

Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de clorofórmio em amostras de águas saborizadas utilizando a técnica de *headspace* micro extração em fase sólida

Marcel Silveira dos Santos*, Edmar Martendal, Eduardo Carasek

Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil.

Recebido em 23/07/2009; revisado em 31/08/2009; aceito em 20/09/2009. Publicado na internet em 07/11/2009.

RESUMO: Uma metodologia analítica simples e rápida foi desenvolvida utilizando a microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME) para a determinação de clorofórmio em 15 amostras de águas saborizadas. A extração do clorofórmio foi realizada com a fibra CAR-PDMS e analisados em um cromatógrafo gasoso equipado com um detector por captura de elétrons (ECD - ^{63}Ni). As variáveis que afetam a eficiência de extração foram: temperatura e tempo, volume de *headspace*, agitação magnética e adição de sal foram otimizadas. A faixa linear da metodologia foi de 0,5 - 45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Baixo limite de detecção foi obtido na faixa de 0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método mostrou excelente precisão, calculada como o desvio padrão relativo (RSD%) ($n = 6$) utilizando uma solução fortificada de 1, 15 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio, obtendo-se 11,2%, 6,4% e 3,8%. Satisfatória sensibilidade relativa de 94% foi obtida.

Palavras-chave: HS-SPME-ECD, clorofórmio, águas saborizadas

* Autor de correspondência. E-mail: marcelsilveira_gmc@hotmail.com

Introdução

A cloração da água é aplicada a fim de imobilizar atividades de microorganismos e/ou assegurar concentrações residuais em sistemas de distribuição de água potável, evitando assim, o redesenvolvimento de microorganismos neste meio. A multiplicidade de doenças causadas por vírus, bactérias, protozoários e parasitas podem ser transmitidas por águas contaminadas. Infecções podem variar de sintomas assintomáticos à leve desconforto, debilitação e até mesmo levar à morte [1, 2]. No processo de cloração, o cloro pode reagir com matéria orgânica natural incluindo substâncias húmicas e fúlvicas. Os tri-halometanos (THMs), incluindo o clorofórmio, são formados neste processo, e a formação destes compostos halogenados dependem do tipo e da concentração da matéria orgânica presente, concentração de íons bromo, dose e forma de cloração, pH, temperatura e concentração de nitrogênio orgânico [1, 3-6]. Os THMs formados são clorofórmio (CHCl_3), diclorobromofórmio (CHCl_2Br), dibromoclorofórmio (CHClBr_2) e bromofórmio (CHBr_3) [7, 8]. O limite permitido para o clorofórmio em água potável é de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, entretanto este valor deve ser reduzido para 60 ou $80 \mu\text{g L}^{-1}$; como já vem acontecendo em legislações de vários países. Na Alemanha, a concentração total de tri-halometanos em água potável não pode exceder $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [9, 10].

Diferentes métodos analíticos baseados em cromatografia gasosa têm sido reportados para a determinação de clorofórmio em água potável. A maioria destes consiste de uma etapa de pré-concentração, tal como a extração líquido-líquido (LPME) [11], *purge and trap* (P&T-GC) [12, 13], extração em fase sólida (SPE) [14] e microextração em fase sólida (SPME) [15, 16].

O objetivo deste estudo é desenvolver uma metodologia rápida e sensível para a determinação de clorofórmio por *headspace*-microextração em fase sólida com detecção por captura de elétrons (HS-SPME-ECD) em águas saborizadas disponíveis comercialmente na cidade de Florianópolis (capital do Estado de Santa Catarina, Brasil). A fibra CAR-PDMS foi aplicada para a extração deste composto. A otimização das variáveis que afetam a eficiência de extração dos analitos, temperatura e tempo de extração, velocidade de agitação, adição de NaCl e volume de *headspace* foram otimizadas univariadamente. Pelo conhecimento dos autores, é a primeira vez que a técnica de SPME é utilizada para estudar clorofórmio em águas saborizadas. As águas saborizadas são uma novidade do mercado de bebidas devido ao seu baixo poder calórico e quantidade de aditivos menor do que refrigerantes comuns.

Material e Métodos

Materiais e reagentes

Solução padrão estoque de clorofórmio (Tedia, Fairfield, USA), foi preparado em metanol (Supelco, Bellefonte, PA, USA) resultando em solução de 4700 mg L⁻¹. Soluções padrão intermediária de 100, 10, e 1 mg L⁻¹ foram preparadas em metanol por diluição da solução estoque com metanol. Diclorometano (Sigma-Aldrich) foi usado como padrão interno. Solução padrão de estoque de 2000 mg L⁻¹ de diclorometano em metanol foi preparada. Solução padrão intermediária de 100 mg L⁻¹ foi preparada da mesma forma que a solução padrão intermediária de clorofórmio. As soluções padrão foram estocadas a 0 °C.

