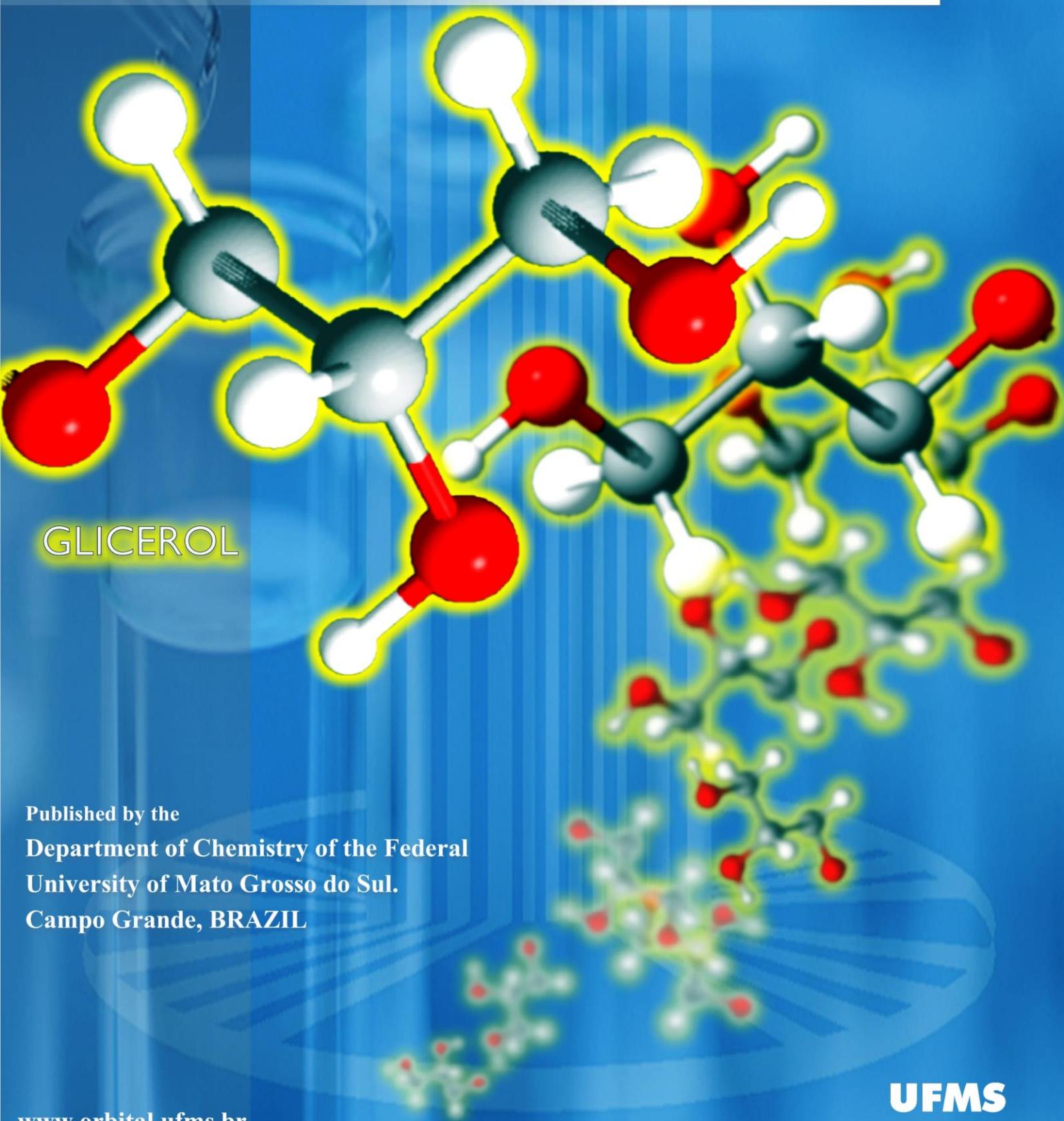


ISSN 1984-6428

JULY-SEPTEMBER
2009
VOLUME 1
NUMBER 3

Orbital

The Electronic Journal of Chemistry



Published by the
Department of Chemistry of the Federal
University of Mato Grosso do Sul.
Campo Grande, BRAZIL

www.orbital.ufms.br

UFMS

Orbital - Vol. 1 No. 3 - July-September 2009

Table of Contents

EDITORIAL

<u>Glycerol: Problem or solution? - That is the question</u>	
<i>Adilson Beatriz</i>	

FULL PAPERS

<u>Application of the exploratory analysis of data in the geographical discrimination of okra of Rio Grande do Norte and Pernambuco</u>	
<i>Francisco Santos Panero, Maria de Fátima Pereira Vieira, Ângela Maria Fagundes da Cruz, Maria de Fátima Vitória Moura</i>	228-237
<u>Development of analytical methodology for determination of chloroform in samples of flavoured waters using headspace-solid phase microextraction technique</u>	
<i>Marcel Silveira dos Santos, Edmar Martendal, Eduardo Carasek</i>	238-250

SHORT COMMUNICATIONS

<u>Preliminary study on enzymatic kinetic resolution of isopropylidene glycerol</u>	
<i>Yara Jaqueline Kerber Araujo, Dênis Pires de Lima, Adilson Beatriz</i>	251-254



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

Editorial

Glycerol: Problem or solution? - That is the question.

In 2004 the Brazilian Program for Biodiesel Production and Use (PNPB) was launched by the Federal Government, aimed at the production of alternative, non-fossil fuels and, more broadly, at the country's economic development [1]. On January 13, 2005, Law 11097 was passed, establishing the inclusion of biodiesel in Brazil's energy balance and mandating the addition of 2% biodiesel (B2) to the composition of diesel by 2008, a ratio to be increased to 5% by 2013 (B5) [1, 2]. Because all diesel oil sold in Brazil has contained as much as 3% of biodiesel (B3) since 2008, a glycerol surplus of the order of 100 000 tons a year is now projected for the Brazilian market—a huge increase from the traditional domestic production of around 30 000 tons a year. In 2013, when the B5 standard goes into effect, the yearly output of glycerol is forecast at 250 000 tons [3]. In the European Union, fuels for vehicles will be required to contain at least 5.75% of biocomponents obtained from renewable sources by the end of 2010. If this target is achieved, it should increase the European demand for biodiesel to over 10 million tons a year by 2010, leading to an annual generation of nearly 1 million tons of glycerol as a co-product. Moreover, if by 2012 the United States replaces 2% of its conventional diesel with biodiesel (B2), as planned, another 365 000 tons of glycerol will find their way to the market [4]. There is therefore consensus that glycerol destination is a critical issue posed to the large-scale production of biodiesel and that alternatives must be sought for the feasible consumption of this extra volume, either as untransformed material or as derivatives with high aggregate value.

Around the world, chemical ingenuity has developed proven methods for converting glycerol into a range of useful products for the various segments of society, from fuels to valuable chemical commodities. Owing to its highly functionalized molecule, glycerol can be easily oxidized, reduced, halogenized, etherified, and esterified, yielding compounds of industrial interest. Epichloridrine, for instance, used in the production of epoxy and phenolic resins, in addition to having other important industrial applications, is today commercially synthesized from glycerol. In this process, glycerol provides an alternative to propylene, which is an essential but non-renewable ingredient in the traditional method of epichloridrine production. In Brazil, a petrochemical company has already unveiled plans for the commercial production of propylene from glycerol. The company has teamed up with researchers from the Federal University of Rio de Janeiro to develop technology to obtain "green" propene based on glycerol resulting from biodiesel production. Propene generated from glycerol will serve as a raw ingredient for polypropylene, which has the same features as polypropylene currently produced from naphtha-derived propene. Nevertheless, renewable raw materials do not necessarily yield "green" products. Actually, the entire production process must meet certain sustainability principles advocated by the so-called *Green Chemistry*.

Having already developed its own state program for biodiesel, Mato Grosso do Sul is bound to face the challenge of marketing its glycerol surplus. Within this setting, it is up to the scientific community to undertake investigations aimed at generating sustainable strategies for converting the plain but versatile glycerol molecule into a variety of chemicals of high aggregate value. These strategies, however, should be oriented by three key elements of sustainability, which are its social, economic, and environmental requirements, all of which must be entirely met if a given process is to be rightly termed sustainable.

In Mato Grosso do Sul, a substantial increase in the number of industrial plants, whether installed or being set up, is now underway, most of them biorefineries. Meanwhile, the number of programs in Chemistry and in related areas has grown at a comparable rate, bringing with them the formation of research groups in the state, with recent holders of doctoral titles being assigned the role of organizing these programs. It is not far-fetched, therefore, to envisage in the near future a regional scientific community prepared to offer feasible solutions to environmental and technological problems, including the appropriate final use of the glycerol surplus produced by the biodiesel sector. It may even be that glycerol will eventually become the main product of this process, with biofuel being a mere co-product. One expects, however, that at that time biodiesel will not become itself a new problem. Whatever the outcomes are, the most important contributions will be made by today's students, whose resourcefulness will drive unforeseen advancements, with worldwide impact.

