

GUILHERME DIAS RODRIGUES

**UM MÉTODO VERDE E SENSÍVEL PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

GUILHERME DIAS RODRIGUES

**UM MÉTODO VERDE E SENSÍVEL PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS
EM AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2009.

Prof. Luis Henrique Mendes da Silva
(Coorientador)

Prof. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Prof^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de
Queiroz

Prof. Antônio Augusto Neves

Prof^a Maria do Carmo Hespanhol da Silva
(Orientadora)

*Dedico este trabalho aos meus
pais, irmão e à minha grande
companheira Vivianne.*

A grandeza não consiste em receber honras, mas sim, em merecê-las.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Deus e todas minhas fontes de fé, pela coragem.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela possibilidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Geraldo e Rozelene, pelo amor, criação, exemplo, preocupação, incentivo, enfim, por desempenharem com louvor a função de serem pais.

Ao irmão Rafael, pelos momentos agradáveis e engraçados nas raras horas de descanso. Valeu juju, menino de feira!

À Vivianne, pelo amor, companheirismo, paciência, dedicação que foram essenciais para a conquista de mais um objetivo.

À Nazaré, Celinho, Vivian e Vinícius, pela acolhida e amizade.

À toda minha família (vó, tias, tios, primas e primos), pela grande torcida, apoio e união.

À Carminha e ao Luis, aos quais me dou o direito de agradecer juntos. Agradeço pela orientação, confiança, oportunidade, investimento, amizade, mas acima de tudo por serem exemplos de profissionalismo e caráter, que certamente foi o que tornou possível a construção deste vínculo. Tenho certeza que essa constante busca por pesquisar e fazer ciência de forma digna renderá muitos bons frutos. Muito obrigado!

Ao professor Minim, pela coorientação durante meu mestrado.

Aos professores Marcone, Antônio Augusto e Maria Eliana, por aceitarem prontamente participar desta defesa.

Ao professor Edilton, pelas conversas e constante apoio.

Aos amigos que trabalharam neste projeto de pesquisa, Pâmela, Ériton e, em especial, ao amigo Leandro, um grande companheiro, parceiro e trabalhador. Valeu feião, você tem uma parcela muito importante neste trabalho!

Ao amigo Quintino, pela grande disponibilidade em ajudar na coleta de amostras. Garotinho, deixa comigo!

Aos companheiros do grupo Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), pelo convívio, respeito e colaboração.

Aos grandes amigos Aparecida, Leonel, Nathália, Igor, Tiago, Montanari, Lilian, Katalin, Juliana, pelos bons momentos e, em especial, ao Eder. Obrigado Nelsinho!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram, o meu eterno agradecimento!

BIOGRAFIA

Guilherme Dias Rodrigues, filho de Geraldo Rodrigues de Almeida e Rozelene Faria Dias Rodrigues Almeida, nasceu em 25 de setembro de 1985, na cidade de Ipatinga, Minas Gerais.

Em março de 2004 ingressou no curso de Química da Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se com o título de Licenciatura e Bacharelado em janeiro de 2008.

Foi bolsista do CNPq, no período de agosto de 2006 a julho de 2007, desenvolvendo trabalhos sob orientação da Prof^ª. Maria do Carmo Hespanhol da Silva do Departamento de Química da UFV.

Em março de 2008, iniciou o curso no Programa de Pós-graduação em Agroquímica, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
Capítulo 1: Revisão de Literatura	1
1. Introdução	1
1.1. Histórico.....	2
1.2. Sistemas Aquosos Bifásicos: Princípios e Propriedades.....	3
2. Referências Bibliográficas.....	8
Capítulo 2: Métodos verdes para determinação de fenóis em água	13
Resumo.....	13
Abstract	14
1. Introdução.	15
1.1. Química verde (QV): definição e princípios.....	15
1.2. Compostos fenólicos.....	16
2. Métodos analíticos ambientalmente seguros para determinação de fenóis em água.....	18
2.1. Microextração em Fase Líquida.....	19
2.2. Microextração em Fase Sólida.....	24
2.3. Espectrofotometria UV/Visível.....	28
2.3.1. Análise em Fluxo.....	30
2.3.2. Extração por Ponto Nuvem.....	31
2.3.3. Método espectrofotométrico para determinação de compostos fenólicos utilizando a reação entre fenol e nitroprussiato de sódio em meio aquoso.....	34
2.3.4. Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma alternativa de extração líquido-líquido ambientalmente segura para determinação	35

de fenóis.....	
3. Conclusão.....	37
Referências bibliográficas.....	38
Capítulo 3: A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two–phase system.....	46
Abstract.....	46
1. Introduction.....	47
2. Experimental.....	49
2.1. Apparatus.....	49
2.2. Chemicals.....	49
2.3. ATPS composition, solutions and standards.....	50
2.4. Procedure.....	51
2.5. Partitioning experiments.....	52
2.6. Environmental Samples.....	52
3. Results and Discussion.....	53
3.1. Chemical aspects.....	53
3.2. Optimization of method.....	54
3.3. Stability of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion in ATPS.....	55
3.4. Partition coefficients and effects of the tie–line length (TLL).....	56
3.5. Analytical figures of merit.....	59
3.6. Analysis of environmental samples.....	61
4. Conclusions.....	62
Acknowledgements.....	62
References.....	63
Anexo 1: Analytical curves used on the study of the effect of the ATPS electrolyte nature and TLL on the determination of phenol and <i>o</i>-cresol. Figures 3 and 4 (Artigo 2).....	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% (w/w) ou % (m/m) – Porcentagem massa/massa

C_P^I ou C_P^B – Composição de polímero na fase inferior

C_P^S ou C_P^T – Composição de polímero na fase superior

C_S^I ou C_S^B – Composição de sal na fase inferior

C_S^S ou C_S^T – Composição de sal na fase superior

2345TeCF – 2,3,4,5-tetraclorofenol

2346TeCF – 2,3,4,6-tetraclorofenol

234TCF – 2,3,4-triclorofenol

2356TeCF – 2,3,5,6-tetraclorofenol

235TCF – 2,3,5-triclorofenol

236TCF – 2,3,6-triclorofenol

23DCF – 2,3-diclorofenol

23DMF – 2,3-dimetilfenol

245TCF – 2,4,5-triclorofenol

246TBF – 2,4,6-tribromofenol

246TCF – 2,4,6-triclorofenol

246TMF – 2,4,6-trimetilfenol

24DCF – 2,4-diclorofenol

24DMF – 2,4-dimetilfenol

24DNF – 2,4-dinitrofenol

25DCF – 2,5-diclorofenol

25DNF – 2,5-dinitrofenol

26DCF – 2,6-diclorofenol

26DNF – 2,6-dinitrofenol

2CF – 2-clorofenol

2M3NF – 2-metil-3-nitrofenol

2M46DNF – 2-metil-4,6-dinitrofenol

2MF – 2-metilfenol

2NF – 2-nitrofenol

345TCF – 3,4,5-triclorofenol
34DCF – 3,4-diclorofenol
34DMF – 3,4-dimetilfenol
34DNF – 3,4-dinitrofenol
35DCF – 3,5-diclorofenol
3CF – 3-clorofenol
3M4NF – 3-metil-4-nitrofenol
3MF – 3-metilfenol
4AAP ou **4-AAP** – 4-aminoantipirina
4C2MF – 4-cloro-2-metilfenol
4C35DMF – 4-cloro-3,5-dimetilfenol
4C3MF – 4-cloro-3-metilfenol
4CF – 4-clorofenol
4M26DNF – 4-metil-2,6-dinitrofenol
4M2NF – 4-metil-2-nitrofenol
4MF – 4-metilfenol
4NF – 4-nitrofenol
5M2NF – 5-metil-2-nitrofenol
AFC – Análise em fluxo contínuo
AFSEG – Análise em fluxo segmentado
AIFMS – Análise por injeção em fluxo baseado em multisingas
AISEQ – Análise por injeção sequencial
CCRD – Delineamento Composto Central Rotacional
CFI – composição da fase inferior
CFS – composição da fase superior
CG ou **GC** – Cromatografia gasosa
CGL – Composição global
CLA ou **TLL** – Comprimento da linha de amarração
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CMC – Concentração micelar crítica
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CV – Coeficiente de variação
DAD – Detector com arranjo de diodos

DCE – Detector de captura de elétrons
DIC – Detector de ionização em chama
EAM UV/Vis ou **UV/Vis** – Espectrometria de absorção molecular UV/Visível
EC ou **CE**– Eletroforese capilar
EFS – Extração em fase sólida
ELT – Extração líquido-líquido tradicional
EM – Espectrômetro de massa
EPA – Environmental Protection Agency
EPN – Extração por ponto nuvem
F – Fenol
FA – Frequencia de amostragem
FI – Fase inferior
FIA – Análise por injeção em fluxo
FS – Fase superior
HL – Hidroclorato de hidroxilamina
K – Coeficiente de partição
LA – Linha de amarração
LB – Linha binodal
LC – Cromatografia líquida
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
MEFC – Microextração em fase líquida com fluxo contínuo
MEFL – Microextração em fase líquida
MEFS – Microextração em fase sólida
MEGU – Microextração com gota única
MELD – Microextração líquido-líquido dispersiva
MHS – Microextração com headspace
MMA – Ministério do Meio Ambiente
M_w – massa molar média
NPS – Nitroprussiato de sódio
P_c – Ponto crítico
PCF – Pentaclorofenol
PEO – Poli(óxido de etileno)

QV – Química verde

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta

SAB ou **ATPS**– Sistema(s) aquoso(s) bifásico(s)

SFMC – Sistema em fluxo baseado em multicomutação

VR – Volume de resíduo

w_p – Porcentagem massa/massa de polímero

w_s – Porcentagem massa/massa de polímero

WWTP – Estação de tratamento de água

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: Revisão de Literatura

- Figura 1** Parâmetros termodinâmicos para um ponto de mistura do sistema Poli(óxido de etileno), PEO, 1500 g mol^{-1} + sulfato de lítio + água , à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 4
- Figura 2** Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB constituído por polímero e sal..... 5
- Figura 3** Variação do volume das fases em função das diferentes composições globais do SAB..... 6

Capítulo 2: Métodos verdes para determinação de fenóis em água

- Figura 1** Configuração básica das etapas principais de um sistema de MEFL. Injeção da microgota de fase extratora (A); extração do analito (B); recolhimento da microgota para análise (C). Reimpressa da ref. 46, com autorização da © Springer..... 20
- Figura 2** Esquema do sistema de MEFC (A), descrito no trabalho desenvolvido por Chen et al., composto pelo recipiente com amostra (1), bomba peristáltica (2), injetor (3), e câmara de extração (4). Esta é detalhada em (B), com a seringa (5), recipiente de vidro (6), e microgota de solvente orgânico (7). Adaptada da ref. 29..... 21
- Figura 3** Esquema do sistema de MEFS, em modo de imersão direta e headspace. Reimpressa da ref. 46, com autorização da © Springer..... 25

- Figura 4** Esquema do sistema de MEFS com dessorção em meio micelar. (A) mostra contendo composto fenólico; (B) etapa de extração e pré-concentração; (C) dessorção do analito em meio micelar. Reimpressa da ref. 59, com autorização da © Elsevier..... 26
- Figura 5** Esquema do sistema utilizado para determinação de fenóis. V: válvulas solenóides de três vias; B: bobina de reação (80 cm); D: cela em fluxo de longo caminho (100 cm); C: carreador, água; S: amostra; R₁: 4AAP em tampão pH 10,0; R₂: K₃[Fe(CN)₆]; W: descarte. Reimpressa da ref. 43, com autorização da © Elsevier..... 31
- Figura 6** Tipos de agregados micelares formados em solução aquosa. Esfera (A); cilíndrica (B) hexágono de cilindros (C); estruturas em camadas (D)..... 33
- Figura 7** Ensaios de SAB aplicados para determinação de fenol em água. Amostra contendo fenol e com o ânion [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ concentrado na FS (A); branco com o ânion nitroprussiato concentrado na FS (B)..... 37

Capítulo 3: A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system

- Fig. 1** Absorption spectra of the [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ anion formed by the reaction system between NPS, HL and (—) phenol or (···) *o*-cresol, and (---) blank assay spectrum in the PEO1500/Li₂SO₄ aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) = 41.71 % (w/w)..... 54
- Fig. 2** Stability of the anion [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ formed by the reaction between NPS, HL and (■) phenol or (○) *o*-cresol in the PEO1500/Li₂SO₄ aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) = 41.71 % (w/w)..... 56

Fig. 3 Effect of tie-line length (TLL) and electrolytes on the (A) phenol and (B) *o*-cresol determination in an aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEO1500, salt and water: (■) Li₂SO₄, (○) K₂HPO₄ + KOH and (▲) Na₂SO₄..... 59

Anexo 1: Analytical curves used on the study of the effect of the ATPS electrolyte nature and TLL on the determination of phenol and *o*-cresol. Figure 3 (Capítulo 3).

Figure 1 Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEG1500 + Li₂SO₄ + H₂O. TLL = 29.43 (■); TLL = 34.97 (●); TLL = 41.71 (▲); TLL = 46.36 (▼); TLL = 51.67 (◆)..... 67

Figure 2 Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEG1500 + (K₂HPO₄ + KOH + H₂O. TLL = 16.61 (■); TLL = 27.06 (●); TLL = 30.09 (▲); TLL = 37.05 (▼); TLL = 42.80 (◆)..... 67

Figure 3 Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEG1500 + Na₂SO₄ + H₂O. TLL = 32.51 (■); TLL = 35.96 (●); TLL = 40.10 (▲)..... 68

Figure 4 Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEG1500 + Li₂SO₄ + H₂O. TLL = 29.43 (■); TLL = 34.97 (●); TLL = 41.71 (▲); TLL = 46.36 (▼); TLL = 51.67 (◆)..... 68

Figure 5 Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEG1500 + (K₂HPO₄ + KOH + H₂O. TLL = 16.61 (■); TLL = 27.06 (●); TLL = 30.09 (▲); TLL = 37.05 (▼); TLL = 42.80 (◆)..... 69

Figure 6 Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEG1500 + Na₂SO₄ + H₂O. TLL = 32.51 (■); TLL = 35.96 (●); TLL = 40.10 (▲)..... 69

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2: Métodos verdes para determinação de fenóis em água

Tabela 1	Fenóis incluídos na lista de poluentes prioritários. Adaptada da ref. 8.....	17
Tabela 2	Teores máximos de fenóis totais permitidos em água. Adaptada da ref. 16.....	18
Tabela 3	Sumário de alguns trabalhos relevantes aplicando MEFL para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas.....	23
Tabela 4	Sumário de alguns trabalhos relevantes aplicando MEFS para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas.....	27
Tabela 5	Trabalhos relevantes aplicando análise em fluxo para determinação de fenóis em água.	32

Capítulo 3: A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system

Table 1	Percent composition (w/w) for PEO1500 (w_P), salt (w_S) and water aqueous two-phase system (ATPS) at 25.0 °C.....	51
Table 2	System optimization for the proposed aqueous two-phase system (ATPS) method using a standard of 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ phenol in the bottom phase.....	55
Table 3	Partition coefficient values of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex for different aqueous two-phase system (ATPS) with different tie-line lengths (TLLs).....	57

Table 4	Analytical features of different UV/visible spectrophotometric procedures for phenols determination.....	60
Table 5	Recovery of phenol and <i>o</i> -cresol in water samples ($n = 3$).....	61

RESUMO

RODRIGUES, Guilherme Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Um método verde e sensível para determinação de fenóis em amostras de água utilizando sistemas aquosos bifásicos.** Orientadora: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Coorientadores: Luis Henrique Mendes da Silva e Luis Antonio Minim.