Cloreto de sódio (Nuclear, Diadema, SP, Brazil) foi usado para modificar a força iônica das amostras. Hidróxido de amônio (Nuclear) 6 M foi preparado em água mineral e usado para reduzir o ácido carbônico (pka 6,1) das amostras até alcançar o pH 6,1. Água mineral foi utilizada, uma vez que estudos anteriores com água destilada e ultrapura continham concentrações traços de clorofórmio. Outros autores têm relatado a presença de tri-halometanos, sobretudo clorofórmio, em matrizes aquosas e até mesmo no ar [17]. Por esta razão, água mineral foi também utilizada para a calibração externa. A fibra utilizada foi a carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS, 75 µm), obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Instrumentos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-14B, equipado com injetor split/splitless e detector por captura de elétrons. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna capilar OV-5; 5% fenil-95% polidimetilsiloxano 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme (OV Specialty Chemical, Marietta, OH). Nitrogênio ultrapuro foi usado como gás auxiliar e de arraste a 48 e 1,0 mL min⁻¹, respectivamente. Vazão de split foi de 1:120. A temperatura do forno da coluna foi 40 °C (2 min), 8 °C min⁻¹ to 80 °C, 20 °C min⁻¹ to 180 °C (1 min). O tempo total da corrida cromatográfica foi de 12 minutos.

Coleta das amostras

As águas saborizadas foram coletadas em supermercados de Florianópolis (SC, Brazil). Foram levadas em consideração diferentes marcas e sabores. Todas as amostras foram estocadas a 0 °C.

Procedimento de microextração em fase sólida nas calibrações e amostras

A extração dos analitos foi realizada com a fibra de carboxen-polidimetilsiloxano

85 µm (85-CAR-PDMS). A fibra foi condicionada por 1 hora a 300 °C antes do uso e a dessorção do branco foi periodicamente realizado. Amostras de 20 mL foram transferidas para frascos de 40 mL o qual continham 20% (m/v) de cloreto de sódio, 30 µg L⁻¹ de diclorometano de padrão interno.

A temperatura de extração foi de 30 °C. O tempo de equilíbrio no banho foi de 8 minutos. A velocidade de agitação usada foi de 1000 RPM. Então, a fibra foi imersa no *headspace* para a extração por 15 minutos e, em seguida, foi imediatamente recolhida e levada ao injetor do cromatógrafo sem atraso (menos que 5 s). A dessorção ocorreu a 280 °C por 3 minutos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Resultados e Discussão

Estudo da influência do gás carbônico na extração de clorofórmio

O primeiro estudo realizado foi investigar a eficiência da extração do clorofórmio comparando duas situações em uma amostra de 20 mL de água saborizada: a primeira realizando a extração sem adição de NaOH 6 M e a outra com a adição de 150 µL de NaOH 6 M (pH final 6,1). O tempo e temperatura de extração foram de 10 minutos e 20 °C, respectivamente. Velocidade de agitação de 500 RPM.

O gás presente nos refrigerantes é o gás carbônico, que diluído em fase aquosa, mantém-se em equilíbrio de acordo com a Fig. 1. Quando um refrigerante é aberto, a pressão é reduzida à pressão atmosférica, isto causa a decomposição do ácido carbônico liberando bolhas de dióxido de carbono. Para contornar isto, a adição de hidróxido de sódio à amostra reduz significativamente a concentração de ácido carbônico resultando nos produtos carbonato de sódio e mono-hidrogenocarbonato de sódio.

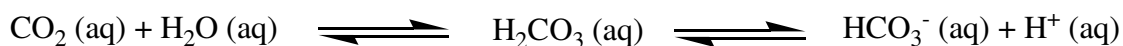


Figura 1. Representação do equilíbrio químico do ácido carbônico.

Observa-se a partir da Fig. 2 que a melhor eficiência de extração ocorre com adição de hidróxido de sódio 6 M. O aumento da eficiência de extração pode ser explicado pela facilitação do analito da fase aquosa para a fase gasosa quando a pressão no *headspace* fica igual ou próxima à pressão atmosférica. Isto acontece naturalmente quando não há um gás, como o gás carbônico, em grande quantidade num volume de *headspace* pequeno.

