

II-280 – VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA ANÁLISE DE ANILINA EM EFLUENTES TÊXTEIS

Danúbia Maria da Silva Freitas⁽¹⁾

Graduação em Licenciatura em Química, UFRPE. Mestre em Tecnologias Energéticas e Nucleares, UFPE. Técnica do Laboratório de Saneamento Ambiental, Centro de Tecnologia e Geociências, UFPE. Doutoranda em Tecnologia Ambiental (Engenharia Civil), UFPE.

Luiz Galdino da Silva

Graduando em Licenciatura em Química, UNICAP, Técnico do Laboratório de Saneamento Ambiental, Centro de Tecnologia e Geociências, UFPE.

Ronaldo Melo Fonseca

Técnico do Laboratório de Saneamento Ambiental. Centro de Tecnologia e Geociências, UFPE.

Sávia Gavazza

Graduação em Engenharia Civil, UFAL. Doutora em Hidráulica e Saneamento (Engenharia Civil), Escola de Engenharia de São Carlos, USP. Professora Associada do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Centro de Tecnologia e Geociências, UFPE. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da UFPE.

Mario Takayuki Kato

Graduação em Engenharia Civil, UFPR. Mestre em Hidráulica e Saneamento (Engenharia Civil), Escola de Engenharia de São Carlos, USP. Doutor em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura, Universidade Agrícola de Wageningen, Holanda. Professor Titular do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Centro de Tecnologia e Geociências. Coordenador do Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE.

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Saneamento Ambiental, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, CTG-UFPE. Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n – Cidade Universitária – Recife – PE – CEP: 50740-530 – Brasil – Tel: (81) 2126-8229 - e-mail: danubia-freitas@live.com

RESUMO

Foi desenvolvido um método cromatográfico para a determinação de anilina em amostras de efluentes de indústria têxtil. Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detector UV-Vis e uma coluna de troca iônica. Os resultados foram satisfatórios na identificação da anilina, tendo em vista que não houve eluição de compostos interferentes no mesmo tempo de retenção dessa amina. As figuras de mérito avaliadas no processo de validação foram: seletividade, linearidade, limites de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão. O método foi linear no intervalo de 0,3 a 1,2 mg.L⁻¹ e apresentou resultados de LD e LQ de 0,04 e 0,013 mg.L⁻¹, respectivamente. O método também foi preciso, apresentando coeficiente de variação de 5% e exato, apresentando exatidão de 97%.

PALAVRAS-CHAVE: Aminas aromáticas, corantes azo, biodegradação, cromatografia líquida, validação de método

INTRODUÇÃO

Nas indústrias de produção têxtil são empregados mais de 100.000 tipos de corantes no processo de tingimento de peças e roupas, gerando grandes quantidades de resíduos com elevado teor de poluente (AMIN *et al.* 2008; KORBATHI e TANYOLAÇ, 2008). Os corantes do tipo azo são os mais utilizados e representam mais de 60% do total de corantes têxteis (ONG *et al.* 2006). Entretanto, estima-se que até 75% dos corantes do tipo azo utilizados não são fixados na peça e, portanto, são encaminhados às águas residuárias (PANDEY *et al.* 2007), podendo causar um grave problema de poluição ambiental, caso não tratadas. Dentre os efeitos indesejáveis ocasionados ao meio ambiente estão: a coloração das águas superficiais, comprometendo o paisagismo dos corpos receptores (lagos, rios e mares); o desenvolvimento e atuação dos macro e micro-organismos superficiais na autodepuração das águas, por diminuir a permeabilidade da luz na superfície aquática (WEBER & WOLFE, 1987; CHUNG *et al.*, 1978); e a formação de diversas aminas aromáticas tóxicas no seu processo de biodegradação (PEREIRA *et al.* 2011). A anilina (fenilamina) é um dos últimos metabólitos da biodegradação

primária dos corantes do tipo azo. Devido a isso, ela é um dos indicadores da biodegradação desta classe de corantes (PEREIRA *et al.*, 2011; PREVOT *et al.*, 2008).

Para monitorar as concentrações dos corantes azo e os subprodutos de sua biodegradação no ambiente e sistema de tratamento de efluentes, métodos analíticos seletivos, exatos, precisos e com baixos limites de detecção foram desenvolvidos. Dentre estes destacam-se a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas por ionização de elétrons (GC/MS-EI), a cromatografia a líquido com detecção por ultra violeta-visível (CLAE-UV-visível) e a cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas por ionização por *electrospray* (LC/MS-ESI) (WEBER & WOLFE, 1987; CHUNG *et al.*, 1978; PREVOT *et al.*, 2008; FREITAS *et al.*, 2018).