Este trabalho apresenta, inicialmente, uma breve revisão sobre sistemas aquosos bifásicos (SAB), incluindo o histórico, princípios e propriedades da técnica. Além disso, uma divulgação sobre métodos verdes para determinação de fenóis em água é apresentada, uma vez que estas substâncias apresentam alto grau de toxicidade. O descarte de compostos fenólicos no ambiente é regulamentado em vários países, inclusive no Brasil, através da resolução CONAMA nº 357 (17 de Março de 2005). Associado a este aspecto, existe uma grande procura por “métodos limpos”, isto é, procedimentos que estejam de acordo com os princípios da Química Verde, que incluem: microextração em fase líquida, microextração em fase sólida, análise em fluxo, extração por ponto nuvem e sistemas aquosos bifásicos. Foi desenvolvido neste trabalho um procedimento sensível e ambientalmente seguro para determinação de fenol e *o*-cresol em amostras de água, utilizando SAB (PEO1500 + sal + água). O método é baseado na reação entre fenol, nitroprussiato de sódio (NPS) e hidrocloreto de hidroxilamina (HL) em meio alcalino, produzindo o ânion complexo $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$, que apresenta concentração preferencial na fase superior do sistema. O método apresentou os seguintes parâmetros analíticos: faixa linear de 1,00 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, coeficiente de variação igual a 0,38 e 0,30 %, limite de detecção de 1,27 e 1,88 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e limite de quantificação de 4,22 e 6,28 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para fenol e *o*-cresol, respectivamente. Recuperações entre 95,7 e 107% foram obtidas para amostras de água. Além disso, o método proposto apresentou excelente concordância com o método padrão de análise.

ABSTRACT

RODRIGUES, Guilherme Dias, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2009. **A greener and sensitive method for phenols determination in water samples using aqueous two-phase systems.** Adviser: Maria do Carmo Hespanhol da Silva. Co-Advisers: Luis Henrique Mendes da Silva and Luis Antonio Minim.

This work initially presents a brief review of aqueous two-phase systems (ATPS), including the history, principles and properties of the technique. Furthermore, a divulgation on green methods for determination of phenols in water is shown, since these substances have high toxicity. The disposal of phenolic compounds is regulated in several countries, including Brazil, through the resolution CONAMA n° 357 (March 17, 2005) and, associated with this, there is a constant search for “environmental safe methods” which are according to the principles of Green Chemistry, such as: liquid phase microextraction, solid phase microextraction, flow analysis, cloud point extraction and aqueous two-phase. In this work a greener and sensitive procedure for the determination of phenol and *o*-cresol in water samples, exploiting ATPS (PEG1500 + salt + water) was developed. The method is based on the reaction among phenol, sodium nitroprusside and hydroxylamine hydrochloride in alkaline medium, producing the complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ which concentrates in the top phase of the system. The method shows the following analytical features: linear range of 1.00 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, coefficient of variation equal 0.38 and 0.30 %, limit of detection of 1.27 and 1.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and limit of quantification of 4.22 and 6.28 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for phenol and *o*-cresol, respectively. Recoveries within 95.7 to 107 % were obtained for water samples. Besides, excellent agreement between the proposed method and the standard method was observed.

Capítulo 1

Revisão de Literatura

1. Introdução

Nos últimos anos, devido ao impacto ambiental negativo gerado pelo grande crescimento industrial e populacional, as regulamentações ambientais tornaram-se mais rígidas. Além disso, esforços têm sido realizados no sentido de minimizar o descarte de resíduos nocivos à saúde humana e ao ambiente. Devido a essa demanda, é crescente o número de pesquisas acadêmicas e industriais voltadas para o desenvolvimento de novos métodos, que sejam sensíveis, menos poluentes, mais seguros, eficientes e ainda economicamente viáveis [1].

Uma das técnicas largamente aplicadas à separação e/ou ao tratamento de resíduos em indústrias é a extração líquido-líquido tradicional (ELT), pois permite que um grande número de diferentes solventes e agentes extratantes sejam utilizados. Isto possibilita que uma extensa variedade de analitos sejam separados [2]. Entretanto, a ELT é uma técnica que emprega solventes orgânicos, que normalmente são tóxicos, cancerígenos e/ou inflamáveis [3].

Uma técnica de extração que vem sendo apresentada na literatura [4,5] como alternativa ambientalmente segura à ELT são os sistemas aquosos bifásicos (SAB). Estes sistemas têm como componente majoritário a água, o que, associado ao fato dos demais componentes não serem tóxicos nem inflamáveis, e em alguns casos, biodegradáveis, justifica o enquadramento dos SAB às novas perspectivas ambientais da química, norteadas pelos princípios da Química Verde [6]. Além disso, esses componentes são comercialmente acessíveis e de baixo custo.

Os sistemas que apresentam regiões com diferentes propriedades termodinâmicas intensivas, denominadas de fases, tem recebido grande atenção por parte das indústrias e dos grandes centros de pesquisa em função das suas aplicabilidades em processos de extração, purificação e pré-concentração de diversos analitos. Um soluto ao ser adicionado em um sistema constituído por duas fases ou mais, se transfere preferencialmente para uma das fases. Tal transferência é dependente de propriedades físico-químicas, tais como temperatura, pH, composição do sistema, dentre outras [7].

1.1. Histórico

O SAB foi descoberto, em 1896, por Beijerinck [8,9], que ao misturar soluções aquosas de gelatina com agar ou gelatina e amido solúvel, percebeu que o sistema resultante apresentava uma turbidez característica e, deixando-o em repouso por algum tempo, ocorria a formação de duas fases espontaneamente. Além disso, constatou que a fase superior era rica em gelatina e a fase inferior enriquecida por ágar (ou amido), sendo que a água era o componente majoritário nas duas fases. Em estudos complementares, Ostwald e Hertel [10,11] constataram que amidos com diferentes frações de amilose e amilopectina, produziam diferentes diagramas de fase. Esta descoberta permitiu concluir que pequenas variações nas interações moleculares têm grande influência sobre as composições das fases em equilíbrio. No final da década de 40, Dobry e Boyer-Kawenoki [12,13], na tentativa de verificar uma possível generalidade do fenômeno de separação de fases, realizaram um estudo sobre a miscibilidade de um grande número de diferentes pares de polímeros, dissolvidos em solventes orgânicos ou em solução aquosa. Os autores observaram que dos 35 pares de

macromoléculas estudados, apenas quatro não resultaram na formação das duas fases. Fato que levou à conclusão de que a incompatibilidade de polímeros é um fenômeno geral.

Somente em 1956, Albertsson [14] evidenciou a grande potencialidade dos SAB aplicando estes sistemas na partição de células e fragmentos de células. Já os primeiros estudos de extração de íons metálicos só se deram no final da década de 1980 com os trabalhos de Zvarova et al. [15] que estudou o comportamento de íons metálicos na presença de agentes extratores solúveis em água. Desde então, os sistemas aquosos bifásicos foram largamente aplicados na separação, purificação e, ou pré-concentração de diversos tipos de solutos como organelas celulares, [16,17] proteínas [18], membranas [19], DNA [20], anticorpos [21], nanopartículas [22], corantes [23], e íons [5,24-28].

1.2. Sistemas Aquosos Bifásicos: Princípios e Propriedades

Os SAB são formados, sob condições termodinâmicas específicas (temperatura, pressão e concentração) [6], a partir da mistura entre soluções aquosas de dois polímeros [29], um polímero e um eletrólito [30], ou dois tipos de sais [31] quimicamente incompatíveis. O processo de separação de fases resulta em um sistema heterogêneo composto por duas fases imiscíveis, sendo a fase superior (FS), rica em polímero, e a fase inferior (FI), rica em sal. Além disso, ambas as fases possuem grande quantidade de água, conforme apresentado pela Figura 1.

Essa natureza bifásica oferece várias vantagens na utilização dos SAB como técnica de separação, como: (i) ambiente adequado para preservação da atividade biológica de solutos [32,33]; (ii) baixa tensão interfacial, o que beneficia o processo de

migração pela interface [34]; e (iii) possibilidade de aplicação em larga escala [35].

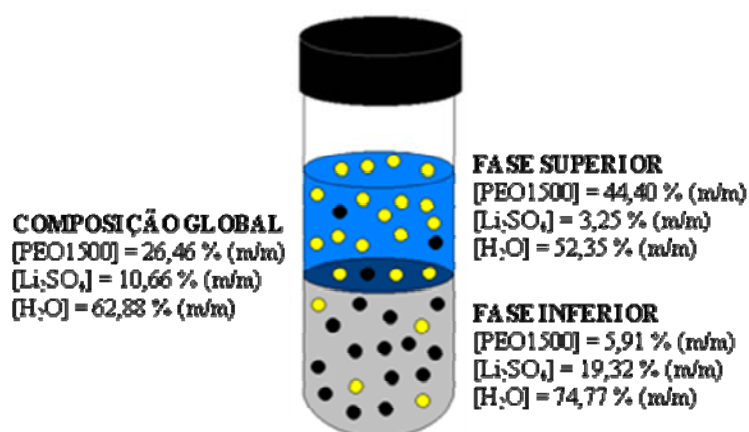


Figura 1. Parâmetros termodinâmicos para um ponto de mistura do sistema Poli(óxido de etileno), PEO, 1500 g mol⁻¹ + sulfato de lítio + água , à 25 °C. [30]

A composição química das duas fases em equilíbrio termodinâmico é geralmente representada por meio de um diagrama de fases. Este, por sua vez, pode ser apresentado graficamente de forma triangular ou retangular, como mostra a Figura 2, que apresenta um SAB formado por um polímero e um sal inorgânico. Nos diagramas retangulares, a concentração de sal do sistema se encontra no eixo das abscissas e a concentração do polímero, no eixo das ordenadas. Estas concentrações geralmente são dadas em porcentagem mássica, % (m/m).

Nestes diagramas encontram-se informações fundamentais para o entendimento e aplicação dos SAB, tais como, as composições globais (CGL) nas quais irão gerar sistemas com uma ou duas fases, a composição da fase superior (CFS) e composição da fase inferior (CFI). A linha binodal (LB) corresponde as mínimas composições de equilíbrio nas quais, o sistema se apresenta com duas fases, e sua posição no diagrama pode variar com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade e a massa molar média do polímero, natureza química do sal, temperatura, pressão e pH do meio [36]. Existem diferentes métodos para a obtenção da linha binodal, entretanto o mais utilizado envolve titulação turbidimétrica e análise das composições das fases [29].

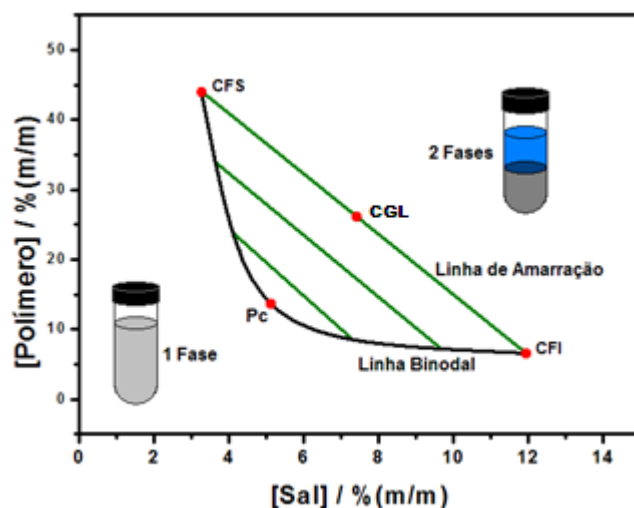


Figura 2. Diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB constituído por polímero e sal.

Além disso, a Figura 2 representa as linhas de amarração (LA), que são retas que ligam os pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico. Ao longo de uma mesma LA, em qualquer composição global, todas as propriedades termodinâmicas intensivas (índice de refração, condutividade, densidade, composição, etc.) de cada fase são constantes, enquanto as propriedades termodinâmicas extensivas (volume, capacidade calorífica, massa, etc.) variam. Por exemplo, na Figura 3, os pontos de composição global A, B e C terão uma mesma composição de fase superior, identificada pelo ponto CFS, e uma mesma composição de fase inferior, dada por CFI. Em compensação, os volumes das fases serão diferentes em cada um destes pontos. Deste modo, à medida que se desloca em cima de uma linha de amarração, em direção a parte inferior do diagrama, por exemplo, obtêm-se composições globais que formarão SAB com maior volume de fase inferior. Em contrapartida, quando se desloca em direção a parte superior do diagrama, ocorre o inverso, obtêm-se sistemas com maior volume de fase superior.

O ponto D (Figura 3) representa uma composição global que pertence a uma LA com comprimento menor que a linha de amarração que contém o ponto B, isto significa

que a diferença entre as propriedades termodinâmicas das fases do sistema com composição global D são menores do que aquelas apresentadas entre as fases dos sistemas com composições globais A, B ou C. A diminuição sucessiva nos comprimentos das linhas de amarração (CLA) leva de encontro ao ponto crítico (Pc). À medida que as composições das duas fases do sistema aproximam deste ponto, a diferença entre as propriedades termodinâmicas dessas fases diminuem até que teoricamente, tornam-se iguais.

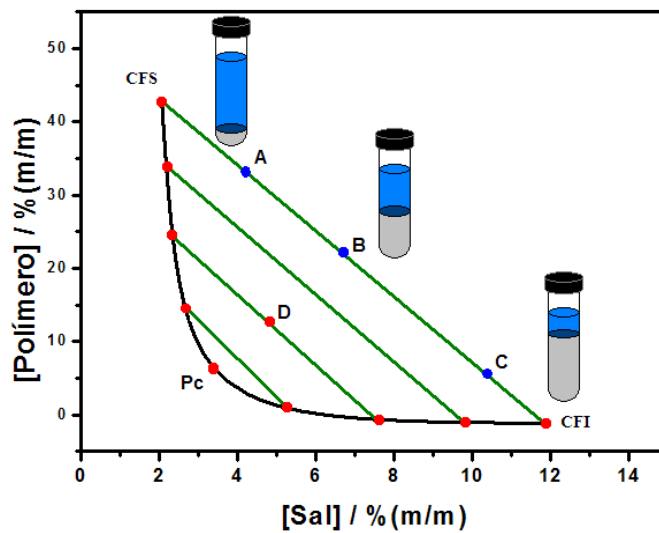


Figura 3. Variação do volume das fases em função das diferentes composições globais do SAB.

Deste modo o comprimento da linha de amarração é um importante parâmetro termodinâmico utilizado para medir a diferença entre as propriedades intensivas das fases em equilíbrio. Este parâmetro é calculado a partir dos valores de composição dos solutos de cada fase, de acordo com a Equação 1:

$$CLA = [(C_P^S - C_P^I)^2 + (C_S^S - C_S^I)^2]^{1/2} \quad (1)$$

onde C_p^s e C_p^i são as concentrações de copolímero e C_s^s e C_s^i são as concentrações do sal % (m/m) nas fases superior e inferior, respectivamente. Ou seja, quanto maior o valor de CLA, mais distintas são as propriedades termodinâmicas intensivas entre as duas fases, o que ocasiona um incremento do coeficiente de partição (K) de um analito, desde que esse apresente migração preferencial para uma das fases ($K \neq 1$).

2. Referências Bibliográficas

- [1] The future Begins with Mining- A Vision of the Mining Industry of the Future. The National Mining Association, **1998**.
- [2] Rydberg, J.; Musikas, C.; Choppin, G. R. Principles and Practices of Solvent Extraction. Marcel Dekker, New York, **1992**.
- [3] da Silva, M. C. H.; da Silva L. H. M.; Paggioli, F. J. A Novel Micellar Medium Using Triblock Copolymer for Cobalt Determination. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 933-937.
- [4] da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Paggioli, F. J.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Sistema aquoso bifásico: Uma alternativa eficiente para extração de íons. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1332-1339.
- [5] da Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Júnior, J. A.; Guimarães, R. O.; Martins, J. P. Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Mixture of Triblock Copolymers L35 and F68 with Na₂SO₄, Li₂SO₄, or MgSO₄. *J. Chem. Eng. Data* **2006**, *51*, 2260-2264.
- [6] Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. “Green Chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 123-129.
- [7] Moteiro Filho, E. S. Equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos poliméricos. **2001**, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Dissertação de Mestrado.
- [8] Beijerinck, M. W. Ueber eine eigentümlichkeit der löslichen stärke. *Zbl. Bakt. II Natur.* **1896**, *627*, 697-699.
- [9] Beijerinck, M. W. Ueber Emulsionsbildung bei der vermischung wässriger lösungen gewisser gelatinierender kolloide. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1910**, *7*, 16-20.

