UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RICARDO DE PRÁ URIO

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E
SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA EM COLUNAS MONOLÍTICAS E
SUPERFICIALMENTE POROSAS PARA DETERMINAÇÃO DE
HERBICIDAS TRIAZÍNICOS EM SOLOS E ÁGUAS**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O Original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

11/11/2015

RICARDO DE PRÁ URIO

Desenvolvimento e avaliação de métodos de extração e separação cromatográfica em colunas monolíticas e superficialmente porosas para determinação de herbicidas triazínicos em solos e águas

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do Título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

11/11/2015

Dedicatória

**Dedico essa Tese aos meus pais Jaime
Urio e Zenilde Teresinha De Prá Urio e a
minha irmã Agnese De Prá Urio.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Jorge Cesar Masini, pelas orientações, ajuda e incentivo e a quem devo grande parte dos conhecimentos científicos adquiridos durante o Doutorado.

Ao professor Dr. Gilberto Abate, que gentilmente forneceu a amostra de solo para a realização de parte dos estudos aqui apresentados.

A todos os amigos do laboratório, que proporcionaram um excelente ambiente de trabalho, contribuindo direta ou indiretamente para o bom andamento das atividades do grupo de pesquisa: Fernando, Gabriel, Diego, Luis Fernando e Marilda.

A todos os demais amigos e funcionários do IQ-USP, com quem tenho convivido diariamente durante todo o Doutorado, pela disponibilidade e auxílio prestado.

A FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo.

“O mundo não é um arco-íris e um amanhecer, na verdade é um lugar ruim e asqueroso. E não importa o quão durão você seja, apanhará e ficará de joelhos, se assim permitir. Nem você, nem ninguém baterão tão forte quanto a vida. Porém, não se trata de quão forte pode se bater, se trata de quão forte se pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada”.

Rocky Balboa

RESUMO

Urio, R. De P. **Desenvolvimento e avaliação de métodos de extração e separação cromatográfica em colunas monolíticas e superficialmente porosas para determinação de herbicidas triazínicos em solos e águas.** 2015. 191 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Química, Insituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O uso de pesticidas levou ao aumento da produtividade e qualidade dos produtos agrícolas, porém o seu uso acarreta na intoxicação dos seres vivos pela ingestão gradativa de seus resíduos que contaminam o solo, a água e os alimentos. Dessa forma, há a necessidade do monitoramento constante de suas concentrações nos compartimentos ambientais. Para isto, busca-se o desenvolvimento de métodos de extração e enriquecimento de forma rápida, com baixo custo, gerando um baixo volume de resíduos, contribuindo com a química verde. Dentre estes métodos destacam-se a extração por banho de ultrassom e a extração por ponto nuvem. Após o procedimento de extração, o extrato obtido pode ser analisado por técnicas de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC), empregando fases estacionárias modernas, tais como as monolíticas e as partículas superficialmente porosas. O emprego de SIC com coluna monolítica (C_{18} , 50 x 4,6 mm) e empacotada com partículas superficialmente porosas (C_{18} , 30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm) foi estudado para separação de simazina (SIM) e atrazina (ATR), e seus metabólitos, desetilatrastina (DEA), desisopropilatrastina (DIA) e hidroxiatrazina (HAT). A separação foi obtida por eluição passo-a-passo, com fases móveis compostas de acetonitrila (ACN) e tampão Acetato de Amônio/Ácido acético ($\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$) 2,5 mM pH 4,2. A separação na coluna monolítica foi realizada com duas fases móveis: $\text{MP}_1 = 15:85$ (v v^{-1}) $\text{ACN}:\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ e $\text{MP}_2 = 35:65$ (v v^{-1}) $\text{ACN}:\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ a uma vazão de 35 $\mu\text{L s}^{-1}$. A separação na coluna com partículas superficialmente porosas foi efetivada com as fases móveis $\text{MP}_1 = 13:87$ (v v^{-1}) $\text{ACN}:\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ e $\text{MP}_2 = 35:65$ (v v^{-1}) $\text{ACN}:\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ à vazão de 8 $\mu\text{L s}^{-1}$. A extração por banho de ultrassom em solo fortificado com os herbicidas (100 e 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) resultou em recuperações entre 42 e 160%. A separação de DEA, DIA, HAT, SIM e ATR empregando HPLC foi obtida por um gradiente linear de 13 a 35% para a coluna monolítica e de 10 a 35% ACN na coluna com partículas superficialmente porosas, sendo a fase aquosa constituída por tampão $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2. Em ambas as colunas a vazão foi de 1,5 mL min^{-1} e o tempo de análise 15 min. A extração por banho de ultrassom das amostras de solo com presença de ATR, fortificadas com concentrações de 250 a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, proporcionou recuperações entre 40 e 86%. A presença de ATR foi confirmada por espectrometria de massas. Foram realizados estudos de fortificação com ATR e SIM em amostras de água empregando a extração por ponto nuvem com o surfactante Triton-X114. A separação empregando HPLC foi obtida por um gradiente linear de 13 a 90% de ACN para a coluna monolítica e de 10 a 90% de ACN para a coluna empacotada, sempre em tampão $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2. Em ambas as colunas a vazão foi de 1,5 mL min^{-1} e o tempo de análise 16 min. Fortificações entre 1 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ resultaram em recuperações entre 65 e 132%.

Palavras-chave: Cromatografia por Injeção Sequencial; Coluna monolítica; fase superficialmente porosa; extração; ultrassom; ponto nuvem.

ABSTRACT

Urio, R. De P. **Development and evaluation of extraction and chromatographic methods in monolithic and core-shell columns for determination of triazine herbicides in soils and waters.** 2015. 191 p. Thesis – Post-graduate Program in Chemistry, Insitute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

The use of pesticides has led to increased productivity and quality of agricultural products, but its use brings the intoxication of living beings by the gradual intake of their residues that contaminate soil, water and food. Thus, there is the need for constant monitoring of their concentrations in environmental compartments. For this, there is a quest for development of fast extraction and enrichment methods, at low cost, generating a low volume of waste, contributing to green chemistry. These methods include the extraction assisted by ultrasound bath and the cloud point extraction. After the extraction, the extract obtained can be analyzed by techniques such as High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Sequential Injection Chromatography (SIC) employing modern stationary phases, such as monolithic and superficially porous particles. The use of SIC with either monolithic column (C_{18} , 50 x 4.6 mm) or column packed with superficially porous particles (C_{18} , 30 x 4.6 mm, 2.7 μm particle size) was studied for separating simazine (SIM) and atrazine (ATR), and metabolites, deethylatrazine (DEA), deisopropylatrazine (DIA) and hydroxyatrazine (HAT). Separation was obtained by stepwise elution, with a mobile phase consisting of acetonitrile (ACN) and 2.5 mM ammonium acetate / acetic acid (NH_4Ac / HAc) pH 4.2 buffer. The separation was performed with two mobile phases: $\text{MP}_1 = 15:85$ (v v^{-1}) ACN: NH_4Ac / HAc and $\text{MP}_2 = 35:65$ (v v^{-1}) ACN: NH_4Ac / HAc at a flow rate of 35 $\mu\text{L s}^{-1}$. The separation in the column with superficially porous particles was carried out with the mobile phases $\text{MP}_1 = 13:87$ (v v^{-1}) ACN: NH_4Ac / HAc and $\text{MP}_2 = 35:65$ (v v^{-1}) ACN: NH_4Ac / HAc at 8 $\mu\text{L s}^{-1}$. The ultrasound bath extraction from a soil fortified with herbicides (100 and 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) resulted in recoveries between 42 and 160 %. Separation of DEA, DIA, HAT SIM and ATR was obtained by HPLC employing a linear gradient from 13 to 35% for the monolithic column and from 10 to 35% ACN in the column packed with superficially porous particles, with the aqueous phases consisting of 2.5 mM NH_4Ac / HAc buffer pH 4.2. In both columns the flow rate was 1.5 mL min^{-1} and the analysis time was 15 min. Ultrasonic extraction from a soil sample containing ATR, fortified with concentrations from 250 to 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, provided recoveries between 40 and 86%. The presence of ATR was confirmed by mass spectrometry. Fortification studies with ATR and SIM were carried out in water samples employing cloud point extraction using Triton-X114 surfactant. The separation was accomplished by HPLC using a linear gradient from 13 to 90 % of ACN for the monolithic column and from 10 to 90 % ACN for the packed column, always in 2.5 mM NH_4Ac / HAc pH 4.2 buffer. In both columns the flow rate was 1.5 mL min^{-1} and the analysis time 16 min. Fortifications between 1 and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ resulted in recoveries between 65 and 132%.

