

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

VINÍCIUS PRAIA CARVALHO

**ESTUDO PARA IMPLANTAÇÃO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE DE BENZIDINA  
EM ÁGUA EM UMA EMPRESA DE ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO SUL**

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA

VINÍCIUS PRAIA CARVALHO

**ESTUDO PARA IMPLANTAÇÃO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE DE BENZIDINA  
EM ÁGUA EM UMA EMPRESA DE ANÁLISE AMBIENTAL DA REGIÃO SUL**

Monografia apresentada junto à atividade de ensino “Projeto tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof<sup>a</sup>. Leandra Franciscato Campo  
Orientadora

Porto Alegre, 2011

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	8
2	ESTADO DA ARTE.....	9
2.1	BENZIDINA .....	9
2.1.1	Contaminação .....	10
2.1.2	Toxicidade .....	11
2.2	CORANTES AZÓICOS.....	12
2.3	TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.....	13
2.4	CROMATOGRAFIA .....	14
2.4.1	Cromatografia Gasosa .....	14
2.4.2	Detectores para CG.....	15
2.5	DERIVATIZAÇÃO .....	16
3	SITUAÇÃO ATUAL.....	18
3.1	COMERCIALIZAÇÃO DOS CORANTES AZÓICOS.....	18
3.2	LEGISLAÇÃO ATUAL PARA BENZIDINA.....	18
3.3	TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DA BENZIDINA.....	19
3.3.1	Técnicas sem derivatização .....	19
3.3.2	Técnicas com derivatização.....	20
3.3.2.1	Sililação .....	20
3.3.2.2	Acilação .....	20
3.3.2.3	Halogenação .....	21
3.3.2.4	Alquilação.....	21
3.4	A EMPRESA.....	21
4	OBJETIVOS .....	24
5	PROPOSTA TECNOLÓGICA.....	25
6	METODOLOGIA .....	26
6.1	EQUIPAMENTOS .....	26
6.2	ANÁLISE SEM DERIVATIZAÇÃO.....	26

6.2.1	Análise da benzdina com solução tampão.....	26
6.2.2	Preparo das soluções.....	26
6.2.3	Preparação das amostras.....	27
6.2.4	Processo de Extração.....	27
6.2.5	Condições cromatográficas.....	27
6.3	ANÁLISE COM DERIVATIZAÇÃO.....	28
6.3.1	Preparo das soluções.....	28
6.3.2	Análise da Reação do Bromo como Derivatizante.....	28
6.3.3	Condições cromatográficas.....	29
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
7.1	TESTE DO PADRÃO.....	30
7.2	RESULTADOS PARA ANÁLISES DA EXTRAÇÃO SEM DERIVATIZAÇÃO..	31
7.2.1	Análise do padrão.....	31
7.2.2	Extração sem o uso do Tampão básico.....	32
7.2.3	Extração com o uso do Tampão básico.....	33
7.2.4	Análise do branco.....	34
7.2.5	Influência do Meio.....	35
7.3	RESULTADOS DA EXTRAÇÃO COM DERIVATIZAÇÃO.....	36
7.3.1	Análise da injeção do Padrão de benzdina.....	36
7.3.2	Análise das amostras derivatizadas.....	37
7.4	ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS.....	42
8	CONCLUSÃO.....	43
9	BIBLIOGRAFIA.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Primeira síntese da benzidina.....	9
Figura 2: Representação de molécula de benzidina no plano <i>xy</i> (a) e na rotação de 90° no eixo <i>x</i> (b).....	10
Figura 3: Formação dos metabólitos cancerígenos da benzidina no citocromo.....	11
Figura 4: Azo corante Direct Black 38.....	12
Figura 5: Redução dos corantes azóicos a aminas aromáticas. ....	13
Figura 6: Esquema de um analisador de quadrupolo para separação dos íons.....	16
Figura 7: Reação geral de Sililação.....	20
Figura 8: Reação geral de Acilação.....	20
Figura 9: Reação geral de halogenação.....	21
Figura 10: Reação geral de alquilação.....	21
Figura 11: Empresa Bioensaios Análise e Consultoria Ambiental. ....	23
Figura 12: Cromatograma do padrão injetado no modo de aquisição SCAN (A) e espectro de massas do mesmo (B). ....	30
Figura 13: Cromatograma do padrão injetado no modo de aquisição SIM.....	31
Figura 14: Cromatograma do pico do padrão no modo de aquisição SIM.....	32
Figura 15: Espectro de massas do banco de dados da biblioteca do equipamento.....	32
Figura 16: Cromatograma do extrato final da fortificada de benzidina de 1 ppm.....	33
Figura 17: Cromatograma do extrato da extração em meio alcalino da amostra fortificada....	34
Figura 18: Cromatograma do extrato da extração em meio alcalino da amostra não fortificada. .....	35
Figura 19: Equilíbrio da benzidina em meio aquoso.....	36
Figura 20: Cromatograma da análise do padrão de 5 ppm de benzidina.....	37
Figura 21: Cromatograma de extrato da amostra branco. ....	37
Figura 22: Efeito da ressonância por doação de elétrons. ....	38
Figura 23: Reação do bromo com a benzidina. ....	39
Figura 24: Cromatogramas da amostra fortificada derivatizada (A) e do branco (B).....	40
Figura 25: Cromatograma da benzidina bromada, pico 19 (A) e o espectro de massas correspondente (B). ....	41
Figura 26: Cromatograma da injeção do extrato da fortificada sem adição do bromo. ....	42

## AGRADECIMENTOS

À UFRGS, pelo ensino de qualidade.

À professora Leandra Campo pela grande ajuda e motivação durante o período de realização do trabalho.

A todos do laboratório K-208B que contribuíram com o meu crescimento científico no período em que estive lá atuando.

Aos chefes Andrea e Milton que me proporcionaram a oportunidade de trabalhar na Bioensaios e contribuíram positivamente para o meu crescimento profissional.

A todos os colaboradores da Bioensaio por fazer o meu cotidiano no trabalho mais feliz.

Ao grande amigo Cristiano Fávero, “O Casca”, por me ajudar desde o início da graduação até o último dia literalmente.

Aos colegas e amigos Adão, Kácris e Roberta pelo companheirismo desde 2005.

A todos os antigos e ainda amigos, Daniel, Eduardo R., Eduardo K., Lucas e o Thiago “Palito”.

A minha família, Praia, Prado e Carvalho, por grande parte da minha felicidade.

Aos meus Tios, que juntos com a “Dona Terezinha” e o “Seu Lênio”, ajudaram muito na minha educação e na formação do meu caráter.

A minha namorada Lidiane, por estar sempre ao meu lado e por todo carinho, amor e paixão.

Ao meu “Paidrasto” Cezar Prado, pelo carinho, pela paciência, incentivo e a ajuda em praticamente toda a minha vida.

A minha mãe, Patrícia Praia, por todas as alegrias que já obtive nessa vida, por sempre me incentivar nos estudos, por me educar, e, principalmente, por ser exemplo de uma boa pessoa.

## Lista de Abreviações

Cromatografia Gasosa	GC
Cromatografia Líquida	LC
Espectrômetro de Massas	EM
Detector de Captura de Elétrons	ECD
Detector de Ionização por Chama	FID
Limite de Quantificação	LQ
Limite de Detecção	LD
Parte por milhão	ppm
Cromatografia Líquida de Alta Performace	HPLC

# 1 INTRODUÇÃO

A benzidina é muito encontrada nas indústrias de produção de corantes destinada ao ramo de tintura para couro, papeis e têxteis; é uma amina aromática sintética usada como intermediária na preparação dos corantes azóicos, é considerada tóxica e cancerígena pelo os órgãos governamentais dos Estados Unidos<sup>1</sup>. A contaminação desse composto é muito encontrada em rios próximos de indústrias de produção de couro, têxteis e da indústria papelreira, acredita-se que boa parte de corantes são perdidos na tintura dos materiais por falta de fixação dos mesmos<sup>2</sup>.

Na natureza, esses corantes azóicos sofrem bio-transformação formando aminas, benzidinas e outros intermediários cancerígenos<sup>3</sup>; por sua alta afinidade com a água é facilmente dispersa em rios e efluentes. É conhecido que a exposição crônica desses compostos pode gerar câncer de bexiga em homens<sup>4</sup> e outros tumores<sup>1</sup>Erro! Indicador não definido..

Diferentes técnicas têm sido descritas para analisar a benzidina e outras aminas aromáticas em água com GC ou LC<sup>5,6,7</sup>, algumas com o uso da derivatização<sup>8,9,10</sup> do extrato. Dentro dos trabalhos sem derivatização se destaca uma metodologia usando a extração em meio alcalino<sup>11</sup>. O processo de derivatização modifica as moléculas visando obter melhores resoluções do pico cromatográfico. Um método de derivatização acessível é halogenação da amina aromática usando o bromo<sup>10</sup>, pois os reagentes necessários são de simples preparo e o processo de análise não apresenta grandes complexidades comparado a outros métodos de derivatização.

A discussão de qual método que melhor atende as condições e necessidades da empresa Bioensaios será o tema desse trabalho, que tem como finalidade implantar um novo método de análise de benzidina em água para a empresa.



## 2 ESTADO DA ARTE

### 2.1 BENZIDINA

A benzidina foi produzida em 1845 pela primeira vez, pela reação de redução do azobenzeno com sulfeto de amônio, produzindo o hidrazobenzeno que reagido com ácido sulfúrico e tratado com base forte forma a benzidina, conforme a Figura 1. Muitos métodos são usados para obter a benzidina comercialmente, o mais comum é a redução de nitrobenzeno com zinco e hidróxido de sódio; também pode ser produzido pela eletrólise do nitrobenzeno seguido de destilação; ou pela nitração do difenil seguido de redução com zinco em meio alcalino<sup>1</sup>.

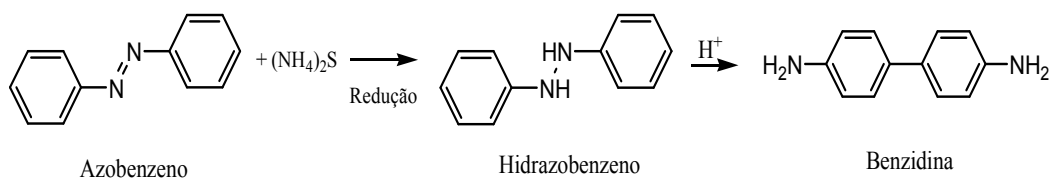


Figura 1: Primeira síntese da benzidina.

A Tabela 1 apresenta as propriedades físicas completas da benzidina<sup>12</sup>. Benzidina é um composto sintético que se apresenta como um sólido cristalino com baixa pressão de vapor decompõe-se a temperaturas maiores que 100°C formando produtos tóxicos como cianetos, dióxido de carbono, monóxido de carbono e óxidos nítricos.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da benzidina.

Fórmula molecular:	$C_{12}H_{12}N_2$
Sinônimos:	4,4'-Bianilina 4,4'-Diaminobifenil
Peso Molecular:	184,24 g/mol
Cor	Branco
Estado físico:	Pó cristalino
Ponto de fusão:	120°C
Ponto de ebulição:	401°C
Solubilidade em água (25°C):	520 mg/L
Pressão de vapor (25°C):	$7 \times 10^{-7}$ mmHg

A benzidina é uma molécula bifenílica planar sendo que o ângulo entre seus anéis aromáticos é de  $38^\circ$  e os grupos amino ficam na posição *trans* na sua forma mais estável como mostra a figura 2<sup>13</sup>.