- [10] Ostwald, W.; Hertel, R. H. Kolloidchemische reaktionen zwischen solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. I. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, *47*, 258-268.
- [11] Ostwald, W.; Hertel, R. H. Kolloidchemische reaktionen zwischen solen von Eiweißkörpern und polymeren Kohlehydraten. II. *Kolloid Z. Z. Polym.* **1929**, *47*, 357-370.
- [12] Dobry, A.; Boyer-Kawenoki, F. J. Phase separation in polymer solution. *Polym. Sci.* **1947**, *2*, 90-100.
- [13] Dobry, A. Sur lincompatibilite des macromolecules en solution. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1948**, *57*, 280-285.
- [14] Albertsson, P. A. Chromatography and Partition of Cells and Cell Fragments. *Nature* **1956**, *177*, 771-774.
- [15] Zvarova, T. I.; Shkinev, V. M.; Vorob'eva, G. A.; Spivakov, B. Ya.; Zolotov, Yu. A. Liquid-liquid extraction in the absence of usual organic solvents: Application of two-phase aqueous systems based on a water-soluble polymer. *Microchim. Acta* **1984**, *84*, 449-458.
- [16] Banik, R. M.; Santhiagu, A.; Kanari, B.; Sabarinath, C.; Upadhyay, S. N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *19*, 337-348.
- [17] Santesson, S.; Ramirez, I. B. R.; Viberg, P.; Jergil, B.; Nilsson, S. Affinity two-phase partitioning in acoustically levitated drops. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 303-308.
- [18] Haghtalab, A.; Mokhtarani, B.; Maurer, G. Experimental results and thermodynamic modeling of the partitioning of lysozyme, bovine serum albumin, and α -amylase in aqueous two-phase systems of PEG and (K_2HPO_4 or Na_2SO_4). *J. Chem. Eng. Data* **2003**, *48*, 1170-1177.

- [19] Everberg, H.; Clough, J.; Henderson, P.; Jergil, B.; Tjerneld, F.; Ramirez, I. B. R. Isolation of *Escherichia coli* inner membranes by metal affinity two-phase partitioning. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1118*, 244-252.
- [20] Frerix, A.; Schonewald, M.; Geilenkirchen, P.; Muller, M.; Kula, M. R.; Hubbuch, J. Exploitation of the Coil-Globule Plasmid DNA Transition Induced by Small Changes in Temperature, pH Salt, and Poly(ethylene glycol) Compositions for Directed Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *Langmuir* **2006**, *22*, 4282-4290.
- [21] Azevedo, A. M.; Gomes, A. G.; Rosa, P. A. J.; Ferreira, I. F.; Pisco, A. M. M. O.; Aires-Barros, M. R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* **2009**, *65*, 14-21.
- [22] Alejandro, N.; T. C. Ling; Lyddiatt, A. Aqueous two-phase recovery of bio-nanoparticles: A miniaturization study for the recovery of bacteriophage T4. *J. Chromatogr. B* **2007**, *854*, 13-19.
- [23] Akama, Y.; Tong, A.; Ito, M.; Tanka, S. The study of the partitioning mechanism of methyl orange in an aqueous two-phase system. *Talanta* **1999**, *48*, 1133-1137.
- (24) da Silva, L. H. M.; da Silva, M.C.H.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. PEO-[M(CN)₅NO]^{x-} (M = Fe, Mn or Cr) Interaction as Driving Force in the Partitioning of the Pentacyanonitrosylmetallate Anion in ATPS: The Strong Effect of the Central Atom. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 11669-11678.
- (25) da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; de Aquino, R. A. N.; Francisco, K. R.; Cardoso, M. V. C.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as driving force for partitioning of the [Fe(CN)₅NO]²⁻ anion in aqueous two-phase systems formed by poly(ethylene oxide) and sulfate salts. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 23540-23546.

(26) da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Júnior, J. A.; Martins, J. P.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Hydrophobic effect on the partitioning of $[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]^{2-}$ and $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ anions in aqueous two-phase systems formed by triblock copolymers and phosphate salts. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *60*, 103-112.

[27] Rogers, R. D.; Willauer, H. D.; Griffin, S. T.; Huddleston, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic system. *J. Chromatogr. B* **1998**, *711*, 255-266.

[28] Rodrigues, G. D.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Paggiolli, F. J.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *62*, 687-693.

[29] Zaslavsky, B. Y. *Aqueous Two-Phase Partitioning, Physical Chemistry and Bio-analytical Applications*. Marcel Dekker, New York, **1995**.

[30] Martins, J. P.; Carvalho, P. C.; da Silva, L. H. M., Coimbra, J. S. R., da Silva, M. C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. *J. Chem Eng. Data* **2008**, *53*, 238-241.

[31] Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt-salt ABS). *Green Chem.* **2007**, *9*, 177-183.

[32] Haraguchi, L. H.; Mohamed, R. S.; Loh, W.; Pessoa Filho, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibr.* **2004**, *215*, 1-15.

[33] Oliveira, M. C.; Abreu Filho, M. A. N.; Pessoa Filho, P. A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 311-318.

[34] Albertsson, P. A. *Partition of Cells, Particles and Macromolecules*, 3rd ed., Wiley Interscience, New York, **1986**.

[35] Kula, M. R.; Kroner, K. H.; Husted, H.; Schütte, H. Technical aspects of extractive enzyme purification. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1981**, *369*, 341-354.

[36] da Silva, L. H. M.; da Silva, M. C. H.; Mesquita, A. F.; Nascimento, K. S.; Coimbra, J. S. R.; Minim, L. A. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + salt + water two-phase systems at different temperatures and pH, *J. Chem. Eng. Data* **2005**, *50*, 1457-1461.

Capítulo 2

Métodos verdes para determinação de fenóis em água

Resumo

A disponibilidade restrita de fontes de água própria para o consumo e os elevados custos para a obtenção de água potável tem causado um aumento da consciência sobre sua utilização e monitoramento. Assim, existe uma grande procura por “métodos limpos”, isto é, procedimentos que estejam de acordo com os princípios da *Química Verde*. Além disso, essas metodologias devem ser capazes de fornecer resultados confiáveis para a análise da qualidade da água para diversos poluentes, tais como compostos fenólicos. Fenol e seus derivados são espécies que estão incluídas na lista de poluentes prioritários em diversos países e, as legislações ambientais estabelecem um limite máximo de fenóis totais em águas utilizadas para consumo humano de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Neste trabalho, serão apresentados métodos ambientalmente seguros para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas empregando diversas técnicas analíticas, que incluem: microextração em fase líquida, microextração em fase sólida, análise em fluxo, extração por ponto nuvem e sistemas aquosos bifásicos.

Palavras-chave: fenóis; química verde; água; microextração em fase líquida; microextração em fase sólida; análise em fluxo, extração por ponto nuvem; sistemas aquosos bifásicos.

Abstract

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 and monitoring of water. Thus, there is a high demand for "environmental safe methods" which are according to the principles of Green Chemistry. Moreover, these methodologies should be able to provide reliable results for the analysis of water quality for various pollutants, such as phenolic compounds. Phenol and its derivatives are species included in the list of priority pollutants in many countries, and environmental legislations establish a limit of $3 \mu\text{g L}^{-1}$ of total phenols in waters used for human consumption. In this work, greener methods for determination of phenolic compounds in aqueous matrices are presented, using several analytical techniques, which include: liquid phase microextraction, solid phase microextraction, flow analysis, cloud point extraction and aqueous two-phase systems.

Keywords: phenols, green chemistry, water, liquid phase microextraction, solid phase microextraction, flow analysis, cloud point extraction and aqueous two-phase systems.

1. Introdução

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

Inevitavelmente, essa demanda teve influência decisiva na Química. Pesquisadores têm buscado, cada vez mais, desenvolver novos métodos,^{2,3} elaborar novas sínteses,^{4,5} criar novas ferramentas,^{6,7} 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.

1.1. 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 aplicação de produtos e processos químicos com o objetivo de reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente.¹ A partir disso,

iniciou-se o desenvolvimento de diversas pesquisas com o objetivo de desenvolver metodologias ambientalmente seguras.

Um dos principais alvos dos estudos envolvendo química verde e da preocupação ambiental é o monitoramento da qualidade de águas, haja vista o fundamental papel 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, que inclui estabelecimento de normas e fiscalização, diversas agências de controle ambientais foram criadas. Dentre elas, destacam-se a *Environmental Protection Agency* (EPA) que, atualmente, é o principal órgão 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,⁸ na qual estão listadas as substâncias mais nocivas à saúde humana e ao ambiente, que incluem: (i) metais (*e.g.*, Sb, Cu, Pb, Zn, Cd, Cr, Ni, Hg, etc.); (ii) agrotóxicos (*e.g.*, DDT); e outras espécies, como CN⁻, benzeno, clorofórmio, etc.. Além disso, esta lista inclui uma classe muito importante de poluente e, que tem sido alvo de pesquisas acadêmicas,⁹⁻¹¹ que são os compostos fenólicos.

1.2. Compostos fenólicos

Fenol e seus derivados são substâncias encontradas em diversos processos industriais. Essas substâncias causam uma constante preocupação do ponto de vista ambiental,¹² devido ao alto grau de toxicidade, bioacumulação nas diferentes cadeias alimentares, mesmo em baixas concentrações e persistência no ambiente.¹³⁻¹⁵ A Tabela 1 apresenta os fenóis incluídos na lista de poluente prioritários. Os 20 compostos

fenólicos presentes nesta lista se dividem em 4 grupos principais, além do próprio fenol: (i) clorofenóis; (ii) metilfenóis (cresóis); (iii) nitrofenóis; e (iv) 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. 8

Grupo	Compostos Fenólicos
Fenol	Fenol
Clorofenóis	2-clorofenol; 2,4-diclorofenol; 2,6-diclorofenol; 2,4,5-triclorofenol; 2,4,6-triclorofenol; 2,3,4,5-tetraclorofenol; 2,3,4,6-tetraclorofenol; 2,3,5,6-tetraclorofenol; pentaclorofenol
Cresóis	2-metilfenol; 3-metilfenol; 4-metilfenol; 2,4-dimetilfenol
Nitrofenóis	2-nitrofenol; 4-nitrofenol; 2,4-dinitrofenol
Outros	4-cloro-3-metilfenol; 2-metil-4,6-dinitrofenol; 2-cilcoexil-4,6-dinitrofenol; 2- <i>sec</i> -butil-4,6-dinitrofenol (Dinoseb)

A resolução CONAMA, número 357, de 17 de Março de 2005,¹⁶ 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 estabelece os teores máximos de fenóis, denominado “Fenóis Totais”,¹⁷ tolerados de acordo com o tipo de água, conforme mostrado na Tabela 2. Para águas doces e salobras de classe 1, que são destinadas ao consumo humano após tratamento adequado, a tolerância para fenóis é de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$. 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 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Além disso, segundo o CONAMA, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, em corpos de água se

apresentarem concentrações máximas de fenóis de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Atualmente, os efluentes industriais 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,¹⁸ pesticidas,¹⁹ papel e celulose,²⁰ petroquímica^{21,22} e siderúrgica.²²

Tabela 2. Teores máximos de fenóis totais permitidos em água. Adaptada da ref. 16

Tipo de água	Descrição	Fenóis Totais^a
Doce - Classe 1	Abastecimento para o consumo humano; proteção de comunidades aquáticas; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças.	$0,003 \text{ mg L}^{-1}$
Doce - Classe 3	Abastecimento para o consumo humano; irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário; dessedentação de animais.	$0,01 \text{ mg L}^{-1}$
Salina - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca.	$0,06 \text{ mg L}^{-1}$
Salobra - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca; abastecimento para o consumo humano; irrigação.	$0,003 \text{ mg L}^{-1}$
Efluente	Quaisquer fontes poluidoras que lançam resíduos em corpos de água.	$0,5 \text{ mg L}^{-1}$

^a substâncias que reagem com 4-aminoantipirina [17]

2. Métodos analíticos ambientalmente seguros para determinação de fenóis em água

Diversos métodos analíticos para determinação de compostos fenólicos foram desenvolvidos, os quais incluem: (i) técnicas eletroanalíticas, representadas por voltametria²³⁻²⁵ e amperometria;²⁶⁻²⁸ (ii) cromatografia gasosa (CG), acoplada a detectores de ionização em chama (DIC),²⁹ captura de elétrons (DCE)³⁰ ou espectrômetro de massa (EM);³¹ (iii) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);³²⁻

³⁵ (iv) eletroforese capilar (EC), com diferentes sistemas de detecção,³⁶⁻³⁸ e (v) espectrometria de absorção molecular na região do UV-Visível (UV/Vis).³⁹⁻⁴³

Essas técnicas sempre foram amplamente aplicadas para determinação de fenóis, entretanto, de modo convencional, isto é, sem a preocupação do impacto gerado ao meio ambiente. Com o advento da Química Verde e de toda a demanda em relação à consciência ambiental, os procedimentos analíticos passaram por modificações com o objetivo de se tornarem “métodos limpos”. Neste trabalho, serão apresentados métodos ambientalmente seguros para determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas empregando diversas técnicas analíticas.

2.1. 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. Entretanto, a ELT e a EFS apresentam diversas desvantagens, como o emprego de grandes quantidades de solventes orgânicos, que por sua vez, são substâncias tóxicas, cancerígenas e/ou inflamáveis;⁴⁴ formação de emulsões; longo tempo de análise; e dificuldade de automação.⁴⁵

Uma proposta para substituição da ELT e EFS foi desenvolvida recentemente. 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 de solvente orgânico (Figura 1).⁴⁶ 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 é empregada, o que reduz a produção de resíduos (Princípio 1 da QV), a exposição de operadores à substâncias tóxicas e o risco de acidentes (Princípio 12 da QV).¹

Desde que a MEFL foi introduzida pela primeira vez, em 1996, por Liu e Dasgupta,⁴⁷ diversos procedimentos empregando a técnica foram desenvolvidos para determinação de fenol, que incluem: microextração com gota única (MEGU);⁴⁸ microextração líquido-líquido dispersiva (MELD);^{49,50} microextração com headspace (MHS), aplicando solventes orgânicos^{51,52} ou soluções aquosas⁵³ como microfase; e a microextração em fase líquida com fluxo contínuo (MEFC).²⁹

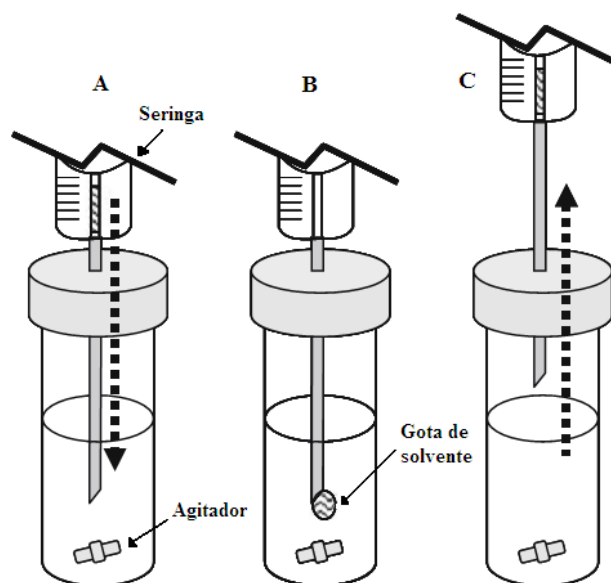


Figura 1. Configuração básica das etapas principais de um sistema de MEFL. Injeção da microgota de fase extratora (A); extração do analito (B); recolhimento da microgota para análise (C). Reimpressa da ref. 46, com autorização da © Springer.