Glicerol: problema ou solução? Eis a questão

Em 2004 foi lançado no Brasil pelo Governo Federal, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB); tal programa objetiva incentivar a produção e uso do mesmo, com enfoque na obtenção de combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis e no desenvolvimento econômico do país [1]. Em 13 de janeiro de 2005 foi publicada a Lei 11.097, que dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. A lei tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel (B2) até 2008 e a adição de 5% (B5) até 2013 [1, 2]. Já em 2008 o diesel comercializado no Brasil passou a conter 3% de biodiesel (B3) e as projeções mostram que o excedente de glicerol seria da ordem de 100 mil toneladas/ano no mercado brasileiro, com a entrada do B3 nesse ano; muito além da produção tradicional, na faixa de 30 mil toneladas/ano. As previsões para 2013, com a introdução do B5 são de uma produção de 250 mil toneladas/ano de glicerol [3]. De acordo com o programa da União Européia, até o final de 2010 combustíveis da frota de veículos dessa região deverá conter, no mínimo, 5,75% de bio-componentes de fontes renováveis. Se esse objetivo se cumprir, a demanda européia por biodiesel poderá aumentar para mais de 10 milhões de toneladas por ano até 2010, gerando cerca de 1 milhão de toneladas/ano de glicerol como co-produto. Além disso, se os Estados Unidos substituir 2% do diesel convencional por biodiesel (B2), em 2012, como previsto, quase 365 mil toneladas extra de glicerol seria acrescentado no mercado [4]. Portanto, é consenso que o destino do glicerol é um sério problema para a produção de biodiesel em grandes quantidades e é fundamental buscar alternativas para o consumo desse volume extra, na forma bruta e/ou como derivados de alto valor agregado.

A engenhosidade química mundial já desenvolveu uma série de métodos concretos para a conversão da glicerina em produtos úteis para a sociedade. Glicerol pode ser usado como combustível e também transformado em *commodities* químicos mais valiosos. A natureza altamente funcionalizada da molécula do glicerol significa que o mesmo pode ser facilmente oxidado, reduzido, halogenado, eterificado e esterificado obtendo substâncias químicas de interesse industrial. Por exemplo, epiclorigrina, um produto químico empregado na produção de resinas epóxi e fenólicas e outras importantes aplicações industriais, atualmente é sintetizada comercialmente a partir do glicerol. Assim, glicerol é usado como um substituto para o propileno utilizado no processo de produção tradicional de epiclorigrina, o qual usa matéria-prima

não-renovável. No Brasil, uma empresa do setor petroquímico anunciou que irá produzir comercialmente propileno a partir do glicerol. A empresa trabalhou juntamente com um grupo de pesquisadores da UFRJ no desenvolvimento da tecnologia que permite produzir o "Propeno Verde", usando-se a glicerol produzido na fabricação de biodiesel. O propeno gerado a partir da glicerina servirá de matéria-prima para a produção de polipropileno que tem as mesmas características do polipropileno atualmente produzido a partir do propeno feito da nafta. Contudo, vale ressaltar que não basta que a matéria-prima de determinado produto seja renovável para ser considerado "produto verde". Todo o processo, porém, deve atender certos princípios de sustentabilidade, preconizada pela chamada *Química Verde*.

Mato Grosso do Sul possui seu programa estadual de biodiesel e certamente terá de enfrentar o desafio de colocar o excedente de glicerol no mercado. Neste contexto, a comunidade científica tem o nobre dever de enveredar estudos para gerar estratégias sustentáveis, visando a conversão da molécula simples e versátil do glicerol em uma variedade de produtos químicos de alto valor agregado. Tais estratégias devem, contudo, balizar-se em 3 elementos principais de sustentabilidade: social, econômico e ambiental. Todos esses três aspectos devem ser totalmente satisfeitos para um determinado processo ser considerado verdadeiramente sustentável.

Em Mato Grosso do Sul, verifica-se um aumento considerável no número de indústrias instaladas e a instalar, principalmente biorrefinarias. Paralelamente, o número de cursos de Química e áreas afins tem aumentado na mesma proporção e, com isso, novos grupos de pesquisas estão sendo nucleados no Estado com a vinda de recém-doutores a fim de estruturar tais cursos. Portanto, não é utópico pensar que, em um futuro bem próximo, a comunidade científica regional também estará preparada para apresentar soluções a problemas ambientais e tecnológicos, incluindo a correta destinação para o volume extra de glicerol produzido pela indústria do biodiesel. Aliás, é possível que algum dia, nesse processo, a glicerina venha se tornar o produto principal e o biocombustível co-produto. Espera-se, no entanto, que chegado esse tempo, o biodiesel não se torne um problema. Por último, as maiores contribuições vão ser trazidas pelos estudantes de hoje, cuja criatividade vai produzir avanços espetaculares com repercussão mundial.

Adilson Beatriz (UFMS)

Editor, Orbital

References

- [1] Portal do Biodiesel: www.biodiesel.gov.br
- [2] Geris, R.; Santos, N. A. C.; Amaral, B. A.; Maia, I. S.; Castro, V. D.; Carvalho, J. R. M. *Química Nova* **2007**, *30*, 1369.
- [3] Mota, C. J. A.; da Silva, C. X. A.; Gonçalves, V. L. C. *Química Nova* **2009**, *32*, 639.
- [4] C.H. Zhou, C.H.; Beltramini, J. N.; Fan, Y. X.; Lu, G.Q. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 527.

Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco

Francisco dos Santos Panero^{a*}, Maria de Fátima Pereira Vieira^b, Ângela Maria Fagundes da Cruz^b, Maria de Fátima Vitória Moura^c

^aDepartamento de Química – Universidade Federal de Roraima, UFRR, CEP 69304-000 Boa Vista – RR, Brasil.

^bDepartamento de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, CEP: 59072-970 Lagoa Seca – RN, Brasil.

^cDepartamento de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, CEP: 59010-180 Petrópolis – RN, Brasil.

Recebido em 25/07/2009; revisado em 12/09/2009; aceito em 03/10/2009. Publicado na internet em 07/11/2009

RESUMO: Os teores de Cu, Zn, Na, Fe, K, Ca, Mn, Mg, PO_4^{3-} , Cl⁻ e SO_4^{2-} foram determinados nas amostras de quiabo dos municípios de Caruaru e Vitória de Santo Antão, em Pernambuco, assim como nos municípios de Ceará-Mirim, Macaíba e Extremoz no Estado do Rio Grande do Norte. O objetivo deste trabalho é a aplicação de dois métodos de análise exploratória de dados: Análise de Componentes principais - PCA e Análise de Agrupamentos Hierárquicos - HCA na discriminação geográfica do quiabo proveniente dos estados do Rio Grande do Norte e Pernambuco. Os resultados mostraram que Cl⁻ e Na foram os principais elementos para a diferenciação das amostras do Estado do Rio Grande do Norte e as amostras de Pernambuco apresentaram os maiores teores de Fe, Cu, Mn, Mg, Ca, Zn, K, PO_4^{3-} e SO_4^{2-} . Os dois métodos de análise exploratória de dados: PCA e HCA são eficientes para discriminação geográfica do quiabo proveniente do Rio Grande do Norte e Pernambuco.

Palavras-chave: análise exploratória de dados, quimiometria, PCA, HCA, quiabo

* Autor de correspondência. E-mail: fspaneroit@yahoo.com.br

Introdução

O quiabo é um fruto proveniente do quiabeiro (*Hibiscus esculentus*) que é uma planta hortícola de origem africana pertencente à família das Malváceas [1]. Possui alto valor nutritivo, medicinal e comercial, tem um ciclo vegetativo rápido, de fácil cultivo e de alta rentabilidade [3]. É bastante encontrado no nordeste brasileiro, em especial no Rio Grande do Norte que tem se destacado como um dos grandes produtores. Além de ser usado na alimentação como um ingrediente importante em diversos pratos da cozinha brasileira, também é utilizado na medicina, atuando como laxante (refrescando o intestino), nos casos de pneumonia, bronquites e tuberculose pulmonar. Por ser um alimento de grande consumo, é necessário estudar a composição do fruto do quiabeiro cultivado em solo potiguar e pernambucano, para compor tabelas de macro e micronutrientes, de modo a auxiliar na aplicação de dietas adequadas, principalmente nos casos de deficiência nutricional [2-4].