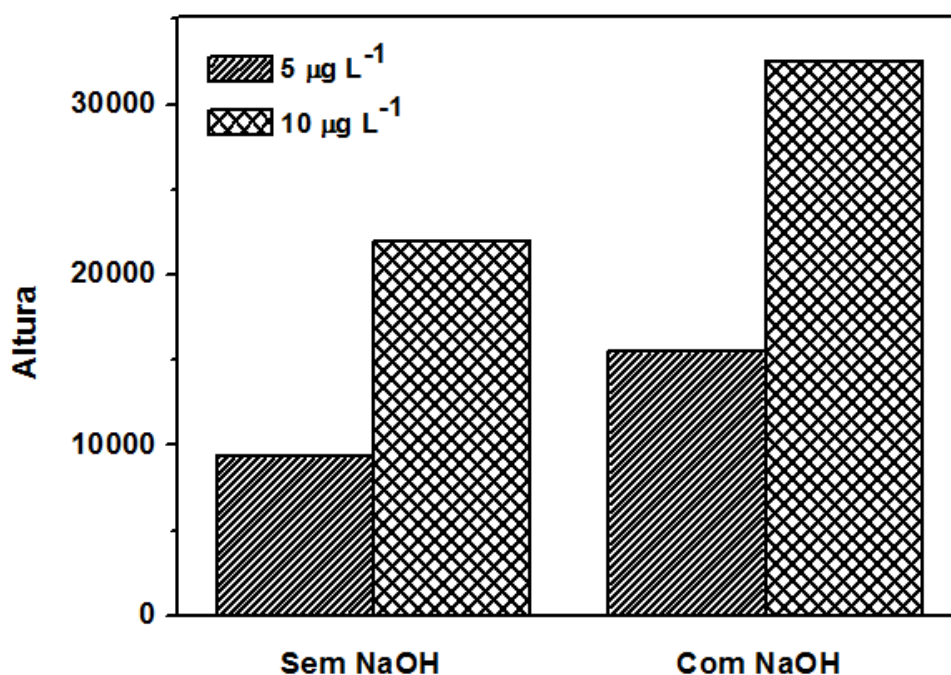


Figura 2. Eficiência de extração da fibra CAR-PDMS para CHCl_3 com e sem adição de NaOH 6 M em soluções fortificadas com 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tempo de extração de 10 minutos a 20 °C. Agitação magnética de 500 RPM. Concentração de CHCl_3 : 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 3$.

Efeito da temperatura

Na sequência para encontrar as melhores condições de extração, o efeito da temperatura na extração do clorofórmio foi realizado. A faixa investigada foi de 10 °C a 80 °C. O incremento da temperatura de extração tem como consequência um aumento da difusão dos analitos em direção à fibra, diminuindo o tempo necessário para que se atinja um equilíbrio de partição entre a amostra e a fase extratora. Entretanto, o processo de adsorção ou absorção é exotérmico e um elevado aumento da temperatura reduz o coeficiente de partição diminuindo a massa de analito extraída no equilíbrio. Geralmente, uma temperatura ótima de extração é observada [18, 19]. Pode ser observado através da Fig. 3 que a melhor condição é de uma temperatura de apenas 20 °C para CHCl_3 . O que já era esperado devido à sua elevada pressão de vapor. Para estudos posteriores foi selecionada uma temperatura de extração de 20 °C.

Efeito do volume de headspace

A extração dos analitos pode ser afetada pelo volume de *headspace* dentro do qual cada composto difunde. A teoria da SPME dita que para uma maior sensibilidade de extração no modo *headspace* o volume da fase gasosa deve ser minimizado. O experimento foi estudado na faixa de 15 mL a 39 mL de volume de *headspace* ou 1 a 25 mL de amostra em frascos de 40 mL. A amostra de água saborizada foi fortificada com

10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tempo de extração de 10 minutos a 20 °C e 500 RPM, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C.