Um exemplo de trabalho aplicando a MEFL para determinação de fenóis é o método desenvolvido por Chen et al.,²⁹ no qual um sistema de MEFC é utilizado como pré- etapa de extração à análise cromatográfica via CG. Conforme esquematizado na

Figura 2, neste método, uma microgota de solvente orgânico ($3 \mu\text{L}$) 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. 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. 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 acidentes; diminuição do erro de análise devido à diminuição de operação humana pelo uso de um sistema em fluxo.

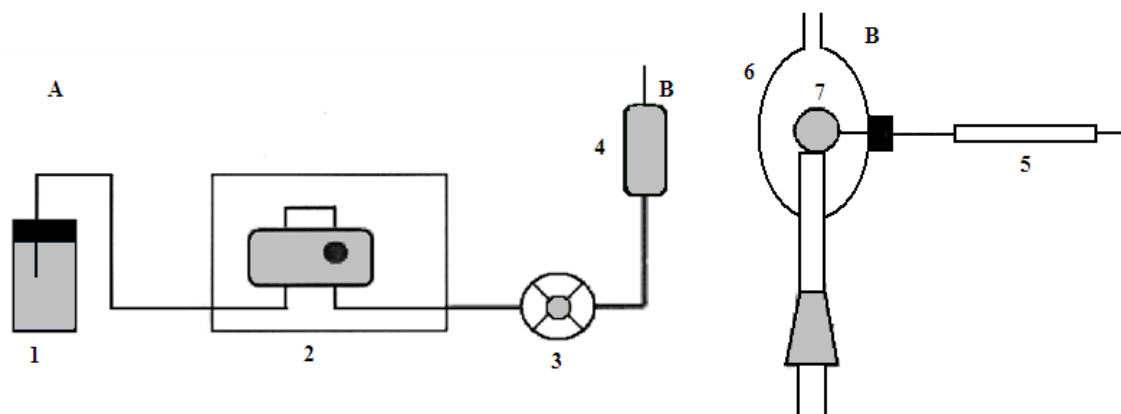


Figura 2. Esquema do sistema de MEFC (A), descrito no trabalho desenvolvido por Chen et al., composto pelo recipiente com amostra (1), bomba peristáltica (2), injetor (3), e câmara de extração (4). Esta é detalhada em (B), com a seringa (5), recipiente de vidro (6), e microgota de solvente orgânico (7). Adaptada da ref. 29.

A Tabela 3 apresenta as principais características deste trabalho e de outros métodos que empregam a MEFL para determinação de compostos fenólicos em água. Detalhes sobre o tipo de matriz, tipo de fenóis estudados, técnica de detecção e as

principais figuras de mérito, como limite de detecção (LOD) e faixa linear, estão descritos na tabela.

Um aspecto importante apresentado na Tabela 3, que é uma tendência geral em trabalhos que envolvem determinação de fenóis, é o fato de os clorofenóis 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.⁵⁴ 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.

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

Técnica	Fenóis^a	Matriz	Deteção	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	48
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	49
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	50
MHS	24DMF; 246TMF; 2CF; 24DCF; 2NF	Drenagem	EC- UV/Vis	1 - 3	5 - 5000	53
MHS	F; 2MF; 4MF	Lagoa	CLAE- UV/Vis	450 - 590	1000 - 30000	51
MHS	24DCF; 246TCF; 2346TeCF; PCF	Lixiviado de aterro	CG-DEC	0,04 - 0,7	0,5 - 100	52
MFC	F; 2MF; 3MF; 24DMF; 23DMF; 34DMF	Coqueria	CG-DIC	1,37 - 2,95	4 - 10000	29

^a F: fenol; 2MF: 2-metilfenol; 3MF: 3-metilfenol; 4MF: 4-metilfenol; 23DMF: 2,3-dimetilfenol; 24DMF: 2,4-dimetilfenol; 34DMF: 3,4-dimetilfenol; 246TMF: 2,4,6-trimetilfenol; 2CF: 2-clorofenol; 3CF: 3-clorofenol; 4CF: 4-clorofenol; 23DCF: 2,3-diclorofenol; 24DCF: 2,4-diclorofenol; 25DCF: 2,5-diclorofenol; 26DCF: 2,6-diclorofenol; 34DCF: 3,4-diclorofenol; 35DCF: 3,5-diclorofenol; 234TCF: 2,3,4-triclorofenol; 235TCF: 2,3,5-triclorofenol; 236TCF: 2,3,6-triclorofenol; 245TCF: 2,4,5-triclorofenol; 246TCF: 2,4,6-triclorofenol; 345TCF: 3,4,5-triclorofenol; 2345TeCF: 2,3,4,5-tetraclorofenol; 2346TeCF: 2,3,4,6-tetraclorofenol; 2356TeCF: 2,3,5,6-tetraclorofenol; PCF: pentaclorofenol; 2NF: 2-nitrofenol; 4NF: 4-nitrofenol; 4C2MF: 4-cloro-2-metilfenol; 2M46DNF: 2-metil-4,6-dinitrofenol.

2.2. 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 90⁵⁵ e é baseada na (i) partição do analito entre a amostra e uma fibra de sílica fundida revestida com um filme de um material sorvente; e na posterior (ii) 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”) ou imersão direta na solução, um processo de transferência de matéria entre as fases ocorre e, o analito é concentrado na fase sólida (Figura 3). 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.

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, o que gera um menor risco de acidentes (Princípio 12 QV) e menor produção de resíduos (Princípio 1 QV).¹ 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.

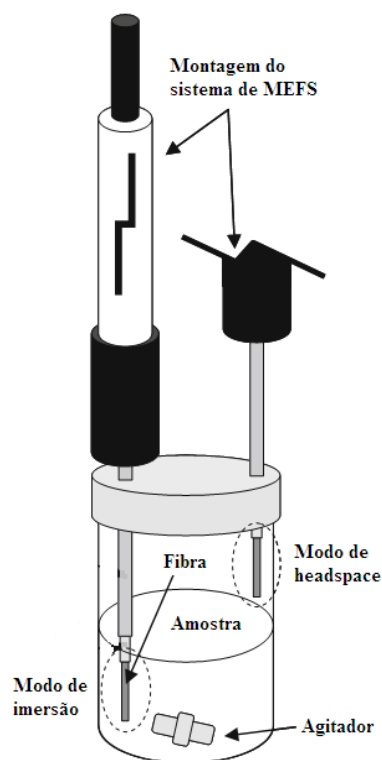


Figura 3. Esquema do sistema de MEFS, em modo de imersão direta e headspace. Reimpressa da ref. 46, com autorização da © Springer.

A MEFS é extensamente aplicada na determinação de compostos fenólicos em matrizes de interesse ambiental, principalmente em amostras de água.^{19,56-62} 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.,⁵⁹ no qual a MEFS com dessorção em meio micelar foi aplicada para determinação de clorofenóis 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 e, segundo os autores do trabalho, previne limitações

como o efeito de memória nas fibras e sobreposição de picos no cromatograma, devido à maior eficiência no processo de eluição.

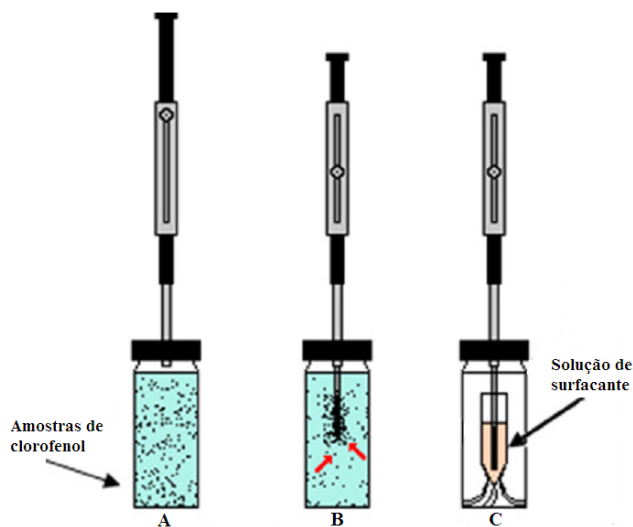


Figura 4. Esquema do sistema de MEFS com dessorção em meio micelar. (A) amostra contendo composto fenólico; (B) etapa de extração e pré-concentração; (C) dessorção do analito em meio micelar.

Reimpressa da ref. 59, com autorização da © Elsevier.

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.

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

Fenol ^a	Matriz	Fibra ^b	Deteção	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref .
F; 2CF; 4CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 4C3MF; 4C35DMF	Esgoto	CW/LEP	CLAE-DAD	0,5 - 20	1,1 - 5,9	59
	Subterrânea					
2MF; 3MF; 4MF; 26DCF; 245TCF; 2346TeCF; 2M46DNF	Rio	Pt/DS-PP	CG-DIC	0,57 - 1,82	2 - 100	56
	Mar					
246TCF; PCF; 246TBF	Rio	NiTi/ZrO ₂	CG-DCE	0,21 - 0,30	0,5 - 30	57
F; 2CF; 4CF; 24DCF; 26DCF; 245TCF; 246TCF; 2346TeCF; PCF; 4C3MF	Superficial	Silica/PA	CG-EM	0,052 - 9,1	0,042 - 79	19
	Subterrânea					
F; 2MF; 3MF; 4MF; 3NF; 2,4DNF; 2,5DNF; 2,6DNF; 34DNF; PCF; 2M3NF; 3M2NF; 3M4NF; 4M2NF; 5M2NF; 4M26DNF; Dinoseb	Chuva	Silica/PA	CG-EM	0,20 - 34,00	n.r. ^d	58
F; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 2NF; 4NF; 24DNF; 24DMF; 4C3MF; 2M46DNF	Esgoto	Silica/PA	CG-DIC	0,610 - 32000	2 - 8000	60
2CF; 24DCF; 2346TeCF; PCF	Lixiviado de aterro	PA	CG-EM	0,0005 – 0,040	0,1 - 100	61
2CF; 4CF; 24DCF; 234TCF; 235TCF; 2346TeCF; 4C3MF	Rio	PA e	CG-EM	0,2 - 50	n.r. ^d	62
	Subterrânea	CW/PDS				
F; 2NF; 4NF; 24DNF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 2M46DNF; 4C3MF	Rio	PA	CLAE- UV/Vis	0,4 - 23	2 - 30000	63
F; 2NF; 4NF; 24DNF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 2M46DNF; 4C3MF	Rio	PA	CLAE-DE ^c	0,013 - 15	0,05 - 100	63
F; 2NF; 4NF; 2CF; 24DCF; 246TCF; PCF; 24DMF; 4C3MF	Rio	CW	CLAE-DAD	1 - 10	10 - 1000	64

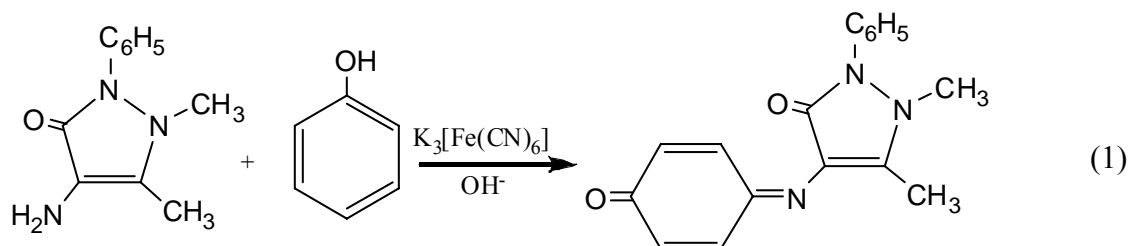
^a 4C3MF: 4-cloro-3-metilfenol; 4C35DMF: 4-cloro-3,5-dimetilfenol; 246TBF: 2,4,6-tribromofenol; 24DNF: 2,4-dinitrofenol; 25DNF: 2,5-dinitrofenol; 26DNF: 2,6-dinitrofenol; 34DNF: 3,4-dinitrofenol; 2M3NF: 2-metil-3-nitrofenol; 3M4NF: 3-metil-4-nitrofenol; 4M2NF: 4-metil-2-nitrofenol; 5M2NF: 5-metil-2-nitrofenol; 4M26DNF: 4-metil-2,6-dinitrofenol; ver restante na Tabela 3. ^b (suporte/filme) CW/LEP: carbowax/lauril éter polioxiado de etileno; Pt/DS-PP: Pt/dodecilsulfato dopado com polipirrol; PA: poliácrlato; PDS: polidimetilsiloxano. ^c DE: deteção eletroquímica. ^d nc: não reportado

2.3. Espectrofotometria UV/Visível

Apesar da MEFL e da MEFS serem técnicas amplamente aplicadas, de modo ambientalmente seguro, para análise de compostos fenólicos e apresentarem diversas vantagens, estas técnicas ainda apresentam aspectos negativos, os quais geram limitações do ponto de vista analítico. Dentre eles pode-se destacar: (i) o alto custo do procedimento quando este envolve técnicas de detecção como CG-EM, CG-DIC, CLAE-DAD; (ii) necessidade de analistas muito bem treinados para operação destes instrumentos que são muito delicados; (iii) vida útil curta e alto custo de algumas fibras utilizadas em MEFS; (iii) emprego de solventes orgânicos, em alguns casos, mesmo que em volume reduzido; e ainda, (iv) impossibilidade de empregar essas metodologias 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. Dessa forma, há uma demanda por metodologias ambientalmente seguras, mas que, além disso, sejam simples, eficientes e economicamente viáveis.

Neste aspecto, a espectrometria de absorção molecular UV/Visível (EAM UV/Vis), comumente conhecida por espectrofotometria, é uma ótima alternativa para determinação de fenóis totais em matrizes aquosas. Inclusive, esta é a técnica empregada no método padrão de análise de fenol, descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*,¹⁷ 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 $K_3[Fe(CN)_6]$, 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 1943⁶⁵ e, a partir disso, foi extensivamente estudada para a determinação

das condições experimentais ótimas (pH, concentração dos reagentes, interferentes, etc.) e parâmetros, como sensibilidade, seletividade.^{66,67}



O método padrão, apesar de possuir vantagens reconhecidas, apresenta uma grande deficiência para detectar teores de fenol abaixo de mg L^{-1} . Para permitir a determinação de fenol em concentrações normalmente presentes em ambientes aquáticos ($< 100 \mu\text{g L}^{-1}$), 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.

2.3.1. 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.⁶⁸ 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.⁶⁹ 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).¹

A análise em fluxo com detecção espectrofotométrica vem sendo bastante empregada para determinação de compostos fenólicos em água, empregando diferentes abordagens, que incluem: (i) análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*);⁷⁰⁻⁷³ (ii) análise em fluxo segmentado (AFSEG);⁷⁴ (iii) sistemas em fluxo baseados em multi-comutação (SFMC);^{43,75} (iv) análise por injeção seqüencial (AISEQ);⁷⁶ (v) análise por injeção em fluxo baseados em multi-seringas (AIFMS);^{42,77} e (vi) análise em fluxo contínuo (AFC).⁷⁸

O trabalho desenvolvido por Lupetti et al.⁴³ emprega a reação entre fenol e 4AAP para determinação de fenóis utilizando um SFMC. Este sistema consiste no emprego de dispositivos de comutação (válvulas solenóides, por exemplo). Estes dispositivos são controlados por computador, 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.⁴³ Um ponto importante

neste procedimento é que o sistema de detecção empregado trata-se de um dispositivo de fibra óptica, cujo caminho óptico é de 100 cm, o que oferece uma alta sensibilidade ao método.

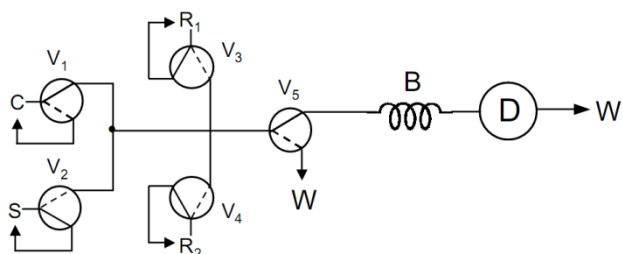


Figura 5. Esquema do sistema utilizado para determinação de fenóis. V: válvulas solenóides de três vias; B: bobina de reação (80 cm); D: cela em fluxo de longo caminho (100 cm); C: carreador, água; S: amostra; R₁: 4AAP em tampão pH 10,0; R₂: K₃[Fe(CN)₆]; W: descarte. Reimpressa da ref. 43, com autorização da © Elsevier.