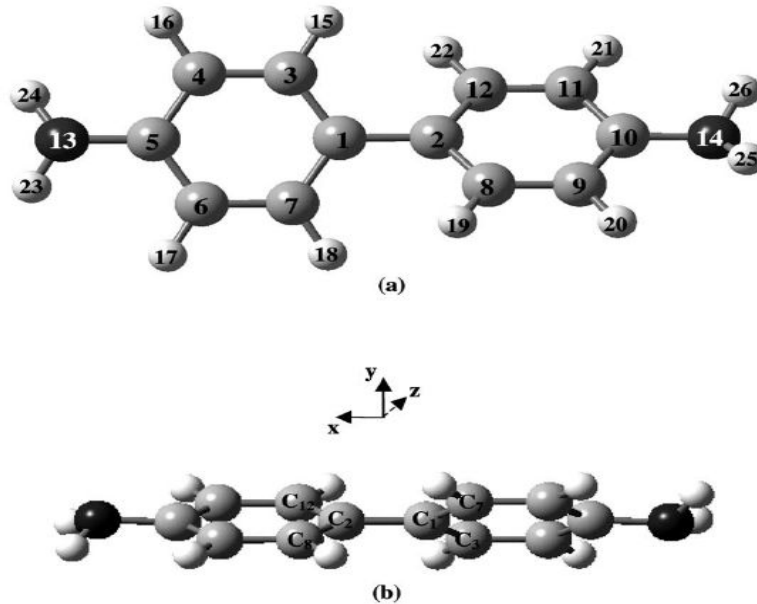


Figura 2: Representação de molécula de benzidina no plano  $xy$  (a) e na rotação de  $90^\circ$  no eixo  $x$  (b).

### 2.1.1 Contaminação

Na contaminação do ar atmosférico, a benzidina é encontrada em partículas e vapores, as partículas são dispersas no ar e com a chuva contamina solos e ambientes aquáticos; os vapores, por sua vez, reagem rapidamente fotoquimicamente gerando radicais hidróxidos aumentando o transporte no ambiente. Sendo a constante da Lei de Henry para a benzidina de  $5,2 \times 10^{-11}$  atm m<sup>3</sup>/mol, pequenas quantidades contaminantes deste corante são oriundas da sua volatilização de solos ou águas<sup>1</sup>.

Em sistema água e solo, ela pode ser adsorvida por solos e sedimentos, baseado no coeficiente de partição do octanol-água ( $K_{oa}$ ) que é de 21,9, a benzidina apresentou um coeficiente de partição de 10,5, isso implica que a benzidina é muito móvel em um sistema de solo-água. A interação com solo pode variar com a variação do pH, em caso de solos ácidos a forma protonada da benzidina é predominante, aumentando a força da ligação nos sítios catiônicos do solo. Em solos húmicos ela forma uma ligação covalente com o material orgânico, a reação envolve a formação de uma imina entre o grupo amino da benzidina e o grupo carbonila do solo húmico, essa reação é reversível; porém a benzidina pode formar uma

ligação irreversível, ou levemente reversível, neste caso a ligação ocorre devido a uma reação de substituição nucleofílica com a quinona residual na matriz solo Erro! Indicador não definido.

## 2.1.2 Toxicidade

Vários órgãos governamentais americanos como, por exemplo, o *Environmental Protection Agency* (EPA), por meio de estudos, declara a benzidina como cancerígena e tóxica. Nenhum estudo demonstrou morte de humanos por inalação de benzidina, porém vários artigos relataram a ocorrência de câncer de bexiga em homens que tiveram exposição crônica desse composto e seus derivados. Em um estudo, trabalhadores expostos por inalação a benzidina, ou corantes azóicos, por um período de 15 anos, foram comparados com homens que nunca foram expostos a aminas aromáticas, o resultado mostrou um aumento significativo de cromossomos que sofreram mutações; a concentração que esses trabalhadores eram expostos é de 0,42-0,86 mg/m<sup>3</sup> de benzidina, ou 7,8-32,3 mg/m<sup>3</sup> de corantes azóicos feitos de benzidina, na urina desses homens foram encontrado 1,8-2,3 µg/L de benzidina, valores muito elevados. Outros estudos feitos com animais evidenciaram efeitos cardiovasculares, hepáticos, hematológicos, renais e vários tumores, por exposição à benzidina<sup>1,12</sup>.

O potencial cancerígeno das aminas aromáticas é devido à formação de seus reativos metabólitos eletróficos, esses metabólitos são formados no citocromo onde ocorrem reações com o acetil-coa, depois de formado eles se ligam covalentemente ao DNA gerando o efeito tóxico e possivelmente mutagênico<sup>4</sup>, exemplos de metabólitos eletróficos estão presentes na Figura 3.

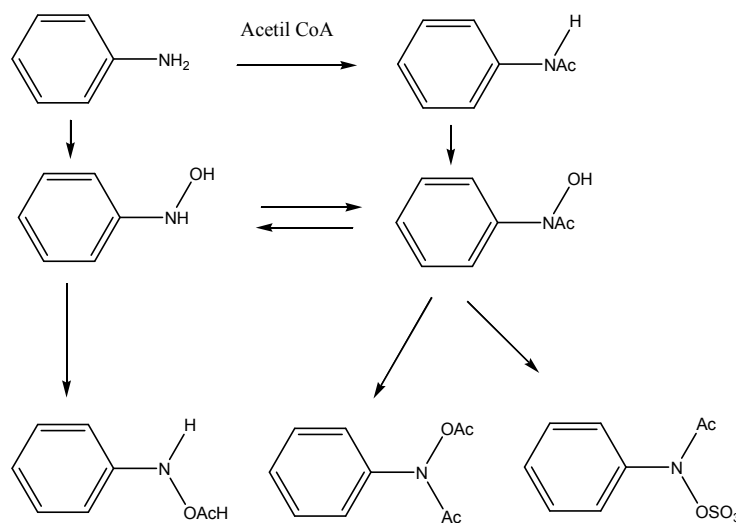


Figura 3: Formação dos metabólitos cancerígenos da benzidina no citocromo.

## 2.2 CORANTES AZÓICOS

O principal destino da benzidina é na produção de corantes azóicos, ela serve como intermediário na sua produção. Um azo-corante se caracteriza por apresentar um, ou mais, grupamentos -N=N- ligados no sistema aromático do seu grupo cromóforo. Os corantes em geral podem ser classificados pela forma de fixação com a fibra, podendo ser: ácido, direto, básico, enxofre e reativos. Os reativos são os mais usados em nível mundial, eles formam ligações covalentes com as fibras, podendo ser utilizados no tingimento de fibras celulósicas, fornecendo boas características de tingimento, solidez e estabilidade química ao material<sup>2</sup>.

Um exemplo de corante a base de benzidina é o *Direct Black 38* (Figura 4), e possui um grande potencial econômico. Na lista da *Colour Index* (1987) dos mais de 2000 corantes azóicos presentes, 447 tem como base na preparação 2-Naftilamina, benzidina e derivados de benzidina<sup>14</sup>.

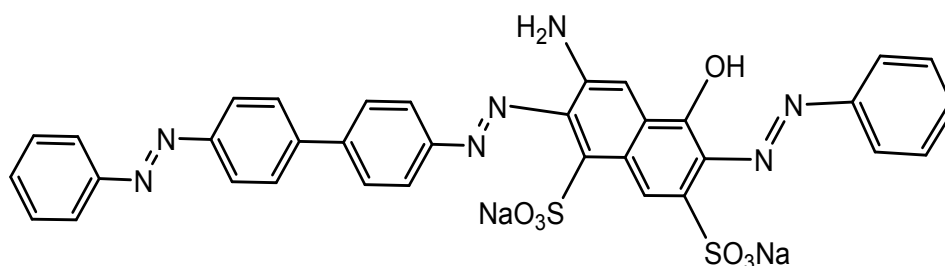


Figura 4: Azo corante Direct Black 38.

Os corantes azóicos são degradados na natureza por enzimas catalíticas, que realizam reações de oxidação, hidrólise, conjugação e redução; essa última é dita como a principal para clivar a ligação azo do corante, gerando a benzidina e outras aminas aromáticas<sup>3,5</sup>. Os corantes, em geral, produzem além da poluição visual, alterações em ciclos biológicos que podem afetar principalmente os processos de fotossíntese<sup>2</sup>.

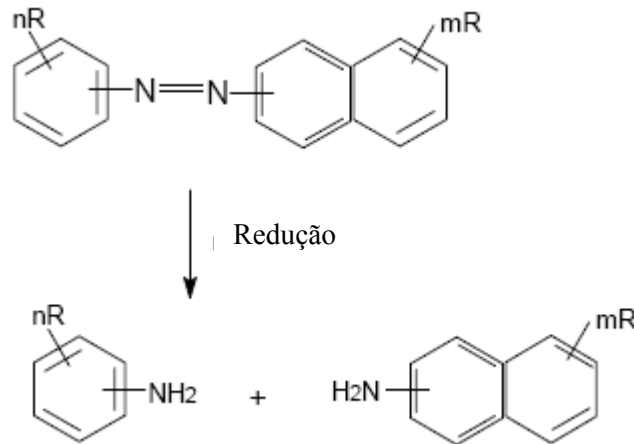


Figura 5: Redução dos corantes azóicos a aminas aromáticas.

### 2.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Atualmente, as técnicas de tratamento de efluentes das industriais têxteis são técnicas físicas, em que processos de coagulação, seguidas de sedimentação ou flotação são eficientes na remoção de material particulado. Outro processo comum é o combinado de processos físico-químicos seguido do tratamento biológico de lodos ativados, que consiste na agitação do efluente com microorganismos na presença de ar, formando uma grande quantidade de material orgânico. O processo é relativamente efetivo, consegue remover 80% das cargas dos corantes, porém o processo é não destrutivo, acumulando grandes quantidades de lodo que não possui utilidade de reaproveitamento<sup>2</sup>.

O tratamento dos efluentes com ozônio é muito atrativo para a degradação de corante e azocorantes; o ozônio é um poderoso agente oxidante que pode reagir com os poluentes por duas vias, oxidação direta ou indireta, na primeira o ozônio ataca as moléculas orgânicas via adição eletrofílica, que pode acontecer em átomos com densidade de carga negativa, ou em ligações duplas ou triplas. Na via indireta, o agente oxidante é o radical hidroxila formado da decomposição do ozônio que reage com as moléculas. Como os corantes, geralmente, são compostos conjugados e ricos em ligações insaturadas, logo essas ligações são facilmente clivadas pelo o ozônio produzindo moléculas menores, por esse motivo pode ocorrer a diminuição da coloração de um efluente contaminado<sup>2</sup>.

Muitos estudos relatam o tratamento dos efluentes com microorganismos visando a biodegradação dos corantes por clivagem da ligação azo, porém poucos sistemas conseguem a eliminação das aminas aromáticas formadas por essa reação<sup>2</sup>.

Em um trabalho recente mostrou-se efetivo na oxidação e remoção dos compostos orgânicos dos efluentes industriais usando o sistema catalítico CWPO (*Catalytic Wet Peroxide Oxidation*) combinado com carvão ativado; esse sistema usa o peróxido para oxidar, e é mais potente do que composto isolado<sup>15</sup>; a remoção foi de 93% dos corantes do efluente<sup>16</sup>.

## 2.4 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um grupo de métodos que permite separar compostos semelhantes de uma mistura complexa. A semelhança entre todas as análises cromatográficas é que a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, líquido ou um fluido supercrítico; e a fase móvel passa por uma fase estacionária que interage com os compostos da amostra. Os componentes que interagem mais com a fase estacionária ficam mais tempo na coluna, cada composto é diferentemente interagida com a fase estacionária, essa diferença na interação com fase estacionária é que faz os componentes da amostra se separarem, e, assim, podendo ser analisados qualitativamente e quantitativamente<sup>17</sup>.

### 2.4.1 Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa tem como fase móvel um gás, inerte, para não interagir com os compostos da amostra e sim para apenas transportar os analitos pela coluna. Existem dois tipos de cromatografia gasosa: Cromatografia gás-sólido e Cromatografia gás-líquido.