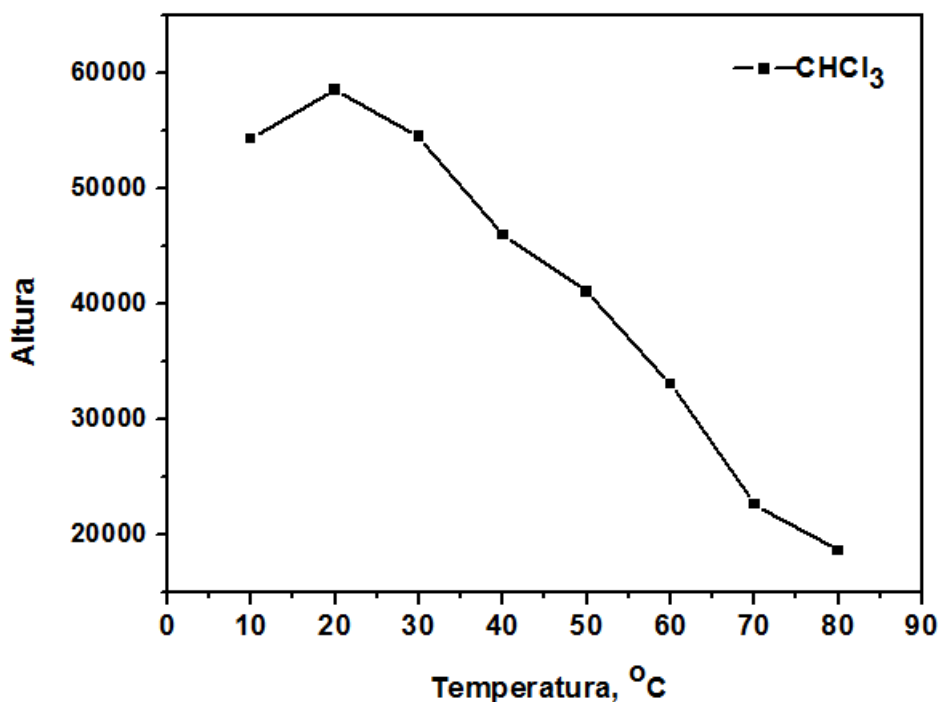


Figura 3. Efeito da temperatura de extração. 10 mL de uma amostra de água saborizada fortificada com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CHCl_3 . 80 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C, $n = 3$. Onde a responde é a média da altura de pico para cada composto.

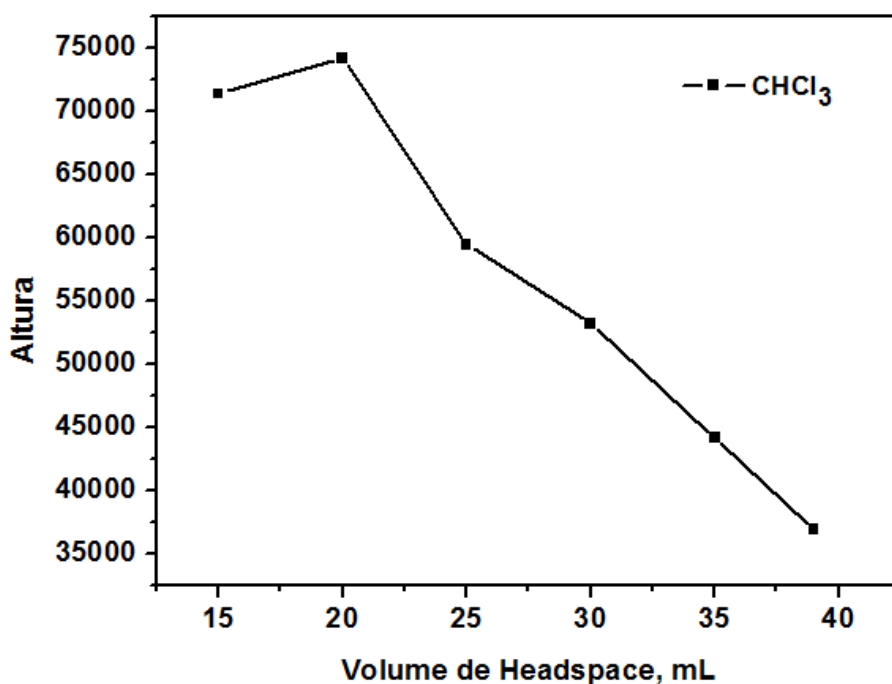


Figura 4. Efeito do volume de *headspace* na extração de CHCl_3 . 80 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 30 °C e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C, $n = 3$.

Pode ser observado na Fig. 4 que a melhor condição de extração para o clorofórmio ocorre com a utilização de 20 mL de volume de *headspace* (volume de amostra de 20 mL). Em 15 mL de *headspace* há queda na eficiência de extração. Uma explicação pode ser a agitação magnética insuficiente para tal volume.

Entretanto, um volume de 15 mL de *headspace* num frasco de 40 mL não se mostra adequado devido a redução da segurança da exposição da fibra num confinamento de *headspace* tão reduzido. Para os demais experimentos um volume de 20 mL de *headspace* foi selecionado.

Efeito da adição de sal

Outra técnica comumente utilizada para aumentar a quantidade de analito extraída pela fibra de SPME é a adição de sal. Como é conhecida, a adição de sal aumenta a força iônica da solução, alterando a pressão de vapor, viscosidade, solubilidade, densidade, tensão superficial etc. de um analito, resultando na variação do equilíbrio líquido/vapor do sistema [16].