A Tabela 5 apresenta características de sistemas em fluxo empregando detecção espectrofométrica utilizados para determinação de fenóis em água. 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. Como os trabalhos tratam de métodos espectrofotométricos, com a utilização de reagentes cromóforos, as concentrações descritas na Tabela 4 correspondem a fenóis totais.

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

Sistema	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	FA (h^{-1})	VR ^a (mL)	Ref.
FIA	900	1000 - 50000	5	29,3	70
FIA	10	100 - 1500	60	4,23	71
FIA	900	19000 - 190000	26	n.r. ^b	72
FIA	30	50 - 15000	40 - 60	4,8	73
AFC	1	100 - 10000	39	n.r. ^b	78
SFMC	1	10 - 100	90	4,0	43
SFMC	13	50 - 3500	65	1,6	75
AIFMS	42 - 448	140 - 17655	11	n.r. ^b	42
AIFMS	4,2 - 15	> 1600	3,16	n.r. ^b	77
AFSEG	0,3	< 10	10	60	74
AFSEQ	100	500 - 25000	12	10	76

^a estimado por determinação. ^b não reportado.

2.3.2. 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 Tanaka⁷⁹ 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, ela foi aplicada para diversos tipos de analitos, como compostos fenólicos.⁸⁰⁻⁸⁵

O potencial da EPN está relacionado a 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.⁸⁶⁻⁸⁸ Tais

micelas 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 camadas,⁸⁹ conforme representado na Figura 6.

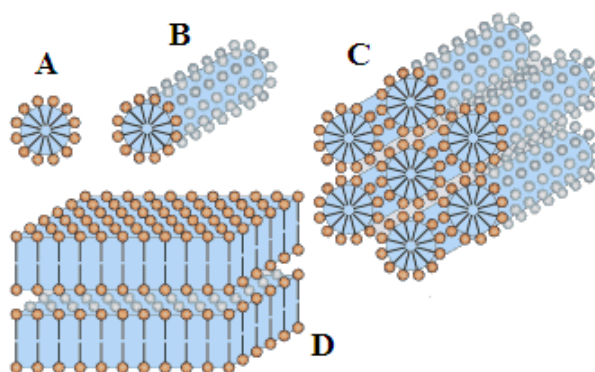


Figura 6. Tipos de agregados micelares formados em solução aquosa. Esfera (A); cilíndrica (B) hexágono de cilindros (C); estruturas em camadas (D).

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 na 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.

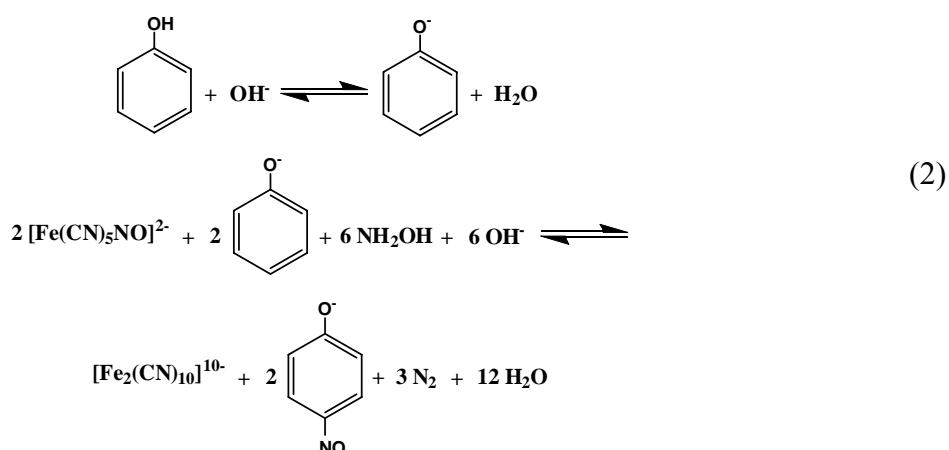
A EPN inclui diversas vantagens, inclusive do ponto de vista ambiental, como: (i) utilização de solventes auxiliares, em substituição aos orgânicos (Princípio 5 da QV);¹ (ii) capacidade de concentrar diversos analitos com recuperação quase quantitativa; (iii) baixo custo e fácil aquisição dos reagentes; e (iv) simplicidade.

O potencial da EPN na determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos foi demonstrado por Katsaounos et al.⁸⁴ ao aplicar a técnica para a extração/pré-concentração do produto da reação entre fenol e 4AAP. Parâmetros como concentração dos reagentes (4AAP e $K_3[Fe(CN)_6]$) 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 valores de 50, 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, 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.

2.3.3. Método espectrofotométrico para determinação de compostos fenólicos utilizando a reação entre fenol e nitroprussiato de sódio em meio aquoso

Um interessante método para determinação de fenol foi descrito Nagaraj et al.⁹⁰ e aprimorado por Kang et al.⁹¹ Este procedimento é baseado em uma reação eletrofílica aromática entre o fenol, nitroprussiato de sódio (NPS) e hidrocloreto de hidroxilamina (HL), em meio alcalino, conforme apresentado 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 $[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$, 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 procedimento 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⁻¹) e, ainda à interferência de algumas espécies como os ânions sulfato e fosfato.^{90,91}



2.3.4. Sistemas Aquosos Bifásicos: Uma alternativa de extração líquido-líquido ambientalmente segura para determinação de fenóis

Com o objetivo de superar as limitações relatadas da reação entre fenol, NPS e HL como ferramenta para análise de fenóis e, substituir o procedimento utilizado no método padrão, algumas novas propostas foram desenvolvidas. Uma delas foi a aplicação de um sistema em fluxo com multicomutação (SFMC) descrito por Ródenas-Torralba et al.⁷⁵ Entretanto, este trabalho não apresentou nenhuma vantagem significativa (em termos de sensibilidade, sensibilidade, e frequência de amostragem) quando comparados com estudos prévios empregando SFMC.⁴³

Uma nova estratégia de extração líquido-líquido para determinação espectrofotométrica de compostos fenólicos foi proposta em 2009 por Rodrigues et al.⁹² Esta técnica é denominada sistemas aquosos bifásicos (SAB). Estes sistemas podem ser formados pela mistura entre soluções aquosas de um eletrólito e um polímero;⁹³ ou dois polímeros solúveis em água;⁹⁴ ou dois tipos de sais,⁹⁵ 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 e torna a técnica de acordo com os princípios da química verde (Princípio 5 da QV).¹ Outras vantagens apresentadas pelos SAB são: (i) simplicidade; (ii) baixo custo; (iii) rápido processo de separação de fase; e (iv) possibilidade de reciclagem dos componentes do sistema (Princípio 7 da QV).^{1,3}

No trabalho descrito por Rodrigues et al.,⁹² um SAB composto pelo polímero poli(óxido de etileno) massa molar média igual a 1500 g mol⁻¹ (PEO1500) + sal (Li₂SO₄ ou Na₂SO₄ ou K₂HPO₄ + KOH) + água foi utilizado como meio reacional, de extração e pré-concentração. O ânion [Fe₂(CN)₁₀]¹⁰⁻ formado a partir da reação entre fenol, NPS e HL apresentou partição preferencial para a fase superior (FS) do sistema, fornecendo valores de coeficiente de partição (*K*) de 66,2 (Figura 7). Este alto valor de *K* torna o procedimento muito sensível para determinação de fenóis. As figuras de mérito do método foram determinadas, apresentando faixa linear de 1,00 a 500 µg kg⁻¹; LOD = 1,27 µg kg⁻¹; LOQ = 4,22 µg kg⁻¹; e volume de resíduo gerado de 24,0 mL por amostra. Além disso, estudos de recuperação foram realizados em amostras de água (destilada, rio, estações de tratamento de água, água industrial, efluente de coqueria) sendo que o método proposto apresentou alta correlação com o método padrão.



Figura 7. Ensaios de SAB aplicados para determinação de fenol em água. Amostra contendo fenol e com o ânion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ concentrado na FS (A); branco com o ânion nitroprussiato concentrado na FS (B).

3. Conclusão

Atualmente é alta a demanda por métodos de determinação de compostos fenólicos em matrizes aquosas, haja vista que estes compostos são considerados poluentes prioritários por órgãos de controle ambiental. Além de eficientes e economicamente viáveis, com o crescimento da consciência ambiental e o advento da química verde, estes métodos devem possuir características que não sejam agressivas ao meio ambiente e à saúde humana.

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, microextração em fase sólida, análise em fluxo, extração por ponto nuvem e, mais recentemente, sistemas aquosos bifásicos.

Referências bibliográficas

- [1] Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 123.
- [2] Zhu, L.; Ding, L.; Zhang, Q.; Wang, L.; Tang, F.; Liua, Q.; Yao, S. *Green Chem.* **2009**, *11*, 132.
- [3] Rodrigues, G. D.; da Silva, M. D. H.; da Silva, L. H. M.; Paggiolli, F. J.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. *Sep. Purif. Technol.* **2008**, *62*, 687.
- [4] Ni, J.; Yu, W.; He, L.; Sun, H.; Cao, Y.; He, H.; Fan, K. *Green Chem.* **2009**, *11*, 756.
- [5] Desset, S. L.; Reader, S. W.; Cole-Hamilton, D. J. *Green Chem.* **2009**, *11*, 630.
- [6] 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.
- [7] Sánchez, R.; Franco, J. M.; Delgado, M. A.; Valencia, C.; Gallegos, C. *Green Chem.* **2009**, *11*, 686.
- [8] U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/greenchemistry>, acessada em Julho de 2009.
- [9] Harnly, J. M.; Bhagwat, S.; Lin, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 47.
- [10] Santana, C. M.; Ferrera, Z. S.; Padrón, M. E. T.; Rodríguez, J. J. S. *Molecules* **2009**, *14*, 298.
- [11] Nistor, C.; Emnéus, J. *Waste Management* **1999**, *19*, 147.
- [12] Kringstad, K. P.; Lindstrom, E. *Sci. Technol.* **1984**, *18*, 236A.

- [13] Puig, D.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* **1996**, *19*, 362.
- [14] Nielson, A. H.; Allard, A. S.; Hynning, P. A.; Rememberger M. *Toxicol. Environ. Chem.* **1991**, *30*, 3.
- [15] Ohlenbusch, G.; Kumke, M. U.; Frimmel, F. H. *Sci. Total Environ.* **2000**, *253*, 63.
- [16] *Conselho Nacional do Meio Ambiente*. <http://www.mma.gov.br/conama>, acessada em Julho de 2009.
- [17] Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed., *American Public Health Association*, Washington DC, **1999**.
- [18] Sarnaik, S.; Kanekar, P. *J. Appl. Microbiol.* **1995**, *79*, 459.
- [19] Simões, N. G.; Cardoso, V. V.; Ferreira, E.; Benoliel, M. J.; Almeida, C. M. M. *Chemosphere* **2007**, *68*, 501.
- [20] Barreto-Rodrigues, M.; Aguiar, C. M.; Cunha, M. A. A. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *164*, 1556.
- [21] Steevensz, A.; Al-Ansari, M. M.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; Biswas, N. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 761.
- [22] Ahmaruzzaman, M.; Sharma, D. K. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *287*, 14.
- [23] Gutiérrez, J. M.; Gutes, A.; Céspedes, F.; del Valle, M.; Muñoz, R. *Talanta* **2008**, *76*, 373.
- [24] Khachatryan, K. S.; Smirnova, S. V.; Torocheshnikova, I. I.; Shvedene, N. V.; Formanovsky, A. A.; Pletnev, I. V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 464.

- [25] El Mhammedi, M. A.; Achak, M.; Bakasse, M.; Chtaini, A. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *163*, 323.
- [26] Korkut, S.; Keskinler, B.; Erhan, E. *Talanta* **2008**, *76*, 1147.
- [27] Kochana, J.; Gala, A.; Parczewski, A.; Adamski, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1275.
- [28] Santos, W. J. R.; Lima, P. R.; Tarley, C. R. T.; Kubota, L. T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1919.
- [29] Chen, X.; Zhang, T.; Liang, P.; Li, Y. *Microchim. Acta* **2006**, *155*, 415.
- [30] Estevinho, B. N.; Martins, I.; Ratola, N.; Alves, A.; Santos, L. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *143*, 535.
- [31] Vichi, S.; Romero, A.; Tous, J.; Tamames, E. L.; Buxaderas, S. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1211*, 1.
- [32] Meyer, J.; Liesener, A.; Gtz, S.; Hayen, H.; Karst, U. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 922.
- [33] Terashima, C.; Rao, T. N.; Sarada, B. V.; Tryk, D. A.; Fujishima, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 895.
- [34] Bennett, B.; Bowler, B. F. J.; Larter, S. R. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3697.
- [35] Oliveira, H. M.; Segundo, M. A.; Lima, J. L. F. C.; Cerdà, V. *Talanta* **2009**, *77*, 1466.
- [36] Wei, W.; Yin, X. B.; He, X. W. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1202*, 212.
- [37] Ding, Y.; Garcia, C. D. *Analyst* **2006**, *131*, 208.

- [38] Tsukagoshi, K.; Kameda, T.; Yamamoto, M.; Nakajima, R. *J. Chromatogr. A* **2002**, *978*, 213.
- [39] Shaghaghi, M.; Manzoori, J. L.; Jouyban, A. *Food Chem.* **2006**, *108*, 695.
- [40] Cao, W.; Mu, X.; Yang, J.; Shi, W.; Zheng, Y. *Spectrochim. Acta Part A* **2007**, *66*, 58.
- [41] Vuković, J.; Matsuoka, S.; Yoshimura, K.; Grdinić, V.; Grubešić, R. *J. Microchim. Acta* **2007**, *159*, 277.
- [42] Manera, M.; Miró, M.; Estela, J. M.; Cerdà, V. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 41.
- [43] Lupetti, K. O.; Rocha, F. R. P.; Fatibello-Filho, O. *Talanta* **2004**, *62*, 463.
- [44] da Silva, M. C. H.; da Silva L. H. M.; Paggioli, F. J. *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 933.
- [45] Rodríguez, I.; Llompart, M. P.; Cela, R. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 291.
- [46] Nerín, C.; Salafranca, J.; Aznar, M.; Batlle, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 809.
- [47] Liu, H.; Dasgupta, P. K. *Anal Chem* **1996**, *68*, 1817.
- [48] Saraji, M.; Bakhshi, M. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1098*, 30.
- [49] Fattahi, N.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M.; Jahromi, E. Z. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 23.
- [50] Fattahi, N.; Samadi, S.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1169*, 63.
- [51] Xu, H.; Yao, J.; Cheng, J.; Cui, Y.; Song, D.; Feng, Y. *Chromatographia* **2008**, *68*, 235.

- [52] Shi, Y.; Chen, M.; Muniraj, S.; Jen, J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1207*, 130.
- [53] Zhang, J.; Su, T.; Lee, H. K. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1988.
- [54] Fu, S.; Li, F.; Chu, S. G.; Xu, X. B. *Chromatographia* **2002**, *56*, 69.
- [55] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
- [56] Alizadeh, N.; Zarabadipour, H.; Mohammadi, A. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *605*, 159.
- [57] Budziak, D.; Martendal, E.; Carasek, E. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *598*, 254.
- [58] Jaber, F.; Schummer, C.; Al Chami, J.; Mirabel, P.; Millet, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2527.
- [59] Santana, C. M.; Padrón, M. E. T.; Ferrera, Z. S.; Rodríguez, J. J. S. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 13.
- [60] Buchholz, K. D.; Pawllszyn J. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 160.
- [61] Lee, M.; Yeh, Y.; Hsiang W.; Hwang, B. *J. Chromatogr. A* **1998**, *806*, 317.
- [62] Moeder, M.; Schrader, S.; Winkler, M.; Popp, P. *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 95.
- [63] Peñalver, A.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, R. M. *J. Chromatogr. A* **2002**, *953*, 79.
- [64] Gonzalez-Toledo, E.; Prat, M. D.; Alpendurada, M. F. *J. Chromatogr. A* **2001**, *923*, 45.
- [65] Emerson, E. *J. Org. Chem.* **1943**, *08*, 417.