Em Pernambuco, várias empresas do setor de confecções encontram-se principalmente no Agreste do Estado, região conhecida como Polo de Confecções do Agreste. É um importante polo de confecção do Brasil, especializado em “jeans”, com atividades distribuídas principalmente nos municípios de Caruaru, Toritama e Santa Cruz do Capibaribe (AMARAL, 2015). Este polo tem cerca de 20 mil empreendimentos, empregando mais de 100 mil trabalhadores e gerando uma renda de 900 milhões de reais/ano (ESTADÃO, 2013).

Diante da expansão e importância econômica e social da indústria têxtil, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias para o tratamento adequado dos seus efluentes e métodos analíticos para avaliar a eficiência dos sistemas de tratamento e as concentrações de seus subprodutos de biodegradação no ambiente. Por essa razão, com o intuito de buscar novas possibilidades de métodos para quantificação da anilina, o objetivo deste trabalho foi implantar e validar uma metodologia empregando CLAE acoplada a um detector UV-visível, para a identificação e quantificação da anilina em amostras de efluente têxtil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e materiais

Foram utilizados: metanol grau cromatográfico da Merck; fosfato monobásico e dibásico de sódio p.a. da Sigma-Aldrich; e água com resistividade de 18 M Ω .cm, purificada em sistema Merck Millipore. O padrão analítico da anilina (99%) foi adquirido da Sigma-Aldrich.

Equipamentos

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a líquido sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu LC-20AT, com sistema de bomba quaternária, degaseificador da fase móvel, injetor automático, compartimento termostatizado para coluna cromatográfica e detector UV-visível com arranjo de diodos (DAD) da Shimadzu SPD20A. Foi utilizada uma coluna analítica em fase reserva Lichrospher[®]RPC18 de 250 mm x 4.6 mm (DI) x 5 μ m da Merck.

Método cromatográfico

Foi utilizada uma fase móvel com 30% de tampão fosfato pH 7,0 e 70% de metanol, empregada de modo isocrático com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹; volume de injeção de 100 μ L; temperatura do compartimento termostatizado da coluna de 30 °C; e detecção UV-visível em 230 nm.

Preparação da amostra

As amostras foram filtradas em membrana de celulose regenerada, porosidade de 0,45 μ m Chromafil[®] Xtra RC-45/25 da Phenomenex. As amostras foram oriundas de um reator anaeróbio em operação no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA-UFPE), em que se avaliava a influência de diferentes aceptores de elétrons na remoção de algumas aminas aromáticas de efluentes têxteis.

Validação da metodologia analítica

O método foi validado conforme preceitos brasileiros, da Resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003) e do documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2006). As figuras de mérito avaliadas foram seletividade, linearidade, limites de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão.

A seletividade do método foi avaliada pela comparação visual do pico do composto de interesse no cromatograma e do espectro UV-visível obtido com a análise cromatográfica das soluções do padrão analítico e das amostras reais de efluente têxtil. A linearidade foi determinada através da obtenção de curva de calibração ($n=3$) com concentrações de 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 e 1,2 mg.L⁻¹. A equação da reta foi determinada através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores de LD e LQ foram calculados matematicamente através dos parâmetros da curva analítica, utilizando os valores do desvio padrão do coeficiente linear da equação e o coeficiente angular da curva analítica, segundo as Eq. 1 e 2:

$$LD = 3,3 \frac{\Delta b}{a} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$LQ = 10 \frac{\Delta b}{a} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde Δb representa desvio padrão do coeficiente linear da equação e a o coeficiente angular da curva analítica.

A exatidão e precisão foram avaliadas pela análise de 7 amostras autênticas fortificadas com os padrões analíticos e comparação dos resultados quantitativos com os valores de referência certificados dos padrões analíticos. A exatidão foi avaliada em termos de recuperação e a precisão, pelo coeficiente de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra os cromatogramas da solução do padrão analítico da anilina (a) e de uma amostra real de efluente têxtil (b). No cromatograma da amostra (Figura 1b) é possível observar que o pico referente à anilina eluiu sem interferentes, o que pode ser comprovado inicialmente, pela sua similaridade com o cromatograma da solução padrão (Figura 1a). Além disso, é possível observar no cromatograma da amostra (Figura 1b) que o pico da anilina não foi afetado pelos componentes da matriz, tendo em vista que os tempos de retenção desses componentes são bem diferentes do composto de interesse. Esses resultados, somados aos espectros obtidos no sistema UV-visível (Figura 2), permitem afirmar que o método foi seletivo. Os espectros da anilina da solução padrão (Figura 2a) e da amostra real (Figura 2b) são muito parecidos, corroborando com a afirmação de que não houve coeluição entre a anilina e outros compostos.