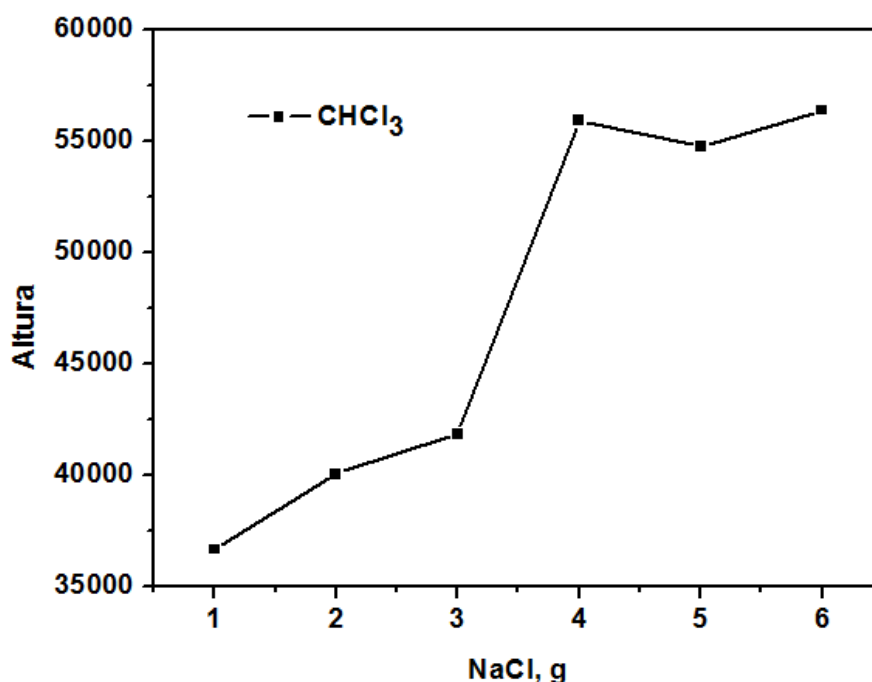


Figura 5. Efeito da adição de sal na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio. 150 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 20°C e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280°C , $n = 3$.

Um estudo preliminar determinou que a saturação de NaCl em 20 mL de amostra de refrigerante foi de 6,2 g a 30°C . A faixa estudada para este experimento foi de 0 a 6 g (0 a 30% m/v). Pode ser observado pela Fig. 5 que há uma melhora na eficiência de extração ao longo das adições de cloreto de sódio e com comportamento bastante

similar. Levando em consideração os erros experimentais, não há diferença significativa com a adição de 4, 5 ou 6 gramas de cloreto de sódio. Para demais análises, a quantidade de 4 gramas de NaCl foi selecionada.

Efeito da agitação magnética

A agitação influencia cineticamente o equilíbrio de partição entre a fase aquosa e a fase de *headspace*. Geralmente, quanto maior for a agitação, mais rápida será a transferência de massa da fase aquosa ao *headspace*. A faixa de estudo foi de 0 a 100 RPM de agitação magnética. Através da Fig. 6, observa-se a tendência do aumento da eficiência de extração do clorofórmio com o aumento da agitação magnética. A velocidade de agitação de 1000 RPM foi selecionada para análises posteriores.