- [66] Mohler, E. F.; Jacob, L. N. *Anal. Chem.* **1957**, 29, 1369.
- [67] Ochynski, F. W. *Analyst* **1960**, 85, 278.
- [68] Anastas, P. T. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1999**, 29, 167.
- [69] Rocha, F. R. P.; Nóbrega, J. A.; Fatibello-Filho, O. *Green. Chem.* **2001**, 3, 216.
- [70] Sheikheldin, S. Y.; Cardwell, T. J.; Cattrall, R. W.; de Castro, M. D. L.; Kolev, S. D. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 419, 9.
- [71] Quaresma, M. C. B.; Cassella, R. J.; Carvalho, M. F. B.; Santelli, R. E. *Micorchem. J.* **2004**, 78, 35.
- [72] Vieira, I. C.; Fatibello-Filho, O. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, 111.
- [73] Frenzel, W.; Oleksy-Frenzel, J.; Mörlen, J. *Anal. Chim. Acta* **1992**, 261, 253.
- [74] Goulden, P. D.; Brooksbank, P.; Day, M. B. *Anal. Chem.* **1973**, 45, 2430.
- [75] Ródenas-Torralba, E.; Morales-Rubio, A.; de la Guardia, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 383, 138.
- [76] Lapa, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Pinto, I. V. O. S. *Analisis* **2000**, 28, 295.
- [77] Horstkottea, B.; Elsholz, O.; Martín, V. C. *Talanta* **2008**, 76, 72.
- [78] Rama, M. J. R.; Medina, A. R.; Díaz, A. M. *Microchim. Acta* **2003**, 141, 143.
- [79] Watanabe, H.; Tanaka, H. *Talanta* **1978**, 25, 585.
- [80] Frankewlcht; R. P.; Hinze, W. L. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 944.

- [81] Seronero, L. C.; Laespada, M. E. F.; Pavón, J. L. P.; Cordero, B. M. *J. Chromatogr. A* **2000**, *897*, 171.
- [82] Wu, Y.; Huang, S. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *373*, 197.
- [83] Filik, H.; Tavman, A. *J. Anal. Chem.* **2007**, *62*, 530.
- [84] Katsaounos, C. Z.; Paleologos, E. K.; Giokas, D. L.; Karayannis, M. I. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, *83*, 507.
- [85] 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.
- [86] Szymczyk, K.; Jańczuk, B. *Langmuir* **2009**, *25*, 4377.
- [87] Cui, X.; Mao, S.; Liu, M.; Yuan, H.; Du, Y. *Langmuir* **2008**, *24*, 10771.
- [88] Zana, R. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **1997**, *123-124*, 27.
- [89] Paleologos, E. K.; Giokas, D. L.; Karayannis, M. I. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 426.
- [90] Nagaraj, P.; Bhandari, J. M.; Achar, B. N. *Indian J. Chem.* **1993**, *32A*, 641.
- [91] Kang, C.; Wang, Y.; Li, R.; Du, Y.; Li, J.; Zhang, B.; Zhou, L.; Du, Y. *Microchem. J.* **2000**, *64*, 161.
- [92] Rodrigues, G. D.; de Lemos, L. R.; Silva, M. C. H.; da Silva, L. H. M.; Minim, L. A.; Coimbra, J. S. R. *Talanta* **2009**, submetido.
- [93] Martins, J. P.; Carvalho, P. C.; da Silva, L. H. M., Coimbra, J. S. R., da Silva, M. C. H.; Rodrigues, G. D.; Minim, L. A. *J. Chem Eng. Data* **2008**, *53*, 238.

[94] Zeng, X.; Osseo-Asare, K. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **2003**, 226, 45.

[95] Bridges, N. J.; Gutowski, K. E.; Rogers, R. D. *Green Chem.* **2007**, 9, 177.

Capítulo 3

A green and sensitive method to determine phenols in water and wastewater samples using an aqueous two-phase system

Abstract

A greener and more sensitive spectrophotometric procedure has been developed for the determination of phenol and *o*-cresol that exploits an aqueous two-phase system (ATPS) using a liquid-liquid extraction technique. An ATPS is formed mostly by water and does not require organic solvent. Other ATPS components used in this study were the polymer, polyethylene oxide, and some salts (i.e., Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$). The method is based on the reaction between phenol, sodium nitroprusside (NPS) and hydroxylamine hydrochloride (HL) in an alkaline medium (pH 12.0), producing the complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ that spontaneously concentrates in the top phase of the system. The linear range was 1.50 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($R \geq 0.9997$; $n = 8$) with coefficients of variation equal to 0.38 % for phenol and 0.30 % for *o*-cresol ($n = 5$). The method yielded limits of detection (LODs) of 1.27 and 1.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and limits of quantification (LOQs) of 4.22 and 6.28 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for phenol and *o*-cresol, respectively. Recoveries between 95.7 – 107 % were obtained for the determination of phenol in natural water and wastewater samples. In addition, excellent agreement was observed between this new ATPS method and the standard 4-aminoantipyrine (4-AAP) method.

Keywords: Aqueous two-phase system; Green chemistry; Phenols determination; Water; Wastewater

1. Introduction

The restricted availability of unpolluted freshwater sources coupled with the high costs of obtaining potable water has caused increasing awareness about the use of water sources. Thus, there is a constant search for inexpensive and greener analytical methods that can provide reliable results for monitoring water pollutants such as phenolic compounds.

Phenol and its derivatives (*e.g.*, cresol) are extremely harmful to the environment and human health [1,2] due to their high toxicity. As a result, they have been included on lists of high priority pollutants in several countries [2,3]. American and Brazilian environmental legislation established limits of $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$ of total phenols permitted in bodies of water [4,5].

Several analytical procedures with different systems of detection were developed to determine phenolic compounds, including gas chromatography (GC) [6–9], liquid chromatography (LC) [10–13], capillary electrophoresis (CE) [14–16], voltammetry [17–19] and amperometric analysis [20–22]. However, these methods do not allow *in situ* continuous monitoring, are costly to implement, demand skilled operators and require derivatization of analytes. Spectrophotometric analysis is applied in the determination of phenols [23,24], exploiting mainly UV-Visible detection [25–27].

The most commonly used analytical methods (*e.g.*, those described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [28]) are spectrophotometric methods based on the oxidative coupling of phenols with 4-aminoantipyrine (4-AAP). However, this procedure has many disadvantages, including (i) employment of large amounts of reagents, especially chloroform, which is toxic and carcinogenic [29]; (ii) difficulty in finding suitable buffers, due to the reactive

sensitivity to pH variations; and (iii) tedious operations such as a distillation step required for some sample analysis.

An interesting spectrophotometric method for the determination of phenolic compounds has been reported by Nagaraj et al. [30] and improved by Kang et al. [31]. It is based on the reaction between phenol, sodium nitroprusside (NPS) and hydroxylamine hydrochloride (HL) in an alkaline medium, producing the blue-colored complex anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$. However, this procedure is not yet suitable for the determination of phenols at concentrations lower than $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$ and for analyses in the presence of electrolytes such as phosphates and sulfates, which promote serious errors. Moreover, a previous distillation step for sample preparation is required.

A convenient approach to address these limitations is to promote the complex formation reaction at the interface between the bottom and top phase of an aqueous two-phase system (ATPS). This reaction avoids salt interference and the posterior transfer of the complex to a small volume of the ATPS top phase. Within this context, ATPS is a strategic liquid-liquid extraction technique for phenol determination. Under specific thermodynamic conditions, an ATPS can be formed by mixtures of aqueous solutions of (i) certain inorganic salts and a polymer [32], (ii) two types of water-soluble polymers [33] or (iii) two types of salts [34]. The resulting systems are two immiscible liquid phases with a polymer-enriched top phase (or enriched with a salt) and a salt-enriched bottom phase (or enriched with the second polymer or salt). Moreover, water is the major component of both phases, thus providing an extraction technology that eliminates the use of hazardous solvents. Finally, ease of use, low costs, shorter times for phase splitting and recycling of the system components are advantages of the technique [35]. ATPS methodologies have already been applied successfully in the separation of different ions [35–38].

The aim of this work was to develop a novel, greener and more sensitive procedure for determining phenol and *o*-cresol compounds. The proposed method is based on the reaction between phenolic compounds, NPS and HL in ATPSs composed of polyethylene oxide 1500 (PEO1500) + salt (Li_2SO_4 , Na_2SO_4 or $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$) + water, exploiting spectrophotometric detection of reaction products. Parameters, such as ATPS electrolyte nature, pH, reagent concentrations, sample stirring time and tie-line length (TLL) were also optimized for the method.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Spectrophotometric measurements were performed with a UV-Visible (UV/Vis) spectrophotometer (Shimadzu UV-2550) with quartz microcells with a 1.00-cm optical path length and total capacity of 450 μL . The slit width was kept at 2.0 nm. The software used for system control and data acquisition was UVProbe. The pH measurements were collected with a combined glass electrode using a digital pH meter (Digimed model DM-20, Digicron Analítica Ltda, São Paulo, Brazil).

2.2. Chemicals

All reagents were of analytical grade quality and used as received without further purification. Distilled water was used throughout the experiments. The polymer was polyethylene oxide (Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) with an average molar mass (M_m) of 1500 g mol^{-1} (denoted as PEO1500). The chemicals in the proposed method, Li_2SO_4 , Na_2SO_4 , K_2HPO_4 , KOH , NaOH , NPS and HL, were obtained from Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). The reagents used in the 4-AAP

procedure [28] were 4-aminoantipyrine, NH_4OH , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Darmstadt, Germany), K_2HPO_4 and KH_2PO_4 (Vetec). Phenol and *o*-cresol were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

2.3. ATPS composition, solutions and standards

The three types of ATPS applied in the development of the procedure were PEO1500 + Li_2SO_4 + water; PEO1500 + Na_2SO_4 + water [32] and PEO1500 + (K_2HPO_4 + KOH) + water. For each system at least three different compositions were studied to verify the effect of the TLL in the partitioning behavior of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex (Table 1). Moreover, global compositions shown in Table 1 are relative to an ATPS composed of 2.00 g of top phase and 10.0 g of bottom phase, which were used in most assays.

All solutions were prepared with distilled water. In the ATPS method, the pH of the water was adjusted to 12.0 with NaOH because this pH is more favorable to the complete reaction of NPS with phenol compounds. For systems composed of the salts K_2HPO_4 + KOH , correction was not necessary because the pH was 12. Stock solutions of top and bottom phases were prepared in distilled water (pH 12.0). PEO1500 and salt concentrations in the phase stock solutions are provided in Table 1. These solutions were used as solvent to prepare all solutions of phenols, NPS and HL. Working standard solutions of phenol within 5.00 and 2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were prepared daily by using the bottom phase as a solvent and the appropriate dilution of a 1.00 g kg^{-1} stock solution. HL working stock solutions (518 mg kg^{-1}) were prepared by weighing the appropriate quantity of hydroxylamine hydrochloride in the bottom phase using an analytical balance (Shimadzu, AY 220) with an uncertainty of ± 0.0001 g. NPS working stock solutions (1,992 mg kg^{-1}) were obtained by dissolving the appropriate amount of salt in

the top phase. In the 4–AAP method, the solutions and standards were prepared as described in the literature [28].

Table 1. Percent composition (w/w) for PEO1500 (w_P), salt (w_S) and water aqueous two–phase system (ATPS) at 25.0 °C.

Tie–line length (TLL)	Global		Top Phase		Bottom Phase	
	w_P	w_S	w_P	w_S	w_P	w_S
PEO1500 + Li₂SO₄ + water						
29.43	11.4	13.83	34.44	5.30	6.85	15.54
34.97	12.0	14.73	39.18	4.15	6.60	16.85
41.71	12.3	16.64	44.40	3.25	5.91	19.32
46.36	12.8	17.62	48.38	2.58	5.68	20.63
51.67	13.5	18.79	53.26	2.15	5.60	22.12
PEO1500 + (K₂HPO₄ + KOH) + water						
16.61	9.31	14.83	20.60	6.82	7.05	16.43
27.06	9.01	18.09	27.36	4.99	5.34	20.71
30.09	9.75	18.79	30.35	4.50	5.63	21.65
37.05	8.87	21.15	34.32	3.68	3.78	24.65
42.80	8.66	23.31	38.13	3.23	2.76	27.33
PEO1500 + Na₂SO₄ + water						
32.51	7.45	13.50	32.36	2.84	2.47	15.63
35.96	7.52	15.17	34.51	2.16	2.12	17.77
40.10	7.87	16.53	37.94	1.95	1.86	19.45

2.4. Procedure

Liquid–liquid equilibrium cells were used to prepare the ATPSs. Working stock solutions of 5.000 g of phenol, 2.000 g of NPS and 5.000 g of HL were weighed. In spectroscopic measurement reference cell were carried out with the top or bottom phase stock solutions containing NPS and HL, respectively. Thus, a final composition of phenol within 2.50 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the bottom phase was obtained, and the global concentrations of NPS and HL were 332.0 mg kg^{-1} and 216 mg kg^{-1} , respectively. The final concentrations of PEO1500 and salt in the ATPS depended on the TLL studied

(Table 1). Subsequently, the biphasic systems were manually stirred for 3 min. and allowed to settle for 20 min. at 25.0 ± 0.1 °C in a temperature-controlled bath (Microquímica, MQBTC 99-20). Finally, aliquots of the top phase were collected with a syringe and diluted by a factor of 1.50. UV/Vis spectrophotometric measurements were carried out at 722.0 nm for phenol and 717.5 nm for *o*-cresol.

2.5. Partitioning experiments

To determine the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex partition coefficient ($K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$) between the two phases, the types of ATPS studied were kept for 24 hrs. in a temperature-controlled bath to reach thermodynamic equilibrium. Subsequently, aliquots of top and bottom phases were collected. The parameter $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ can therefore be defined as

$$K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}} = \frac{A_T}{A_B} \quad (1)$$

where A_T and A_B are the absorbance (at 722.0 or 717.5 nm) of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex in the top and bottom phases, respectively.

The influence of TLLs in the partitioning behavior of the complex anion was studied by determining K as a function of the two different TLL values for each ATPS.

2.6. Environmental Samples

A distilled sample of furnace coke effluent was used to determine the applicability of the method in environmental samples. To determine the concentration of phenol in these samples, without matrix effects, the Standard Addition Method was performed by adding 0.250 g of sample to each ATPS standard. The recovery rate provided by the proposed method was also determined in samples such as natural river

water, industrial water, distilled water and samples from waste water treatment plants (WWTPs). In these cases, samples without the distillation step were used as the bottom phase of the ATPS, to which appropriate amounts of phenol were added. The 4–AAP method [28] was also applied to the same samples for comparison and to check the accuracy of the proposed method.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical aspects

The procedure is based on an aromatic electrophilic reaction, which is represented by Equation 2. In strongly alkaline mediums, phenol is converted to phenolate. Thus, the electrophilic reaction can take place more easily because the benzene ring becomes very active due to the presence of the negative oxygen (O^-). According to theoretical calculations, the sites that the nitroso group (^+NO) of the NPS attacks the phenolate molecule at *para*- or *ortho*-positions. The electrophilic or electrophobic properties of the substituents in the benzene ring affect the reaction extension, and consequently the sensitivity of the method [31]. Figure 1 shows the absorption spectra of the reaction product ($[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$) obtained in the ATPS top phase. The complex chemical structure was determined by Kang et al. [31]. The maximum absorbance is at 722.0 nm for phenol and 717.5 nm for *o*-cresol. Blank signals are insignificant in the wavelength chosen for taking measurements. Moreover, the spectra show (Fig. 1) that the procedure is more sensitive for phenol than *o*-cresol, which confirms that substituents present on the benzene ring affect the properties of the compounds and the formation of the $[Fe_2(CN)_{10}]^{10-}$ complex.