Os crescentes avanços e sofisticações das técnicas instrumentais de análise química proporcionam a obtenção de um maior volume de resultados, havendo assim a necessidade de utilização de técnicas de tratamentos de dados mais complexas do ponto de vista matemático [5]. O reconhecimento de padrões não supervisionado foi introduzido há algumas décadas no tratamento de dados químicos, dando origem a uma nova disciplina denominada quimiometria, uma importante ferramenta que permite a extração de informação útil e relevante dos dados químicos [6].

Procedimentos para controle de qualidade ou discriminação de origem geográfica de uvas, amostras de mel, vinho, água mineral, água superficial, água subterrânea e bebidas não-alcoólicas, empregando métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados têm sido propostos na literatura ao longo da última década [7-10]. Diferentes estratégias podem ser utilizadas para se obter a informação desejada em experimentos dessa natureza.

Reconhecimento de Padrões Não Supervisionado

Os métodos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não consegue evidenciar. Um dos objetivos na utilização do reconhecimento de padrões não supervisionado é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilita a visualização de todo o conjunto de dados [11].

As duas técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionado mais conhecidas são as análises de agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA). A PCA e a HCA são metodologias exploratórias que visam

evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras em um determinado conjunto de dados. Desse modo, tornam-se perfeitamente aplicáveis em experimentos de rastreabilidade [12].

A análise de componentes principais (PCA) é um método de reconhecimento de padrão não supervisionado utilizado para projetar dados n-dimensionais em um espaço de baixa dimensão, ou seja, as informações contidas no espaço de dimensão n são comprimidas através de combinações lineares das variáveis originais a um espaço geralmente de ordem 2 ou 3 [13]. A PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. Em uma análise de componentes principais, o agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de "scores" e "loadings", cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais os dados são projetados [14-15]. Os "scores" fornecem a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os "loadings" fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as PCs são ortogonais, é possível examinar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos "scores" e dos "loadings" [16-17]. O estudo do conjunto de "scores" e "loadings" permite ainda estimar a influência de cada variável em cada amostra [10].

A análise de agrupamento hierárquico (HCA) é um processo hierárquico no qual em cada passo a matriz de dados é diminuída em uma dimensão, pela reunião de pares semelhantes, até a reunião de todos os pontos em um único grupo [15, 16]. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, sendo útil para determinar a semelhança entre amostras. O método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si. Os resultados são apresentados na forma de um dendrograma, na qual agrupa amostras ou variáveis em função da similaridade [10, 17]. Neste diagrama, a escala varia de zero (amostras sem similaridades) a um (amostras similares) [14].

Morgano e colaboradores realizaram a diferenciação de diversos tipos de vegetais (feijão, lentilha, soja, batata, cenoura, aipo, brócolis, couve-flor, chicória, alface, grão de bico, repolho, beterraba, batata doce e inhame) através de PCA e HCA utilizando a composição de macro e micronutrientes e minerais (Na, K, Ca, Mg, P e Fe) [20].

Neste trabalho as técnicas de reconhecimento de padrões não supervisionados (HCA e PCA) foram aplicadas ao conjunto de dados formados por variáveis medidas por amostras de minerais feitas no quiabo, visando avaliar a constituição nutricional do quiabo, e a discriminação geográfica dos quiabos provenientes dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Material e Métodos

Amostras

Foram coletadas amostras de quiabo oriundas de cinco diferentes municípios dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (Figura 1): X-PE (Chã Grande - município de Caruaru), VSA-PE (município de Vitória de Santo Antão), ambas no Estado de Pernambuco; no Estado do Rio Grande do Norte, teve-se, C-RN (Coqueiro - município de Ceará-Mirim), M-RN (município de Macaíba) e E-RN (Estivas - município de Extremoz).

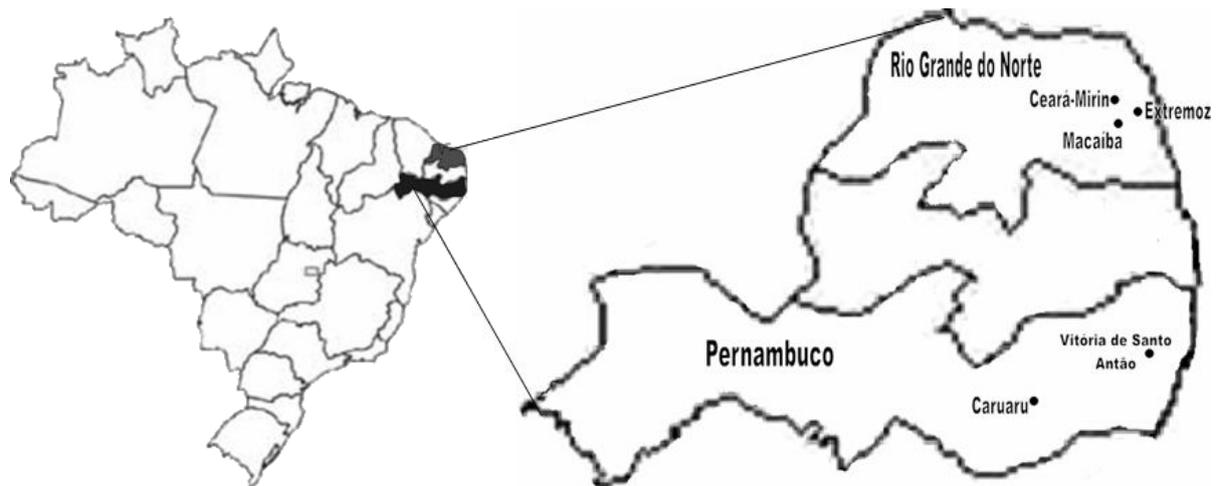


Figura 1. Localização das amostras, municípios dos Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Preparação das amostras

As amostras (frutos verdes de quiabo verde, cerca de 2,0 kg) foram previamente limpas com papel toalha para retirada de resíduos não desejáveis (areia, restos de folhas etc.). Em seguida, as amostras foram cortadas em rodela e distribuídas para a determinação de umidade, cinzas e minerais, sendo desidratadas a 105 °C e depois de frias maceradas e acondicionadas na forma de pó, em frascos de vidro previamente limpos, para a execução das determinações de macro e micronutrientes.

Análise de metais e espécies aniônicas

A quantificação dos minerais foi obtida a partir das cinzas do quiabo, a qual foi dissolvida em HCl 10% (v/v). As determinações dos metais (Cu, Zn, Na, Fe, K, Ca, Mn, Mg) foram feitas usando-se um espectrofotômetro de absorção atômica Varian, modelo SpectrAA 110 (*), com lâmpada de cátodo oco, calibrado em condições específicas de comprimento de onda, fenda e mistura de gases para cada elemento. O fosfato foi determinado por Espectroscopia de Absorção Molecular através de um equipamento Varian, modelo Cary 1E (*), utilizando-se o método do molibdovanadato. O cloreto e o

sulfato foram analisados pelos métodos de Möhr e Turbidimétrico, respectivamente. Para a quantificação de cada mineral foram construídas curvas de calibração, com exceção do cloreto. Os padrões e reagentes utilizados foram da marca Merck com certificado de análise rastreado com padrões NIST.

(*) Central Analítica – Departamento de Química – UFRN – RN

Análise estatística

Para efetuar a análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi utilizado o software EINSIGHT [18]. As determinações químicas foram realizadas em triplicata para cada amostra. Utilizou-se estas triplicatas para a construção da matriz de dados (15 x 11), 15 amostras e onze variáveis foram utilizadas na análise exploratória de dados (PCA e HCA).

Os dados foram previamente auto-escalados antes de serem submetidos à análise de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquico uma vez que há uma grande variação de respostas das diversas variáveis, ou seja, diferem em ordem de grandeza, atribuindo-se assim um mesmo peso para todas as variáveis [19, 20]. Para obtenção do dendrograma do HCA foram utilizadas a distância euclidiana e o método de conexão incremental.

