



Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2013/06.13.16.45-NTC

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOLOGRAFIA IÔNICA

Adriana Faria Azevedo
Maurício Ribeiro Baldan
Neidenêi Gomes Ferreira

Nota Técnica

Projeto: 23038.236200/2008-34 -
CAPES.

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3EA4DHB>>

INPE
São José dos Campos
2013

PUBLICADO POR:

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE

Gabinete do Diretor (GB)

Serviço de Informação e Documentação (SID)

Caixa Postal 515 - CEP 12.245-970

São José dos Campos - SP - Brasil

Tel.:(012) 3208-6923/6921

Fax: (012) 3208-6919

E-mail: pubtc@sid.inpe.br

CONSELHO DE EDITORAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA PRODUÇÃO INTELLECTUAL DO INPE (RE/DIR-204):**Presidente:**

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Membros:

Dr. Antonio Fernando Bertachini de Almeida Prado - Coordenação Engenharia e Tecnologia Espacial (ETE)

Dr^a Inez Staciarini Batista - Coordenação Ciências Espaciais e Atmosféricas (CEA)

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação Observação da Terra (OBT)

Dr. Germano de Souza Kienbaum - Centro de Tecnologias Especiais (CTE)

Dr. Manoel Alonso Gan - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPT)

Dr^a Maria do Carmo de Andrade Nono - Conselho de Pós-Graduação

Dr. Plínio Carlos Alvalá - Centro de Ciência do Sistema Terrestre (CST)

BIBLIOTECA DIGITAL:

Dr. Gerald Jean Francis Banon - Coordenação de Observação da Terra (OBT)

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO DOCUMENTÁRIA:

Marciana Leite Ribeiro - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Yolanda Ribeiro da Silva Souza - Serviço de Informação e Documentação (SID)

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA:

Maria Tereza Smith de Brito - Serviço de Informação e Documentação (SID)

Luciana Manacero - Serviço de Informação e Documentação (SID)



Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



sid.inpe.br/mtc-m19/2013/06.13.16.45-NTC

PROTOCOLO DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SOLUÇÕES AQUOSAS POR CROMATOLOGRAFIA IÔNICA

Adriana Faria Azevedo
Maurício Ribeiro Baldan
Neidenêi Gomes Ferreira

Nota Técnica

Projeto: 23038.236200/2008-34 -
CAPES.

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/3EA4DHB>>

INPE
São José dos Campos
2013

RESUMO

O Laboratório de Eletroquímica e Materiais Carbonosos, que pertence ao Laboratório Associado de Sensores e Materiais do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, implementou a partir de 2009 facilidades para análise de amostras aquosas e desenvolvimento de tecnologias afins voltadas ao meio ambiente. Deste modo, este documento tem por objetivo protocolar a determinação de compostos fenólicos em soluções aquosas, oriundas das pesquisas ambientais desenvolvidas neste laboratório.

PROTOCOL FOR DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN AQUEOUS SOLUTIONS BY ION CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

The Laboratory of Electrochemistry and Carbon Materials, that belong to the Associate Laboratory of Sensors and Materials of the National Institute of Space Research, implemented since 2009 facilities for analysis of aqueous samples and development of technologies related to the environmental. Thus, this document aims to file the determination of phenolic compounds in aqueous solutions, derived from environmental research carried out in this laboratory.

LISTA DE FIGURAS

| | <u>Pág.</u> |
|---|--------------------|
| Figura 1.1 - Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método de determinação de compostos fenólicos..... | 2 |
| Figura 2.1 - Cromatógrafo de íons 850 Professional IC | 3 |
| Figura 2.2 - Célula eletroquímica para IC (Metrohm) | 4 |
| Figura 2.3 - Detector modelo 791 VA Detector (Metrohm).. .. | 5 |
| Figura 2.4 - Coluna de separação de compostos fenólicos (Protosil Enviro PHE 3 µm)..... | 5 |