A cromatografia gás-líquido tem uma extensa aplicação em várias áreas da ciência, por isso seu nome foi reduzido para apenas cromatografia gasosa. Ela se baseia na partição do analito entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida, imobilizada na superfície de um sólido inerte, criando de certa forma um equilíbrio entre o analito e as fases; esse equilíbrio é conhecido como prato teórico. A denominação de pratos teóricos é uma analogia feita a partir do processo de destilação para a cromatografia, é um tanto infeliz, pois na coluna cromatográfica não existem pratos com condições de equilíbrio, já que o equilíbrio não pode ser atingido com uma fase móvel em movimento constante. A amostra antes de entrar na coluna é vaporizada para facilitar o transporte da amostra<sup>17</sup>.

## 2.4.2 Detectores para CG

Vários tipos de detectores estão disponíveis para detectar os compostos da cromatografia gasosa, o detector é escolhido de acordo com a espécie a ser analisada. Algumas características importantes desses detectores são<sup>17</sup>:

- Boa estabilidade e reprodutibilidade;
- Uma resposta linear para os solutos em variável faixa linear;
- Uma ampla faixa de temperatura de análise, preferencialmente que abranja de 25°C até 400°C;
- Resposta rápida independente da vazão;
- Alta confiabilidade e de fácil utilização;
- Similaridade na resposta para todos os solutos;
- Não destruir a amostra.

Ainda não foi encontrado um detector que atenda todas essas características, e pouco provável que isto venha acontecer. Tipos de detectores mais usados em cromatografia gasosa são:

**-Detector de Ionização de Chama:** é um dos mais aplicáveis em cromatografia gasosa. O princípio desse detector é a geração de íons dos analitos quando pirolisados em uma chama de ar e hidrogênio. Os íons produzem corrente através da chama, e um potencial é aplicado na ponta do queimador e de um eletrodo coletor localizado acima da chama, logo a corrente resultante é dirigida para um amplificador operacional<sup>17</sup>.

**-Detector de Condutividade Térmica:** o princípio está na variação da condutividade térmica de uma fluxo gasoso que carrega os analitos, que passa pelo um elemento sensível; que pode ser um fio fino de ouro, platina, tungstênio, ou um termistor semiconductor; a resistência desse elemento fornece uma medida da condutividade do gás<sup>17</sup>.

**-Detector de Captura de Elétrons:** opera do mesmo modo que um contador proporcional de radiação X, o efluente passa sobre um emissor de radiação  $\beta$ , geralmente Níquel-63, o elétron do emissor provoca ionização do gás de arraste, na ausência de algum composto orgânico a ionização resulta numa corrente constante entre os pares de eletrodos. Quando uma molécula orgânica, que tenha facilidade para capturar o elétron, passa por essa radiação, acontece uma diminuição da corrente entre os eletrodos. A técnica é muito sensível para moléculas que tenham grupos funcionais eletronegativos, como os halogênios, peróxidos, quinonas e grupos nitros<sup>17</sup>.

**-Espectrômetro de Massas (EM):** os analitos quando saem da coluna são atomizados e convertidos em um feixe de íons, os íons, em movimento, são separados pelo espectrômetro de massas baseado em uma razão de massa e carga ( $m/z$ ). As moléculas são ionizadas por impacto eletrônico ou por ionização química. Na ionização por impacto eletrônico, um vapor molecular da amostra recebe um bombardeio de elétrons energéticos produzindo íons positivos. Na ionização química, os átomos gasosos da amostra são ionizados por uma colisão com os íons formados por bombardeio eletrônico de um excesso de um gás reagente. Os tipos mais usados de espectrômetro de massas mais usados são: Quadrupolo (ver Figura 6<sup>18</sup>), Dupla Focalização e o Tempo de Vôo<sup>17</sup>.

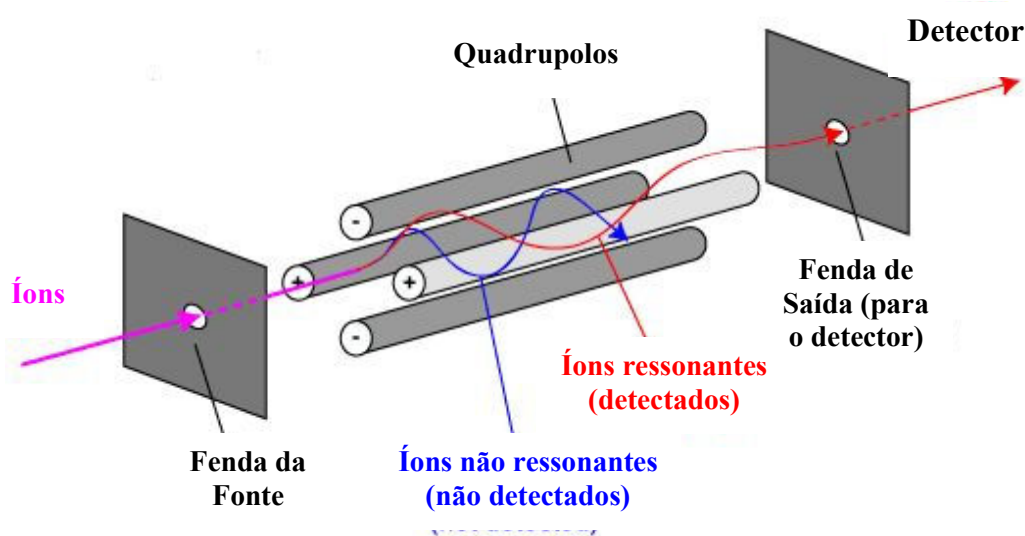


Figura 6: Esquema de um analisador de quadrupolo para separação dos íons.

## 2.5 DERIVATIZAÇÃO

A derivatização é um processo para modificar quimicamente uma molécula alterando sua estrutura e suas propriedades químicas. Essa técnica é muito utilizada para melhorar as análises cromatográficas, modificando: a polaridade da molécula, a sensibilidade da análise, o tempo de retenção, estabilidade do composto, entre outros benefícios. Podemos citar como pontos negativos a produção de derivados não desejados e uma etapa a mais na análise<sup>6</sup>.

As reações de derivatizações são extremamente seletivas para aminas primárias, secundárias e terciárias; e aumentam a detecção e a separação dessas aminas. Muitos reagentes de derivatização são empregados não só apenas para modificar quimicamente a molécula, mas também, direcionar para uma técnica específica de análise, como por exemplo:



os reagentes de silício melhoram as condições de análise para cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas; ou o benzaldeído que reage com aminas primárias formando derivados que são melhores detectáveis no detector de ionização na chama do que as aminas quando não derivatizadas<sup>6</sup>.

A molécula de amina derivada resultante pode variar devido ao tipo de amina e o tipo de reagente derivatizante utilizado.

### 3 SITUAÇÃO ATUAL

#### 3.1 COMERCIALIZAÇÃO DOS CORANTES AZÓICOS

A comercialização de corantes a base de benzidina está diminuindo em nível mundial, nos Estados Unidos a produção desses corantes terminou em 1973<sup>1</sup>. Nos países subdesenvolvidos ainda são comercializados corantes a base de benzidina, entretanto, no início de 2005, a União Européia entrou com uma diretriz, estabelecendo limites na entrada de artigos de couro e têxteis tingidos com corantes azóicos, que possam liberar aminas aromáticas em concentrações maiores do que 30 ppm<sup>19</sup>. As empresas que assinaram essa diretriz são:

- A Chimical S.A;
- Bann Química Ltda;
- BASF S.A.;
- Brancotex Inds. Quims. Ltda;
- Ciba Esp Quims Ltda;
- Inpal S.A. Inds Químicas;
- Clariant S.A;
- Cleomar Química Ind. Com. Ltda;
- DyStar Ltda;
- Enia Inds. Químicas S.A.;
- Lanxess.

Isso fez com que a indústria coureira e têxtil que usam os corantes azóicos na fase de acabamento de seus produtos, aumente o controle sobre os seus fornecedores de corantes, para que não contenha corantes azóicos<sup>19</sup>.

#### 3.2 LEGISLAÇÃO ATUAL PARA BENZIDINA

A Bioensaios, uma empresa que atua em análise ambiental, recebe amostras para a análise de benzidina que o Conselho Nacional do Meio-Ambiente (CONAMA) classifica da seguinte maneira:

- Águas doces: águas com salinidade igual ou inferior a 0,5 %;
- Águas salobras: águas com salinidade superior a 0,5 % e inferior a 30 %;
- Águas salinas: águas com salinidade igual ou superior a 30 %.

Sendo assim, o valor máximo permitido de benzidina em água doce destinada ao consumo humano e recreação de contato primário é de 0,001 µg/L, e para água doce, salinas e salobras que exista pesca ou cultivo de organismo para fins de consumo humano é de 0,0002 µg/L<sup>20</sup>.

### 3.3 TÉCNICAS PARA DETECÇÃO DA BENZIDINA

#### 3.3.1 Técnicas sem derivatização

Muitas técnicas existentes para determinação da benzidina em água conseguem obter baixos limites de detecção. As técnicas que se destacam em detectar baixos níveis de benzidina sem derivatização são em cromatografia líquida de alta performance acoplada com detector de ultravioleta-visível<sup>21</sup>. Aminas aromáticas foram detectadas com limites de detecção de até 0,05 ng/L com o uso da cromatografia líquida de alta performance/EM e para a benzidina, este limite foi de 0,013 ng/L e a recuperação dos analitos foi maior do que 95%<sup>7</sup>. Neste trabalho, os analitos foram extraídos em fase sólida, porém, alguns trabalhos demonstram que não conseguem os mesmos resultados com uma extração líquido-líquido<sup>21</sup>.

Num trabalho recente<sup>11</sup>, foram apresentados bons resultados para detecção de benzidina sem o uso de derivatização. Na validação do método de análise a extração usada foi do tipo líquido-líquido com a adição de uma solução tampão de pH 9,5, a extração foi realizada com diclorometano, após o extrato foi concentrado e injetado no Cromatógrafo Gasoso/ EM. A recuperação foi de 82% e o limite de quantificação foi de 0,008 mg/L.

### 3.3.2 Técnicas com derivatização

#### 3.3.2.1 Sililação

Em métodos de cromatografia gasosa é comum o emprego de técnicas de derivatização para conseguir melhor resolução do pico cromatográfico. A sililação é uma das técnicas mais simples e rápida de derivatização para cromatografia a gás, ela bloqueia os sítios próticos das amins aromáticas, diminuindo a interação dipolo-dipolo entre as moléculas, com isso aumenta a volatilidade dessas moléculas. Porém, essa técnica é menos usada em cromatografia gasosa, pois seus derivados possuem uma instabilidade hidrolítica e alta atividade doadora do grupo silil formado<sup>8</sup>.

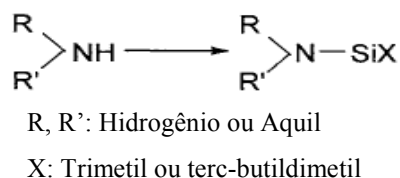


Figura 7: Reação geral de Sililação.

#### 3.3.2.2 Acilação

A acilação das amins primárias e secundárias é o método mais usado para análises de cromatografia gasosa, pois a adição do grupo acila aumenta a volatilidade, mobilidade cromatográfica e a estabilidade da molécula. Os reagentes de acilação podem ser os anidridos ácidos, haletos de acila e acil amidas, esses reagentes reagem facilmente com a amina em condições moderadas de reação<sup>8</sup>.

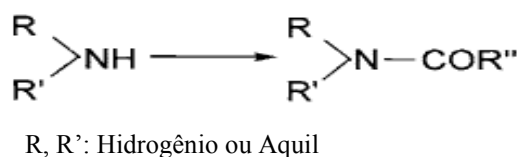
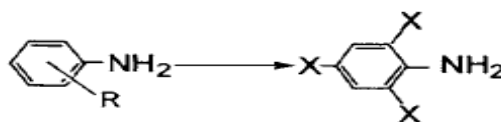


Figura 8: Reação geral de Acilação.