Keywords: Sequential injection chromatography; monolithic column; core-shell column; ultrasound; cloud point

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Rotas de transporte e degradação dos pesticidas.....	19
Figura 02: Sistema micelar formado por surfactantes.....	36
Figura 03: Representação da estrutura química do Triton X-114.....	38
Figura 04: Micrografias de fases estacionárias monolíticas.....	42
Figura 05: Representação esquemática e micrografias de fases estacionárias superficialmente porosas.....	44
Figura 06: Representação dos processos de difusão e transferência de massa em fases estacionárias convencionais e superficialmente porosas.....	46
Figura 07: Reação de desalquilação da atrazina à desetilatrazina.....	62
Figura 08: Reação de desalquilação da atrazina à desisopropilatrazina.....	63
Figura 09: Reação de hidrólise da atrazina à hidroxiatrazina.....	64
Figura 10: Representação esquemática do sistema SICrom™.....	79
Figura 11: Cromatograma obtido para um branco de água deionizada.....	100
Figura 12: Cromatograma obtido para uma solução mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando SIC com a coluna monolítica.....	101
Figura 13: Cromatograma resultante da subtração da absorbância de 223 nm frente à de 300 nm para uma solução mistura dos compostos em estudo.....	103
Figura 14: Relação área de pico x volume de amostra.....	104
Figura 15: Cromatograma obtido para uma solução mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando SIC com a coluna core-shell.....	105
Figura 16: Cromatogramas obtidos para a análise de interferentes em SIC.....	112
Figura 17: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom de amostras de solo, empregando SIC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	116
Figura 18: Efeito na eluição de uma solução mistura das triazinas em estudo diluída em acetonitrila.....	119
Figura 19: Cromatogramas obtidos para os extratos da amostra de solo.....	120

Figura 20: Relação área de pico x volume de amostra e Cromatogramas obtidos para a análise de uma solução mistura dos compostos em estudo em diferentes volumes de amostra.....	123
Figura 21: Cromatogramas obtidos para uma solução mistura dos compostos em estudo na concentração de 40 µg L ⁻¹	124
Figura 22: Cromatogramas obtidos para análise de interferentes empregando o conceito de focalização em coluna.....	126
Figura 23: Cromatogramas obtidos para a análise de interferência de soluções de ácido húmico.....	128
Figura 24: Cromatogramas obtidos para a análise de interferência de soluções de ácido fúlvico.....	129
Figura 25: Cromatogramas obtidos para a análise de extratos aquosos de solo e sedimento e para amostra de água fortificadas com simazina e atrazina.....	131
Figura 26: Recuperações obtidas para as fortificações dos extratos aquosos de solo e sedimento e para a amostra de água.....	132
Figura 27: Cromatogramas obtidos para as composições de gradiente de fase móvel avaliadas para a separação dos compostos em estudo empregando HPLC com a coluna monolítica.....	135
Figura 28: Cromatograma obtido para a análise de uma solução padrão mistura dos compostos em estudo, obtido com a composição de gradiente de fase móvel otimizada empregando HPLC com a coluna monolítica.....	136
Figura 29: Cromatogramas obtidos para as composições de gradiente de fase móvel avaliadas para a separação dos compostos em estudo empregando HPLC com a coluna core-shell.....	137
Figura 30: Cromatograma obtido para a análise de uma solução padrão mistura dos compostos em estudo, obtido com a composição de gradiente de fase móvel otimizada empregando HPLC com a coluna core-shell.....	139
Figura 31: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o estudo de fortificação com os compostos em estudo e extração por banho de ultrassom de uma amostra de solo com a presença de atrazina empregando HPLC com a coluna monolítica.....	146
Figura 32: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para o estudo de fortificação com os compostos em estudo e extração por banho de ultrassom de uma amostra de solo com a presença de atrazina empregando HPLC com a coluna core-shell.....	147
Figura 33: Espectro de massas obtido para a amostra de solo com presença de atrazina empregando HPLC/MS-MS com a coluna monolítica.....	149
Figura 34: Espectro de massas obtido para a amostra de solo com presença de atrazina empregando HPLC/MS-MS com a coluna core-shell.....	151

Figura 35: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom da amostra de solo com presença de atrazina, empregando HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	153
Figura 36: Cromatograma obtido para a análise de uma solução padrão mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna monolítica.....	157
Figura 37: Cromatograma obtido para a análise de uma solução padrão mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna core-shell.....	159
Figura 38: Cromatogramas obtidos para a análise de soluções padrão mistura dos compostos em estudo nas concentrações de 5 e 250 µg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna monolítica.....	164
Figura 39: Cromatogramas obtidos para a análise de soluções padrão mistura dos compostos em estudo nas concentrações de 5 e 250 µg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna core-shell.....	166
Figura 40: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por ponto nuvem de amostra de água (1), empregando HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	168
Figura 41: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por ponto nuvem de amostra de água (2), empregando HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	169
Figura 42: Cromatogramas obtidas para a análise das amostras de água, fortificadas com os compostos em estudo e submetidas a extração por ponto nuvem, empregando HPLC com a coluna monolítica.....	172
Figura 43: Cromatogramas obtidas para a análise das amostras de água, fortificadas com os compostos em estudo e submetidas a extração por ponto nuvem, empregando HPLC com a coluna core-shell.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Classificação dos pesticidas.....	18
Tabela 02: Quantidades adicionadas de solo, solução mistura das triazinas em estudo e concentração teórica das amostras no estudo de extração por banho de ultrassom.....	86
Tabela 03: Parâmetros analíticos obtidos para as curvas analíticas de referência dos compostos em estudos, com concentrações entre 0,1 e 1 mg L ⁻¹ , avaliados para diferentes concentrações de tampão de fase móvel, empregando SIC com a coluna monolítica.....	98
Tabela 04: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência dos compostos em estudo, com concentrações entre 0,1 e 1 mg L ⁻¹ , empregando SIC com a coluna core-shell.....	107
Tabela 05: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando Cromatografia por Injeção Sequencial.....	109
Tabela 06: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência dos compostos em estudo, com concentrações entre 0,1 e 1 mg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	141
Tabela 07: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando o HPLC Shimadzu.....	143
Tabela 08: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando o HPLC Dionex.....	161
Tabela 09: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência dos compostos em estudo, com concentrações entre 5 e 250 µg L ⁻¹ , empregando HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell.....	163

LISTA DE SIGLAS

AMA: Ametrina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: Ionização química à pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APP: Fotoionização à pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*

ATR: Atrazina

BRO: Bromacil

CI: Ionização química, do inglês *Chemical Ionization*

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPE: Extração por ponto nuvem, do inglês *Cloud Point Extraction*

DEA: Desetilatrazina

DIA: Desisopropilatrazina

DIU: Diuron

EC: Comunidade da União Europeia, do inglês *European Communities*

EI: Ionização por impacto de elétron, do inglês *Electron Ionization*

ESI: Ionização por eletronebulização, do inglês *Electrospray Ionization*

GC: Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LD₅₀: Dose letal oral capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste

LIU: Linuron

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCL: Concentração máxima permitida (para águas potáveis), do inglês *Maximum Contaminant Level*

MET: Metribuzina

MMA: Ministério do Meio Ambiente

MS: Espectrometria de massas, do inglês *Mass Spectrometry*

MS: Ministério da Saúde

SIA: Análise por Injeção Sequencial, do inglês *Sequential Injection Analysis*

SIC: Cromatografia por Injeção Sequencial, do inglês *Sequential Injection Chromatography*

SIM: Simazina

SINDAG: Sindicato de Industria de Defensivos Agrícolas

TIU: Tebuthiuron

UE: União Europeia

US-EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United States Environmental Protection Agency*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Retenção de pesticidas no solo	19
1.2 Degradação de pesticidas no solo	20
1.2.1 Hidrólise.....	20
1.2.2 Fotodegradação	21
1.2.3 Biodegradação	22
1.3 Transporte de pesticidas no solo.....	24
1.3.1 Lixiviação.....	24
1.3.2 Escoamento superficial	26
1.3.3 Volatilização	28
1.4 Análise de pesticidas	29
1.4.1 Extração de pesticidas	31
1.4.1.1 Extração por banho de ultrassom.....	32
1.4.1.2 Extração por ponto de nuvem	34
1.4.2 Separação, identificação e quantificação de pesticidas.....	38
1.4.2.1 Cromatografia por Injeção Sequencial	38
1.4.2.2 Fases estacionárias monolíticas.....	40
1.4.2.3 Fases estacionárias de partículas superficialmente porosas	44
1.4.2.4 Detecção espectrofotométrica e espectrometria de massas	47
1.5 Pesticidas selecionados para estudo.....	54
1.5.1 Ametrina	56
1.5.2 Atrazina.....	57
1.5.3 Bromacil.....	59
1.5.4 Diuron	60
1.5.5 Desetilatrazina.....	61
1.5.6 Desisopropilatrazina	62
1.5.7 Hidroxiatrazina.....	64
1.5.8 Linuron.....	65
1.5.9 Metribuzina.....	66
1.5.10 Simazina.....	68
1.5.11 Tebuthiuron.....	69
2 OBJETIVOS	71
2.1 Objetivos gerais.....	71
2.2 Objetivos específicos	71
3 PARTE EXPERIMENTAL	73
3.1 Materiais.....	73
3.1.2 Amostras e padrões.....	77
3.2 Métodos	78
3.2.1 Cromatografia por Injeção Sequencial	78

3.2.1.1 Avaliação da composição de fase móvel para a separação de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.....	78
3.2.1.2 Estudos de interferentes em Cromatografia por Injeção Sequencial empregando coluna monolítica e coluna core-shell.....	83
3.2.1.3 Estudo de fortificação e extração de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina em solo, empregando banho de ultrassom, Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.....	84
3.2.1.4 Estudos de focalização em coluna monolítica empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial.....	87
3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	90
3.2.2.1 Estudos de fortificação e extração de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina em solo com a presença de atrazina, empregando banho de ultrassom, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell	90
3.2.2.2 Estudos de fortificação e extração de atrazina e simazina em amostras de água, empregando ponto nuvem, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell	94
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
4.1 Cromatografia por Injeção Sequencial.....	96
4.1.1 Avaliação da composição de fase móvel para a separação de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.....	96
4.1.2 Estudos de interferentes em Cromatografia por Injeção Sequencial empregando coluna monolítica e coluna core-shell.	111
4.1.3 Estudo de fortificação e extração de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina em solo, empregando banho de ultrassom, Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.....	115
4.1.4 Estudos de focalização em coluna monolítica empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial	122
4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	134
4.2.1 Estudos de fortificação e extração de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina em solo com a presença de atrazina, empregando banho de ultrassom, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell	134
4.2.2 Estudos de fortificação e extração de atrazina e simazina em amostras de água, empregando ponto nuvem, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell	156
5 CONCLUSÕES	175
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
7 ANEXOS	189

1 Introdução

Em práticas agrícolas um sistema produtivo deve ser planejado desde o início da instalação da lavoura até o produto chegar à prateleira do mercado, ou a mesa do consumidor. Com relação a sua produção se espera que esta seja competitiva, eficiente e que esteja englobada em práticas ambientais corretas, como a manutenção dos recursos naturais, como o solo e a água. Para isso, parte dos produtores tem optado por sistemas rotacionais de cultura permitindo a melhoria e a manutenção das qualidades físicas e químicas do solo (Silva *et al*, 2007).