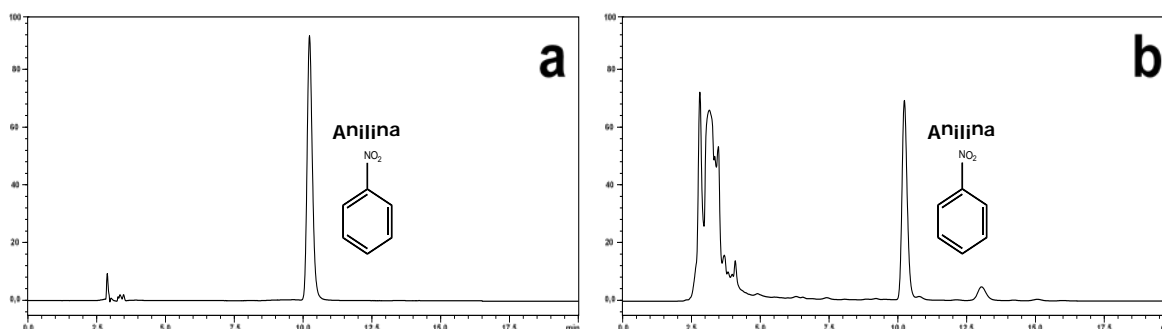


Figura 1. Cromatograma da: (a) solução padrão de anilina e (b) efluente de reator anaeróbio contendo anilina analisado com a coluna em fase reversa C18.

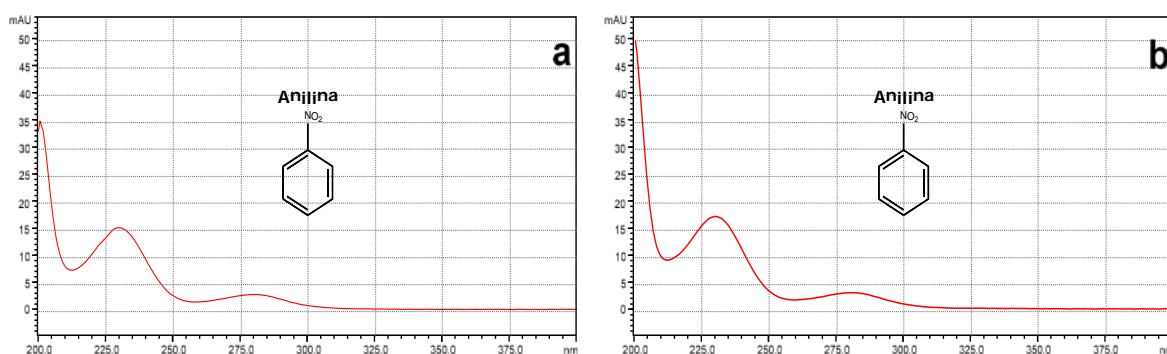


Figura 2. Espectro UV-visível da: (a) solução padrão de anilina e (b) efluente de reator anaeróbio contendo anilina analisado com a coluna em fase reversa C18.

A linearidade foi avaliada preparando-se uma curva de calibração em triplicata. O método apresentou linearidade no intervalo de 0,3 a 1,2 mg.L⁻¹ da anilina, evidenciado pelo coeficiente de correlação médio (n=3) maior que 0,99 (ANVISA, 2003 e INMETRO, 2006), como mostrado na Tabela 1. Os coeficientes angular e linear da equação da reta e suas variações também são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Linearidade da curva analítica e limites de detecção e quantificação do método

Parâmetros	Anilina
Inclinação da reta (a)	540073
Desvio padrão da inclinação da reta (S _a)	±8971
Intersecção da reta (b)	-9932
Desvio padrão da intersecção da reta (S _b)	±7255
Coeficiente de correlação ajustado (r ²)	0,9997
Faixa linear de trabalho (mg.L ⁻¹)	0,3 a 1,2
Limite de detecção (mg.L ⁻¹)	0,04
Limite de quantificação (mg.L ⁻¹)	0,13