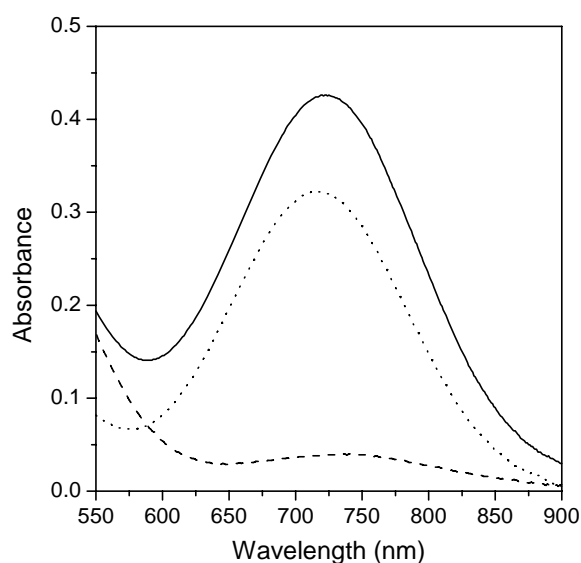
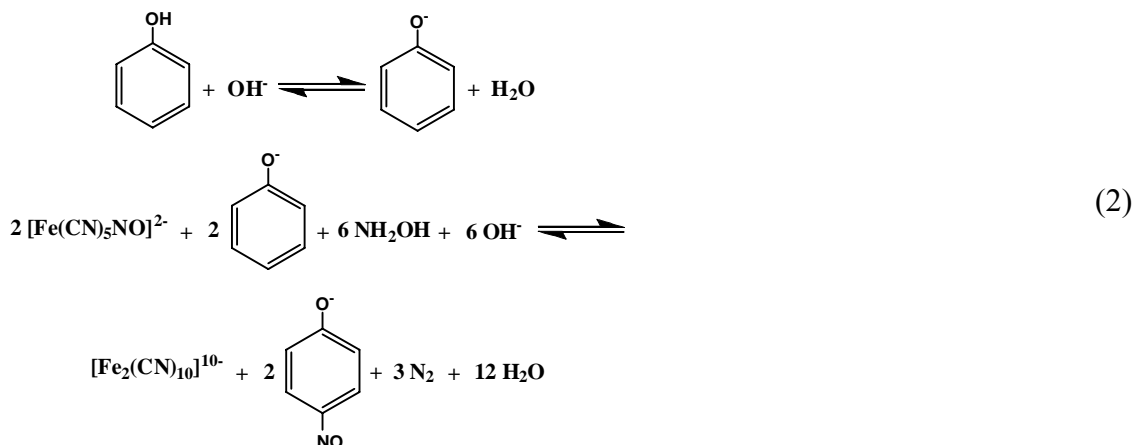


Fig. 1. Absorption spectra of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion formed by the reaction system between NPS, HL and (—) phenol or (···) *o*-cresol, and (---) blank assay spectrum in the PEO1500/ Li_2SO_4 aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) = 41.71 % (w/w).

3.2. Optimization of method

Method optimization was done to improve the sensitivity for low phenol concentrations. An experiment was carried out using Central Composite Rotatable Design (CCRD) in Response Surface Methodology (RSM) to evaluate the significance level of the factors. Five factors were investigated: system pH; NPS concentration; HL concentration; sample stirring time and phase splitting time. After exposure to

conditions determined by the CCRD, analytical responses were evaluated by spectrophotometric measurements. Only significant coefficients at 5 % probability were considered in the model using a Student's *t*-test. Table 2 shows the evaluated range and the optimum values for each variable.

Table 2. System optimization for the proposed aqueous two-phase system (ATPS) method using a standard of 600 $\mu\text{g kg}^{-1}$ phenol in the bottom phase.

Parameter	Evaluated range	Selected value
pH	8.00–12.0	12.0
NPS concentration (mg kg^{-1})	140.0–670.0	332.0
HL concentration (mg kg^{-1})	110.0–385.0	216.0
Stirring time (min.)	1–5	3
Phase splitting time (min.)	20–60	20

NPS = sodium nitroprusside; HL = hydroxylamine hydrochloride

3.3. Stability of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion in ATPS

In general, cyan complexes are photosensitive, so experiments were performed in the absence of light to avoid complex decomposition. Figure 2 shows the stability of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex. Stability was studied through UV/Vis absorption spectra of the top phase. After a period of 75 hrs., no change in the UV/Vis spectra was observed, and the absorbance at 722.0 nm for phenol or 717.5 nm for *o*-cresol remained constant over 75 hrs.

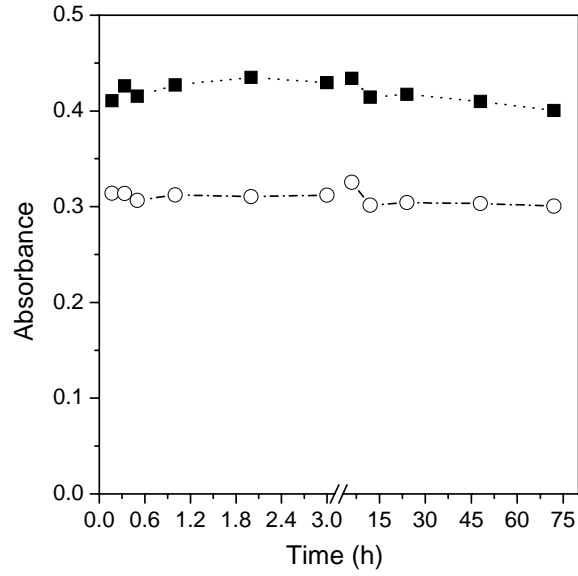


Fig. 2. Stability of the anion $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ formed by the reaction between NPS, HL and (■) phenol or (○) *o*-cresol in the PEO1500/ Li_2SO_4 aqueous two-phase system (ATPS) with a tie-line length (TLL) = 41.71 % (w/w).

3.4. Partition coefficients and effects of the tie-line length (TLL)

The TLL is a thermodynamic parameter that expresses the difference in intensive thermodynamic functions between the top and bottom phases at a constant pressure and temperature [39]. The TLL is expressed by the difference between polymer and salt concentrations present in the different phases. Generally, this parameter is a determinant in the partitioning process of some solutes and is calculated with the following equation:

$$TLL = [(C_P^T - C_P^B)^2 + (C_S^T - C_S^B)^2]^{1/2} \quad (3)$$

where C_P^T and C_P^B are the polymer concentrations in the top and bottom phases, respectively, and C_S^T and C_S^B are applied in the same way to the salt.

Table 3 shows the values of $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ for two different TLL values for all ATPSs studied. Similar values of TLL were chosen to determine the influence of electrolytes in the partitioning behavior of the complex. The $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion shows a preferential concentration in the polymer-rich phase, reaching $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ values as high as 66.2 for a TLL of 41.71 % (w/w) of the ATPS PEO1500 + Li_2SO_4 + water, which shows the best responses for both phenol and *o*-cresol. Moreover, the value of $K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$ increases as the TLL increases because more variable intensive thermodynamic difference between top and bottom phases properties (i.e., salt and polymer compositions) are associated with increasing TLL values [40]. As a consequence, higher concentrations of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion are observed in the top phase [41].

Table 3. Partition coefficient values of the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex for different aqueous two-phase system (ATPS) with different tie-line lengths (TLLs).

ATPS	TLL (% (w/w))	$K_{[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}}$	
		Phenol	<i>o</i> -cresol
PEO1500 + Li_2SO_4	29.43	17.8	56.6
	41.71	66.2	60.2
PEO1500 + (K_2HPO_4 + KOH)	30.09	13.7	27.3
	42.80	32.4	36.6
PEO1500 + Na_2SO_4	32.51	3.86	6.30
	40.10	7.52	8.88

Figure 3 shows the influence of the TLL on the sensitivity of the method for phenol (Fig. 3 A) and *o*-cresol (Fig. 3 B) determination for the three kinds of ATPS. These data were obtained by plotting analytical curves for all the TLLs of the ATPSs and then comparing the absorbance values of the same phenol standard ($600 \mu\text{g kg}^{-1}$). ATPS PEO1500/ Na_2SO_4 studies in TLLs > 40.10 % (w/w) were not practical due to the

precipitation of sulfate. Absorbance increases as the TLL increases, but for higher TLL values the signal becomes constant or even decreases. A possible reason for this behavior is that the increase in TLL also induces an ATPS salt concentration increase (Table 1), which interferes with the formation of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion, as described by Kang [31]. Thus, the sensitivity of the method depends on the competition between forming $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anions and its concentration in the top phase, which in turn depends on the TLL. Since the reaction process occurs at interfaces using an ATPS method, it is interesting to note that the interference of ions, such as sulfate and phosphate, is insignificant compared to reports by Nagaraj et al. [30] and Kang et al. [31], indicating that the tolerance limit for sulfate and phosphate is lower than 25,000 and 5,000 mg L^{-1} , respectively.

The effects of electrolytes on the determination of phenol and *o*-cresol are also shown in Fig. 3. A TLL value of 41.71 % (w/w) using PEO1500/ Li_2SO_4 ATPS presented the highest response among all the systems studied. This behavior may be explained by the model proposed by da Silva and Loh [40]. Through calorimetric measurements, it was suggested that the trend in the effectiveness of a salt to induce ATPS formation is associated with cation–polymer interactions. According to this model, when salts and polymers are mixed, cations of the salt interact with the ethylene oxide PEO groups, releasing water molecules that solvate the polymer in a process driven by an entropy increase. This cation binding continues as more electrolytes are added until saturation is reached and after which no further gain in entropy is possible, and phase splitting becomes more favorable. In da Silva and Loh's study [42], it was proposed that a higher amount of the Li^+ cation is necessary to energetically saturate the polymer chain compared to K^+ and Na^+ cations. Thus, in the ATPS composed of Li_2SO_4 , the macromolecule of PEO is more positively charged than the systems

composed of $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$ or Na_2SO_4 , which enables a stronger electrostatic interaction between the PEO segments and the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ complex. Consequently, higher partitioning of the complex anion to the PEO-rich phase occurs. Therefore, the PEO1500/ Li_2SO_4 ATPS system is more suitable for applying the proposed method in the determination of trace concentrations of phenols in environmental samples.

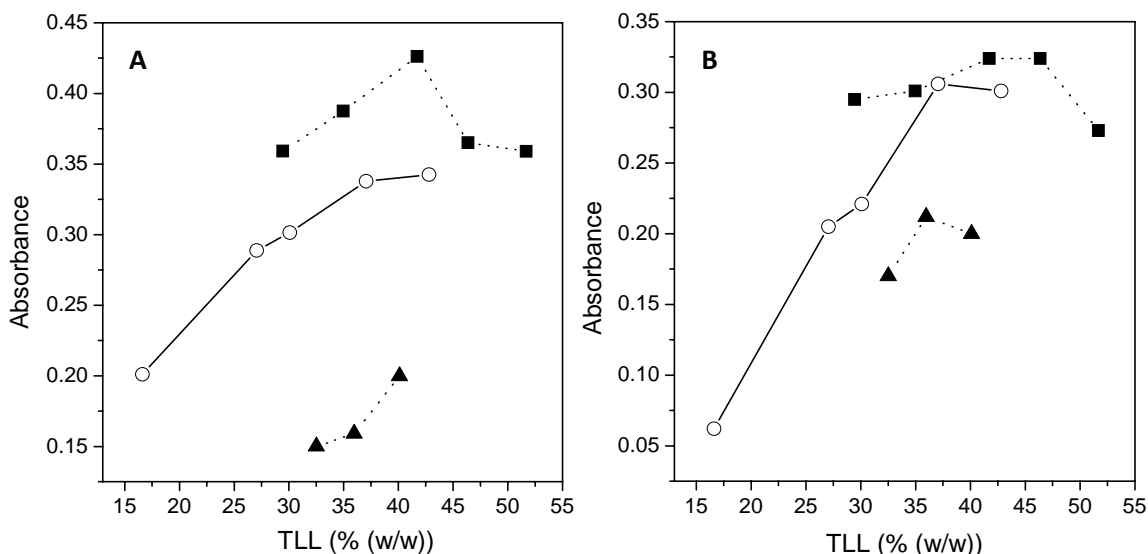


Fig. 3. Effect of tie-line length (TLL) and electrolytes on the (A) phenol and (B) *o*-cresol determination in an aqueous two-phase system (ATPS) composed of PEO1500, salt and water: (■) Li_2SO_4 , (○) $\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KOH}$ and (▲) Na_2SO_4 .

3.5. Analytical figures of merit

Under optimum experimental conditions (Table 2), additional experiments were performed to establish the analytical features of the procedure. The PEO1500/ Li_2SO_4 ATPS system was used in these studies due to its higher sensitivity (Fig. 3).

Table 4 shows the main characteristics of the proposed method compared to the standard method [28] and described by Kang et al. [31]. To increase the limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ), ATPS with 1.0000 g of top phase and 23.0000 g of bottom phase were used, offering a higher concentration factor of $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion and consequently a reduction in the range of the analytical curve.

The linear responses ($R \geq 0.9997$) were within 1.00 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ phenol, which is suitable for determination of phenols in water samples according to the limits established by the American and Brazilian legislation [4,5]. The method achieves LODs of 1.27 and 1.88 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and LOQs of 4.22 and 6.28 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for phenol and *o*-cresol, respectively. These values are lower than those obtained using the 4-AAP method [28] or the reaction between phenol, NPS and HL [31] without extraction. However, it is also notable that spectrometric UV/Vis methods that provide the lowest LOD involve the use of an optical path length of 100 cm [27] or three consecutive extractions with chloroform [28]. Nevertheless, the employment of chloroform is harmful to the environment and human health.

Table 4. Analytical features of different UV/visible spectrophotometric procedures for phenols determination.

Parameter	Proposed method		4-AAP method [28]	Literature method [31]
	phenol	<i>o</i> -cresol	(without extraction)	
Linear Range	1.00–500 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		1000–5000 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	50–5000 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
R ($n = 8$)	0.9999	0.9997	0.9998	0.9998
Cell optical path	1.00 cm		1.00 cm	2.00 cm
LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	1.27	1.88	100	50
LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	4.22	6.28	NA	NA
CV (%) ($n = 5$)	0.38	0.30	0.35	1.3
Waste volume (mL) ^a	24.0	24.0	100	50.0

^a Estimated per determination; NA mean not available; LOD = limit of detection; LOQ = limit of quantification; CV = coefficients of variation.

The coefficients of variation (CV) were 0.38 % for phenol and 0.30 % for *o*-cresol. The proposed method offers a significant reduction in the volume of waste compared to the reference method. Hence, the new procedures are a suitable and environmentally-friendly alternative to methods available in the literature that employ hazardous solvents, such as chloroform, or generate large amounts of waste.

Furthermore, these results support the feasibility of applying the proposed method to the determination of phenol in environmental samples.

3.6. Analysis of environmental samples

Table 5 shows the results of recovery studies on water samples. The ATPS method was compared with the standard 4–AAP method [28] to check the accuracy and reliability of the proposed procedures. Studies were carried out using natural river water, industrial water, distilled water and samples from WWTPs. Recovery rates between 95.7 – 107 % were obtained, and the results had excellent agreement with the standard method [28] at the 95 % confidence level according to a $K_{[\text{Fe}(\text{CN})_{10}]^{10-}} = \frac{A_T}{A_B}$ paired *t*-Test [43]. Moreover, concentrations of total phenols in furnace coke effluent without spiked phenol were determined. This sample was previously distilled and diluted according to the linear range of the method. The concentration values of total phenols found in the sample with the ATPS and 4–AAP methods were 815.7 and 781.7 mg kg⁻¹, respectively, which corresponds to a relative error of 4.35 % between both methods.