Mesmo com a implantação desses sistemas de culturas rotacionais, todas as culturas agrícolas estão suscetíveis a interferências de plantas daninhas, o que torna essencial a implementação de práticas defensivas, através da utilização do controle químico, realizado através do emprego de pesticidas.

O emprego de pesticidas na agricultura desde os anos 1940 promoveu um aumento na produtividade e uma melhora na qualidade dos produtos agrícolas, possibilitando o atendimento da demanda alimentícia da maioria dos países. Apesar dos benefícios que trazem os pesticidas, o problema de intoxicações causadas pelo uso dos mesmos tem se tornado uma grande preocupação nas últimas décadas, especialmente pelo fato de que estas intoxicações acontecem pela injeção gradativa destes produtos que contaminam a água, os alimentos e o solo (Rissato *et al*, 2004).

O Brasil desde 2008 assumiu o posto do país que mais emprega pesticidas no mundo. Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entre o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o consumo de pesticidas no Brasil foi superior a 936 mil toneladas de produtos comerciais (cerca

de 400 mil toneladas em quantidade de ingrediente ativo). Isto representa um aumento no consumo de pesticidas de 700% nos últimos 40 anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse mesmo período. Mato Grosso foi o maior consumidor de pesticidas, representando 18,9%, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%), Rio Grande do Sul (10,8%), Goiás (8,8%), Minas Gerais (9%), Bahia (6,5%), Mato Grosso do Sul (4,7%) e Santa Catarina (2,1%). Segundo dados do Sindicato Nacional de Indústrias de Defensivos Agrícolas (SINDAG) em 2011, de um volume total de 852,8 milhões de litros de pesticidas empregados nas mais diversas culturas agrícolas, a soja utilizou 40% desse volume, seguida do milho (15%), da cana-de-açúcar e do algodão com 10%, dos citros (7%), do café (3%), do trigo e do arroz com 3%, do feijão (2%), da batata, do tomate e da pastagem com 1%, da maçã (0,5%), da banana (0,2%) e das demais culturas com 3,3% (Carneiro *et al*, 2012).

No Brasil, cerca de 430 ingredientes ativos e 2.400 formulações de pesticidas estão registradas no Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e no Ministério do Meio Ambiente (MMA). Dos 50 pesticidas mais empregados nas lavouras do Brasil, 22 são proibidos na União Europeia (UE) (Carneiro *et al*, 2012).

Defini-se por pesticida todo e qualquer produto químico empregado para combater pragas (plantas daninhas, animais ou microrganismos) que se prolifere e viva em meio às diversas culturas agrícolas, acarretando em prejuízos às mesmas. A Tabela 1 agrupa as diferentes classes que englobam os pesticidas e as pragas às quais atacam.

Tabela 1: Classificação dos pesticidas

Classe Pesticida	Praga de combate
Acaricida	Caraças, Aranhas, Acarinos
Antimicrobiano	Micróbios
Fungicidas	Fungos
Herbicidas	Plantas e ervas daninhas
Inseticidas	Insetos
Moluscidas	Caracóis e Lesmas
Rodenticidas	Roedores

Uma vez aplicados os pesticidas podem atingir o solo de forma direta ou indireta. Atingem de forma direta através da incorporação superficial dos mesmos quando estes são aplicados diretamente sobre as plantas agrícolas ou solo, para a remoção de pragas ou ervas daninhas. Podem ainda atingir o solo de forma indireta, através da pulverização das partes aéreas das plantas e pela queda de frutos e folhas que receberam aplicação de pesticidas (Peres, 2000).

Ao atingirem o solo, inicia-se o processo de redistribuição e degradação dos pesticidas aplicados, o qual pode ser extremamente curto ou durar meses, ou até anos, dependendo da estrutura e das características físico-químicas do pesticida (Silva *et al*, 2007). Na Figura 1 são apresentados, esquematicamente, os processos que atuam na movimentação e na degradação de pesticidas no meio ambiente, ilustrando os meios mais prováveis onde esses compostos podem ser encontrados.

Figura 01: Principais rotas de transporte e degradação de pesticidas no meio ambiente (adaptado de Martins, G. L., 2010).

1.1 Retenção de pesticidas no solo

Os pesticidas se incorporam ao solo pelo processo de sorção que, conforme denominado por Koskinen & Harper (1990), se caracteriza por um fenômeno temporário pelo qual o pesticida em solução se fixa a uma fase (superfície) sólida ou líquida. Essa fixação ocorre por interação entre a superfície de partículas coloidais do adsorvente (solo) e do adsorvato (pesticida). O sentido e a intensidade dessas forças de interação resultam no aumento ou na diminuição da concentração do pesticida na suspensão do solo. O processo de sorção é dependente das propriedades do solo e do composto aplicado, as quais incluem tamanho, distribuição, configuração, estrutura molecular, funções químicas, solubilidade, polaridade, distribuição de cargas, natureza ácido/base, entre outros. A quantidade de pesticida sorvido aos constituintes do solo é diretamente proporcional à superfície

específica do material coloidal e decresce, geralmente, com o aumento da temperatura provocada pelo incremento da energia cinética das moléculas. Entretanto a velocidade das reações químicas aumenta com a elevação das temperaturas, podendo favorecer a sorção com os constituintes orgânicos do solo (Wolfe *et al*, 1990; Silva *et al*, 2007).

1.2 Degradação de pesticidas no solo

Uma vez incorporados ao solo os pesticidas sofrem processos de degradação, que alteram a sua estrutura molecular, ocasionados por fenômenos bióticos ou abióticos. Quando a transformação é total, dando origem a CO₂, H₂O e íons minerais, é chamado de mineralização. Quando é parcial recebe o nome de metabolização e dá origem a formação de subprodutos, chamados de metabólitos.

1.2.1 Hidrólise

O principal mecanismo de degradação dos pesticidas no solo é a hidrólise. A hidrólise é influenciada, no solo e na água, pelo valor do pH, temperatura e pela sorção do pesticida. A hidrólise é um processo de transformação química, na qual a molécula do pesticida reage com a água, formando uma nova ligação carbono-

oxigênio e rompendo uma ligação carbono-X na molécula não degradada (Meakins *et al*, 1995)..

1.2.2 Fotodegradação

Após a aplicação os pesticidas permanecem na superfície das plantas ou na camada superior do solo, onde são expostos à radiação solar e sofrem processos de fotodegradação (fotólise). Geralmente, a luz (radiação solar) apresenta um papel de catalisador de reações químicas como a hidrólise, oxidação, redução, entre outros, e os produtos de transformação resultantes destas reações, são, muitas vezes, os mesmos formados por processos enzimáticos. O efeito da energia radiante, com comprimento de onda entre 290 e 450 nm promove o rompimento da estrutura molecular dos pesticidas. Para absorver radiação na região do ultravioleta (UV), com energia suficiente para promover o rompimento de ligações químicas, a molécula do pesticida necessita apresentar insaturação eletrônica, normalmente com os elétrons π deslocados (cromóforos) (Prata, 2002).

Uma molécula de pesticida não necessita absorver energia radiante diretamente para que ocorra o processo fotoquímico. Se uma molécula aceptora estiver em contato com outra molécula doadora excitada pela luz, esta pode transferir a energia de excitação para a aceptora, que pode, então, sofrer a reação fotoquímica como se tivesse adquirido a energia radiante diretamente. Esse processo recebe o nome de fotossensibilização (Wolfe, 1990).

A extensão da fotodegradação depende do tempo de exposição, da intensidade, do comprimento de onda da luz, do estado físico do pesticida, da natureza do suporte, do pH da solução e da presença de água e fotossensibilizadores (Prata, 2002).

1.2.3 Biodegradação

A biodegradação é, tipicamente, um processo em que a molécula do pesticida é degradada pela ação do metabolismo dos microrganismos no solo (Monteiro, 1997). A degradação microbiana pode ocorrer por reações metabólicas diretas, ou por efeitos indiretos dos microrganismos com as propriedades físicas e químicas do solo (Prata, 2002). A biodegradação ocorre em função da produção de enzimas por microrganismos degradadores de pesticidas, os quais em contato com essas moléculas, dentro ou fora das células microbianas, participam de uma série de reações, tais como: oxidação, redução, hidrólise, desalquilação, descarboxilação, hidroxilação, metilação, desalcolixação, entre outros (Lovoreti, 1996). Sendo assim, são cinco os principais processos envolvidos na degradação microbiana de pesticidas no solo:

- *Catabolismo*: o pesticida serve como fonte de energia e/ou nutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos degradadores. Um exemplo é a degradação do herbicida glifosato que pode ser induzida na ausência de P no meio, funcionando como fonte desse nutriente para determinadas espécies de microrganismos (Eijsackers, 1985; Prata, 2002).