LISTA DE TABELAS

| | <u>Pág.</u> |
|---|--------------------|
| Tabela 1.1 - Parâmetros cromatográficos para análise dos compostos fenólicos em meio aquoso | 1 |
| Tabela 1.2 - Tempos de retenção de cada analito | 2 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| INPE | Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais |
| LABEMAC | Laboratório de Eletroquímica e Materiais Carbonosos |
| LAS | Laboratório Associado de Sensores e Materiais |
| EPA | U.S. Environmental Protection Agency (EPA) |
| IC | Cromatografia Iônica (<i>Ion Chromatography</i> – IC) |
| LAQUATEC | Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|---|
| μL | Unidade de volume, microlitro |
| L | Unidade de volume, litro |
| min | Unidade de tempo, minutos |
| μm | Unidade de comprimento, micrometro |
| mm | Unidade de comprimento, milímetro |
| mM | Unidade de concentração, milimolar |
| MPa | Unidade de pressão, megaPascal |
| $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ | Unidade de fluxo, mililitros por minuto |
| $^{\circ}\text{C}$ | Unidade de temperatura, graus Celsius |
| μA | Unidade de corrente, microampere |
| KNO_3 | Nitrato de potássio |
| H_2SO_4 | Ácido sulfúrico |
| KCl | Cloreto de potássio |

SUMÁRIO

| | <u>Pág.</u> |
|--|--------------------|
| 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 1 |
| 2 MATERIAIS E EQUIPAMENTO..... | 3 |
| 3 REAGENTES E PADRÕES..... | 7 |
| 4 SEGURANÇA..... | 8 |
| 5 RESUMO DO MÉTODO..... | 9 |
| 5.1 Ligando e checando o sistema..... | 9 |
| 5.2 Troca e conexão da coluna..... | 9 |
| 5.3 Dados operacionais do Detector 791 VA..... | 10 |
| 5.4 Criando uma nova database e method..... | 10 |
| 5.5 Estabilizando o sistema..... | 10 |
| 5.6 Desligando o sistema..... | 11 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 12 |
| ANEXO 1. Procedimento para limpeza e montagem da célula eletroquímica...13 | |

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O método descrito neste protocolo foi baseado em diversos métodos desenvolvidos pela *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) para a determinação de compostos fenólicos em água potável (métodos 604, 625 e 528). Este método foi adaptado para atender às necessidades do LABEMAC. Os parâmetros relacionados à cromatografia iônica (*Ion Chromatography – IC*) descritos neste protocolo foram configurados pela empresa Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica para a análise de compostos fenólicos em meio aquoso com o objetivo principal de orientar os usuários do LABEMAC a respeito da determinação destes compostos por cromatografia iônica. Os parâmetros utilizados para o desenvolvimento deste método estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Parâmetros cromatográficos para análise dos compostos fenólicos em meio aquoso.

| | |
|------------------------------------|--|
| Volume (ou loop) de injeção | 10 µL |
| Tempo de análise | 25 minutos |
| Integração | Automática |
| Tipo de Coluna | Prontosil Enviro PHE 3 µm |
| Detector | 791 VA detector e interface 771 IC |
| Composição do Eluente (fase móvel) | 20 mM de KNO ₃ ; 0,5 mM de H ₂ SO ₄ , 30% do volume total de metanol; água deionizada |
| Fluxo | 0,800 ml.min ⁻¹ |
| Pressão | 15,6 MPa |
| Temperatura | 25,5 °C |

A Figura 1.1 mostra um exemplo de cromatograma adquiridos por este método para o fenol, 4-clorofenol e 3-ntitrofenol.