Resultados e Discussão

A determinação de minerais do quiabo no resíduo seco (RS), proveniente dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de espécies metálicas do quiabo no resíduo seco (RS), (mg de espécie metálica/100g de amostra)

Amostra	Cu	Zn	Na	Fe	K	Ca	Mn	Mg	PO ₄	SO ₄	Cl
XPE1	1,02	3,69	5,98	3,50	2888,17	977,49	5,48	676,59	114,07	489,38	12,80
XPE2	1,01	3,71	5,86	3,54	2927,02	970,27	5,46	677,36	115,17	492,13	12,60
XPE3	1,03	3,68	6,10	3,52	2812,28	973,52	5,48	676,82	114,72	494,33	12,85
VSAPÉ1	1,35	3,72	1,50	4,34	2053,79	1041,03	6,80	935,33	92,46	497,88	12,04
VSAPÉ2	1,33	3,78	1,41	4,35	2078,32	1043,19	6,81	938,57	94,44	503,38	12,12
VSAPÉ3	1,37	3,69	1,58	4,34	2041,27	1038,02	6,83	937,73	93,56	501,78	12,09
CRN1	0,98	2,48	11,81	3,23	1813,61	620,67	4,10	300,13	93,50	471,11	37,63
CRN2	0,97	2,50	12,23	3,26	1826,43	624,86	4,12	302,17	94,55	477,61	37,75
CRN3	0,99	2,52	11,95	3,21	1802,29	621,66	4,14	303,37	94,12	476,96	37,69
MRN1	0,84	2,18	9,87	3,37	1935,17	843,71	3,31	506,76	85,49	384,51	34,41
MRN2	0,86	2,15	9,02	3,40	1942,36	852,55	3,32	507,19	87,76	391,16	34,57
MRN3	0,87	2,20	9,36	3,38	1938,85	848,47	3,34	506,57	87,12	388,11	34,48
ERN1	1,10	2,65	18,01	3,84	1466,31	778,35	4,67	364,81	102,46	404,86	39,90
ERN2	1,12	2,63	17,82	3,84	1470,29	785,90	4,66	366,22	100,83	403,84	40,12
ERN3	1,12	2,66	17,23	3,85	1468,78	780,94	4,69	365,72	101,23	404,23	40,07

A Tabela 1 apresenta o conjunto de dados experimentais utilizado para realizar as

análises exploratórias PCA e HCA. As técnicas de análise multivariada foram utilizadas visando resumir em poucas e importantes dimensões a maior parte da variabilidade da matriz para a obtenção de relações entre os dados obtidos, extraindo desta maneira a informação química mais relevante.

Análise de componentes principais (PCA)

Realizando a análise de componentes principais (PCA) foi verificado que as componentes PC1 e PC2 descrevem 83,27% da variação total dos dados e fornecem informações discriminatórias das amostras. Sendo que a primeira componente principal (PC1) descreve 65,42% da variação total, 17,85% da variação total dos dados é descrita pela segunda componente principal (PC2). Através do gráfico de "scores" (Figura 2) observa-se a formação de dois agrupamentos.

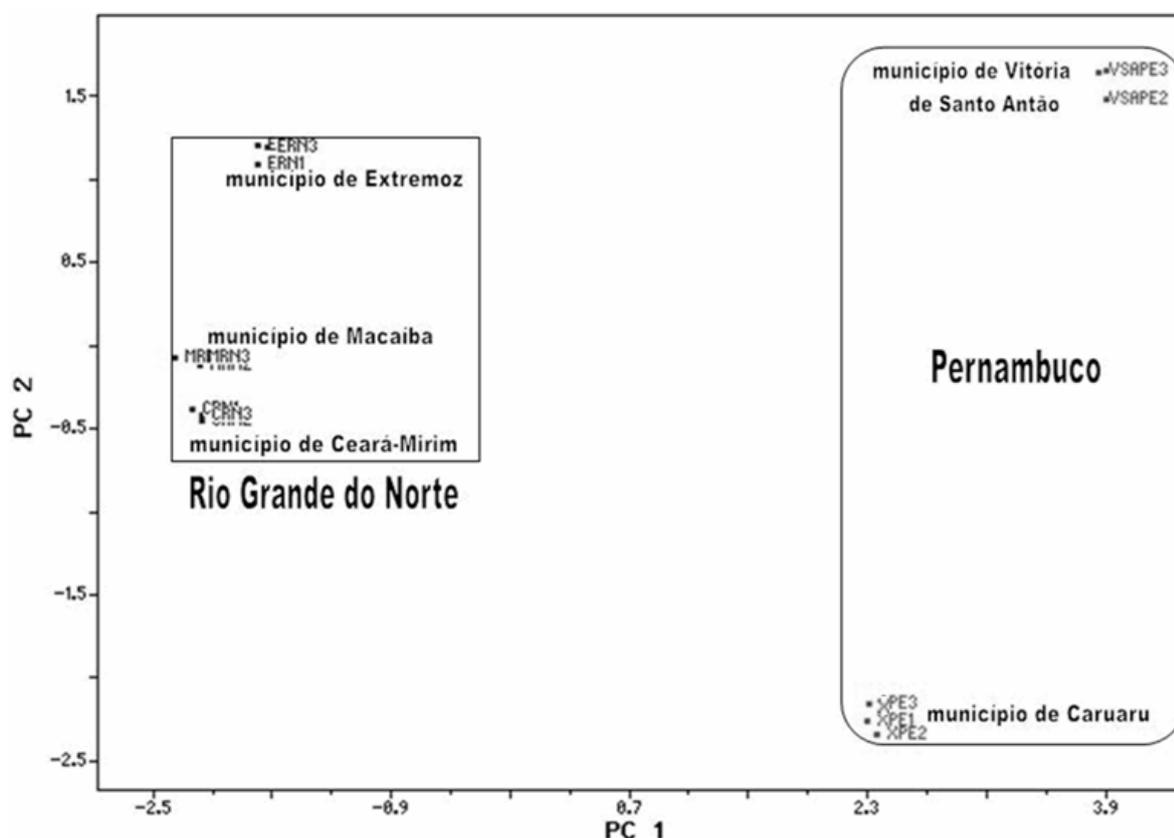


Figura 2. Gráfico dos "scores", PC2 vs PC1, autoescalado, var. tot. 83,27%, discriminação geográfica dos quiabos provenientes dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Analisando a PC1 é possível observar a discriminação de dois grandes grupos, ou seja, as amostras provenientes do Estado de Pernambuco: XPE (Chã Grande - município de Caruaru) e VSAPE (município de Vitória de Santo Antão) as amostras provenientes do Estado do Rio Grande do Norte: CRN (Coqueiro - município de Ceará-Mirim), MRN (município de Macaíba) e ERN (Estivas - município de Extremoz). Através do gráfico dos

"loadings" (Figura 3) é possível observar a influência das variáveis sobre as amostras, gráfico dos "scores". O comportamento distinto apresentado pelas amostras CRN, MRN e ERN, ou seja, a discriminação geográfica destas amostras em relação as amostras do Estado de Pernambuco, foi causada pelos teores de Cl (cloreto), Na (sódio), pois as amostras de quiabo provenientes do Estado do Rio Grande do Norte apresentam maiores teores de Cl e Na em relação as demais amostras. Já as amostras de quiabo provenientes do Estado de Pernambuco, XPE e VSAPE, apresentam os maiores teores de Fe, Cu, Mn, Mg, Ca, Zn, K, PO₄ e SO₄.