- *Cometabolismo*: o pesticida sofre biodegradação por reações metabólicas, mas nesse caso não serve como fonte primária de energia e/ou nutrientes para os microrganismos. Nesses casos a molécula por vezes não sofre biodegradação completa. Através da adição de materiais orgânicos no solo, ocorre o aumento da atividade e/ou a biomassa microbiana, evidenciando a biodegradação cometabólica (Prata, 2002).
- *Polimerização ou conjugação*: as moléculas originais de um pesticida, ou as moléculas dos seus metabólitos, se combinam com compostos naturais do solo, como aminoácidos ou carboidratos, ou com outra molécula de pesticida. A formação do conjugado normalmente torna a molécula mais polar e por consequência mais hidrolisável. A formação do metabólito dicloanilina, característico de muitos herbicidas derivados da ureia, tais como o diuron, pode ser considerado resultante da polimerização de metabólitos mais simples, isto é, duas moléculas de diuron devem sofrer o processo de biodegradação para que seja formada a molécula de dicloroamina (Roberts *et al*, 1998; Prata, 2002).
- *Acúmulo*: ocorre quando a molécula de um pesticida é incorporada ao microrganismo, sem que sofra degradação microbiana. Esse processo pode ocorrer de forma ativa ou passiva (Prata, 2002).
- *Efeitos secundários da atividade microbiana*: Esse processo ocorre quando a atividade microbiana gera alterações no pH e potencial redox do pesticida, promovendo a degradação do mesmo (Prata, 2002).

Em síntese, a biodegradação ocorre em função da produção enzimática promovida por microrganismos degradadores de pesticidas, as quais em contatos com essas moléculas participam de diversas reações, entre elas: oxidação, redução,

hidrólise, desalquilação, descarboxilação, hidroxilação, metilação, desalcolixação, entre outras (Lavorenti, 1996; Prata, 2002).

1.3 Transporte de pesticidas no solo

O transporte de pesticidas no solo depende de fatores como as propriedades físico-químicas e biológicas do solo, das condições ambientais e das propriedades físico-químicas dos pesticidas e, são governados, principalmente, por processos de retenção e biodegradação.

O transporte de pesticidas no solo e deste para águas superficiais, subterrâneas e para atmosfera, ocorre por processos de lixiviação, escoamento superficial e volatilização.

1.3.1 Lixiviação

A lixiviação é a principal forma de transporte dos pesticidas, não voláteis e solúveis em água, pelo solo. O movimento dos pesticidas através do solo, causado pela água, ocorre de duas maneiras: pela movimentação lateral dos pesticidas na superfície do solo e pelo movimento de penetração dos mesmos com a água drenada. O processo de lixiviação depende da presença da molécula do pesticida na solução do solo, ou que o mesmo esteja adsorvido nas partículas de argilas, ácidos

fúlvicos e húmicos, aminoácidos, peptídeos e açúcares (Prata, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Marchese, 2007). A lixiviação de pesticidas é uma das principais formas de contaminação dos mananciais aquáticos, principalmente os superficiais. A lixiviação excessiva vertical contribui, em muitos casos, para que o pesticida atinja e contamine o lençol freático.

De forma geral, os principais fatores determinantes da lixiviação de pesticidas no solo são a solubilidade em água da molécula, a textura e a estrutura do solo e o índice pluviométrico da região em questão. Devido a isso, moléculas com elevada solubilidade em água, como por exemplo, o herbicida picloram, em solos arenosos e em regiões de elevado índice pluviométrico, apresenta um considerável potencial de lixiviação. Moléculas altamente sorvidas aos colóides do solo, como os herbicidas glifosato, paraquat e diquat, tendem a ser pouco lixiviadas. Moléculas que são rapidamente mineralizadas, como o 2,4-D, também apresentam baixo potencial de lixiviação (Prata, 2002).

Muitos são os exemplos de moléculas de pesticidas detectadas em cursos de água. Em amostras de águas subterrâneas de 4 estados nos Estados Unidos, foi constatado a presença do fungicida clorotalonil e de seu metabólito hidroxiclotalonil, que é 30 vezes mais tóxico (Cox, 1997). A atrazina e seus metabólitos desetilatraxina (DEA) e desisopropilatraxina (DIA) foram encontrados em amostras de água do rio Mississippi (Pereira & Rostad, 1990).

De acordo com Langenbach *et al.* (2000), a atrazina é o herbicida mais encontrado em cursos de água no mundo. Vários estudos de monitoramento ambiental, em áreas norte-americanas, têm mostrado a presença de seus metabólitos, DEA e DIA, em cursos de água tanto superficiais como subterrâneas

(Pereira & Rostad, 1990; Thurman *et al.*, 1991; Thurman *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 1994; Lerch *et al.*, 1998). A extensão e mobilidade da atrazina estão relacionadas ao conteúdo da matéria orgânica do solo (Moreau & Mouvet, 1997; Mersie & Seybold, 1999), o qual, por sua vez, também está envolvido na metabolização deste herbicida. A metabolização da atrazina em hidroxiatrazina (HAT), seu principal metabólito (Lerch *et al.*, 1999), ocorre principalmente via hidrólise química, e é catalisada pelos processos de sorção e meio ácido (Lerch *et al.*, 1998; Martin-Neto *et al.* 2001). Estes autores mostram que a transferência de prótons entre a atrazina e as substâncias húmicas do solo pode contribuir na metabolização da atrazina em HAT e aumentar sua sorção, mostrando que a matéria orgânica pode atuar no retardamento da lixiviação da atrazina de diferentes maneiras.

1.3.2 Escoamento superficial

O risco de ocorrência de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas tem mostrado a necessidade de estudos sobre os processos de transporte destes compostos nos solos. Tais estudos devem focar os processos de lixiviação e escoamento superficial. O movimento do pesticida ao longo da superfície do solo, juntamente com o escoamento da água da chuva, até a superfície das águas dos rios, lagos e terrenos de menor declividade é conhecida como escoamento superficial ou “*runoff*” (Prata, 2002).

Considerando que a principal parte do fluxo de massa no solo ocorre durante a primeira chuva após a aplicação do pesticida, a perda por meio da lixiviação

durante uma chuva pode ser assumida como sendo comparável à perda por escoamento superficial (Flury, 1996).

A distância que um pesticida é transportado no solo e a sua concentração no destino final são influenciados por fatores como: taxa de aplicação, propriedades físico químicas do pesticida e do solo, tempo de erosão após a aplicação, quantidade de precipitação, taxa de infiltração, topografia do terreno e tipo de cobertura (Leonard, 1990). A deposição de pesticida é o resultado final do transporte de massa superficial, a qual é influenciada pela velocidade das forças carregadoras (água ou vento) e o tamanho da partícula no qual o pesticida pode estar sorvido (Prata, 2002).

O transporte de um pesticida por escoamento superficial não é tão previsível como o é por lixiviação, no qual pode-se ter como base as propriedades físico-químicas do pesticida. O escoamento superficial é muito dependente dos padrões de uso, condições climáticas e geografia (Schuz, 2001).

O plantio direto é a prática agrícola de maior importância na redução do escoamento superficial. Os estudos de Triplett *et al* (1978) mostram a redução do transporte de atrazina e simazina devido ao “*runoff*” em áreas onde este sistema de cultivo foi implementado. O sistema de cultivo por plantio direto se caracteriza por ser um sistema de manejo do solo onde restos vegetais de diversas culturas, entre eles a palha do milho e as folhas de banana, são mantidos na superfície do solo, tornando-o mais compacto e possibilitando a proteção do mesmo contra processos de erosão e escoamento superficial, reduzindo, dessa forma, o transporte de nutrientes e pesticidas para partes mais baixas do terreno, rios e lagos.

1.3.3 Volatilização

A volatilização é um processo no qual o pesticida presente na superfície do solo, rios, lagos e plantas passa para a atmosfera. A tendência da molécula de um pesticida passar para o estado gasoso depende da sua pressão de vapor. Quanto mais próximo de 700 mmHg (~ 1 atm), for o valor de pressão de vapor de um pesticida, maior será a sua tendência de passar para o estado gasoso (Montgomery, 1997).

Uma vez que um pesticida adentra no ambiente, sua entrada e transporte para e pela atmosfera vão depender de vários fatores tais como a pressão de vapor, a entalpia de vaporização da molécula, o coeficiente de partição entre a atmosfera e qualquer outra fase e o fluxo de massa de ar, o qual transportará qualquer pesticida disperso na fase atmosférica (Glotfelty & Schomburg, 1989; Taylor & Spencer, 1990).

Embora a pressão de vapor de um pesticida determine, em grande extensão, a entrada do produto na atmosfera, deve-se levar em conta que este não é o único fator que está relacionado à volatilização da molécula do pesticida para a atmosfera. A pressão de vapor de um pesticida pode dar uma boa estimativa do transporte para a atmosfera enquanto o pesticida estiver no estado livre ou volatilizado em uma superfície inerte. Quando o pesticida estiver ligado à superfície do solo, rios, lagos ou plantas, a pressão de vapor não deve ser considerada como único índice (Taylor & Spencer, 1990). Fatores como a temperatura, concentração inicial do pesticida, umidade e pH, entre outros fatores, podem controlar a liberação do pesticida para a atmosfera (Goellner, 1995). A elevação da temperatura da superfície do solo é um fator que intensifica a perda por volatilização dos pesticidas, assim como a

intensificação dos ventos sobre a superfície do solo e plantas que tende a favorecer a volatilização pelo carregamento dos vapores que se formam. Níveis mais baixos de água na camada superficial do solo favorecem a integração das moléculas dos pesticidas junto à fase sólida, pelos fenômenos de sorção reduzindo assim a taxa de volatilização para a atmosfera. Em altas temperaturas a volatilização da água pode elevar a transferência da molécula do pesticida para a atmosfera por arrastamento no fluxo ascendente de vapor (Taylor & Spencer, 1990; Deuber 1992; Prata 2002).

1.4 Análise de pesticidas

Os avanços da química analítica têm sido constantes na busca do progresso em métodos para a determinação de pesticidas no ambiente. Após a amostragem e obtenção de uma amostra bruta representativa, os métodos de análise envolvem cinco principais etapas: homogeneização, extração, separação, identificação e quantificação.