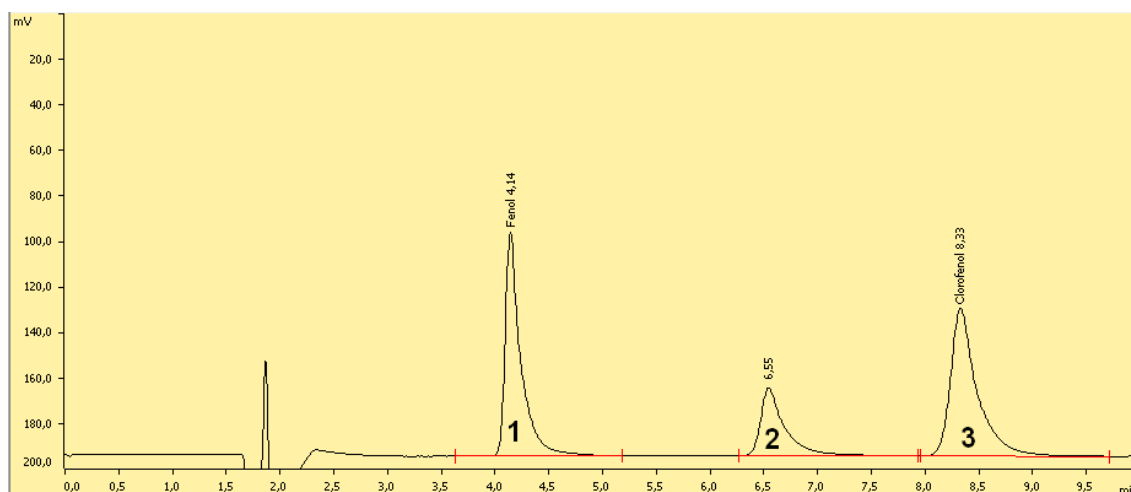


Figura 1.1 – Cromatograma obtido durante o desenvolvimento do método de determinação de compostos fenólicos.

Na Tabela 1.2 estão descritos os tempos de retenção obtidos para cada analito.

Tabela 1.2 – Tempos de retenção de cada analito

| Número do Pico | Tempo de Retenção (min) | Nome do componente |
|----------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | 4,14 | fenol |
| 2 | 6,55 | 3-nitrofenol |
| 3 | 8,33 | 4-clorofenol |

É recomendado que este método seja utilizado somente sob supervisão de analistas experientes em cromatografia iônica, principalmente no momento da interpretação dos resultados dos cromatogramas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico estará descrito os materiais e os equipamentos utilizados neste método.

Cromatógrafo de íons – Sistema analítico completo com o cromatógrafo de íons e todos os acessórios necessários, incluindo seringas, colunas analíticas e detector de condutividade. No Laboratório de Aerossóis, Soluções Aquosas e Tecnologias (LAQUATEC) está disponível o equipamento 850 Professional IC, da marca Metrohm, similar ao mostrado na Figura 2.1.



Figura 2.1 – Cromatógrafo de íons 850 Professional IC (Metrohm).

Os detalhes de funcionamento e operação deste equipamento estão descritos no documento *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011), disponível na Biblioteca Digital do INPE.

Célula eletroquímica para IC- célula fornecida junto com o 791 VA Detector da Metrohm, Figura 2.2. Contém um eletrodo de referência Ag/AgCl (6.0727.000 – designação da Metrohm) e um eletrodo de trabalho, que neste método é o eletrodo de ouro (6.1204.140 - designação da Metrohm).



Figura 2.2. Célula eletroquímica para IC (Metrohm).

Detector amperométrico – modelo 791 VA Detector (Figura 2.3). Este detector permite o uso de detecção eletroquímica/amperométrica nos equipamentos de IC ou HPLC (high performance liquid chromatography). Ele pode ser usado em série com outro detector ou sozinho. Para o seu uso é

necessário um equipamento chamado 771 IC Compact Interface que é a interface entre o sinal analógico e a informação digital.

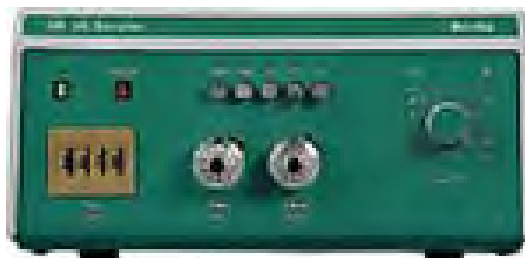


Figura 2.3. Detector modelo 791 VA Detector (Metrohm).