### 3.3.2.3 Halogenação

Na reação de halogenação, as posições *orto* e *para* desimpedidas da amina aromática são atacadas via substituição eletrofílica. O bromo reage facilmente com a amina aromática e seus derivados são de simples extração e separação para cromatografia gasosa<sup>8</sup>.



X: Halogênios

R: Hidrogênio ou Aquil

Figura 9: Reação geral de halogenação.

### 3.3.2.4 Alquilação

Alquilação é a entrada de um grupo alquila no lugar do hidrogênio da amina, diminuindo a polaridade da molécula. A alquilação de uma amina primária gera uma amina secundária, de uma amina secundária, uma amina terciária. O grupo de reagentes de alquilação mais usados são os aldeídos/ borohidreto de sódio; para analisar anfetaminas é usada a derivatização com propanal/borohidreto de sódio para formar N-propil derivados<sup>8</sup>.



Figura 10: Reação geral de alquilação.

## 3.4 A EMPRESA

Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental é um laboratório analítico que atua no mercado desde 1990, realizando análises e estudos de: água, solos, sedimentos, resíduos, alimentos, meio ambiente e produtos para as áreas de: Agronegócios, Agroquímicos, Meio Ambiente, *Reach* e Saneantes. Inicialmente os serviços se consolidaram nas áreas de avaliação da periculosidade de produtos agroquímicos e outros, de monitoramento de águas,

de resíduos sólidos, de meio ambiente através do setor de ecotoxicidade, expandindo suas atividades para físico-química e química orgânica<sup>22</sup>. Hoje a empresa possui:

- Laboratório Ambiental
- Laboratório de Química Orgânica;
- Laboratório de Físico-Químico;
- Laboratório de Microbiológico
- Laboratório de Toxicologia;
- Laboratório de Ecotoxicidade;
- Laboratório de Radioisótopo.

A garantia da qualidade é uma importante estratégia para o sucesso da empresa, a capacitação das melhorias dos processos é constante e existe alto investimento em equipamentos modernos. Algumas das certificações nacionais mais relevantes que a empresa possui são: INMETRO (ISSO/IEC 17025:2005), REBLAS/ANVISA (Certificado ANALI 017 em boas práticas de laboratório) e MAPA (Portaria N° 36 e N° 37 para formulações e resíduos de agrotóxicos). Possui, também, certificações internacionais, como, por exemplo: **SFOPH** (Autoridade Suíça em BPL) e **SENAVE** – (*Servicio Nacional de Qualidade de Alimentos Agrícolas – Paraguai*)<sup>22</sup>.

A Bioensaios esta localizada no Bairro Santa Isabel na cidade de Viamão-RS, a sede tem uma área de 1.200 m<sup>2</sup> e conta com uma equipe de funcionários de 50 colaboradores em níveis de doutores, mestres, graduados, técnicos, estagiários e ensino básico<sup>22</sup>.

Os métodos desenvolvidos para a empresa devem atender as seguintes adequações:

- Necessitar de reagentes e equipamentos disponíveis na empresa;
- Reprodutibilidade;
- Baixa complexidade na execução;
- Tempo compatível com a rotina de trabalho;
- Atender os limites de quantificação para análise.



Figura 11: Empresa Bioensaíós Análise e Consultoria Ambiental.

## **4 OBJETIVOS**

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar dois métodos de análise de benzidina em água, sem a derivatização e com o uso de derivatização, com o intuito de verificar qual se aplica com maior eficiência para fazer parte do escopo de análises da empresa Bioensaios Análise e Consultoria Ambiental.



## 5 PROPOSTA TECNOLÓGICA

A proposta tecnológica desse trabalho é avaliar um método de análise para a benzidina em água dentro da empresa, visando à implantação do mesmo. A empresa Bioensaios possui uma carência de métodos usados para analisar a benzidina em água, visto isso, o presente trabalho poderá ajudar a empresa nesse ponto.

A escolha do método sem derivatização e com a extração em meio básico<sup>11</sup> foi por causa da sua simplicidade de análise e pela semelhança com os outros métodos já existentes na Bioensaios. Métodos usando a extração em fase-sólida e o HPLC para análise de benzidina em efluentes industriais<sup>7</sup> também atendem as necessidades da empresa, porém, nesse momento para a Bioensaios, é mais interessante usar métodos que envolvam análises no GC / EM. O baixo custo envolvido e o curto tempo para realizar o método sem derivatização também foram fatores importantes na escolha dele.

A procura para a realização de métodos com derivatização foi visando uma futura necessidade da empresa em alcançar níveis mais baixos de detecção da benzidina. A escolha da halogenação da benzidina com o bromo foi devido a sua maior simplicidade comparado com os outros métodos com derivatização pesquisados na literatura. A solução derivatizante do bromo é um reagente de simples preparo e possui uma elevada reatividade com aminas aromáticas em condições brandas de reação<sup>Erro! Indicador não definido.23</sup>. O artigo usado como referência conseguiu o limite de detecção para a benzidina de 390 µg/L com recuperação de 96 % no GC / EM, usando o ECD obtiveram melhores resultados, 29 µg/L de limite de detecção e 96 % de recuperação<sup>10</sup>.

Um método que envolvia a análise em níveis traço da benzidina usando a silição na derivatização foi cogitado para ser testado na Bioensaios, os limites obtido nesse trabalho foram de 0,004 µg/L com recuperação de aproximadamente de 102 %<sup>9</sup>, entretanto esse método exigia o uso de reagentes de difícil acesso para a empresa, a complexidade e o tempo envolvido na análise completa foram fatores influentes para descartar a realização desse teste.

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 EQUIPAMENTOS

O cromatógrafo gasoso usado é GC 2010 acoplado a um espectrômetro de massas QP2010-Plus da marca Shimadzu. A ionização empregada é por Impacto Eletrônico (EI) com 70 eV, o espectrômetro é do tipo quadrupolo. A coluna é uma OV-5ms (30m x 0,25mm x 0,25µm) que tem recheio de 5 % de difenil e 95 % dimetilpolisiloxano. O gás de arraste usado é o hélio.

O concentrador usado é um multi-vapor Syncore da marca Buchi, que possui controle de programação para pressão e temperatura.

Todos os equipamentos e reagentes usados pertencem a Bioensaios, com a exceção da solução de Bromo, que foi cedida e preparada pela Professora Leandra Campo da UFRGS.

### 6.2 ANÁLISE SEM DERIVATIZAÇÃO

#### 6.2.1 Análise da benzidina com solução tampão

Na análise de benzidina em água com solução tampão básica foi avaliada a técnica apresentada na dissertação de mestrado<sup>11</sup> com algumas modificações para adaptar o método na empresa Bioensaios, as alterações foram:

- Coluna cromatográfica
- Solução Tampão Utilizada
- Cromatógrafo Gasoso

#### 6.2.2 Preparo das soluções

A solução tampão usada foi a Solução Tampão de Kolthoff, é preparada pela adição de 50 mL de solução de carbonato de sódio 0,1 M, 10 mL de solução de ácido clorídrico aquoso 0,1 M e 40 mL de água destilada<sup>24</sup>.

A solução padrão de benzidina foi preparada a partir da diluição do Padrão de Benzidina de 100 ppm da marca Dr. Ehrenstorfer em metanol.

### **6.2.3 Preparação das amostras**

Quatro amostras com 1L de água ultra pura Mili-Q foram fortificadas com 1 mL de uma solução padrão de benzidina com concentração de 1 ppm e uma amostra não foi fortificada para servir de branco. Para analisar a importância do meio alcalino na análise foi adicionado, após as fortificações, 100 mL de uma solução tampão de pH 10,50 em duas das quatro amostras fortificadas e no branco.

### **6.2.4 Processo de Extração**

A extração utilizada foi a extração líquido-líquido em funil de separação de 1L com diclorometano, 60 mL de diclorometano foi adicionado, agitou-se manualmente por 2 minutos a mistura despressurizando o sistema, repousar até a separação das fases e recolher a fase orgânica, neste caso a mais densa. A fase orgânica é filtrada com sulfato de sódio para diminuir a umidade do extrato. Esse processo é repetido mais 2 vezes para cada amostra. Após, o extrato é recolhido e concentrado a 1 mL em um multi concentrador com controle de temperatura e agitação mecânica. Enfim, o concentrado passa por um filtro antes de ir para a análise cromatográfica.

### **6.2.5 Condições cromatográficas**

As condições cromatográficas e espectrométricas programadas para analisar essas amostras foram:

- Temperatura do injetor: 290°C
- Temperatura do detector: 290°C
- Fluxo: 1 mL/min
- Splitless

- Programa de aquecimento no forno: 135° (5min) - 15°C/min - 210°C (10min) – 30°C/min – 320°C (10 min)
- Modo de aquisição: SIM, íons monitorados (m/z): 184, 183, 92.

## 6.3 ANÁLISE COM DERIVATIZAÇÃO

### 6.3.1 Preparo das soluções

A solução de bromo em ácido acético (1:4 v/v) foi preparada pela a diluição de 10 mL de Bromo em 40 mL de ácido acético.

A solução padrão de benzidina foi preparada a partir da diluição do Padrão de Benzidina de 100 ppm da marca Dr. Ehrenstorfer em metanol.

### 6.3.2 Análise da Reação do Bromo como Derivatizante

A reação foi avaliada conforme as condições otimizadas na referência<sup>10</sup>. Nesta parte não foi verificado a qualidade da extração da benzidina da água, e sim a formação do derivado bromado da amina aromática. Visto isso, o procedimento foi o seguinte: 1 mL de uma solução padrão de benzidina de 5 ppm foi diluída em 3 mL de ácido acético, 0,25 mL da solução de bromo em ácido acético (1:4 v/v) e essa solução foi agitada manualmente por 3 minutos a temperatura ambiente. A solução permaneceu em repouso por 15 minutos para completar a reação. Para terminar a reação e eliminar o excesso de bromo adicionou-se 0,75 mL de uma solução saturada de sulfito de sódio e o meio foi basificado com 6 mL de hidróxido de sódio 10 M até adquirir pH de 14 aproximadamente. Para a extração usou-se 3 mL de diclorometano numa extração líquido-líquido, essa etapa foi repetida mais duas vezes, o extrato foi concentrado a 1 mL para injeção cromatográfica. Uma amostra branco sem a benzidina foi feita para a verificação de contaminação nas amostras.

### 6.3.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas e espectrométricas programadas para analisar essas amostras foram:

- Temperatura do injetor: 250°C
- Temperatura do detector: 280°C
- Fluxo: 1 mL/min
- Splitless
- Programa de aquecimento no forno: 60° (2min) - 5°C/min - 180°C – 15°C/min – 280°C (15 min)
- Modo de aquisição: SIM, íons monitorados (m/z): 170, 340, 259, 184, 92.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 TESTE DO PADRÃO

Primeiramente foi testada a análise apenas do padrão em metanol, sem nenhum tratamento, no modo de aquisição SCAN; este modo é usado para obter o espectro de massas do composto, para isso se faz uma varredura entre pontos de massa preestabelecidos que, no caso presente, foi de 40 a 400  $m/z$ . A relação massa / carga ( $m/z$ ) é obtida pela razão da massa atômica ou molecular  $m$  de um íon pela carga  $z$  que esse íon possui<sup>17</sup>.

Na injeção no modo SCAN do padrão de benzidina em metanol com concentrações de 1, 10, 20, 40 ppm não apareceu o pico de interesse no cromatograma. Apenas com a concentração de 100 ppm o cromatograma apresentou o sinal de benzidina (Figura 12A), este sinal encontrado não tem boa resolução pois possui uma base muito larga do pico.