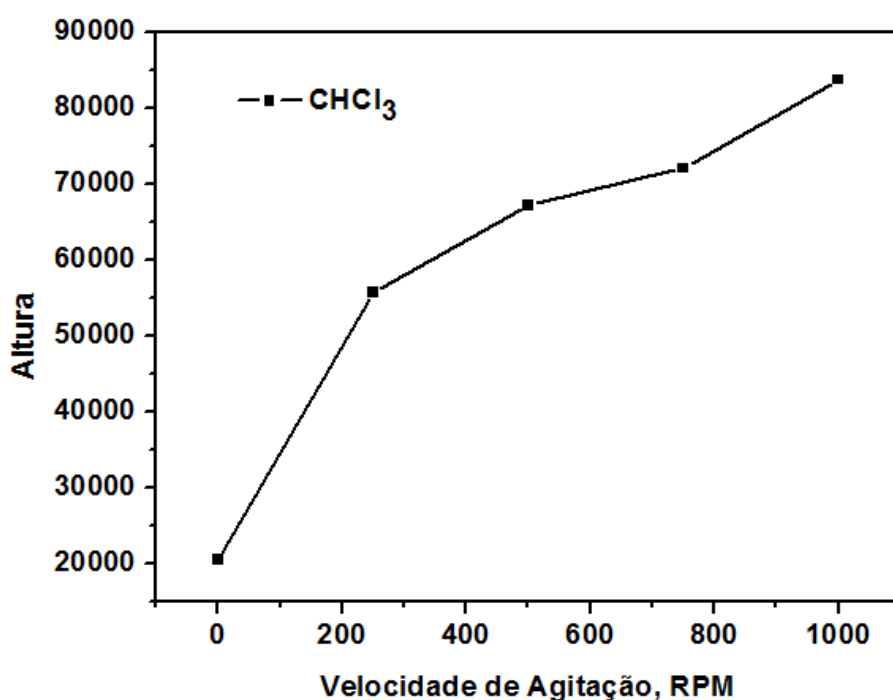


Figura 6. Efeito da velocidade de agitação magnética na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio e 4 g de NaCl. 150 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 20°C , tempo de dessorção de 3 minutos a 280°C , $n = 3$.

Efeito do tempo de extração

O efeito do tempo de extração pode ser observado na Fig. 7. Considerando os erros experimentais, em 10 minutos a fibra de PDMS-CAR extrai a máxima quantidade de massa por extração para o clorofórmio.

Os resultados obtidos para esta variável foram abaixo dos estudos de extração de clorofórmio em água potável encontrados na literatura. San Juan et al. [20] obtiveram um tempo ótimo extração de 40 minutos utilizando a fibra de CAR-PDMS. Para estudos

posteriores o tempo de equilíbrio de 15 minutos foi selecionado.

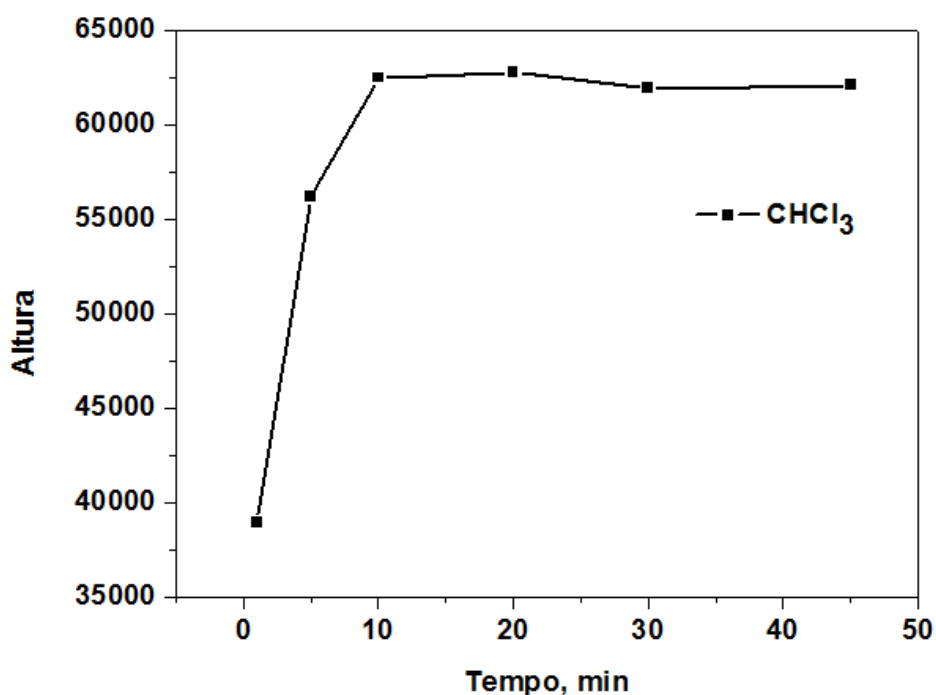


Figura 7. Efeito do tempo na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CHCl_3 . 150 μL de NaOH 6 M e 4 g de NaCl. Tempo de desorção de 3 minutos a $280 \text{ }^\circ\text{C}$, $n = 3$.

Figuras analíticas de mérito

Após os resultados obtidos nas otimizações das variáveis que afetam a eficiência de extração do clorofórmio, as figuras analíticas de mérito foram investigadas. A faixa de linearidade do método HS-SPME-ECD foi realizada pela construção de um gráfico da altura relativa ao padrão interno diclorometano utilizando uma amostra de água mineral (livre de clorofórmio). A faixa linear estudada foi entre $0,05 - 45 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 6$). O limite de detecção foi calculado como sendo três vezes a estimativa do desvio do coeficiente linear dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de correlação para a metodologia proposta para a determinação de clorofórmio.

Composto	Faixa linear, $\mu\text{g L}^{-1}$	LD ^a , $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ ^b , $\mu\text{g L}^{-1}$	R
CHCl_3	0,5 - 45	0,46	1,53	0,999

^alimite de detecção. ^blimite de quantificação.