Coluna de separação de compostos fenólicos - ProntoSil Enviro PHE 3 μm (dimensão: comprimento x diâmetro interno = 125 x 4.6 mm), conforme mostrada na Figura 2.4. Esta coluna pode ser utilizada tanto em cromatógrafos de íons como em HPLC. Pode-se utilizar soluções com pH de 2 a 9. O armazenamento desta coluna deve ocorrer no próprio eluente ou água ultra-pura em temperatura ambiente. Não deixá-la armazenada por mais de 6 meses. Neste caso colocá-la apenas em uso com circulação do eluente ou água ultra-pura.



Figura 2.4 – Coluna de separação de compostos fenólicos (ProntoSil Enviro PHE 3 μm).

Software: O software Magic Net 2.0 é utilizado para a geração de todos os dados cromatográficos.

Materiais laboratoriais - Balança analítica: usada para pesar os reagentes para preparação do eluente e de soluções padrão; Seringas plásticas de 10 ml: usada para a filtragem e injeção das amostras; Membranas filtrantes: de acetato ou éster de celulose, 25 mm de diâmetro e 0,45 microns de tamanho de poro, para a pré-filtragem das amostras; Vidrarias em geral: como béqueres, balões volumétricos de fundo chato, bastão de vidro, etc., utilizados na preparação de soluções.

3 REAGENTES E PADRÕES

Neste tópico estará descrito os reagentes e padrões utilizados neste método.

Água reagente: utilizada na para preparação de eluentes, diluição de amostras e padrões, e lavar vidraria para a cromatografia de íons é necessário o uso de água de alta pureza. A água do tipo 1 pode ser considerada como “ideal”, ou seja, a água com a melhor qualidade possível de ser obtida com a tecnologia disponível atualmente para tratamento e purificação de água. Este tipo de água é utilizado em análises que requerem o mínimo de interferência e máximos de precisão e exatidão, preparações de soluções padrão e processos onde a presença de microrganismos de vê ser mínima. A água do tipo 1 deve ser utilizada no momento em que é produzida, não deve ser estocada, pois a sua resistividade diminui e também pode ocorrer a contaminação bacteriana (BREDA, 2001).

Solução eluente: a concentração desta solução eluente é 20 mM de KNO_3 ; 0,5 mM de H_2SO_4 , 30% do volume total de metanol; água deionizada. Esta solução é preparada da seguinte forma: dissolve-se 2,02 g de KNO_3 em 400 mL de água ultrapura. Em seguida, adiciona-se 26 μL de H_2SO_4 e 300 mL de metanol. Misture bem e coloque no ultrassom para a remoção de possíveis bolhas maiores contidas na solução. Finalmente, transfira quantitativamente para um balão de 1 L e complete com água ultra-pura.

Soluções padrão estoque, 1000 mg.L⁻¹: Soluções padrão estoque, podem ser compradas como soluções certificadas ou preparadas a partir de reagentes grau ACS.

4 SEGURANÇA

A toxicidade e a carcinogenicidade de cada reagente utilizado neste método não foi totalmente estabelecida. Cada reagente químico deve ser considerado como um risco em potencial para a saúde e a exposição ao mesmo deve ser tão baixa quanto possível. Os procedimentos a serem realizados devem ser os mesmos àqueles já conhecidos para reagente químicos extremamente perigosos.

O LAQUATEC dispõe de um documento que auxilia os usuários com relação a Segurança: *Protocolo de segurança do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011). Este documento está disponível para os usuários na Biblioteca Digital do INPE. Além disso, é responsabilidade do usuário fazer um levantamento de todo material reagente a ser utilizado durante as análises e suas fichas de segurança ou MSDS.