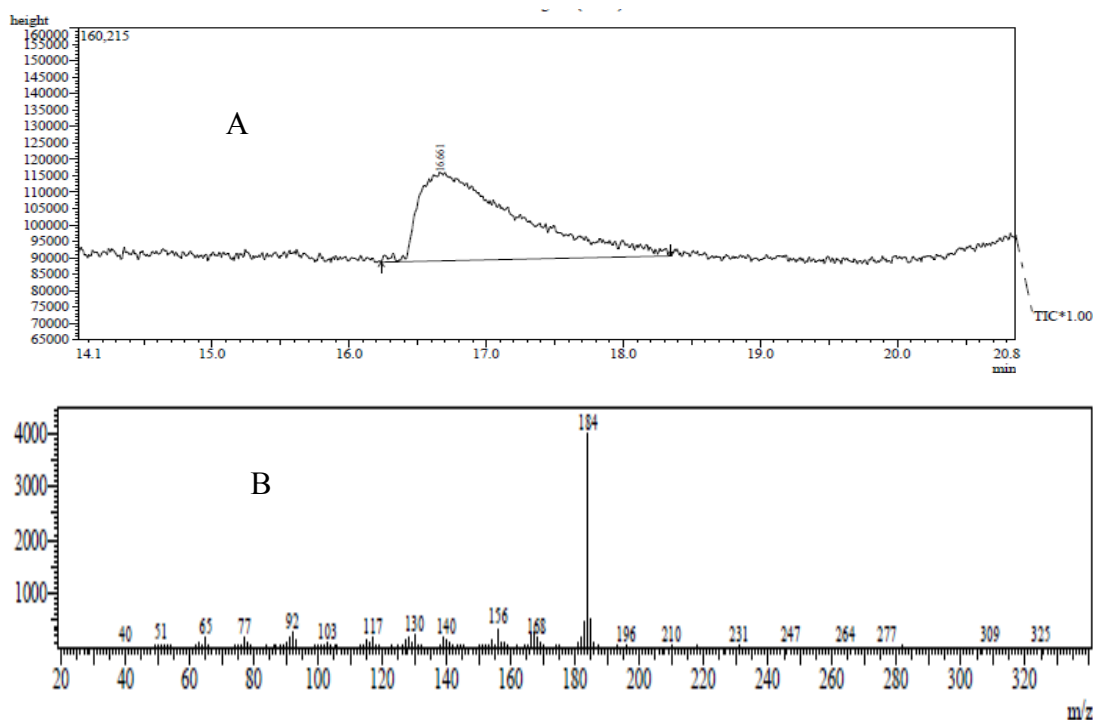


Figura 12: Cromatograma do padrão de 100 ppm analisado no modo SCAN (A) e espectro de massas do mesmo (B).

Já no modo de aquisição SIM a resolução é melhor, os padrões injetados apareceram com uma base menor do pico (figura 13), a área do pico referente à concentração de 20 ppm foi de 2174177 unidades no tempo de retenção de 16,19 minutos.

No modo SIM, o operador escolhe quais massas para monitorar, o equipamento ganha muito em sensibilidade, isso acontece devido ao tempo maior que os íons têm para serem monitorados, geralmente os íons escolhidos para ser monitorados são os  $m/z$  característicos da molécula a ser analisada. Os íons monitorados foram 184, 183 e 92. Geralmente para análise são monitorados dois íons, um para quantificar (mais intenso) e outro para identificar.

As condições cromatográficas desses cromatogramas foram as mesmas usadas para analisar a extração da benzidina em meio básico. Foi testada a injeção do padrão com as condições do método da análise da benzidina derivatizada, o resultado foi positivo, porém o pico teve menor intensidade comparada com do outro método citado.

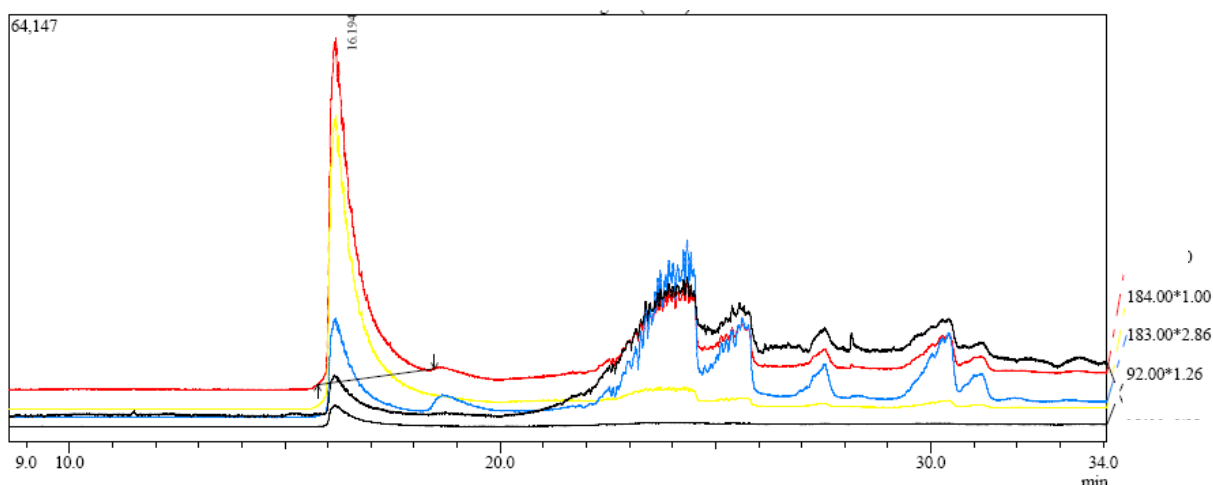


Figura 13: Cromatograma do padrão injetado no modo de aquisição SIM.

## 7.2 RESULTADOS PARA ANÁLISES DA EXTRAÇÃO SEM DERIVATIZAÇÃO

### 7.2.1 Análise do padrão

Os resultados encontrados não foram expressos em concentrações e sim por comparação de área com o padrão de concentração conhecida.

A área do pico padrão para essas análises foi de 20788 unidades no tempo de retenção de 15,75 minutos, a concentração do padrão foi de 1 ppm (ver figura 14), os sinais

dos íons monitorados saíram em tempos de retenção iguais e em proporções semelhantes ao do espectro de massas do banco de dados do equipamento (ver figura 15).

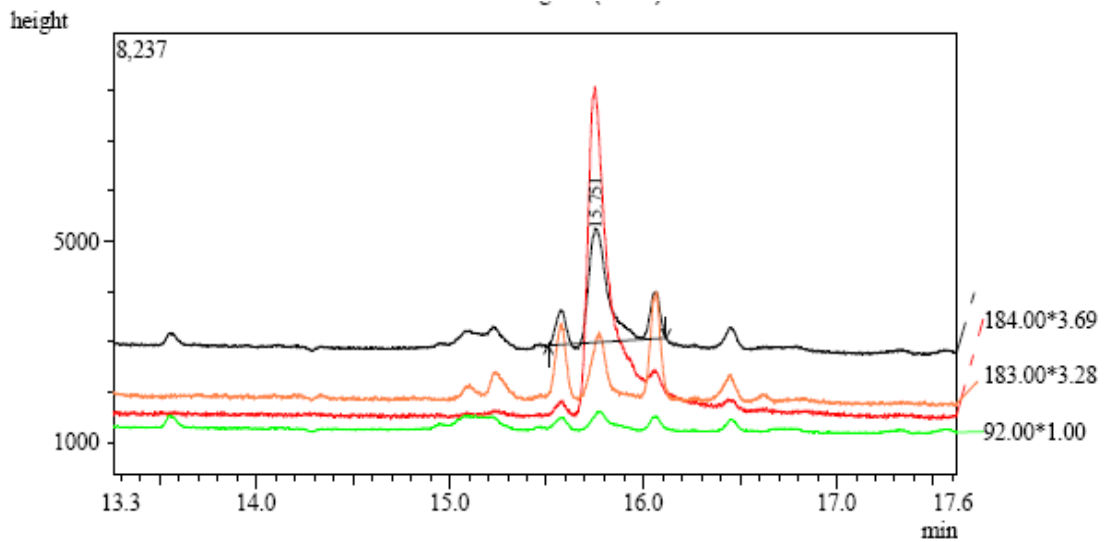


Figura 14: Cromatograma do pico do padrão no modo de aquisição SIM.

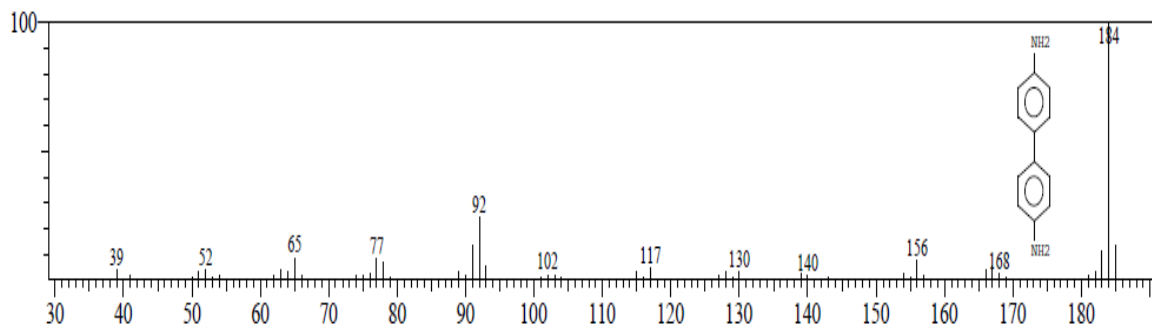


Figura 15: Espectro de massas do banco de dados da biblioteca do equipamento.

## 7.2.2 Extração sem o uso do Tampão básico

O teste da extração sem o uso do tampão básico foi realizado em duplicata, os resultados foram semelhantes entre as fortificadas. A área do pico de 16871 unidades no tempo de retenção de 15,56 minutos, comparado com a área do pico do padrão fornece uma recuperação de 81 %. A recuperação foi calculada por:

$$R(\%) = A_F/A_B \times 100$$



Onde,  $A_F$  é a área do sinal do cromatograma da amostra fortificada e  $A_B$  é a área do sinal do padrão de 1 ppm.

O tempo de retenção dos picos das amostras fortificadas e do padrão são muito próximo e as proporções de altura dos sinais 184, 183 e 92 também são semelhantes, essas informações confirmam que o pico observado é o pico da benzidina.

A recuperação encontrada é aceitável para as condições exigidas para essa análise; para a empresa a faixa de exigência a ser respeitada é do INMETRO que é de 70 % a 120 % de recuperação do analito.

A amostra, depois da fortificação, ficou com concentração de 1  $\mu\text{g/L}$  de benzidina, que atende o limite máximo permitido pelo CONAMA, para água doce classe I, que é de 1  $\mu\text{g/L}$ . Para quantificar um composto em cromatografia o pico tem que fornecer um sinal / ruído ( $s/n$ ) maior do que 10, nesta análise o  $s/n$  foi de 24, isto mostra que pode-se diminuir mais o nível de fortificação da amostra, podendo analisar concentrações menores do que 1  $\mu\text{g/L}$  em água sem perder a qualidade.