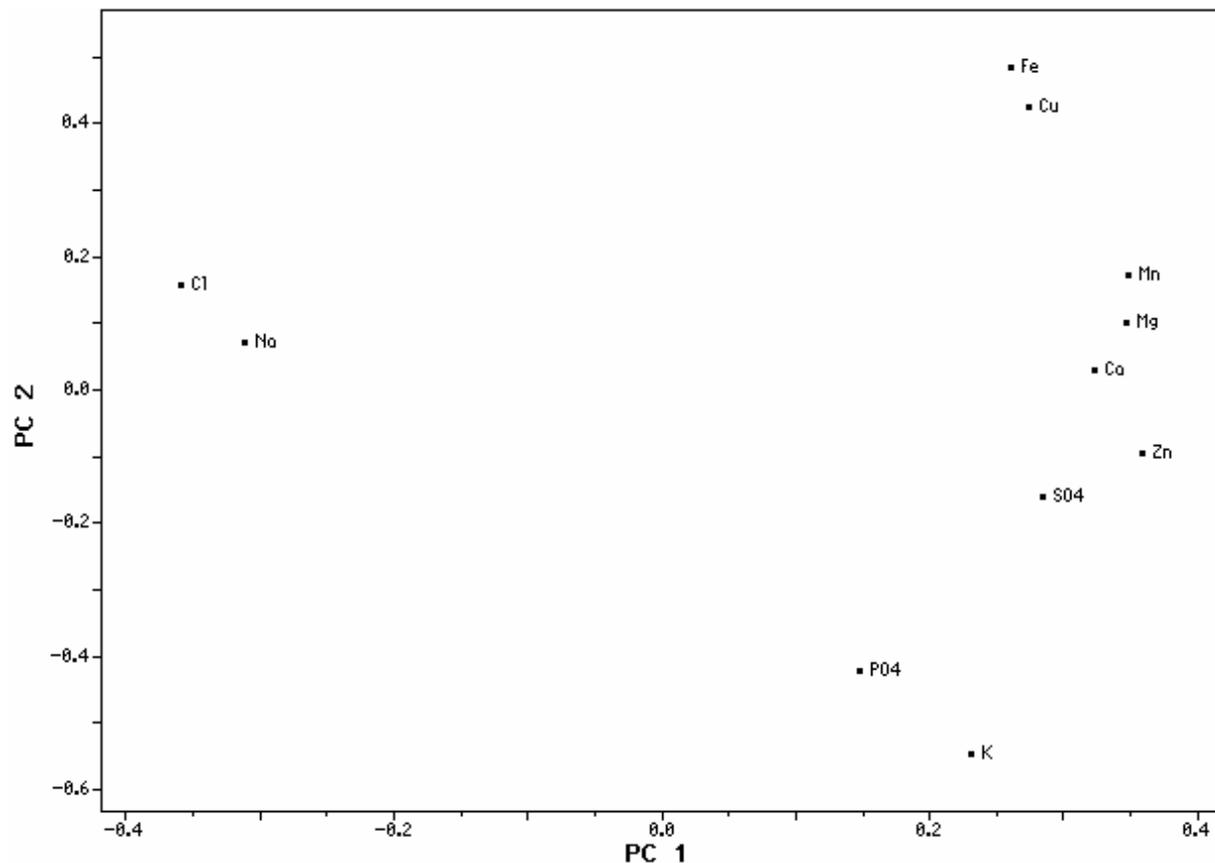


Figura 3. Gráfico dos "loadings", PC2 vs PC1, autoescalamamento, var. tot. 83,27%, influência das variáveis na discriminação geográfica dos quiabos provenientes dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Analisando a PC2, na Figura 2, é possível observar um ligeiro deslocamento da amostra ERN das demais amostras provenientes do Rio Grande do Norte. Isso ocorreu devido aos maiores teores de Fe e Cu em relação aos municípios do Estado do Rio Grande do Norte. Dentro do grupo formado pelos municípios de Pernambuco também pode ser observado um deslocamento entre as amostras: XPE e VSAPE. Isso ocorreu, pois as amostras de quiabo provenientes do XPE possuem maiores teores de PO₄ e K, e as amostras de quiabo de VSAPE possuem maiores teores de Fe e Cu do estado de PE.

Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

As tendências observadas através da análise dos componentes principais (PCA) foram confirmadas através do dendrograma obtido pela HCA (Figura 4), ou seja, é possível observar a formação de dois grandes agrupamentos.

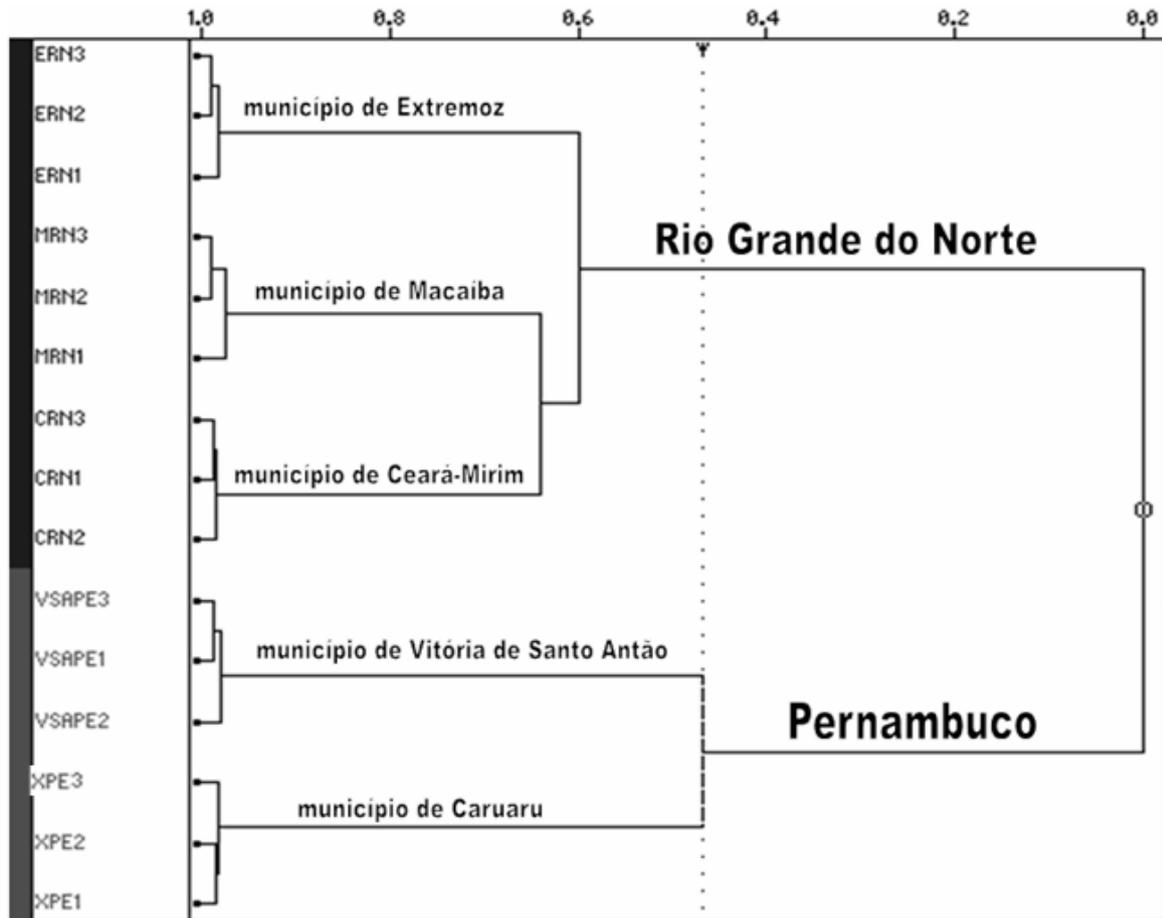


Figura 4 – Dendrograma das amostras (HCA), autoescalamento, distância Euclidiana, técnica de conexão incremental, discriminação geográfica dos quiabos provenientes dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte.

As amostras provenientes do Estado do Rio Grande do Norte: CRN (Coqueiro - município de Ceará-Mirim), MRN (município de Macaíba) e ERN (Estivas - município de Extremoz), formaram um agrupamento. Já as amostras provenientes do Estado de Pernambuco: XPE (Chã Grande - município de Caruaru) e VSAP (município de Vitória de Santo Antão) localizam-se no dendrograma separadas das amostras do Rio Grande do Norte, formando outro agrupamento.

Conclusões

As amostras foram agrupadas de acordo com o esperado, mostrando que a

análise exploratória de dados permite que se obtenham informações rápidas e eficientes sobre a similaridade entre as amostras através de visualização gráfica. A PCA identificou as amostras provenientes de Pernambuco e Rio Grande do Norte, e a HCA confirmou os resultados produzidos pela PCA, discriminando geograficamente as amostras de quiabo. Com isso foi possível demonstrar a aplicação da análise exploratória de dados (HCA e PCA) na discriminação geográfica de alimentos. Desse modo, como o avanço tecnológico dos programas computacionais nesta área tornou-os disponíveis e a utilização deles é relativamente simples, é possível que os analistas de alimentos utilizem os métodos multivariados corretamente, para a construção de modelos de previsão ou classificação, com o objetivo de prever a origem de amostras alimentares.

ABSTRACT

Application of the exploratory analysis of data in the geographical discrimination of okra of Rio Grande do Norte and Pernambuco

The contents of Cu, Zn, Na, Fe, K, Ca, Mn, Mg, PO₄³⁻, Cl⁻ and SO₄²⁻ were determined in samples of okra of the municipal districts of Caruaru and Vitória de Santo Antão, in Pernambuco, as well as in the municipal districts of Ceará-Mirim, Macaíba and Extremoz in the state of Rio Grande do Norte. The objective of this work is the application of two methods of exploratory analysis of data: Principal Component Analysis - PCA and Hierarquical Cluster Analysis - HCA in the geographical discrimination of okra originating in the states of Rio Grande do Norte and Pernambuco. The results showed that Cl⁻ and Na were the main elements for the differentiation of the samples of Rio Grande do Norte and, the samples of Pernambuco presented the largest amount of Fe, Cu, Mn, Mg, Ca, Zn, K, PO₄³⁻, and SO₄²⁻. Boths the methods of exploratory analysis of data investigated are efficient for geographical discrimination of okra originating in Rio Grande do Norte and Pernambuco.

Keywords: *exploratory analysis, chemometrics, PCA, HCA, okra*

Referências Bibliográficas

- [1] Balbach, A.; Boarim, D. S. F. *As Hortaliças na Medicina Natural*, 1ª ed. São Paulo: Missionária, 1992.