Table 5. Recovery of phenol and *o*-cresol in water samples (*n* = 3).

Sample	ATPS method recovery (%)		4–AAP method recovery (%)	
	phenol	<i>o</i> -cresol	phenol	<i>o</i> -cresol
Distilled water	97.6 ± 1.6	99.4 ± 1.5	97.8 ± 0.1	98.6 ± 0.2
River water	107 ± 0	108 ± 0	104 ± 1	105 ± 1
Industrial water	98.0 ± 1.5	100 ± 3	95.8 ± 0.3	95.8 ± 0.3
WTP water 1	100 ± 2	98.5 ± 1.0	101 ± 0	96.2 ± 0.2
WTP water 2	95.7 ± 0.5	96.4 ± 0.3	99.2 ± 0.6	99.2 ± 0.6

ATPS = aqueous two–phase system; 4–AAP = 4–aminoantipyrine; WWTP = wastewater treatment plant.

4. Conclusions

The analytical utility of an ATPS method for determining trace phenols in water and wastewater was demonstrated for the first time by exploiting the reaction between phenol, NPS and HL. This reaction produced the $[\text{Fe}_2(\text{CN})_{10}]^{10-}$ anion complex, which concentrated in the top phase of the ATPSs studied. The proposed method offers clearly advantageous analytical features in comparison to procedures involving the same reaction [31] or with a standard method [28], including an enhanced sensitivity and linear range as well as reduced waste volumes and no organic solvents. Pre-concentrations of analyte in the polymer-rich phase of the system allow the method to reach LOD and LOQ values that are suitable for determining total phenols in natural water and wastewater with high accuracy and in compliance with the regulatory requirements of environmental health agencies.

Acknowledgements

The authors acknowledge Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) for their financial support. G.D.R. and L.R.L. thank CNPq for research fellowships.

References

- [1] K.P. Kringstad, E. Lindstrom, *Sci. Technol.* 18 (1984) 236A.
- [2] <http://www.epa.gov>, accessed in May 2009.
- [3] D. Puig, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 362.
- [4] J. Švitel, S. Miertuš, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 828.
- [5] <http://www.mma.gov.br>, accessed in May 2009.
- [6] S. Vichi, A. Romero, J. Tous, E.L. Tamames, S. Buxaderas, *J. Chromatogr. A.* 1211 (2008) 1.
- [7] X. Chen, T. Zhang, P. Liang, Y. Li, *Microchim. Acta* 155 (2006) 415.
- [8] B.N. Estevinho, I. Martins, N. Ratola, A. Alves, L. Santos, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 535.
- [9] J. Rolfes, J.T. Andersson, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3073.
- [10] B. Bennett, B.F.J. Bowler, S.R. Larter, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3697.
- [11] H.M. Oliveira, M.A Segundo, J.L.F.C. Lima, V. Cerdà, *Talanta* 77 (2009) 1466.
- [12] J. Meyer, A. Liesener, S. Gtz, H. Hayen, U. Karst, *Anal. Chem.* 75 (2003) 922.
- [13] C. Terashima, T.N. Rao, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Anal. Chem.* 74 (2002) 895.
- [14] W. Wei, X.B. Yin, X.W. He, *J. Chromatogr. A.* 1202 (2008) 212.

- [15] Y. Ding, C.D. Garcia, *Analyst* 131 (2006) 208.
- [16] K. Tsukagoshi, T. Kameda, M. Yamamoto, R. Nakajima, *J. Chromatogr. A.* 978 (2002) 213.
- [17] J.M. Gutiérrez, A. Gutés, F. Céspedes, M. del Valle, R. Muñoz, *Talanta* 76 (2008) 373.
- [18] K.S. Khachatryan, S.V. Smirnova, I.I. Torocheshnikova, N.V. Shvedene, A.A. Formanovsky, I.V. Pletnev, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 464.
- [19] M.A. El Mhammedi, M. Achak, M. Bakasse, A. Chtaini, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 323.
- [20] S. Korkut, B. Keskinler, E. Erhan, *Talanta* 76 (2008) 1147.
- [21] J. Kochana, A. Gala, A. Parczewski, J. Adamski, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1275.
- [22] W.J.R. Santos, P.R. Lima, C.R.T. Tarley, L.T. Kubota, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1919.
- [23] M. Shaghghi, J.L. Manzoori, A. Jouyban, *Food Chem.* 108 (2008) 695.
- [24] W. Cao, X. Mu, J. Yang, W. Shi, Y. Zheng, *Spectrochim. Acta Part A* 66 (2007) 58.
- [25] J. Vuković, S. Matsuoka, K. Yoshimura, V. Grdinić, R.J. Grubešić, *Microchim. Acta* 159 (2007) 277.
- [26] M. Manera, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 41.
- [27] K.O. Lupetti, F.R.P. Rocha, O. Fatibello-Filho, *Talanta* 62 (2004) 463.

- [28] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, A.D. Eaton, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, twentieth ed., American Public Health Association, Washington DC, 1999.
- [29] M.C.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, Anal. Sci. 21 (2005) 933.
- [30] P. Nagaraj, J.M. Bhandari, B.N. Achar, Indian J. Chem. 32A (1993) 641.
- [31] C. Kang, Y. Wang, R. Li, Y. Du, J. Li, B. Zhang, L. Zhou, Y. Du, Microchem. J. 64 (2000) 161.
- [32] J.P. Martins, P.C. Carvalho, L.H.M. da Silva, J.S.R. Coimbra, M.C.H. da Silva, G.D. Rodrigues, L.A. Minim, J. Chem. Eng. Data 53 (2008) 238.
- [33] X. Zeng, K. Osseo-Asare, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 226 (2003) 45.
- [34] N.J. Bridges, K.E. Gutowski, R.D. Rogers, Green Chem. 9 (2007) 177.
- [35] G.D. Rodrigues, M.D.H. da Silva, L.H.M. da Silva, F.J. Paggioli, L.A. Minim, J.S.R. Coimbra, Sep. Purif. Technol. 62 (2008) 687.
- [36] L.H.M. da Silva, M.C.H. da Silva, J.A. Júnior, J.P. Martins, J.S.R. Coimbra, L.A. Minim, Sep. Purif. Technol. 60 (2008) 103.
- [37] A.E. Visser, S.T. Griffin, D.H. Hartman, R.D. Rogers, J. Chromatogr. B. 743 (2000) 107.
- [38] L. Bulgariu, D. Bulgariub, J. Chromatogr. A. 1196 (2008) 117.
- [39] L. Capezio, D. Romanini, G.A. Pico, B. Nerli, J. Chromatogr. B 819 (2005) 25.
- [40] L. H. M. da Silva, M. C. H. da Silva, R. A. N. de Aquino, K. R. Francisco, M. V. C. Cardoso, L. A. Minim, J. S. R. Coimbra, J. Phys. Chem. B. 110 (2006) 23540.

[41] L. H. M. da Silva, M. C. H. da Silva, K. R. Francisco, M. V. C. Cardoso, L. A. Minim, J. S. R. Coimbra, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 11669.

[42] L.H.M Silva, W. Loh, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10069.

[43] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, fourth ed., Prentice Hall, 2000.

Anexo 1

Analytical curves used on the study of the effect of the ATPS electrolyte nature and TLL on the determination of phenol and *o*-cresol. Figures 3 and 4 (Artigo 2).

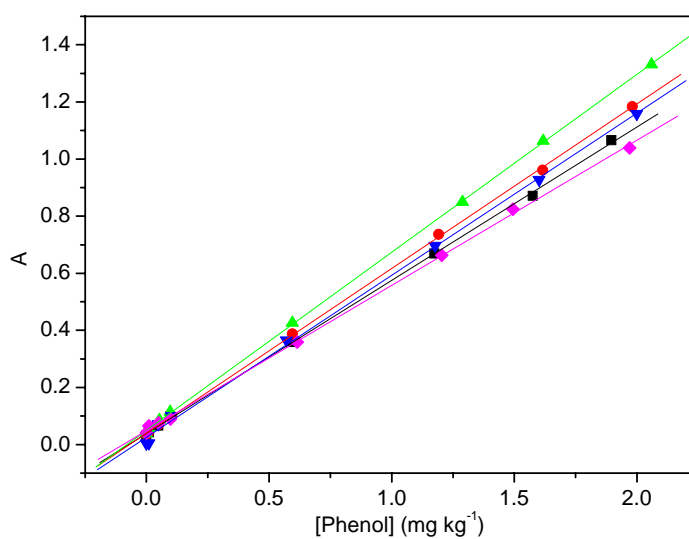


Figure 1. Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEO1500 + Li_2SO_4 + H_2O . TLL = 29.43 (■); TLL = 34.97 (●); TLL = 41.71 (▲); TLL = 46.36 (▼); TLL = 51.67 (◆).

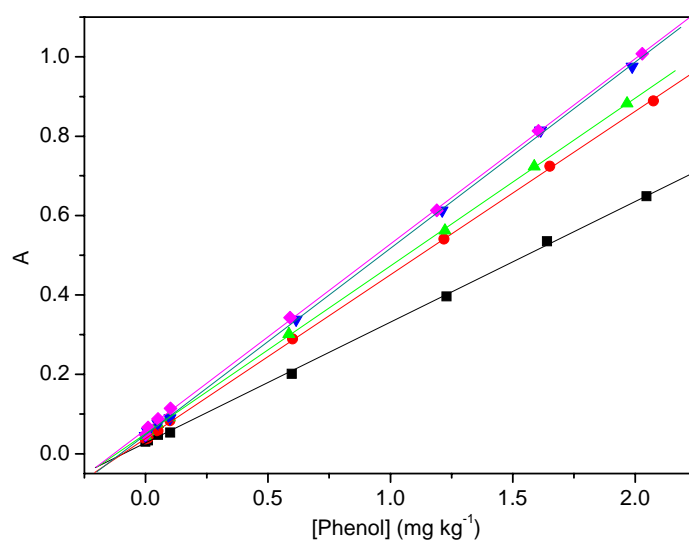


Figure 2. Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEO1500 + (K_2HPO_4 + H_2O).

KOH + H₂O. TLL = 16.61 (■); TLL = 27.06 (●); TLL = 30.09 (▲); TLL = 37.05 (▼);
TLL = 42.80 (◆).

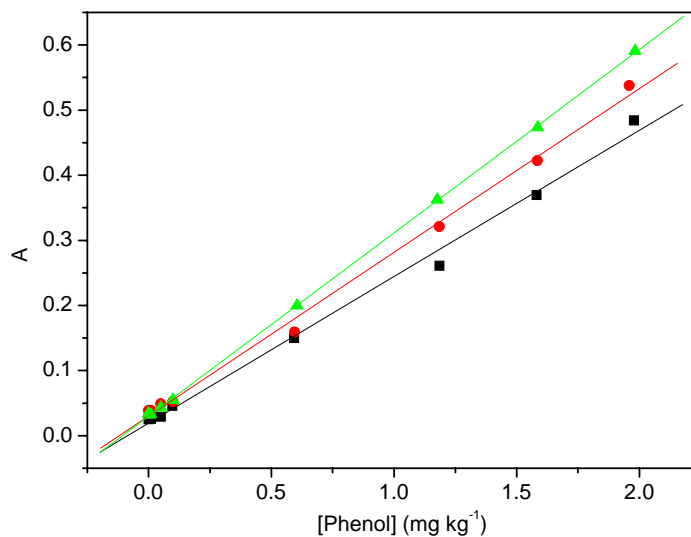


Figure 3. Effect of TLL on the determination of phenol in ATPS composed by PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O. TLL = 32.51 (■); TLL = 35.96 (●); TLL = 40.10 (▲).

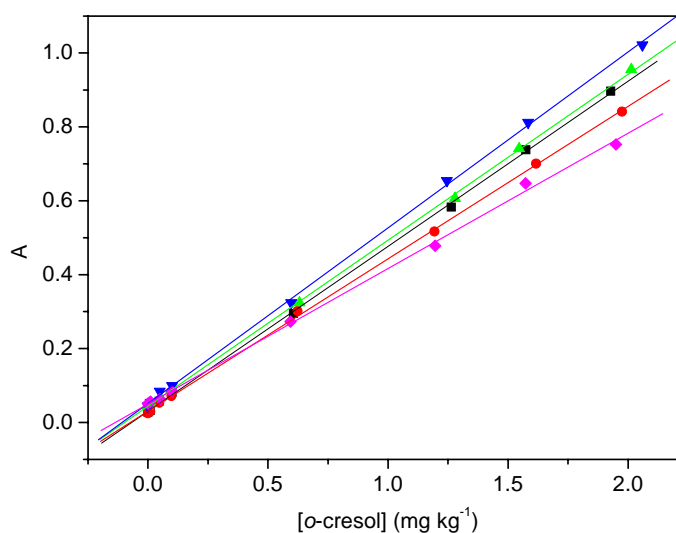


Figure 4. Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEO1500 + Li₂SO₄ + H₂O. TLL = 29.43 (■); TLL = 34.97 (●); TLL = 41.71 (▲); TLL = 46.36 (▼);
TLL = 51.67 (◆).

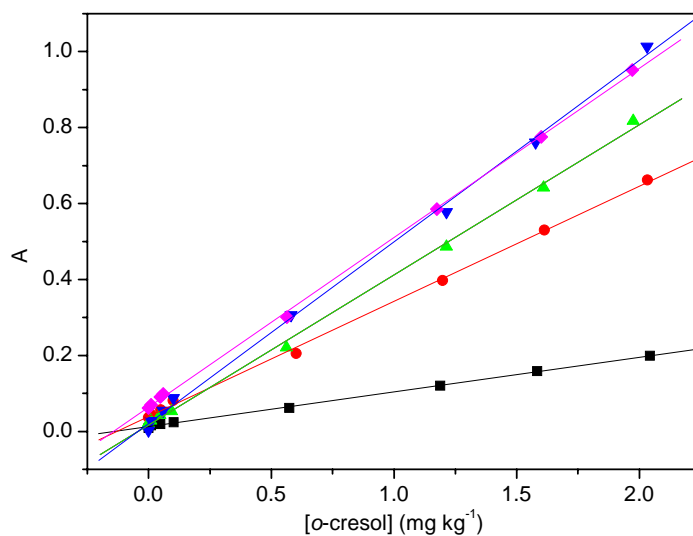


Figure 5. Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEO1500 + (K₂HPO₄ + KOH + H₂O). TLL = 16.61 (■); TLL = 27.06 (●); TLL = 30.09 (▲); TLL = 37.05 (▼); TLL = 42.80 (◆).

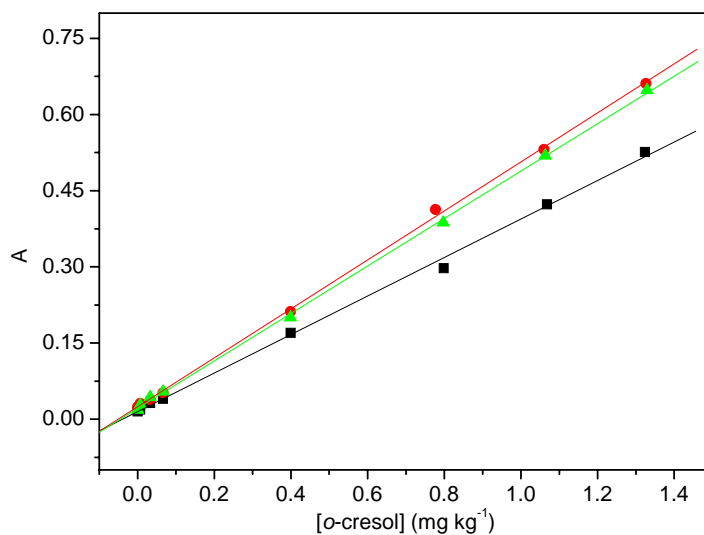


Figure 6. Effect of TLL on the determination of *o*-cresol in ATPS composed by PEO1500 + Na₂SO₄ + H₂O. TLL = 32.51 (■); TLL = 35.96 (●); TLL = 40.10 (▲).