
40. Wei, W.; Yin, X. B.; He, X. W.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1202, 212.
41. Ding, Y.; Garcia, C. D.; *Analyst* **2006**, 131, 208.
42. Tsukagoshi, K.; Kameda, T.; Yamamoto, M.; Nakajima, R.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 978, 213.
43. Shaghghi, M.; Manzoori, J. L.; Jouyban, A.; *Food Chem.* **2006**, 108, 695.
44. Cao, W.; Mu, X.; Yang, J.; Shi, W.; Zheng, Y.; *Spectrochim. Acta Part A* **2007**, 66, 58.
45. Vuković, J.; Matsuoka, S.; Yoshimura, K.; Grdinić, V.; Grubešić, R. J.; *Microchim. Acta* **2007**, 159, 277.
46. Manera, M.; Miró, M.; Estela, J. M.; Cerdà, V.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 582, 41.
47. Lupetti, K. O.; Rocha, F. R. P.; Fatibello, O.; *Talanta* **2004**, 62, 463.
48. Oh, S. Y.; Ko, J. W.; Jeong, S. Y.; Hong, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1205, 117.
49. Gruz, J.; Novák, O.; Strnad, M.; *Food Chem.* **2008**, 111, 789.
50. Nagy, K.; Redeuil, K.; Bertholet, R.; Steiling, H.; Kussmann, M.; *Anal. Chem.* **2009**, 81, 6347.
51. da Silva, M. C. H.; da Silva L. H. M.; Paggioli, F. J.; *Anal. Sci.* **2005**, 21, 933.
52. Rodríguez, I.; Llompart, M. P.; Cela, R.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 885, 291.
53. Liu, H.; Dasgupta, P. K.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1817.
54. Nerín, C.; Salafraña, J.; Aznar, M.; Batlle, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 809.
55. Saraji, M.; Bakhshi, M.; *J. Chromatogr., A* **2005**, 1098, 30.
56. Fattahi, N.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; Jahromi, E. Z.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 1157, 23.
57. Fattahi, N.; Samadi, S.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 1169, 63.
58. Xu, H.; Yao, J.; Cheng, J.; Cui, Y.; Song, D.; Feng, Y.; *Chromatographia* **2008**, 68, 235.
59. Shi, Y.; Chen, M.; Muniraj, S.; Jen, J.; *J. Chromatogr., A* **2008**, 1207, 130.
60. Zhang, J.; Su, T.; Lee, H. K.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 1988.
61. Fu, S.; Li, F.; Chu, S. G.; Xu, X. B.; *Chromatographia* **2002**, 56, 69.
62. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145.
63. Alizadeh, N.; Zarabadipour, H.; Mohammadi, A.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 605, 159.
64. Budziak, D.; Martendal, E.; Carasek, E.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, 598, 254.
65. Jaber, F.; Schummer, C.; Al Chami, J.; Mirabel, P.; Millet, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 2527.
66. Santana, C. M.; Padrón, M. E. T.; Ferrera, Z. S.; Rodríguez, J. J. S.; *J. Chromatogr., A* **2007**, 1140, 13.
67. Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 160.
68. Lee, M.; Yeh, Y.; Hsiang W.; Hwang, B.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 806, 317.
69. Moeder, M.; Schrader, S.; Winkler, M.; Popp, P.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 873, 95.
70. Peñalver, A.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 953, 79.
71. Gonzalez-Toledo, E.; Prat, M.D.; Alpendurada, M.F.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 923,45.
72. Anastas, P. T.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1999**, 29, 167.
73. Rocha, F. R. P.; Nóbrega, J. A.; Fatibello, O.; *Green Chem.* **2001**, 3, 216.
74. Sheikheldin, S. Y.; Cardwell, T. J.; Cattrall, R. W.; de Castro, M. D. L.; Kolev, S. D.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, 419, 9.
75. Quaresma, M. C. B.; Cassella, R. J.; Carvalho, M. F. B.; Santelli, R. E.; *Microchim. J.* **2004**, 78, 35.
76. Vieira, I. C.; Fatibello, O.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, 111.
77. Frenzel, W.; Oleksy-Frenzel, J.; Mörlen, J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, 261, 253.
78. Goulden, P. D.; Brooksbank, P.; Day, M. B.; *Anal. Chem.* **1973**, 45, 2430.
79. Ródenas-Torralba, E.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 138.
80. Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Pinto, I. V. O. S.; *Analisis* **2000**, 28, 295.
81. Horstkotte, B.; Elsholz, O.; Martín, V. C.; *Talanta* **2008**, 76, 72.
82. Rama, M. J. R.; Medina, A. R.; Díaz, A. M.; *Microchim. Acta* **2003**, 141, 143.
83. Emerson, E.; *J. Org. Chem.* **1943**, 08, 417.
84. Mohler, E. F.; Jacob, L. N.; *Anal. Chem.* **1957**, 29, 1369.
85. Ochynski, F. W.; *Analyst* **1960**, 85, 278.
86. Watanabe, H.; Tanaka, H.; *Talanta* **1978**, 25, 585.
87. Frankewlcht; R. P.; Hinze, W. L.; *Anal. Chem.* **1994**, 66, 944.
88. Seronero, L. C.; Laespada, M. E. F.; Pavón, J. L. P.; Cordero, B. M.; *J. Chromatogr., A* **2000**, 897, 171.
89. Wu, Y.; Huang, S.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, 373, 197.
90. Filik, H.; Tavman, A.; *J. Anal. Chem.* **2007**, 62, 530.
91. Katsaounos, C. Z.; Paleologos, E. K.; Giokas, D. L.; Karayannis, M. I.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 83, 507.

92. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Moreno-Cordero, B.; Pérez-Pavón, J. L.; García-Pinto, C.; Laespada, E. F.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *902*, 251.
93. Szymczyk, K.; Ja czuk, B.; *Langmuir* **2009**, *25*, 4377.
94. Cui, X.; Mao, S.; Liu, M.; Yuan, H.; Du, Y.; *Langmuir* **2008**, *24*, 10771.
95. Zana, R.; *Colloids Surf., A* **1997**, *123-124*, 27.
96. Paleologos, E. K.; Giokas, D. L.; Karayannis, M. I.; *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 426.
97. Nagaraj, P.; Bhandari, J. M.; Achar, B. N.; *Indian J. Chem.* **1993**, *32A*, 641.
98. Kang, C.; Wang, Y.; Li, R.; Du, Y.; Li, J.; Zhang, B.; Zhou, L.; Du, Y.; *Microchem. J.* **2000**, *64*, 161.
99. Rodrigues, G. D.; de Lemos, L. R.; da Silva, L. H. M.; da Silva, M. D. H.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. D.; *Talanta* **2010**, *80*, 1139.
100. Hespanhol da Silva, M. D.; Mendes da Silva, L. H.; Paggioli, F. J.; Reis Coimbra, J. S.; Minim, L. A.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1332.
101. Mendes da Silva, L. H.; Loh, W.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1345.
102. Martins, J. P.; Carvalho, C. D.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. D.; da Silva, M. D. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A.; *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 238.
103. Rodrigues, G. D.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Teixeira, L. D.; Andrade, V. M.; *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 1894.
104. Martins, J. P.; Mageste, A. B.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Coimbra, J. S. D.; Minim, L. A.; *J. Chem. Eng. Data* **2009**, *54*, 2891.
105. Zeng, X.; Osseo-Asare, K.; *Colloids Surf., A* **2003**, *226*, 45.
106. Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D.; *Green Chem.* **2007**, *9*, 177.