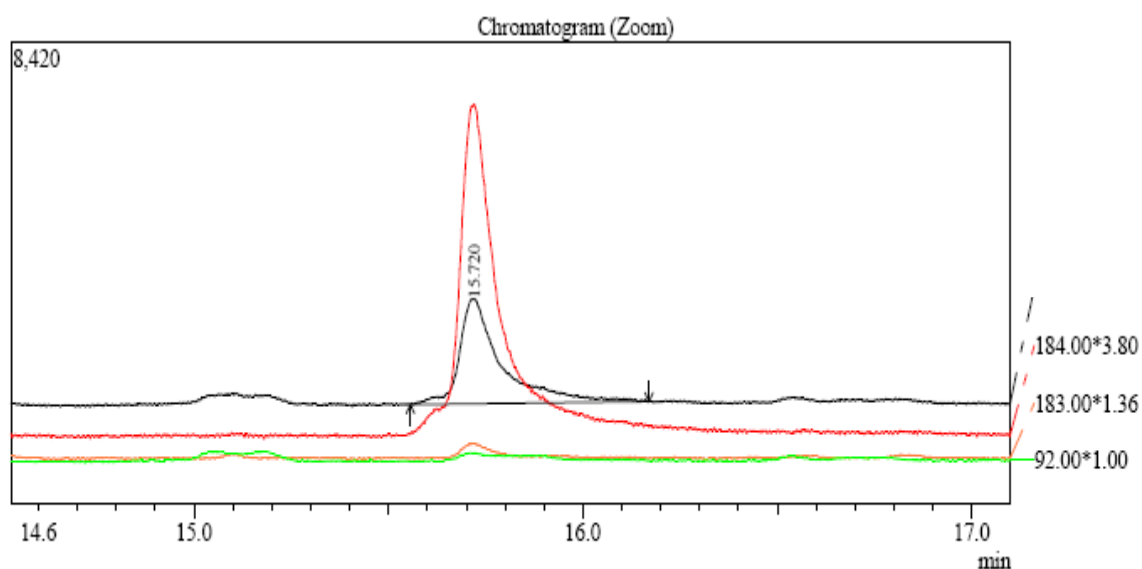


Figura 16: Cromatograma do extrato final da fortificada de benzidina de 1 ppm.

### 7.2.3 Extração com o uso do Tampão básico

Nos testes para a análise da influência do meio alcalino na extração foram melhores do que no meio neutro. O pico da benzidina teve maior intensidade para o mesmo nível de concentração da extração em meio neutro; a extração foi realizada em duplicata, fornecendo

resultados muito semelhantes, a área foi de 22544 unidades no tempo de retenção de 15,59 minutos.

Comparado com a área do pico do padrão a recuperação foi de 108 %, os sinais do cromatograma confirmam a benzidina pela a semelhança com o cromatograma do padrão; uma análise dos picos base, 184, 183 e 92  $m/z$ , mostra que eles têm a mesma relação de tamanho que os do espectro de massas apresentado da biblioteca do equipamento, esse dado serve também como confirmação da identificação da molécula.

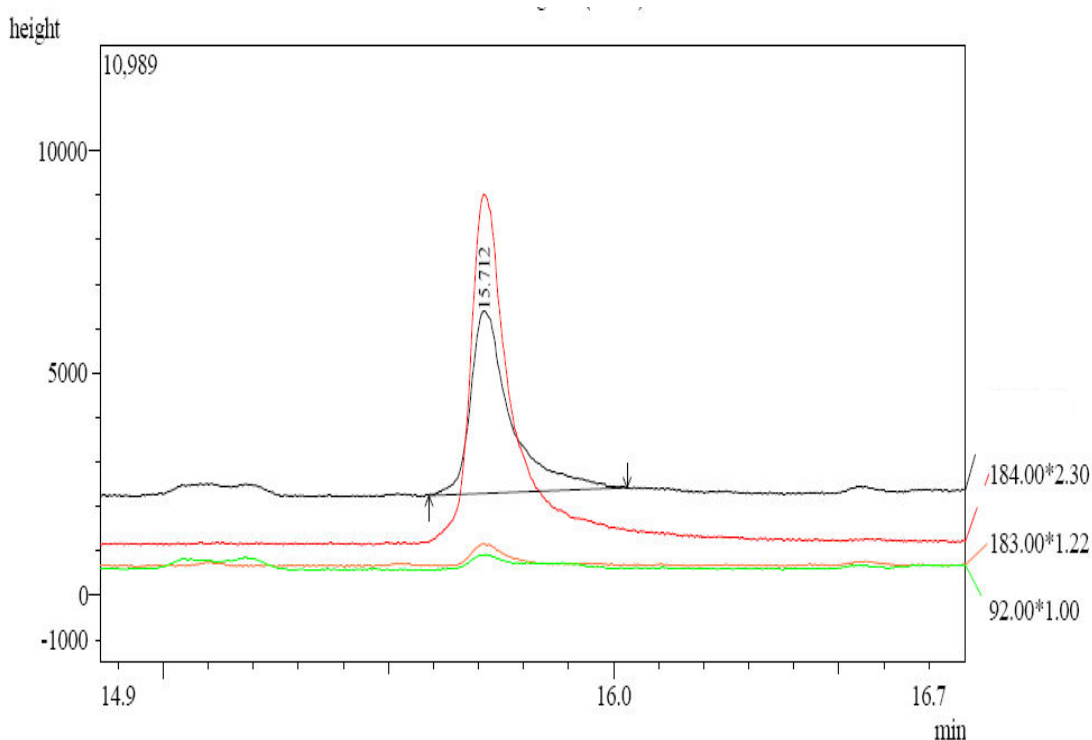


Figura 17: Cromatograma do extrato da extração em meio alcalino da amostra fortificada.

#### 7.2.4 Análise do branco

Um teste para avaliar a contaminação na análise foi realizado, a amostra foi preparada da mesma forma que as réplicas do estudo em meio alcalino, com a diferença de não ter sido fortificada com o padrão.

Próximo ao tempo do pico do padrão apareceu o sinal do íon da massa 184, um dos picos característicos da benzidina, a área do pico é considerada pequena comparada aos outros picos dos cromatogramas aqui citados, o valor da área é de 1368 unidades. Os íons 92 e 183

não apareceram no cromatograma (ver figura 18), pois são muito menores comparados ao íon 184. Possivelmente, ocorreu uma pequena contaminação, que pode ser da vidraria usada ou da coluna cromatográfica.

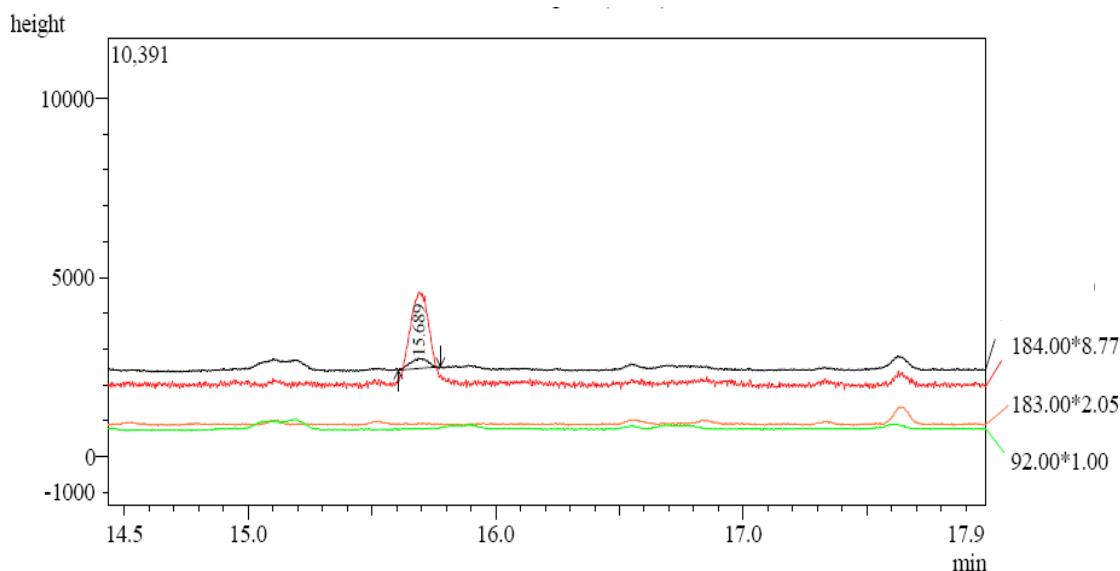


Figura 18: Cromatograma do extrato da extração em meio alcalino da amostra não fortificada.

### 7.2.5 Influência do Meio

Como observado nos resultados o meio alcalino exerceu influência positiva na intensidade do pico das amostras fortificadas. A explicação disso é que em soluções com pH mais baixos, as aminas se convertem em moléculas catiônicas, que tem como característica possuir uma maior solubilidade em água. No caso estudado, a benzidina é considerada uma base de Lewis em solução aquosa, por ter um par de elétrons doadores, e, em pH menores, forma o cátion amônio que tem uma partição maior na água, sendo assim, fica mais difícil a extração com o solvente orgânico, e, por conseqüência, gera uma menor recuperação da benzidina no extrato (ver figura 20)<sup>25</sup>.

Na figura 20<sup>25</sup>, também é observado que a adição do íon hidróxido no meio desloca o equilíbrio para a manutenção da forma neutra da molécula, que facilita a interação com o solvente orgânico. Esses fatos explicam porque em meio básico a recuperação da benzidina aumenta consideravelmente.

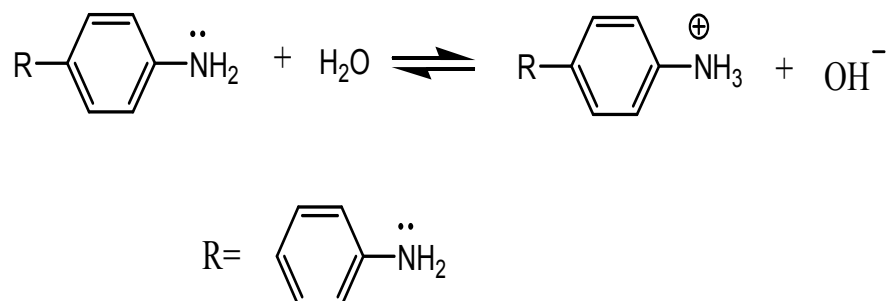


Figura 19: Equilíbrio da benzidina em meio aquoso.

### 7.3 RESULTADOS DA EXTRAÇÃO COM DERIVATIZAÇÃO

Os resultados da extração com derivatização também não foram analisados pelas concentrações, pois, para isso, seria necessário um padrão da molécula da benzidina na forma derivatizada que a empresa não continha. Logo, foi usada a intensidade do pico da benzidina derivatizada no tempo citado pela a literatura<sup>10</sup>.

#### 7.3.1 Análise da injeção do Padrão de benzidina

A concentração do padrão injetado de benzidina foi de 5 ppm em metanol, com área de 77388 unidades e tempo de retenção 30,88 minutos (ver figura 20). O tempo de retenção do pico do padrão mudou em relação ao padrão injetado do teste sem derivatização, o equipamento, o padrão e a coluna cromatográfica não variaram, porém as condições cromatográficas sim. Isso já era esperado, pois a mudança de fluxo da coluna e da rampa de temperatura são alguns dos fatores fundamentais para a mudança do tempo do pico de uma molécula em um cromatograma.

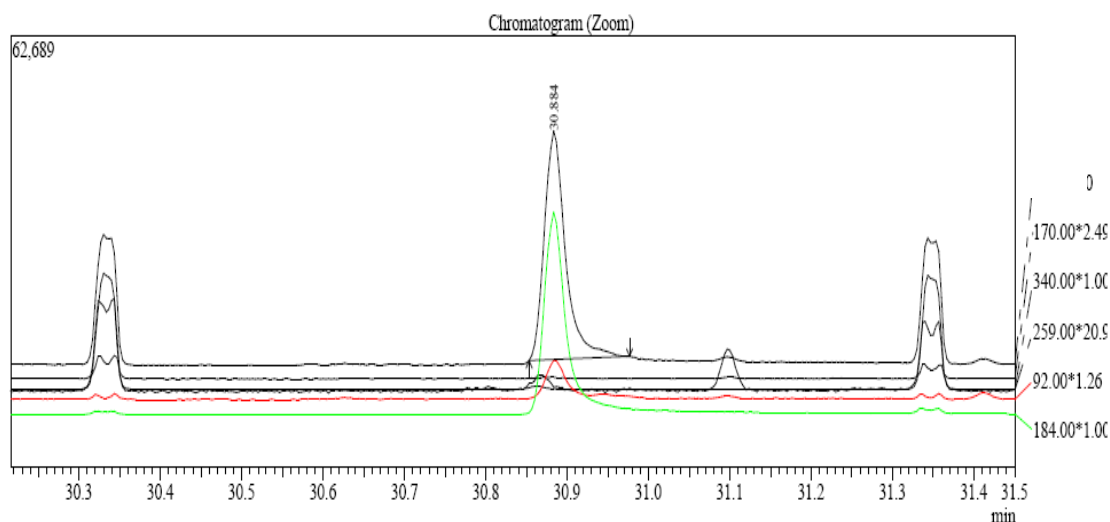


Figura 20: Cromatograma da análise do padrão de 5 ppm de benzidina.