Ótimo coeficiente de correlação foi obtido. A metodologia proposta foi capaz de detectar concentração de CHCl_3 por volta de 217 vezes menor que a concentração máxima admissível em água potável segundo a *United States Environmental Protection*

Agency (USEPA). O método mostrou excelente precisão, calculada como o desvio padrão relativo (RSD%) ($n = 6$) utilizando uma solução fortificada de 1, 15 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio, obtendo-se 11,2%, 6,4% e 5,7%, respectivamente.

Aplicação da metodologia nas amostras de águas saborizadas

O método proposto foi aplicado na análise de 15 amostras de águas saborizadas, levando em consideração diferentes sabores e marcas. Para avaliar efeitos de matriz, uma curva de calibração com uma amostra de água saborizada foi construída. Avaliando assim, a sensibilidade relativa da curva de calibração com água mineral e a curva de calibração da amostra de água saborizada. A sensibilidade relativa encontrada foi de 94%. Assim, a utilização da matriz de água saborizada tem pequena influência na metodologia de SPME. Logo, a curva de calibração externa pode ser usada para análises quantitativas.

Tabela 2. Concentrações encontradas de clorofórmio em águas saborizadas.

Amostras	Concentração encontrada \pm S.D., $\mu\text{g L}^{-1}$
Maracujá	
A	2,44 \pm 0,3
Limão e maracujá	
A	2,2 \pm 0,05
Maça e limão	
A	2,55 \pm 0,2
B	1,98 \pm 0,2
Laranja e limão	
A	3,61 \pm 0,4
Limão e menta	
A	1,67 \pm 0,05
B	5,79 \pm 0,3
Abacaxi, limão e hortelã	
A	2,42 \pm 0,02
Cereja	
A	2,24 \pm 0,2
Maçã	
A	<LD
B	2,11 \pm 0,3
Tangerina	
A	<LD
B	1,8 \pm 0,1
Framboesa	
A	2,65 \pm 0,07
Melancia	
A	4,26 \pm 0,3

Como pode ser visto na Tabela 2, em todas as amostras os valores encontrados para clorofórmio ficaram acima do limite de quantificação da metodologia proposta, exceto para as amostras "A" de maçã e tangerina. Entretanto, nenhuma amostra apresentou valores acima do permitido segundo a EPA para água potável. A faixa encontrada foi de 1,67 – 5,79 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Fig. 8 exibe o cromatograma do método HS-

SPME-ECD de uma das amostras analisadas.

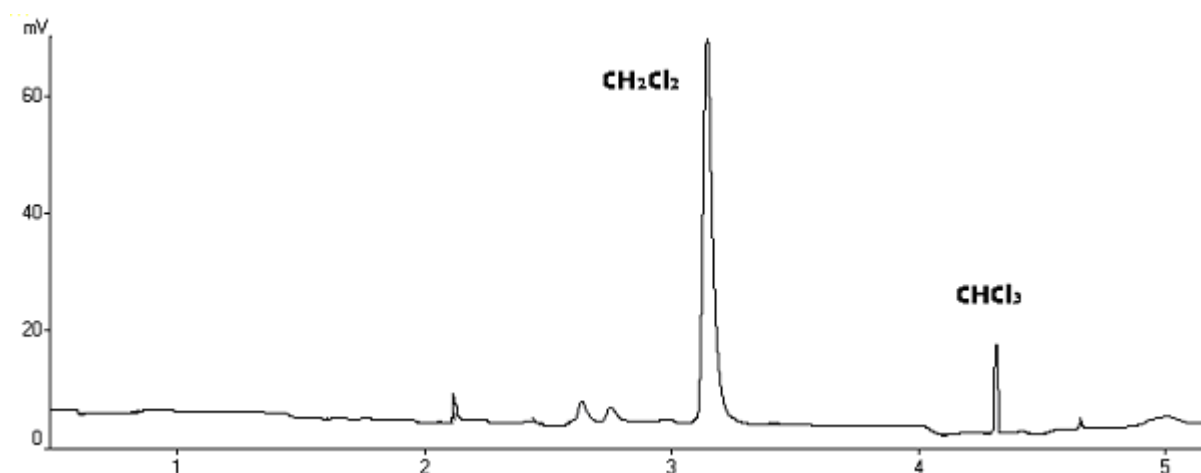


Figura 8. Cromatograma da amostra de água saborizada de sabor limão e menta designada como amostra "B". Os picos com o tempo de retenção de 3,1 e 4,2 minutos se referem ao padrão interno diclorometano e clorofórmio, respectivamente.