Após homogeneização a primeira etapa a ser realizada em um método de análise é a extração dos analitos de interesse dos compartimentos ambientais como solo e água. Este extrato é então submetido, muitas vezes, a uma etapa de “*clean-up*”, que consiste em um procedimento para a remoção de possíveis impurezas e interferências. A próxima etapa consiste na concentração da fração purificada na etapa anterior até um volume menor. Em seguida, uma pequena fração desse volume é injetada em um instrumento capaz de separar, identificar e quantificar seletivamente o analito de interesse na amostra.

Entre os procedimentos de extração, também chamados de métodos de preparo de amostra, largamente empregados para a determinação de pesticidas em amostras de solo destacam-se a extração por sistema Soxhlet e a extração por banho de ultrassom. Para a determinação em amostras de água os métodos de extração mais empregados são a extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e a extração líquido-líquido. Um método alternativo que vem sendo empregado para a extração e pré-concentração de diversos compostos de interesse ambiental, biológico e farmacêutico tem sido a extração por ponto de nuvem (CPE, do inglês *cloud point extraction*), que emprega o uso de micelas de surfactante, eliminando a necessidade do uso de grandes quantidades de solvente orgânico.

No que se diz a respeito a técnicas de separação, identificação e quantificação de pesticidas, destacam-se a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). Ambas as técnicas, nas últimas décadas, tem sido acopladas a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a seletividade das mesmas para a quantificação de pesticidas, assim como para a confirmação da presença dos analitos de interesse na matriz investigada.

Em 2003 surgiu a Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC, do inglês *Sequential Injection Chromatography*), uma técnica de separação que consiste no acoplamento de sistemas de análise por injeção sequencial (SIA, do inglês *Sequential Injection Analysis*) com colunas cromatográficas.

1.4.1 Extração de pesticidas

Tem sido incansável a busca e o aperfeiçoamento de métodos que promovam a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse, assim como a remoção, tanto quanto for possível, de outros compostos que não sejam os de interesse, ou seja, dos interferentes.

Um método de extração deve idealmente ser de fácil manipulação, envolver o menor número de etapas possível, permitir a recuperação quantitativa dos analitos de interesse, sem que ocorram perdas ou degradação dos mesmos. Deve produzir um meio adequado ao método analítico empregado e, o mais importante, deve gerar uma solução que contenha os analitos de interesse, em concentrações adequadas à sensibilidade da técnica empregada para a separação, identificação e quantificação dos mesmos.

O método de extração comumente empregado para a determinação de pesticidas em amostras de solo é a extração por sistema Soxhlet. A extração por sistema Soxhlet é um método consagrado e o mais empregado para a extração de pesticidas em solo (Mukherjee & Gopal, 1996; Motohashi *et al*, 1996; Babié *et al*, 1998; LeBaron *et al*, 2008). Emprega grandes volumes de solvente orgânico (entre 50 e 500 mL), normalmente de alta pureza, de custo elevado e tóxicos, como por exemplo, metanol, diclorometano, hexano e acetona. O tempo médio de extração pode variar de 1 a 72 h e gera aquecimento da matriz a ser extraída, aumentando assim os riscos de contaminação e degradação dos analitos de interesse. O procedimento de extração gera uma solução diluída que usualmente precisa ser concentrada através da evaporação do excesso de solvente, o que pode ocasionar perdas consideráveis dos analitos (Vale, 1997).

Métodos alternativos vêm sendo aplicados para a extração de pesticidas de amostras de solo, entre eles a extração por banho de ultrassom tem ganhado grande destaque.

1.4.1.1 Extração por banho de ultrassom

O estudo da influência das ondas ultrassônicas sobre sistemas químicos é denominado Sonoquímica e a aplicação destas ondas, sonicação. Paul Langevin é considerado o pai do ultrassom. Foi ele o primeiro a transmitir ondas de som na água do mar com o objetivo de detectar icebergs em 1917. Em 1927 Loomis e Cols observaram pela primeira vez os efeitos das ondas ultrassônicas em sistemas químicos e biológicos. Entretanto, a técnica só começou a ser efetivamente empregada a partir do desenvolvimento dos transdutores piezoelétricos e, em 1950 foram comercializados os primeiros aparelhos geradores de ondas ultrassônicas, o que possibilitou estudar o efeito destas sobre sistemas químicos (Barboza & Serra, 1992; Adams, 2002).

As primeiras tentativas para colocar em evidência o papel específico das ondas ultrassônicas na química foram realizadas em sistemas homogêneos, para se estudar a sua influência na água pura e no meio aquoso, através de várias reações, como por exemplo, reações de adição, hidratação, hidrólise de ésteres e acetais, oxidações, rupturas de ligações carbono-carbono e carbono-halogênio, reduções, rearranjos, polimerizações e despolimerizações (Barboza & Serra, 1992).

Nos sistemas heterogêneos foram observados os efeitos emulsificantes e homogeneizantes das ondas ultrassônicas, como a rápida formação de emulsões água-óleo. Com o aumento do emprego do ultrassom, foram constatados fenômenos tais como rompimento de células vivas, dispersão de tecidos biológicos e limpeza de superfícies (Barboza & Serra, 1992).

O ultrassom é um processo que utiliza a energia das ondas sonoras de alta potência (frequência entre 20 e 100 kHz) e de baixa potência (frequência entre 1 e 10 MHz) para criar vibrações que causem variações na pressão no líquido gerando cavitação.

As ondas de baixa potência são usadas na engenharia e na medicina para testes e diagnósticos técnicos. As ondas sonoras de alta potência produzem aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface dos sistemas líquido-líquido, líquido-sólido e líquido-gás, causando permanente mudança física e química nos sistemas, pois geram a cavitação (Barbosa & Serra, 1992; Adams, 2002).

A cavitação consiste na formação e propagação de ondas sonoras no meio reacional que originam uma variação na pressão e por sua vez a formação e implosão de microbolhas de gás no meio reacional. Envolve três estágios: a nucleação, que é a formação de bolhas de ar próximas às superfícies irregulares de partículas sólidas presentes; o crescimento das bolhas e a violenta explosão (Barboza & Serra, 1992).

A cavitação ocorre quando, sob o efeito de ondas ultrassônicas, houver uma redução na pressão do meio reacional suficiente para que a distância entre as moléculas ultrapasse a distância que mantém o líquido intacto. Formam-se então,

espaços vazios no líquido, as chamadas bolhas de cavitação. Quando a pressão aumenta pelo efeito da aproximação das moléculas do líquido, a bolha entra em colapso e implode (Barboza & Serra, 1992).

Existem dois tipos de geradores de ondas ultrassônicas: o banho e a sonda. A sonda é empregada em laboratórios de microbiologia para o rompimento celular. Neste sistema o transdutor encontra-se fixado na extremidade de uma ponta metálica e fica em contato direto com o sistema reacional, o que, teoricamente, o torna mais eficiente. Já no banho o gerador de frequência é preso diretamente no fundo da cuba e as ondas ultrassônicas são transmitidas através de um líquido, o que gera uma dispersão da energia ultrassônica e, dessa forma, uma menor eficiência (Barbosa & Serra, 1992; Adams, 2002).

Dentre as vantagens da extração por sistema de banho de ultrassom, quando comparados a sistemas de extração convencionais como o Soxhlet, por exemplo, destacam-se a redução do tempo de reação, a redução da quantidade de reagentes (solventes), a seletividade, o favorecimento de reações que normalmente não ocorrem em condições normais, a simplificação de sistemas reacionais e a redução de custos (Barboza & Serra, 1992).

1.4.1.2 Extração por ponto de nuvem

Atenção considerável vem sendo dada ao uso de micelas de surfactantes para procedimentos de extração e pré-concentração de uma vasta gama de compostos de interesse ambiental, biológico e farmacêutico (Tang *et al*, 2004; Zhou

et al, 2009; Tang *et al*, 2010; Khan *et al*, 2010; Wang *et al*, 2010; Jiang *et al*, 2010; Liu *et al*, 2014; Jessen & Wulff, 2015; Zhou *et al*, 2015; Heydare *et al*, 2015; Li *et al*, 2015). Em soluções aquosas as micelas de surfactante proporcionam a separação de fases com rápida turbidez da solução em função da alteração da temperatura. A temperatura em que esse fenômeno ocorre é conhecida como temperatura de ponto de nuvem. Ao aquecer a solução micelar do surfactante acima do ponto de nuvem, o sistema que inicialmente era composto de uma única fase isotrópica, separa-se em duas fases. Uma delas é rica em surfactante e a outra aquosa (solução diluída do surfactante). Ao ser separada, a fase rica em surfactante pode carregar consigo componentes presentes originalmente em solução que sejam capazes de se ligarem ou serem dissolvidos no interior hidrofóbico do agregado micelar, sendo extraídos da solução original e concentrando-se em um pequeno volume da fase rica em surfactante (Quina & Hinze, 1999; Martínez *et al*, 2000). Essa metodologia é conhecida como extração por ponto nuvem (CPE, do inglês *Cloud Point Extraction*) e tem como principal vantagem a pré-concentração direta do analito de interesse, uma vez que este, inicialmente dissolvido em uma solução diluída de maior volume, passa para a fase rica em surfactante, de menor volume. Outra vantagem da extração por ponto nuvem é a adição de pequenas quantidades de surfactante na solução aquosa da amostra, eliminando a necessidade do uso de grandes quantidades de solvente orgânico como ocorre na maioria dos métodos convencionais.

O procedimento de extração por ponto de nuvem foi introduzido e idealizado por Watanabe e Tanaka em 1978, que empregaram a técnica na extração de complexos metálicos hidrofóbicos.