- [2] Almeida, F. S. Guia de Herbicidas: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional, Londrina: IAPAR, 1985.
- [3] Camargo, L. S. As Hortaliças e seu Cultivo. Revista e atualizada, 3ª ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992.
- [4] Malavolta, E. Manual de Química Agrícola, São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.
- [5] Bruns, R. E.; Faigle, J. F. G. *Quim. Nova* **1985**, 8, 84.
- [6] Beebe, K. R.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 1007A.
- [7] Silva, F. V.; Kamogawa, M. Y.; Ferreira, M. M. C.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. *A. Eclét. Quím.* **2002**, 27, 91.
- [8] Panero, F. S.; Silva, H. E. B. Abstract do 1st International Meeting on Chemometrics and Multivariate Analysis Applied to Cultural Heritage and Environment, Nemi-Rome, Italy, 2006.
- [9] Silva, H. E. B.; Panero, F. S.; Israel, M. A. S. Abstract of the 10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.
- [10] Panero, F. S.; Silva, H. E. B.; Panero, J. S. *Chinese J. Geochemistry* **2006**, 25, 165.
- [11] Moura, M. C. S.; Lopes, A. N. C.; Moita, G. C.; Neto, J. M. M. *Quim. Nova* **2006**, 29, 429.
- [12] De Sousa, R. A.; Neto, W. B.; Poppi, R. J.; Baccam, N.; Cadore, S. *Quim. Nova* **2006**, 29, 654.
- [13] Ferreira, E. C.; Rodrigues, S. H. B. G.; Ferreira, M. M. C.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A. *Eclét. Quím.* **2002**, 27, 77.
- [14] Panero, F. S.; da Silva, H. E. B. *Microchem. J.* **2008**, 88, 194.
- [15] Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C. *Quim. Nova* **2007**, 30, 481.
- [16] Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: a practical guide*, New York: John Wiley & Sons, 1997.
- [17] Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, New York: John Wiley & Sons, 1986.
- [18] EIN*SIGHT 3.0, Infometrix, Seattle, USA, 1991
- [19] De Oliveira, A. P.; Gomes Neto, J. A.; Ferreira, M. M. C. *Eclét. Quím.* **2006**, 31, 7.
- [20] Morgano, M. A.; Queiroz, S. C. N.; Ferreira, M. M. C. *Braz. J. Food Technol.* **1999**, 2, 73.

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.

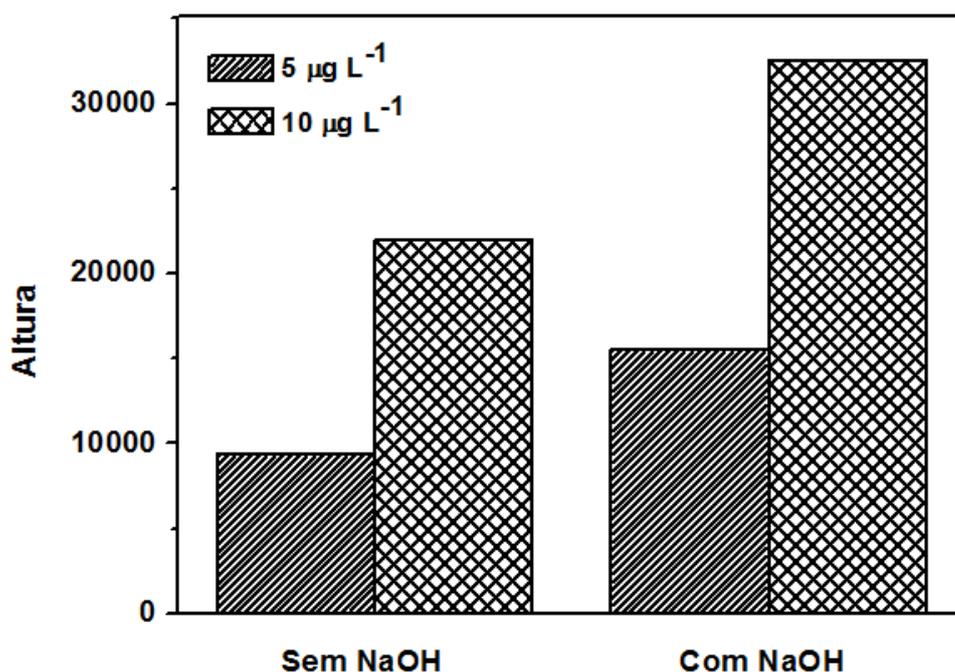


Figura 2. Eficiência de extração da fibra CAR-PDMS para CHCl_3 com e sem adição de NaOH 6 M em soluções fortificadas com 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Tempo de extração de 10 minutos a 20 °C. Agitação magnética de 500 RPM. Concentração de CHCl_3 : 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 3$.

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.

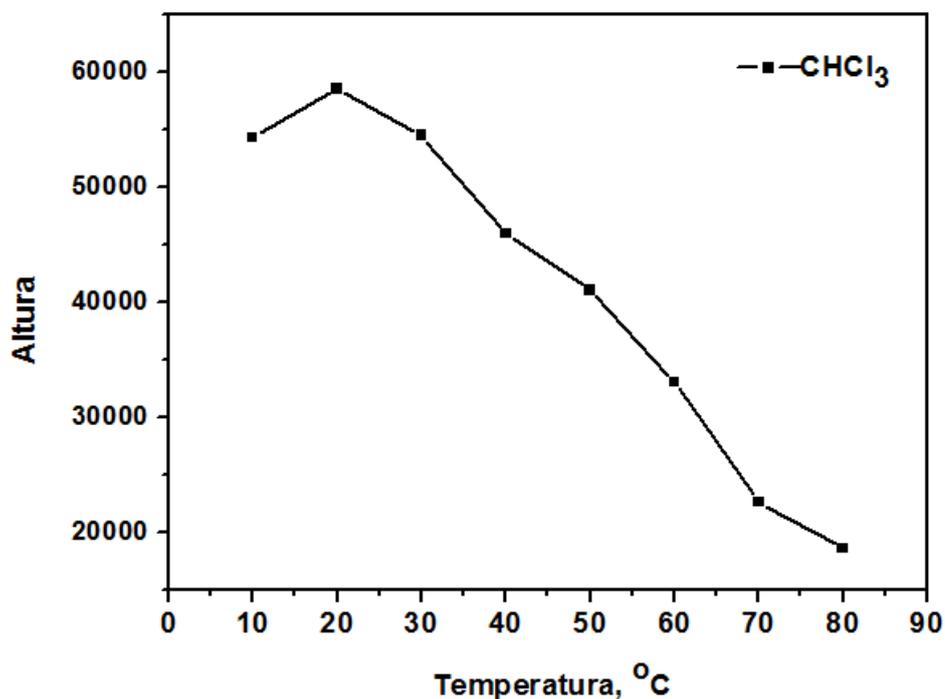


Figura 3. Efeito da temperatura de extração. 10 mL de uma amostra de água saborizada fortificada com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de CHCl_3 . 80 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C, $n = 3$. Onde a responde é a média da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

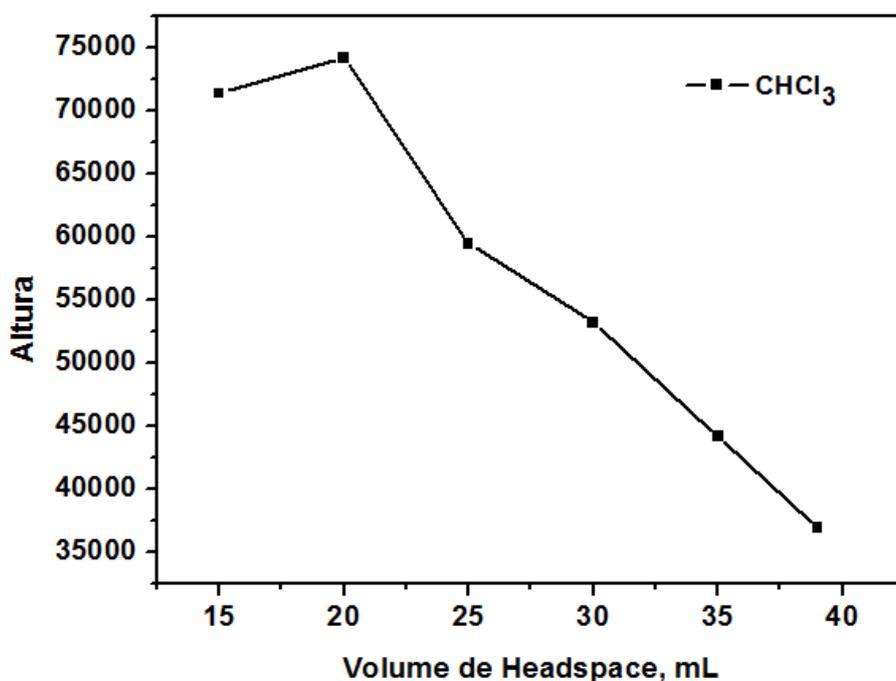


Figura 4. Efeito do volume de *headspace* na extração de CHCl_3 . 80 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 30 °C e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C, $n = 3$.