A confirmação do pico da benzidina veio através dos sinais 184 e 92, e da ausência desse sinal no cromatograma gerado pela análise do extrato da amostra branco. Como pode ser observado, na figura 21, aproximadamente no tempo 30,90 minutos não tem nenhum sinal característico da benzidina.

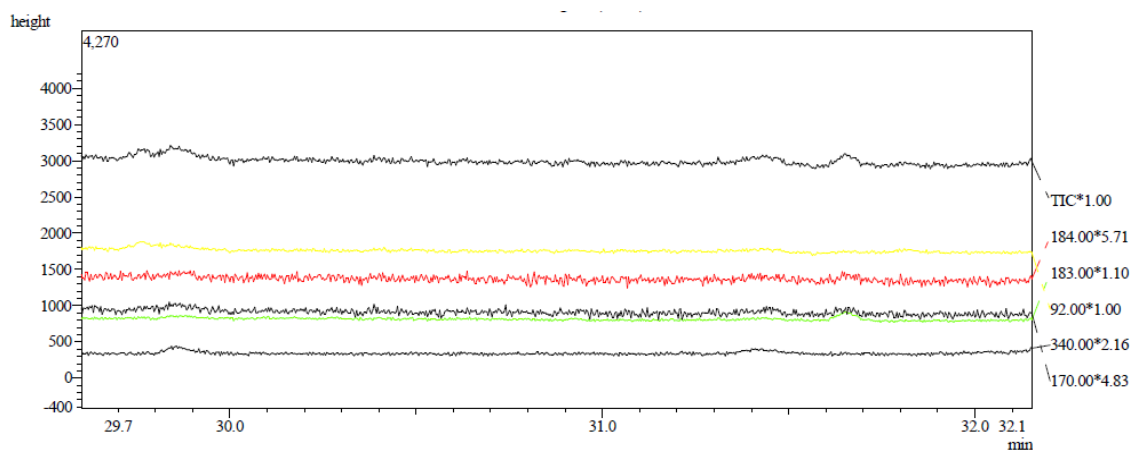


Figura 21: Cromatograma de extrato da amostra branco.

### 7.3.2 Análise das amostras derivatizadas

A benzidina tem um grupo amina no anel aromático, isso torna o anel mais reativo do que o benzeno em si; substituintes que fornecem essa característica são chamados de grupos ativadores. Outra função desempenhada pelo o grupo amina em um anel aromático é a



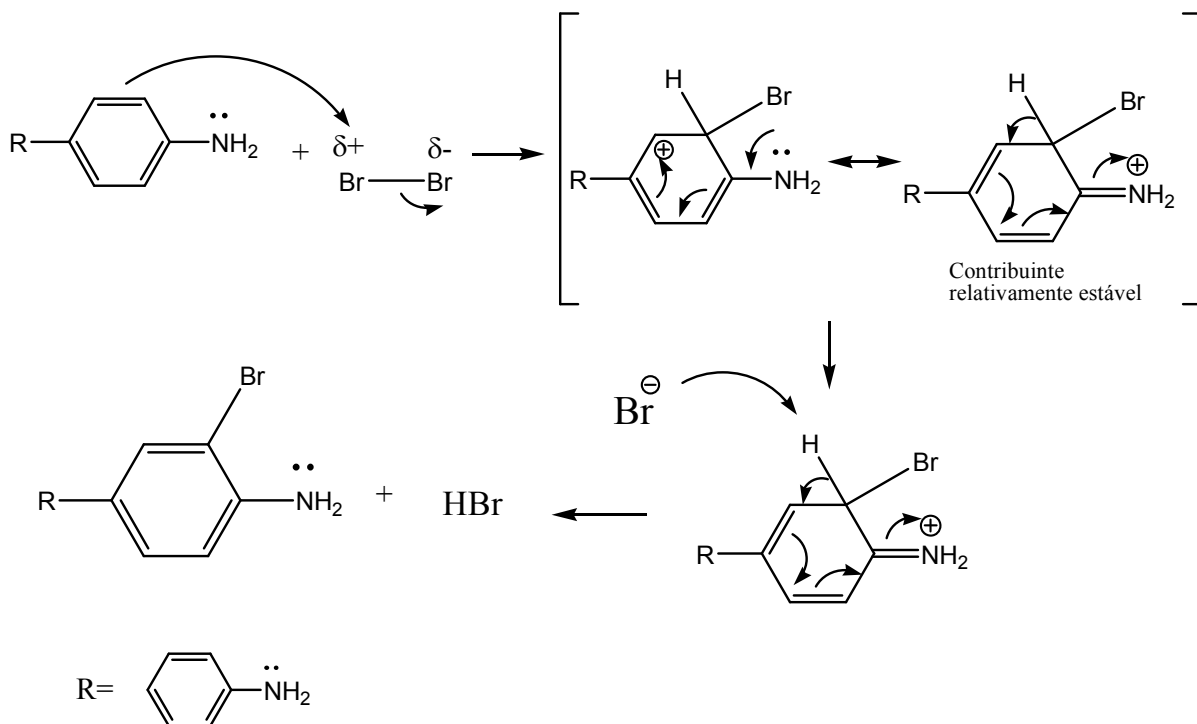


Figura 23: Reação do bromo com a benzidina.

Os íons monitorados foram os 340 e 170  $m/z$ , que correspondem à massa da benzidina di-bromada e a sua metade, respectivamente de acordo com a literatura.<sup>10</sup> A figura 25 mostra os cromatogramas obtidos. O cromatograma obtido da injeção do extrato, da amostra fortificada derivatizada, apresentou os sinais característicos da molécula bromada, que são 170, 259 e 340  $m/z$  (ver figura 24). O tempo de retenção foi de 39,90 minutos, que é próximo ao tempo da benzidina bromada relativo ao artigo específico, como visto na figura 25. Porém, no tempo de 39,90 minutos o mesmo sinal é apresentado na amostra não fortificada, o sinal está com a metade da intensidade do outro cromatograma, mas com as idênticas características espectrométricas, esse dado apresenta uma possível contaminação, esses testes foram repetidos em dias diferentes, entretanto os resultados vieram a se repetir.

O sinal da benzidina derivatizada apresentou uma melhora na resolução do seu pico, a base dele diminui em relação ao pico do padrão de benzidina não derivatizada, como pode ser observado comparando o cromatograma da amostra fortificada derivatizada (Figura 24 A) com o cromatograma da análise do padrão (Figura 20 A).

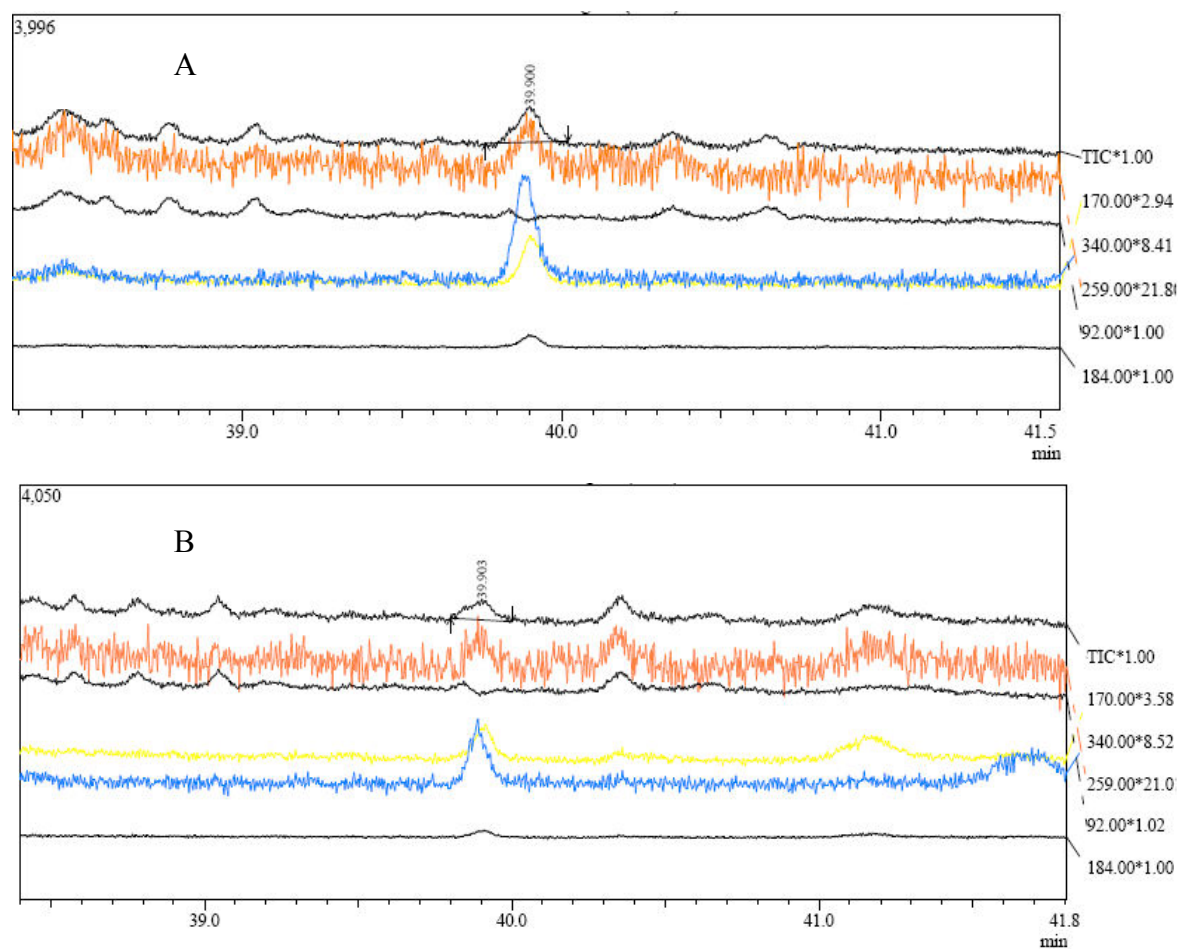


Figura 24: Cromatogramas da amostra fortificada derivatizada (A) e do branco (B).

O tempo de retenção da benzidina bromada observado no artigo tomado como base para as discussões deste trabalho<sup>10</sup>, foi de 41 minutos aproximadamente como pode ser visto na Figura 25 que apresenta o cromatograma e o espectro de massas encontrado pelos autores. Nesse estudo, eles avaliaram o resultado da derivatização de uma mistura de diferentes aminas aromáticas com o bromo, a benzidina é o pico 19 no cromatograma da Figura 25A.