As micelas formadas pelos surfactantes são denominadas de agregados micelares. A formação das micelas ocorre quando a concentração é aumentada até certo valor limiar, chamado de concentração micelar crítica. A região interior da micela contém a parte hidrofóbica da molécula do surfactante e a superfície exterior consiste em grupos hidrofílicos hidratados ligados às moléculas de água (Figura 2) São classificados como iônicos, não iônicos e zwitteriônicos (anfóteros) (Martínez *et al*, 2000).

Figura 02: Ilustração representativa de uma micela formada por surfactante (Bechtold, 2005).

As substâncias presentes originalmente em solução que sejam capazes de se ligarem no interior hidrofóbico do agregado micelar podem ser extraídas da solução original e concentradas em um pequeno volume da fase rica em surfactante. Tais substâncias podem interagir eletrostaticamente e/ou hidrofobicamente. A extensão da extração depende muito da força dessas interações entre o soluto e a micela (Quina & Hinze, 1999).

O mecanismo pelo qual ocorre a separação de fases ainda não foi completamente esclarecido. São varias as possibilidades levantadas na literatura. Uma das possibilidades é que a separação se dá pelo aumento do agregado micelar quando a temperatura é elevada acima da temperatura de ponto nuvem. Outra possibilidade é que a interação micelar, que é dependente da temperatura, promova a separação de fases. Em temperaturas baixas essas atrações seriam repulsivas, mas atrativas a altas temperaturas (Hienze & Pramauro, 1993; Mukherjee *et al*, 2011).

A separação física das fases é facilitada pela diferença de densidade entre as duas fases formadas. A fase rica em surfactante apresenta, normalmente, uma maior densidade. Outro fator importante para que a separação das fases ocorra é a temperatura de ponto de nuvem de cada surfactante. Para os surfactantes mais comumente empregados a temperatura de ponto de nuvem varia entre 20°C e 80°C (Merino *et al*, 2002).

Os surfactantes não iônicos do tipo éteres octilfenóxi polioxietilenados (OPE), também conhecidos como Tritons, são os mais empregados pelas suas baixas temperaturas de ponto nuvem e a disponibilidade comercial. O Triton X-114 (Figura 3) é um dos surfactantes mais empregados para a extração e pré-concentração de pesticidas devido à conveniência de separar as fases em temperaturas em torno de 25°C (Zhou *et al*, 2009; Liu *et al*, 2014). Algumas das características físico-químicas do Triton X-114 são: temperatura de ponto nuvem: 23-25°C; Densidade: 1,06 g cm⁻³; cmc: 0,2 mM ou 0,009% w/w em água (Sigma-Aldrich, 2015).

Figura 03: Estrutura química representativa do surfactante não iônico Triton X-114 ((1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol).

1.4.2 Separação, identificação e quantificação de pesticidas

Ao final dos procedimentos de preparo de amostra o extrato final é obtido. Acredita-se que este contenha os analitos de interesse. Para esta hipótese ser confirmada é necessário submeter o extrato a técnicas de separação, identificação e quantificação. As análises de pesticidas em amostras ambientais e biológicas são, em sua grande maioria, realizadas por técnicas cromatográficas como GC e HPLC. Mais recentemente as determinações de pesticidas e de outros compostos de interesse veem sendo realizadas alternativamente pelo emprego da técnica de Cromatografia por Injeção Sequencial.

1.4.2.1 Cromatografia por Injeção Sequencial

A Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC) foi desenvolvida em 2003 por Satinsky e colaboradores, que propuseram o emprego das colunas monolíticas em sistemas SIA, possibilitando a obtenção de separações cromatográficas com perfis

similares aos obtidos pelo emprego de HPLC. Satinsky e colaboradores (2003) demonstraram que a bomba de pistão, utilizada em sistemas de análise por injeção sequencial, era capaz de impulsionar a solução transportadora através de colunas monolíticas modificadas com octadecilsilano, possibilitando a separação de componentes de misturas simples. Diante disso, a solução transportadora passa a exercer a função de fase móvel, possibilitando a realização de separações simples. O emprego das colunas monolíticas, tanto em SIC como em HPLC, proporciona uma significativa redução no tempo e nos custos de análises, principalmente considerando-se a diminuição do consumo de fase móvel em comparação com sistemas HPLC. Em sistemas SIC o consumo de fase móvel empregando colunas monolíticas é ainda menor do que em HPLC, uma vez que nos sistemas SIC o fluxo de fase móvel não é contínuo, sendo acionado somente durante a análise propriamente dita e interrompido logo após o término da mesma.

A Cromatografia por Injeção Sequencial tem sido aplicada em diferentes áreas, entre elas a análise de compostos farmacêuticos, na qual têm se mostrado eficiente, obtendo-se separações com perfis similares às obtidas pelo emprego de HPLC, tendo como vantagens em relação a esta menor custo instrumental, possibilidade da realização de análises on-line, monitoramento de processos industriais, uso de reagentes durante a análise, economia de solventes e uma baixa geração de resíduos. Apresenta como desvantagens a baixa capacidade volumétrica da bomba (5 mL), menor robustez e a falta de um programa próprio para o tratamento dos dados obtidos. Por ser uma técnica relativamente nova, a parte instrumental requer melhorias para sanar as desvantagens citadas (Chocholus *et al*, 2007).

1.4.2.2 Fases estacionárias monolíticas

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação, comumente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa, compostas de pequenos domínios e canais internos relativamente grandes, que fornecem altas permeabilidades, permitindo-se trabalhar a elevadas vazões. Os domínios internos são constituídos de microporos (largura não superior a 2 nm) e/ou mesoporos (largura entre 2 e 50 nm) (Faria *et al*, 2006).

A popularização das fases monolíticas aconteceu a partir de 2000, quando os monolitos de sílica se tornaram disponíveis comercialmente. Os primeiros relatos de preparação destas fases são datados entre o final dos anos 60 e início dos anos 70 quando Kubin e colaboradores (1967) prepararam monolitos poliméricos baseados em poli(2-hidroxietil metacrilato) para serem empregados em cromatografia de exclusão na separação de proteínas sob baixa pressão. Porém, a permeabilidade de tal polímero era demasiadamente baixa impossibilitando a utilização da mesma. Anos depois Ross e colaboradores (1970) preparam monolitos baseados em poliuretano para serem empregados em cromatografia líquida e gasosa, obtendo uma excelente permeabilidade, porém problemas de solubilização do polímero pela fase móvel impossibilitaram a sua utilização. Em 1992 a tecnologia das colunas monolíticas efetivamente começou a se desenvolver quando, Svec e Frechet (1992) introduziram uma classe completamente nova de meio contínuo de separação baseada em monolitos poliméricos macroporos, rígidos, produzidos por um processo de polimerização *in situ* realizada dentro da própria coluna cromatográfica. Em 1996 Minakuchi e colaboradores (1996), empregando o processo sol-gel, preparam

monolitos de sílica derivatizada com grupos octadecil como fase estacionária para HPLC (Zou *et al*, 2002; Faria *et al*, 2006).

Em função da natureza do material as colunas monolíticas podem ser classificadas em duas categorias: colunas monolíticas baseadas em polímeros orgânicos e colunas monolíticas baseadas em sílica. Os monolitos baseados em polímeros são empregados, principalmente, para a separação de macromoléculas, como as proteínas, por exemplo. Já os monolitos baseados em sílica são empregados para a separação de moléculas de baixa massa molar, entre elas os pesticidas (Faria *et al*, 2006).

Os monolitos baseados em sílica para suporte cromatográfico são preparados na forma de um cilindro, pelo processo sol-gel. Diferentemente do que ocorre na preparação dos monolitos poliméricos, os monolitos de sílica para uso em HPLC não são preparados dentro das colunas cromatográficas convencionais (aço inoxidável). O cilindro monolítico sofre um encolhimento após a etapa de secagem, perdendo o contato com a parede interna da coluna cromatográfica. Devido a isto se utilizam materiais de poli(éter-éter-cetona) (PEEK – poly(ether-ether-ketone)) na fabricação de monolitos baseados em sílica, que se ajustam, por pressão e aquecimento, ao diâmetro do monolito (Faria *et al*, 2006).

Monolitos baseados em sílica são constituídos de pequenos domínios, denominados de esqueletos ou glóbulos, e longos canais dentro de uma estrutura sequencial, ordenada e ininterrupta (Figura 04). Os esqueletos de sílica são constituídos de mesoporos, com largura em torno de 13 nm, que são responsáveis pela separação cromatográfica. Já os canais internos, de aproximadamente 2 µm de diâmetro, são os responsáveis pela baixa resistência ao fluxo de fase móvel,

gerando uma alta permeabilidade. Em função disso, a pressão de colunas monolíticas gerada é baixa, permitindo separações em altas vazões de fase móvel e, dessa forma, diminuindo os tempos de análise. Por sua vez, as fases estacionárias baseadas em monolitos poliméricos são constituídas de microporos (Faria *et al*, 2006).

Figura 04: Micrografias de fases estacionárias monolíticas, onde: a) monolito baseado em sílica (visão transversal (zoom de 1800x); b) monolito baseado em sílica (visão longitudinal (zoom de 15000x); c) monolito baseado em sílica (visão longitudinal (zoom 7000x); c) monolito baseado em poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etileno) (visão longitudinal (zoom de 4000x) (Adaptada de Hayes & Malik, 2000; Shu *et al*, 2004).