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].

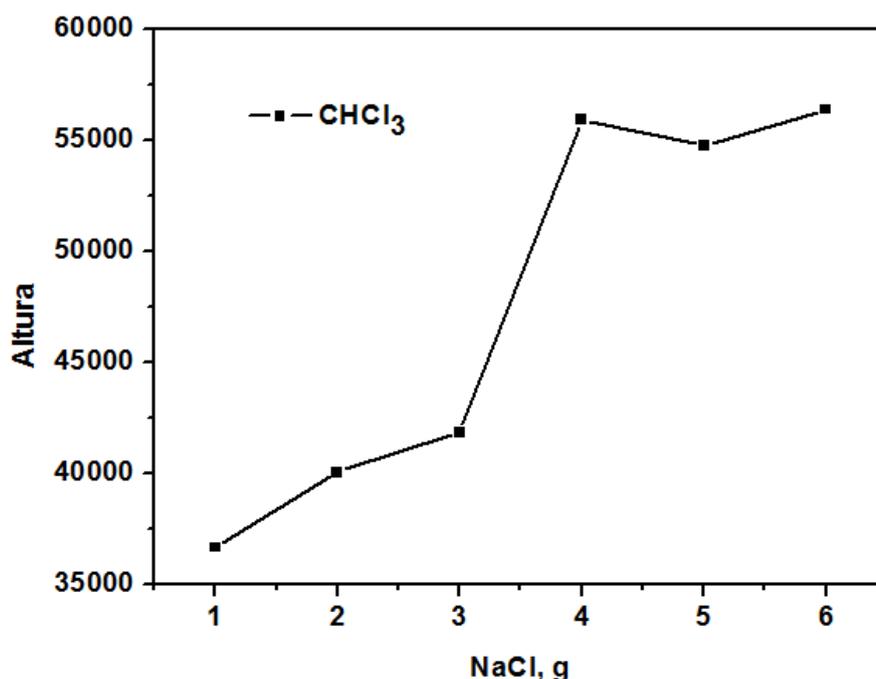


Figura 5. Efeito da adição de sal na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio. 150 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 20 °C e 500 RPM de agitação magnética, tempo de dessorção de 3 minutos a 280 °C, $n = 3$.

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.

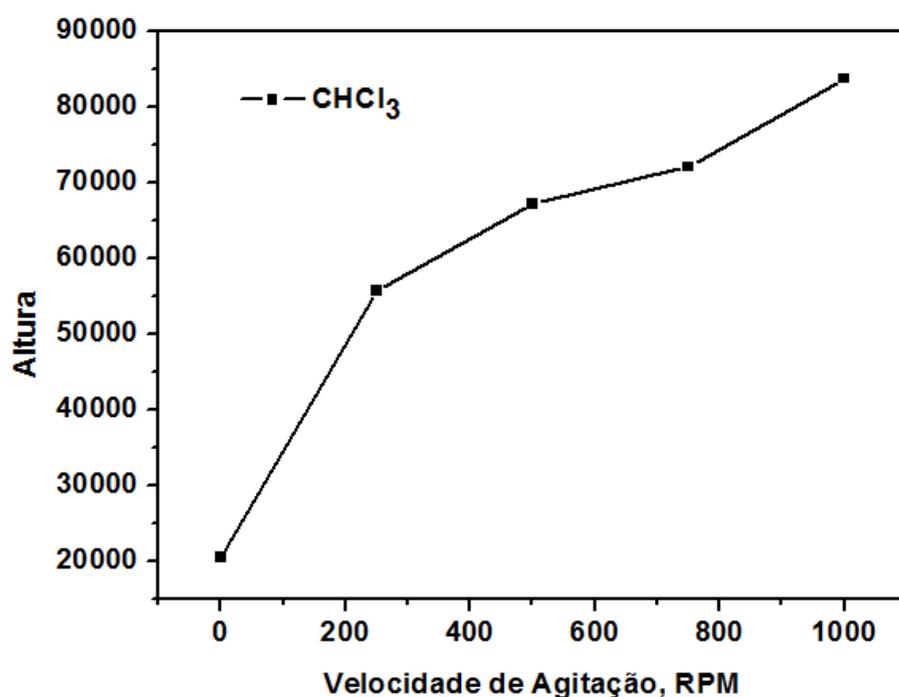


Figura 6. Efeito da velocidade de agitação magnética na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de clorofórmio e 4 g de NaCl. 150 μL de NaOH 6 M. Tempo de extração de 10 minutos a 20°C , tempo de dessorção de 3 minutos a 280°C , $n = 3$.

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.

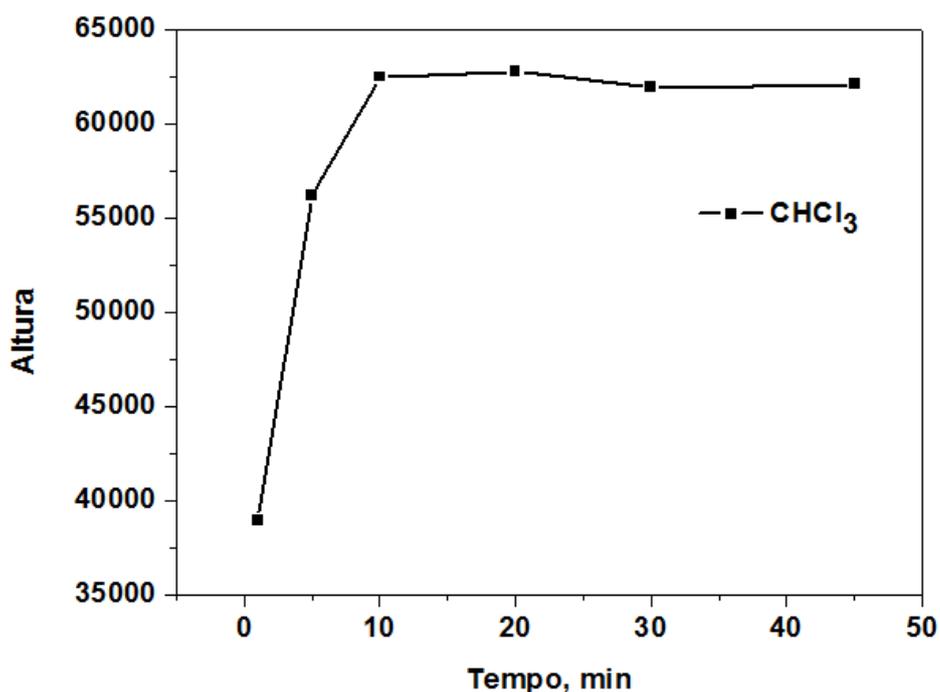


Figura 7. Efeito do tempo na extração de CHCl_3 . 20 mL de amostra de água saborizada fortificada com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ CHCl_3 . 150 μL de NaOH 6 M e 4 g de NaCl. Tempo de desorção de 3 minutos a 280°C , $n = 3$.

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.

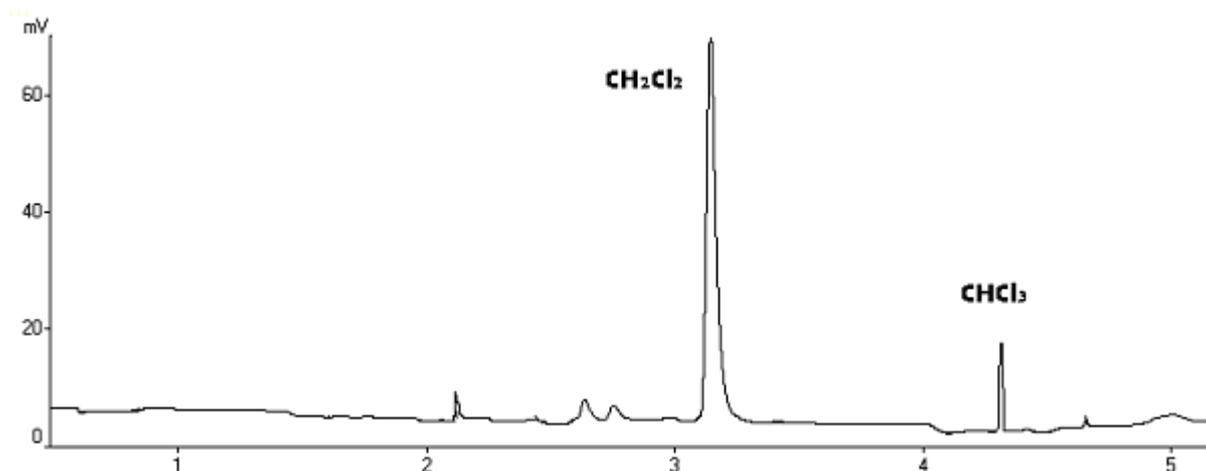


Figura 8. Cromatograma da amostra de água saborizada de sabor limão e menta designada como amostra "B". Os picos com o tempo de retenção de 3,1 e 4,2 minutos se referem ao padrão interno diclorometano e clorofórmio, respectivamente.