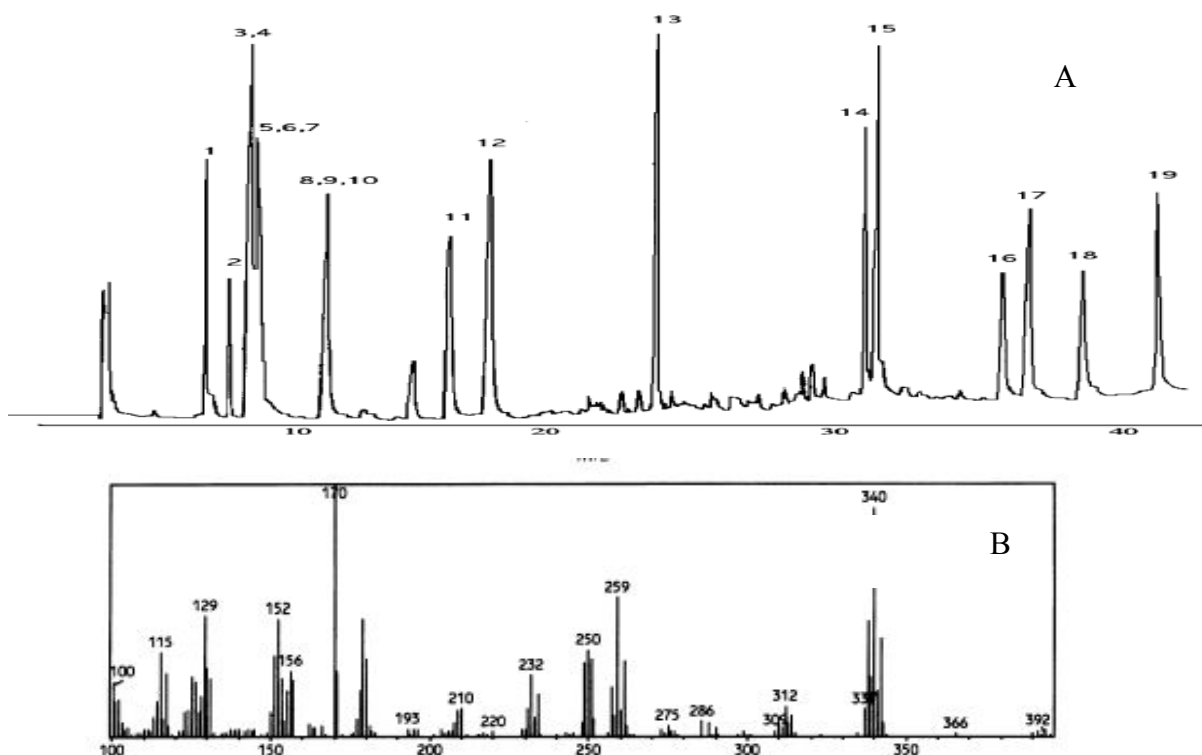


Figura 25: Cromatograma da benzidina bromada, pico 19 (A) e o espectro de massas correspondente (B) extraído da referência 10.

O fato de não aparecer um sinal característico da benzidina no tempo de 30,90 minutos representa que a benzidina adicionada na solução reagiu com o bromo, um provável problema é o solvente escolhido para extração, o diclorometano. Na referência usada como base<sup>10</sup> é dito que os melhores resultados foram obtidos quando usado acetato de etila para remover os analitos orgânicos da solução aquosa, após o término da reação com o bromo. Porém, neste trabalho de conclusão, foi usado diclorometano, pois no momento da separação das fases, orgânica e aquosa, não se distingue a interface entre as duas soluções quando usado o acetato de etila, por isso, a escolha do diclorometano, que é um solvente orgânico imiscível na água.

Outro teste realizado foi a extração da amostra fortificada, mas, dessa vez, sem a adição do bromo, com a intenção de verificar a resposta da análise apenas para a benzidina não derivatizada, a concentração dessa fortificada era de 1 ppm. O cromatograma dessa análise gerou um sinal de má qualidade para identificação do pico da benzidina (ver figura 26), com base larga e pouca altura, o sinal de 184 apareceu no tempo de 31,79 minutos. A identificação desse sinal como benzidina é tanto quanto duvidosa, mas esse sinal não apareceu no cromatograma do extrato que sofreu a derivatização. Logo, pela análise citada, é demonstrado que o diclorometano não é indicado para extrair a benzidina e seus derivados bromados.

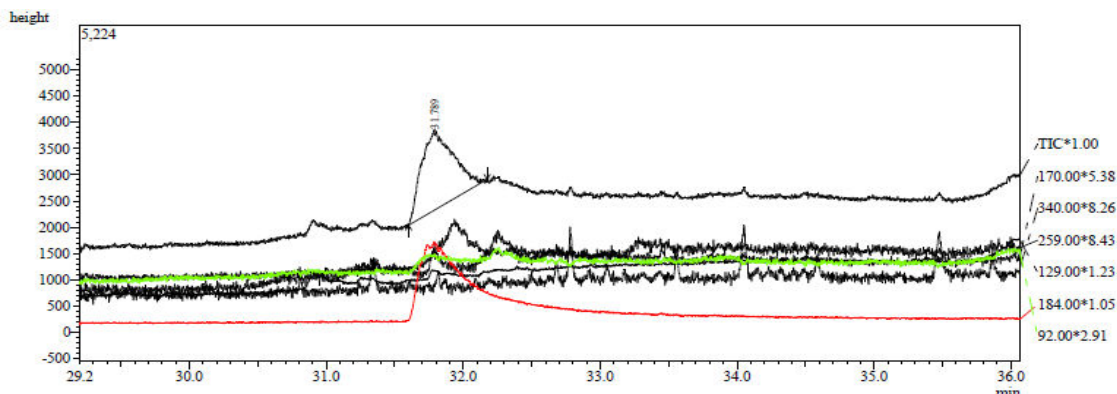


Figura 26: Cromatograma da injeção do extrato da fortificada sem adição do bromo.

## 7.4 ANÁLISE GERAL DOS RESULTADOS

A metodologia das amostras sem derivatização apresentou melhores resultados, e, também, melhores condições de trabalho na análise. O processo de extração é mais simples do que o processo com derivatização, pois não necessita a etapa de reação no extrato, com isso, o método ganha em:

- Tempo de extração;
- Menor uso de reagentes;
- Complexidade da análise.

O tempo de uma extração completa para uma amostra que necessita derivatização é de aproximadamente 30 minutos a mais comparada com a metodologia sem derivatização. O único reagente exigido para extração tamponada é a solução Tampão de Kolthoff<sup>24</sup>, que, como já visto, é uma solução de simples preparo, o outro método, por sua vez, necessita de três reagentes a mais, solução bromo:ácido acético (1:4), solução aquosa saturada de sulfito de sódio e a solução de hidróxido de sódio 10 M. A etapa de reação do bromo é um processo mais complexo, que exige um maior cuidado da parte do analista.

O método de extração usando o tampão foi mais eficiente, a intensidade do pico foi maior do que o sem tampão alcalino, a área resultante pode ser diminuída para níveis menores de fortificação das amostras, provavelmente pode-se chegar ao nível mais baixo no qual é exigido pelo CONAMA para detecção de benzidina águas doces que é  $0,0002 \mu\text{g}/\text{L}^{20}$ .

## 8 CONCLUSÃO

O método que melhor se enquadra nas condições e exigências da empresa é o método sem derivatização, usando o meio alcalino para auxiliar na etapa da extração. O método com derivatização necessitaria de mais alguns estudos para fornecer resultados positivos, a mudança do solvente usado para extrair os analitos orgânicos após a reação seria uma boa tentativa para alcançar melhores resultados.

A metodologia usando o bromo como derivatizante melhora a resolução dos picos, conseqüentemente, fornece menores valores de limite de quantificação como visto na literatura, no entanto, a empresa Bioensaios, não necessita de valores de limite de quantificação tão pequenos para suas análises, provavelmente o método usando a extração em meio alcalino atenderá as exigências da empresa. O tempo para fazer a análise do método sem derivatização foi considerado bom, pois é mesmo tempo de realizações das outras análises da empresa quando usado a extração líquido-líquido. Os reagentes e equipamentos usados também são os mesmos para as outras extrações.

O próximo passo para implantar essa análise sem derivatização é fazer uma validação desse método, que consiste em fazer testes de repetitividade, precisão intermediária, recuperação, seletividade, linearidade e limites de quantificação e detecção.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Agency for Toxic Substances and Disease Registry-ATSDR, *Toxicological Profile for Benzidine*, Geórgia (2001)
- <sup>2</sup> Kunz, A., Peralta-Zamora, P., Gomes, S., Duran, N., *Química Nova*, V. 25, Número. 1, 78-82 (2002)
- <sup>3</sup> Guaratini, C. C. I., Zanoni, M. V. B., *Química Nova*, V. 23, Número: 1, 71-78 (2000)
- <sup>4</sup> Benigni, R., Giuliani, A., Franke, R., Gruska, A., *Chemical Reviews*, V. 100, Número: 10, 3697-3714 (2000)
- <sup>5</sup> Pielesz, A., Baranowska, I., Rybak, A., W"ochowicz, A., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V. 53, 42-47 (2002)
- <sup>6</sup> Kataoka, H., *Journal of Chromatography A*, V. 733, 19-34 (1996)
- <sup>7</sup> Bacaloni, A., Cavaliere, C., Faberi, A., Foglia, P., Marino, A., Samperi, R., Lagan`a, A., *Talanta*, V. 72, 419-426 (2007)
- <sup>8</sup> Kataoka, H., *Journal of Chromatography Library*, V. 70, 365-404 (2005)
- <sup>9</sup> Shin, H. S., Ahn, H. S., *Chromatographia*, V. 63, Número: 1/2, 77-84 (2006)
- <sup>10</sup> Dados, A.E., Stalikas, C.D., Pilidis, G.A., *Chromatographia*, V. 59, Número: 5/6 (2004)
- <sup>11</sup> Arruda, F. R., *Determinação de Benzidina nos rios que recebem a carga de efluentes das indústrias têxteis da cidade de São Carlos*, Tese de Mestrado em Química Analítica, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo (2008)
- <sup>12</sup> Choudhary, G., *Chemospher*, V. 32, Número: 2, 267-291 (1996).
- <sup>13</sup> Akalin, E., Akyu`z, S., *Journal of Molecular Structure*, Número: 651-653, 571-577 (2003)
- <sup>14</sup> Golka, K., Kopps, S., Myslak, Z.W., *Toxicology Letters*, V. 151, 203-210 (2004)
- <sup>15</sup> Britto, J. M., Rangel, M. C., *Química Nova*, V. 31, Número: 1, 114-122 (2008)
- <sup>16</sup> Türgay, O., Ersöz, G., Atalay, S., Forss, J., Welander, U., *Separation and Purification Technology*, V. 79, 26-33 (2011)
- <sup>17</sup> Skoog, A. D., Holler, F. J., Nieman, T. A., *Princípios de Análise Instrumental*, 5º Edição, Bookman, Porto Alegre (2002)
- <sup>18</sup> <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/assuntos/assunto.asp?codcapitulo=8&codassunto=17&numero=3> (Acessado dia 26/06/2011)
- <sup>19</sup> <http://www.abit.org.br/abitonline/exclusivo/aolv2/aolex15104102004.htm> (Acessado dia 15/06/2011)
- <sup>20</sup> Resolução No 357 de 17 de Março de 2005, Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.
- <sup>21</sup> Lacorte, S., Perrot, M. C., Fraisse, D., Barcelo´ D., *Journal of Chromatography A*, V. 833, 181-194 (1999)
- <sup>22</sup> <http://www.bioensaios.com.br/> (Acessado dia 25/06/2011)
- <sup>23</sup> Solomons, T. W. G., Fryhle, C. B., *Química Orgânica*, V.2, 8º Edição, LTC Editora, Rio de Janeiro (2006)
- <sup>24</sup> Morita T., Assumpção R. M. V., Manual de soluções, reagentes e solventes, 2º Edição, Editora Edgard Blucher LTDA, São Paulo (1995)
- <sup>25</sup> Pavia, D. L., Lampman, G. M, Kriz, G. S., Engel, R. G., *Química Orgânica Experimental – Técnicas de escala pequena*, 2º Edição, Bookman, Porto Alegre (2009)