Conclusões

A técnica de microextração em fase sólida em modo *headspace* utilizando a fibra de CAR-PDMS foi aplicada para determinar clorofórmio em 15 amostras de águas saborizadas por cromatografia gasosa e detecção por captura de elétrons. A metodologia proposta demonstrou ser precisa, exata e alcançou um limite de detecção baixo.

Nenhuma amostra ultrapassou os limites permitidos por legislações, como a EPA. Entretanto, há grande divergência entre os valores permitidos de muitas legislações. O que sugere que ainda não há estudos suficientes para uma conclusão definitiva da margem de segurança deste composto para a saúde humana.

Agradecimentos

Os autores agradem ao CNPq pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

Development of analytical methodology for

determination of chloroform in samples of flavored waters using headspace-solid phase microextraction technique

A simple and fast analytical methodology was developed using the headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) for the determination of chloroform in 15 samples of flavoured waters. The chloroform extraction was performed with the fiber CAR-PDMS and analyzed on a gas chromatography equipped with electron capture detector (ECD - ^{63}Ni). The variables that affect the efficiency of extraction are the following: temperature and time, volume of headspace, magnetic stirring and salt addition. The linearity of the method ranged from 0.5 to 45 $\mu\text{g L}^{-1}$. Low limit of detection was 0.46 $\mu\text{g L}^{-1}$. The method showed excellent precision, calculated as the relative standard deviation (RSD%) ($n = 6$) using spiked solutions of 1, 15 and 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ of chloroform and, the values obtained were 11.2%, 6.4% and 3.8%. Excellent relative sensitivity of 94% was also achieved.

Keywords: HS-SPME-ECD, chloroform, flavored waters.

Referências Bibliográficas

- [1] Rodriguez, M. J.; Sérodes, J. B.; Levallois, P. *Water Res.* **2004**, 38, 4367. [[CrossRef](#)]
- [2] Bull, R. J.; Birnbaum, L. S.; Cantor, K. P.; Rose, J. B.; Butterworth, B. E.; Pegram, R.; Tuomisto, J. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1995**, 28, 155. [[CrossRef](#)]
- [3] Pavelic, P.; Nicholson, B. C.; Dillon, P. J.; Barry, E. J. *Contam. Hydrol.* **2005**, 77, 119. [[CrossRef](#)]
- [4] Aboul, M. Y. Z.; Wells, M. J. M. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1116, 272. [[CrossRef](#)]
- [5] Gang, D.; Clevenger, T. E.; Banerji, S. K. *J. Hazar. Mater.* **2003**, 96, 1. [[CrossRef](#)]
- [6] Kim, H.; Shim, J.; Lee, S. *Chemosphere* **2002**, 46, 123. [[CrossRef](#)]
- [7] Uyak, V.; Ozdemir, K.; Toroz, I. *Sci. Total Environ.* **2007**, 378, 269. [[CrossRef](#)]
- [8] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992.
- [9] Zhao, R. S.; Lao, W. J.; Xu, X. B. *Talanta* **2004**, 62, 751. [[CrossRef](#)]
- [10] The Council of the European Union. Quality of Water Intended for Human Consumption. Official Journal of the European Communities, Council Directive 98/83/EC, **1998**.
- [11] EPA method 551.1, Rev. 1.0, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, **1995**.
- [12] Golfinopoulos, S. K.; Lekkas, T. D.; Nikolau, A. D. *Chemosphere* **2001**, 45, 275. [[CrossRef](#)]
- [13] Nikolaou, A. D.; Lekkas, T. D.; Golfinopoulos, S.K.; Kostopoulou. *Talanta* **2002**, 56, 717. [[CrossRef](#)]

- [14] Gioia, M. L.; Leggio, A.; Pera, A.; Liguori, A.; Napoli.; Siciliano, C. *Chromatographia* **2004**, 60, 319. [[CrossRef](#)]
- [15] Cardinali, F. L.; Ashley, D. L.; Morrow, J. C.; Moll, D. M.; Blount, B. C. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, 42, 200. [[CrossRef](#)]
- [16] Cho, D. K.; Kong, S. H.; Oh, S. G. *Water Res.* **2003**, 37, 402. [[CrossRef](#)]
- [17] Zoccolilo, L.; Amendola, L.; Cafaro, C.; Insogna, S. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1077, 181. [[CrossRef](#)]
- [18] Budziak, D.; Martendal. E.; Carasek, E. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1164, 18. [[CrossRef](#)]
- [19] Jia, M.; Zhang, H.; Min, D. *J Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2744. [[CrossRef](#)]
- [20] San Juan, P. M.; Carrillo, J. D.; Tena, M. T. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1139, 27. [[CrossRef](#)]