O limite de detecção LD, que é a menor quantidade do analito detectado, e o limite de quantificação LQ, que é a menor quantidade do analito determinado com precisão e exatidão, foram 0,04 e 0,13 mg.L⁻¹, respectivamente. A exatidão e a precisão do método foram determinadas pela análise de 7 réplicas autênticas do ponto intermediário (0,7 mg.L⁻¹) da curva analítica, realizada pela fortificação da matriz com o padrão para esta concentração. A Tabela 2 mostra os níveis de recuperação do composto e precisão do método. Estes níveis são considerados mais que satisfatórios para matrizes complexas (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 2. Recuperação e precisão do método analítico

Exatidão (recuperação) (%)	Precisão (%)
97	±5

CONCLUSÕES

O método proposto para identificação e quantificação da anilina pela cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18, para amostras de efluente de indústria têxtil, foi devidamente validado segundo os critérios de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.

O método foi seletivo para a matriz estudada e apresentou linearidade na faixa de trabalho de 0,3 a 1,2 mg.L⁻¹. O limite de detecção e quantificação foram 0,04 e 0,13 mg.L⁻¹, respectivamente. O método apresentou boa precisão, uma vez que o valor do coeficiente de variação foi de apenas 5% e também apresentou boa exatidão (97%). Sendo assim, as condições operacionais adotadas para as análises cromatográficas se mostraram adequadas e válidas para a determinação quantitativa da anilina em amostras de efluentes de indústria têxtil.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento do Brasil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsas para realização das pesquisas neste tema aos pesquisadores do LSA-UFPE. Aos pós-graduandos Rhayssa de Brito Silva e José Roberto Santos de Carvalho, por cederem amostras de seus experimentos para realização dos testes de validação do método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIN, H., AMER, A., FECKY, A. E., IBRAHIM, L. Treatment of Textile Wastewater Using H₂O₂/UV Systems. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, v. 42, p. 17-28, 2008.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE nº 899 de 29/05/2003. Brasília (DF): Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
3. CHUNG, K.T.; FULK, G.E.; EGAN, M. Reduction of azo dyes by intestinal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, p. 558-562, 1978.
4. ESTADÃO, 2013. <https://economia.estadao.com.br/noticias/geral/agreste-tem-2-maior-polo-textil-do-pais-imp-981078>. Acessado em 20/09/2018.
5. FREITAS, D. M. S.; SILVA, L. G.; FONSECA, R. M.; OLIVEIRA, J. J. M.; GAVAZZA, S.; FLORENCIO, L.; KATO, M. T. Validação de método de cromatografia líquida para análise de ácido sulfanílico em efluentes têxteis. In: SIMPOSIUM LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 18., 2018, Porto.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização E Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Documento orientativo DOQ-CGCRE-008. 35p. 2006.
7. KORBATHI, B., TANYOLAÇ, A. Electrochemical Treatment of Simulated Textile Wastewater with Industrial Components and Levafix Blue CA Reactive Dye: Optimization Through Response Surface Methodology. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, p. 422-431, 2008.
8. ONG, S. TOORISAKA, E., HIRATA, M. HANO, T. Granular Activated Carbon-Biofilm Configured Sequencing Batch Reactor Treatment of C.I. Acid Orange 7. *Dyes and Pigments*, v. 76, p. 142-146, 2006.
9. PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L. Bacterial Decolorization and Degradation of Azo Dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 59, p. 73-84, 2007.
10. PEREIRA, R.; PEREIRA, L.; VAN DER ZEE, F.; MADALENA, A. M. Fate of aniline and sulfanilic acid in UASB bioreactors under denitrifying conditions. *Water Research*, v. 45, p. 191-200, 2011.
11. PREVOT, A.B.; FABBRI, D.; PRAMAURO, E.; BAIOCCHI, C.; MEDANA, C. High performance liquid chromatography coupled to ultraviolet diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of intermediates produced in the initial steps of the photocatalytic degradation of sulfonated azo dyes, *Journal of Chromatography A*, v. 1202, p.145-154, 2008.
12. RIBANI, M.; CARLA, B. G.; BOTTOLI, M.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, F. C. L. (2004) Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.
13. WEBER, E.; WOLFE, N.L. Kinetic studies of the reduction of aromatic AZO compounds in anaerobic sediment/water systems. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v.6, p. 911-919, 1987.