As eficiências das fases monolíticas são similares às obtidas com colunas recheadas, no entanto a pressão no sistema cromatográfico gerado pelas colunas monolíticas é aproximadamente 6 vezes menor do que a pressão gerada por colunas recheadas. As vantagens das colunas monolíticas são mais evidentes quando se compara o número de pratos por unidades de pressão. As fases

monolíticas apresentam cerca de 1900 pratos por unidade de pressão (bar) enquanto que as fases estacionárias recheadas geram 310 pratos. Outro fator que contribui para as altas eficiências das fases monolíticas são os processos de transferência de massa. Em vazões elevadas de fase móvel a contribuição do termo de transferência de massa da fase móvel é maior, enquanto que o da fase estacionária é menor quando comparado às colunas recheadas. Além disso, nas fases estacionárias monolíticas, os processos de transferência de massa, além de ocorrerem por difusão como nas colunas de materiais particulados, ocorrem por convecção devido aos poros serem bastante largos, permitindo uma maior rapidez na transferência de massa (Lämmerhofer *et al*, 2001; Zou *et al*, 2002; Tanaka & Kobayashi, 2003; Oberacher *et al*, 2004; Engelhardt & Götzinger, 2004; Ikegami & Tanaka, 2004; Faria *et al*, 2006).

Pelo fato das fases monolíticas serem preparadas diretamente dentro do tubo de PEEK ou aço inoxidável, a reprodutibilidade das colunas é um fator de extrema importância. A reprodutibilidade das fases monolíticas, fabricadas tanto em laboratório como em nível comercial, vêm sendo avaliadas, tendo como principal parâmetro para tal o tempo de retenção de vários compostos. Dentre os diversos parâmetros analíticos avaliados, as estimativas dos desvios padrões relativos (RSD, do inglês *Relative Standard Deviations*), em diversos estudos, não excederam 5% para a retenção dos compostos avaliados (Hoegger & Freitag, 2001; Jiang *et al*, 2001; Svec, 2003; Engelhardt & Götzinger, 2004; Faria *et al*, 2006).

1.4.2.3 Fases estacionárias de partículas superficialmente porosas

A busca por melhorias na eficiência em HPLC tem sido incessante nos últimos anos. A tecnologia mais recente introduzida no mercado como estratégia para obter melhoras na eficiência em HPLC consiste na utilização de fases estacionárias com partículas superficialmente porosas com diâmetro inferior a 3 μm , denominadas de *Fused-Core*, *Core-Shell*, *Porous-Shell*, entre outros nomes. Estas colunas possuem tamanho típico entre 2,6-2,7 μm de diâmetro de partícula, e são constituídas de um núcleo sólido não poroso e impermeável (*core*), com 1,7 μm de diâmetro, externamente revestido por uma camada porosa (*Shell*) de 0,5 μm de diâmetro, responsáveis pela separação cromatográfica (Figura 05).

Figura 05: Representação esquemática e micrografias de uma partícula de sílica superficialmente porosa. a) Partícula superficialmente porosa (Adaptado de HALO material suplementar); b e c) Micrografias da partícula superficialmente porosa (Adaptas de Kirkland *et al*, 2008); d) micrografia da superfície porosa (Adaptada de Hayes *et al*, 2014).

Fases estacionárias superficialmente porosas têm como principal vantagem a baixa resistência à transferência de massa. A difusão de uma fase para a outra e seu retorno para a fase original, é denominada de transferência de massa. A transferência de massa na fase móvel é o processo pelo qual a amostra, presente no interior da fase móvel, é trazida à superfície da fase estacionária. Este processo é representado pelo termo C_{fm} da equação de *Van Deemter*. A transferência de massa na fase estacionária é o processo pelo qual as moléculas de um determinado composto sorvidas nas partículas da fase estacionária, são dessorvidas da mesma para a fase móvel. Este processo é representado pelo termo C_{fe} da equação de *Van Deemter* (Leite, 2008; Lanças, 2009; Chocholous, 2011).

$$H = A + \frac{B}{\bar{\mu}} + (C_{fm} + C_{fe})\bar{\mu} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde:

H = altura de um prato

$\bar{\mu}$ = velocidade linear média da fase móvel

A = termo caminhos múltiplos

B = termo para difusão molecular

C_{fm} = termo para a transferência de massa na fase móvel

C_{fe} = termo para a transferência de massa na fase estacionária

Estas colunas, por terem a característica de serem superficialmente porosas, possibilitam uma menor distância de difusão e uma maior taxa de transferência de massa, diminuindo os termos C_{fm} e C_{fe} da equação de *Van Deemter*. O pequeno tamanho das partículas contribui para a melhora nos processos de transferência de massa e para a diminuição da difusão turbulenta, elevando a velocidade linear e, com isso, resultando em uma menor assimetria de pico (Figura 06).

Figura 06: Representação dos processos de difusão e transferência de massa, em colunas superficialmente porosas e convencionais e, suas respectivas contribuições para a assimetria de pico (Adaptada de Sigma-Aldrich – Supelco® Analytical).

As fases estacionárias superficialmente porosas possuem uma maior eficiência de coluna comparada à eficiência das colunas convencionais. A eficiência de uma coluna, em geral, é determinada pelo número de pratos, **N**. Quanto maior o número de pratos maior será a eficiência de uma coluna. Um prato é definido como uma etapa de equilíbrio da distribuição do soluto entre a fase móvel e estacionária. Quanto maior o valor de **N**, mais etapas de transferência de fase existirão e a separação será maximizada. O número de pratos efetivos por metro (**N_{eff}**) leva em consideração o tamanho da coluna cromatográfica empregada, sendo assim mais preciso que **N** que não considera o tamanho da caluna, e é calculado por:

$$N_{eff} = \frac{16 \left(\frac{t'_R}{W_b} \right)^2}{L} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Eq. (3)}$$

onde:

N_{eff} = Número de pratos efetivos por metro

t'_R = tempo de retenção ajustado

W_b = largura da base do pico, é obtida traçando-se as tangentes aos pontos de inflexão e medindo-se o comprimento da linha de base que fica compreendida entre os pontos que cortam a tangente

L = comprimento da coluna em metros

t_M = tempo que todos os solutos não retidos (sem interação com a fase estacionária) demorarão para percorrer a fase estacionária

t_R = tempo de retenção

1.4.2.4 Detecção espectrofotométrica e espectrometria de massas

A detecção espectrofotométrica é uma das técnicas mais empregadas nas determinações analíticas em diversas áreas, entre elas a determinação de pesticidas. Para a determinação de pesticidas a técnica espectrofotométrica comumente empregada é a espectrofotometria ultravioleta/visível.

A região ultravioleta do espectro é geralmente considerada na faixa de 190 a 400 nm e a região do visível entre 400 e 800 nm. As energias correspondentes a essas regiões são ao redor de 72 a 150 kcal.mol⁻¹ na região ultravioleta, e 36 a 72 kcal.mol⁻¹ para a região visível. Energias dessa magnitude correspondem, muitas vezes, à diferença entre estados eletrônicos de muitas moléculas.

A absorbância de uma amostra (analito) é a quantidade de luz absorvida pela mesma e é determinada pela lei de Beer-Lambert.

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad \text{Eq. (4)}$$

onde:

A = Absorbância

ε = absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = caminho óptico (cm)

c = concentração (mol L^{-1})

O espectrofotômetro, também chamado de detector, é o instrumento capaz de registrar os dados de absorbância em função do comprimento de onda. O registro desses dados é chamado de espectro de absorção. Cada espécie química possui um espectro de absorção característico.

Em técnicas cromatográficas o detector tem a função de identificar a presença de substâncias de interesse que estejam eluindo da coluna cromatográfica e deve, entre outras características, ser sensível à concentração de um ou mais analitos presentes na amostra, ter uma alta sensibilidade e um baixo limite de detecção, ser capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas, fornecer uma resposta rápida e linear a pequenas variações das concentrações dos analitos de interesse e não causar a destruição dos mesmos.

Os espectrofotômetros que utilizam como sistema de detecção um tubo fotomultiplicador e os que utilizam arranjo de diodos são os detectores comumente

empregados. Um tubo fotomultiplicador é constituído por um tubo de vidro ou de quartzo sob vácuo, no qual existe um conjunto de placas metálicas interligadas. Quando a radiação incide sobre estas placas metálicas elas induzem uma corrente elétrica, segundo a teoria do efeito fotoelétrico proposto por Einstein em 1905 (Santos, 2002). A qualidade do material do catodo determina a sensibilidade espectral do tubo. O segundo tipo de detector comum mais usado é o arranjo de diodos. Um arranjo de diodos consiste em uma série de fotodiodos detectores posicionados lado a lado num cristal de silício de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e consequentemente o detector. Este detector permite que a absorbância de uma amostra em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo. A resolução espectral deste tipo de detectores depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo.

Outra técnica de detecção empregada é a espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) que é uma técnica analítica de acoplamento utilizada para obter informações de massa molar e de características estruturais da amostra. É umas das mais importantes ferramentas analíticas disponíveis uma vez que é capaz de fornecer informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição quantitativa e qualitativa de amostras complexas, a estrutura e composição de superfícies sólidas e as proporções isotópicas de átomos em amostras. Quando associada a técnicas de separação, é uma poderosa ferramenta de confirmação da presença das espécies analisadas (Holler *et al*, 2009).

O acoplamento do espectrômetro de massas é realizado em diversas técnicas, entre elas as mais comuns são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida.

A combinação da GC-MS é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo gasoso são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do MS. O interfaceamento pode ser feito por meio de um separador de jato, que é constituído por dois capilares alinhados e separados por uma distância de cerca de 1 mm, tendo vácuo estabelecido entre eles por meio de uma bomba de vácuo. Desta maneira, quando o eluente da coluna atravessa o primeiro capilar, grande parte do gás carregador, que possui baixa massa atômica, é bombeado para fora dos capilares, enquanto as moléculas de analito (com maior massa) mantêm-se em fluxo linear e penetram no segundo capilar que as direciona para a fonte de íons do espectrômetro de massas (Vékey, 2001; Chiaradia *et al*, 2008).