Neste protocolo, os seguintes materiais têm potencial altamente tóxico ou perigoso, e, portanto devem ser consultadas as MSDS:

- **Ácido Sulfúrico** – utilizado na preparação da solução do eluente. Manuseie o ácido sulfúrico com extremo cuidado porque ele é corrosivo para os tecidos do corpo. A inalação dos vapores pode causar severos danos aos pulmões. O contato com a pele ou olhos pode causar severas queimaduras.

- **Compostos fenólicos** – utilizados na preparação dos padrões para curva de calibração. São corrosivos e irritantes para as membranas mucosas. Potencialmente fatal se ingerido, inalado ou absorvido pela pele. Causa queimaduras severas e afeta o sistema nervoso central, fígado e rins.

5 RESUMO DO MÉTODO

Neste tópico estará descrito um resumo dos procedimentos que devem ser adotados ao realizar uma análise de compostos fenólicos usando CI.

5.1 Ligando e checando o sistema

- Checar o equipamento conforme descrito no item 4 do *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011);
- Ligar o estabilizador;
- Ligar o computador;
- Esperar a inicialização do Windows. Entrar no ícone “LAB”;
- Ligar o equipamento na parte de trás (perto do cabo de energia);
- Ligar o detector (791 VA DETECTOR) e a interface 771 IC (todos os botões de liga/desliga encontram-se na parte de trás dos equipamentos);
- Clicar duas vezes no ícone do software MAGIC NET.

5.2 Troca e conexão da coluna

- Efetuar o procedimento conforme descrito no item 7 do *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011), lembrando que a coluna de fenol não possui chip, nem pré-coluna, então a etapa: “Conectar a coluna e a pré-coluna a serem utilizadas sem conectar os capilares” não se aplica a esta coluna.
- Quando a coluna for usada pela 1ª vez, deve-se seguir os procedimentos para conexão contidos na “BULA” que vem dentro da caixa da mesma.

- Conexão da coluna - Conectar o **capilar A** na base da coluna e o **capilar C** no topo da coluna, lembrando que o sentido do fluxo é de baixo para cima (FLOW ↑).

5.3 Dados operacionais do Detector 791 VA

- Qualquer dúvida quanto ao procedimento olhar no **INSTRUCTIONS FOR USE (8.791.1003)** do detector que se encontra no armário embaixo do cromatógrafo IC
- Abra na página 2 do **INSTRUCTIONS FOR USE (8.791.1003)**. Nesta página tem a Fig. 1 (Front of the 791 VA detector). Para fenôis devem-se colocar os seguintes valores: (a) +120 no “digital switch” (n°11 da figura). Se for outra substância, olhar na pág. 15-16 do manual; (b) os botões n°9 e 10 deverão estar no zero; (c) o botão n°8 deverá ser posicionado em 0.5 μ A (range de corrente).
- Observação importante: qualquer problema que for detectado no equipamento durante a análise pode ser conferido se há uma solução nas páginas 32 e 33 do **INSTRUCTIONS FOR USE (8.791.1003)**. Caso não seja possível solucionar, entrar em contato com a assistência técnica da Metrohm.

5.4 Criando uma nova database e method

- Efetuar os procedimentos conforme descrito nos itens 8 ao 12 do *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC (FORTI; ALCAIDE, 2011)*.

5.5 Estabilizando o sistema

- Na plataforma “wokplace”, clicar na aba “equilibration”.
- Clicar em “start HW”. Uma linha de base será realizada na aba “live display”.