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](#)]

Preliminary study on enzymatic kinetic resolution of isopropylidene glycerol

Yara J. K. Araujo, Dênis Pires de Lima, and Adilson Beatriz*

Departamento de Química, CCET, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller, 1555, CEP 79074-460 - Campo Grande-MS, Brazil.

Received: 14 July 2009; revised: 02 September 2009; accepted: 24 September 2009.
Available online: 26 September 2009.

ABSTRACT: This work presents a preliminary screening directed to obtaining optically active glycerol derivatives. It was tested six lipases from different sources as a means for kinetic resolution.

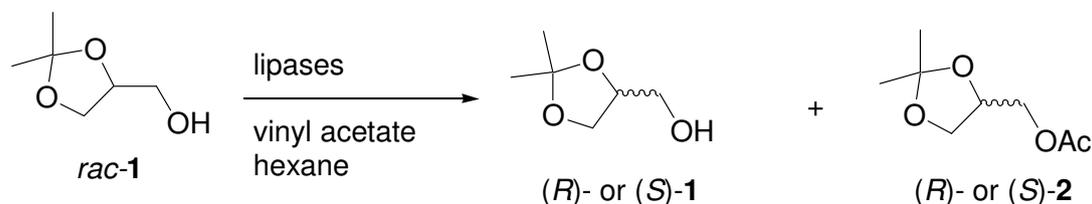
Keywords: isopropylidene glycerol, enzymatic resolution, lipase, biocatalysis

Optically active 1,2-*O*-isopropylidene glycerol (IPG) is an useful starting material for synthesis of important compounds, such as glycerophospholipids, β -blockers, prostaglandins, PAF (platelet aggregation factor) and many others [1, 2]. This compound is usually synthesized from *D*-mannitol and *L*-serine or ascorbic acid [1]. An important alternative to prepare chiral glycerol derivatives is using glycerol itself. The differentiation of two enantiotopic groups in the prochiral glycerol molecule would in fact lead to chiral molecules, which could be transformed in both enantiomers of glycerol derivatives by selective functional group manipulation [3]. These desymmetrization methods have long been exploited either in the chemical catalysis as in biocatalysis and offer a valuable tactic for asymmetric induction. In biocatalytic process is often the use of isolated enzymes [4] or whole microorganisms [5], and it has incited much attention from researchers because it's an environmentally friendly process [6]. Enzymatic resolution of a racemate is also a widely used method to obtain enantiomerically enriched compounds [6, 7].

Hydrolytic enzymes such as lipases, esterases, and proteases have been used

* Corresponding author: adilbeat@nin.ufms.br

extensively as catalysts in enantioselective and regioselective synthesis [2, 8, 9]. However, enantioselective esterification of primary alcohol of glycerol derivatives, such as IPG (*rac*-**1**) is still a challenge. Thus, screening with different source of lipases is valuable to achieve suitable selectivity. In this work we present a screening made with 6 lipases for kinetic resolution by acetylation of racemic IPG in order to obtain optically active glycerol derivatives (scheme 1).



Scheme 1. Kinetic resolution of IPG

Lipases from porcine pancreas (II), wheat germ and *Candida rugosa* were purchased from Sigma-Aldrich Co., *Penicillium camembertii* and *Thermomyces lanuginosa* lipases from Fluka Co. Lipase from *Candida antarctica* (Novozym 435) was donated by Novozymes. Glycerol and vinyl acetate were purchased from Acros (Brazil). Hexane was of analytical grade. The enantiomeric excess (*ee*) was determined by GC using a GC Varian 3800 with chiral adsorbent Astec Chiraldex B-PM. Chromatographic conditions: injector temperature: 250 °C; oven initial temperature 75 °C to 105 °C at 1 °C/min. The flame ionization detector was maintained at 250 °C; carrier gas: helium gas (1 mL/min). ¹H and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker AVANCE DPX-300 spectrometer and were recorded at 300 and 75 MHz respectively. IPG (*rac*-**1**) was prepared from glycerol using a literature procedure [10]. According to work of Kawanami et al. [2], dry hexane was the best choice of solvent among several others for kinetic resolution of cyclic ketals of glycerol. Thus, the solvent was chosen to our reactions.

The compound **1** (30 mg) was subjected to kinetic resolution in dry hexane (6 mL) using 6 different lipases (5 or 1 mg), and the vinyl acetate (1.1 eq.) as the acylating agent, at 30 °C under continuous stirring (150 rpm) in an orbital shaker. The results are presented in Table 1.

According to Table 1, all six lipases showed low selectivity. The results are in accordance to a reported result where enantioselectivity of other lipases toward primary alcohol is much lower than to secondary alcohol [11].

An important outcome is that the use of 2.2 eq. of vinyl acetate causes a dramatic increase in the enantioselectivity promoted by lipase from *P. camembertii* (*ee* >99%).

Table 1. Kinetic Resolution of IPG^a

Lipase	Time (min)	ee _s ^{*b} (%)	ee _p ^b (%)	Conv. (%)	E-value ^c
<i>T. lanuginosa</i>	90	20 (S) ^d	25 (R) ^d	43	2,0
Novozym 435	15	3 (R)	5 (S)	30	1,1
<i>P. camembertii</i>	420	-	14 (R)	1	-
Porcine Pancreas	420	-	5 (S)	6	-
<i>Candida rugosa</i>	300	10 (S)	31 (R)	27	2,0
wheat Germ	480	3 (S)	20 (R)	>0,1	-

^aExperimental conditions: Substrate (3 mg); lipase (5 mg/1 mg to *T. lanuginosa*); vinyl acetate (1.1 eq.); dry hexane (6 mL), at 30 °C under continuous agitation (150 rpm).

^bDetermined by GC (column CHIRALDEX B-PM)

^cCalculated by using the equation: $E = \ln[(1-ee_s)(1+ee_p/ee_p)]^{-1} / \ln[1+ee_s)(1+ee_s/ee_p)]^{-1}$ [ref. 5]

^dAbsolute configuration was determined by comparison of the specific optical rotation with literature [ref. 12]

*ee_s = substrate enantiomeric excess; ee_p = product enantiomeric excess

Although it was achieved low *E* values for this enantioselective kinetic resolution, the results prompted us to take the next step in the research and make a detailed study of these reactions so as to have a better understanding of these results, including the increase of the enantiomeric excess from 14% (1.1 eq. of vinyl acetate) to >99% (2.2 vinyl acetate) promoted by lipase of *P. camembertii*.

Acknowledgements

This work had financial support of FUNDECT-MS (Brazil). The authors thank Novozymes. They also want to thank Chemist Maxwell P. Andreu and Prof. Dr. Luiz H. Viana (UFMS) for chiral GC analysis.

References and Notes

- [1] Britgoff, D.; Laumen, K.; Schneider M. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1583.

- [2] Kawanami, Y.; Honnma, A.; Ohta, K.; Matsumoto, N. *Tetrahedron* **2005**, 61, 693.
- [3] Mukaiyama, T.; Tanabe, Y.; Shimizu, M. *Chem. Lett.* **1984**, 401.
- [4] Richter, N.; Neumann, M.; Liese, A.; Wohlgemuth, R.; Eggert, T.; Hummel, W. *ChemBioChem.* **2009**, 12, 1888.
- [5] Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry*, 4th ed. Berlin: Springer, 2000.
- [6] Fessner, W-D.; Anthonsen, T., eds. *Modern Biocatalysis - Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.
- [7] Strübing, D.; Krumlinde, P.; Piera, J.; Bäckvall, Jan-E. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1577.
- [8] Bianchi, D.; Bosetti, A.; Golini, P.; Cesti, P.; Pina, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 817.
- [9] Vänttinen, E.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 923.
- [10] Renoll, M.; Newman, M. S. *Organic Syntheses*, Coll. Vol. 3, 1955, 5023; Vol. 28, 1948, 73.
- [11] Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH, 1999; p. 65.
- [12] Molinari, F.; Cavenago, K. S.; Romano, A.; Romano, D.; Dandoli, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 1945.