- A pressão de trabalho dessa coluna é em torno de 15 MPa (máxima 20 MPa) e o valor do Channel 1 fica em ~ 480 mV e Channel 2 em ~0.21mV. Caso o valor do canal 1 dê acima desse valor não há problema, desde que ele não ultrapasse 1200 mV e não esteja interferindo na detecção da amostra. Se algum destes problemas acontecerem seguir os passos do **ANEXO 1: Procedimento para limpeza e montagem da célula eletroquímica.**
- Apertar o botão **MEAS** do 791 VA detector. A luz referente ao overload pisca, mas tem que apagar em 5 segundos. Se não apagar, desaperte o botão MEAS e siga os passos do **ANEXO1: Procedimento para limpeza e montagem da célula eletroquímica.** Este problema pode estar relacionado com bolha dentro da célula eletroquímica, ou quando a amostra é muito concentrada ou quando o eletrodo de trabalho (WE) está empregnado.
- Na hora que dá overload aparece um pico no cromatograma que logo começa a cair. Espere estabilizar tudo por ~15 minutos.
- Estando tudo certo pode iniciar as medidas conforme descrito nos itens 14 e 15 do *Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias – LAQUATEC* (FORTI; ALCAIDE, 2011).

5.6 Desligando o sistema

- Acabando as injeções desligue o botão MEAS do 791 VA detector.
- Aperte o ícone STOP HW
- Feche o software *Magic Net*.
- Desligue os botões do detector, interface e do cromatógrafo.
- Desligue o computador e o estabilizador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREDA E.M. **Água grau reagente para laboratório e outros fins especiais.** Campinas: UNICAMP, 2001. 29 p. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_responde/%c1GUA%20GRAU%20REAGENTE.PDF>. Acesso em: 26 fev. 2013.

FORTI, M.C.; ALCAIDE, R.L.M. **Manual de procedimentos de cromatografia iônica do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 52 p. Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ77E>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

FORTI, M.C.; ALCAIDE, R.L.M. **Protocolo de segurança do laboratório de aerossóis, soluções aquosas e tecnologias - LAQUATEC.** São José dos Campos: INPE, 2011. v. 1, 37 p. Disponível em: <<http://urlib.net/8JMKD3MGP7W/39QJ5PL>>. Acesso em: 26 fev. 2013.

ANEXO 1. Procedimento para limpeza e montagem da célula eletroquímica

- Mais detalhes sobre essa etapa, bem como o layout da célula, você encontrará nas páginas 11 a 14 do manual do 791 VA Detector (**INSTRUCTIONS FOR USE – 8.791.1003**).
- Não pode ter bolha dentro da célula. Sempre complete o líquido dentro da mesma que é o KCl 3 mol.L⁻¹.
- O eletrodo de referência tem que ter uma tonalidade branca. Se estiver amarelo ou marron será necessário fazer o procedimento de regeneração. Neste caso, entrar em contato com o suporte técnico da Metrohm Pensalab. Este eletrodo também tem uma vedação (gasket) que pode ocasionar vazamento. Neste caso substituí-la.
- Apertar as conexões o suficiente para evitar vazamentos. Cuidado para não apertar demais.
- Se o eletrodo de trabalho estiver impregnado com algum material será necessário poli-lo. O polimento é feito com pó de alumina 0.3 µm (kit da Metrohm) no sentido 8 até ficar espelhado. Mais informações nas páginas 20 a 22 do manual do 791 VA Detector (**INSTRUCTIONS FOR USE – 8.791.1003**).
- Na hora que for montar a célula, o software Magic Net tem que estar na aba “*equilibration*”. O cromatógrafo CI não pode estar fazendo nenhuma análise.
- **Montando a célula.** Posição Wall-jet: o eluente deve entrar na célula na posição de frente para o eletrodo de trabalho (WE). Nesta etapa deve-se plugar o eletrodo de trabalho (WE) e o eletrodo auxiliar (AE).
- Na aba “*equilibration*”, clicar em start HW. Manter o local de entrada do eletrodo de referência para cima, de modo que a cavidade da célula comece a encher com o eluente. Começou a sair eluente por essa entrada, plugue o eletrodo de referência (RE) sem parar o sistema. Este procedimento é para minimizar a presença de bolhas dentro da célula. Neste momento, a pressão do sistema subirá até ~15 MPa. Confira

novamente se não há vazamento. A célula eletroquímica está pronta para uso.