Os métodos de ionização mais empregados em GC-MS são a ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e a ionização química (CI, do inglês *Chemical Ionization*). Na EI o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia, em torno de 70 eV. As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentro os quais o mais comum é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron $[M^+]$. Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera a fragmentação dos analitos. Este é um dos maiores problemas referentes à EI, pois a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro. Já a CI, é uma técnica que foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas dos analitos, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente. Esta mistura, moléculas do analito + gás reagente, é então bombardeada com

elétrons, assim como ocorre na EI. Como o gás reagente está em excesso em relação ao analito, ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudo-moleculares do analito $[M+H]^+$. Como este processo é de baixa energia, quase não são observadas fragmentações (Kitson *et al*, 1996; Vékey, 2001; Ardey, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

Quando se utiliza a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas são encontradas incompatibilidades relacionadas à vazão do eluente do sistema cromatográfico com relação à velocidade de bombeamento do sistema de vácuo e o projetor da fonte de íons do espectrômetro de massas. As vazões utilizadas em HPLC são, em geral, na ordem de 1 mL min^{-1} , de maneira que não é possível bombardear o eluente diretamente para o interior da fonte do espectrômetro, que opera a pressões de cerca de $1,3 \times 10^{-4} \text{ Pa}$. Sendo assim, uma das mais importantes funções da interface empregada no acoplamento HPLC-MS é remover o quanto for possível da fase móvel. Outro problema é que os compostos separados por HPLC, geralmente, são relativamente poucos voláteis e/ou sensíveis à temperatura, de maneira que não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização convencionais. Dessa forma, foi necessário o desenvolvimento de interfaces e de formas de ionização alternativas (Vékey, 2001; Ardey, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados no interfaceamento HPLC-MS, foram desenvolvidas várias interfaces, nas quais também, é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis. As interfaces mais empregadas são a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray*

Ionization), a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (APP, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*) (Kitson *et al*, 1996; Vékey, 2001; Smeraglia *et al*, 2002; Ardey, 2003; Granby *et al*, 2004; Núñez *et al*, 2005; Bos *et al*, 2006; Chiaradia *et al*, 2008).

Em ESI, o líquido no qual o analito de interesse se encontra dissolvido na fase móvel, passa através de um capilar, que se encontra à pressão atmosférica e é mantido sob alta voltagem, e são formadas pequenas gotas altamente carregadas (“*spray*”) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. A dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂) na região do “*spray*”. À medida que ocorre a dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Neste momento ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram. Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (Vékey, 2001; Smeraglia *et al*, 2002; Ardrey, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

Como em ESI a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Uma vez que em ESI são gerados íons com múltiplas cargas, esta técnica pode ser aplicada à compostos com massas molares relativamente grandes, pois como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) dos íons, o intervalo de “massa” de

aplicabilidade do instrumento pode ser expandido por um fator equivalente ao número de cargas do íon, isto é, um íon com m/z 1000 e com 20 cargas representa um composto com uma massa molar de 20 000 Da. Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida. Uma vez que a ESI é dependente da concentração do analito, o uso de divisores de fluxo, para diminuir a vazão do eluente para o interior da interface, não afeta, de forma notável, sua detectabilidade (Vékey, 2001; Andrey *et al*, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

Na APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa através de um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas. O “*spray*” formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que passam através de uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente, proveniente da fase móvel, encontra-se em maior concentração no “*spray*” que o analito, este é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (Vékey, 2001; Smeraglia *et al*, 2002; Andrey *et al*, 2003; Chiaradia *et al*, 2008).

Tanto em ESI quanto em APCI ocorre a denominada ionização suave, isto é, são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo. Nestas fontes de ionização, também pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares, Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $HCOO^-$ e CH_3COO^- , que são espécies iônicas presentes em modificadores presentes nas fases móveis. (Vékey, 2001; Smeraglia *et al*, 2002; Ardey, 2003; Núñez *et al*, 2005; Bos *et al*, 2006; Chiaradia *et al*, 2008).

A APP é uma técnica de ionização relativamente nova, introduzida por Robb e colaboradores em 2000, que pode ser considerada complementar às outras técnicas de ionização à pressão atmosférica (ESI e APCI), uma vez que certos grupos de compostos apolares e de baixa polaridade, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, só podem ser analisados por HPLC-MS quando se aplica a fotoionização. A fonte de APP é constituída por um nebulizador aquecido que transforma o eluente da coluna cromatográfica em um “*spray*” e gera sua dessolvatação parcial. Possui uma lâmpada UV com potência de 10,2 eV, cuja função é ocasionar a ionização das moléculas do analito presentes nas gotículas do “*spray*”. Esta fonte de ionização é menos suscetível à supressão iônica induzida pela matriz e interferências químicas ocasionadas pela presença de tampões no eluente da fase móvel. A APP baseia-se na formação de um íon molecular radical a partir da absorção de um fóton por uma molécula, seguida da ejeção de um elétron. Isto só é possível quando a energia do fóton irradiador ($h\nu$) é maior que o potencial de ionização (PI) da molécula. Este processo é denominado fotoionização direta. A probabilidade de ocorrer à fotoionização direta é baixa, uma vez que os fótons de UV têm uma baixa penetração numa mistura densa de gases e vapores à pressão atmosférica (Robb *et al*, 2000; Bos *et al*, 2006; Chiaradia *et al*, 2008).

1.5 Pesticidas selecionados para estudo

Desde os anos 1970 o interesse pela contaminação ambiental dos pesticidas tem aumentado significativamente, isto se deve em grande parte ao grande aumento

no consumo a nível mundial, bem como, as preocupações com seus impactos ambientais. Esse interesse se deve em parte aos avanços nos sistemas de separação e identificação, bem como as diretrizes mais rígidas que passaram a vigorar, principalmente nos Estados Unidos e na Europa. A identificação de pesticidas, principalmente herbicidas, no ambiente, tem sido um indicativo para o entendimento do comportamento e destino destes compostos.

O uso frequente de pesticidas na agricultura resulta, muitas vezes, na presença de seus resíduos e de seus metabólitos no ambiente. Assim a determinação quantitativa desses resíduos de pesticidas em matrizes ambientais, entre elas o solo e a água, é de fundamental importância nos programas de monitoramento ambiental (Haque & Freed, 1975; Matallo, 1997).

Dentre os pesticidas empregados em larga escala na agricultura brasileira, destacam-se os herbicidas da família das triazinas (ametrina; atrazina e seus principais metabólitos, desetilatrazina, desisopropilatrazina e hidroxiatrazina; metribuzina e simazina), da família das ureias (diuron, linuron e tebuthiuron) e o herbicida bromacil pertencente à família das uracilas. Estes herbicidas, apesar de proibidos na Europa, são largamente empregados no Brasil em culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, entre outras. São aplicados diretamente ao solo, podendo se transportados para a atmosfera, lençol freático, rios e lagos. Devido a estes fatos optou-se pela escolha desses compostos para o desenvolvimento dos estudos aqui descritos. Abaixo são apresentadas, entre outras informações, as características físico-químicas de cada composto, suas formas de ação, transporte pelos compartimentos do ambiente e degradação. Estas informações foram obtidas das seguintes fontes: Vermeulen *et al*, 1982; Steinheimer, 1993; Dean *et al*, 1996; Vargas *et al*, 2006; LeBaron *et al*, 2008; Sigma-Aldrich; PubChem; ChemService.

1.5.1 Ametrina

Nome comum: Ametrina

Abreviação: AMA

Nome comercial: Ametrina Agripec®, Evik®, Gesapax® 500 SC, Gesapax® GRDA

Nome químico: 2-etilamino-4-isopropilamino-6-metimercapto-1,3,5-triazina

Número CAS : 834-12-8

Fórmula molecular: C₉H₁₇N₅S

Peso molecular: 227,3 g mol⁻¹

Densidade: 1,18 g cm⁻³

Ponto de fusão: 84-85°C

Pressão de vapor: 1,12x10⁻⁴ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 200 mg L⁻¹

pK_a: 4,1

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 1009-1356 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

A ametrina é um herbicida pertencente à família das triazinas e é empregado em culturas de abacaxi, algodão, banana, café, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho e uva, sendo o mecanismo de ação a inibição da fotossíntese. É indicado como tratamento complementar em pós-emergência tardia de papuã e folhas largas. Pode ser absorvido pelas raízes e folhas de plantas e translocado via apoplasto (junto com o fluxo de água, via xilema), quando absorvido pelas raízes e, possui translocação baixa quando absorvido pelas folhas, atuando sobre as plantas como produto de contato. Esse produto requer seis horas sem chuva após a aplicação para ser absorvido. É pouco móvel no solo, por ser muito adsorvido por colóides

orgânicos e minerais deste. A sua adsorção é altamente influenciada pelo pH do solo. Também pode apresentar adsorção negativa (dessorção), ocorrendo liberação para as plantas daninhas de moléculas anteriormente inativadas pelos colóides do solo. É medianamente lixiviável em solo arenoso. Sua degradação no solo é essencialmente microbiana, mas também química, por processos de oxidação e hidrólise. Apresenta persistência média nas doses indicadas de quatro a seis meses nas condições tropicais e subtropicais, podendo ser maior que nove meses se usado em doses elevadas, dependendo do clima e tipo de solo.

1.5.2 Atrazina

Nome comum: Atrazina

Abreviação: ATR

Nome comercial: Atrex®, Gesaprim®, Gesaprim® 500, Gesaprim® GRDA, Atranex® 500 SC, Atrazina Nortox® 500 SC, Atrazinax®, Coyote® 500 SC, Herbitrin® 500 BR, Primóleo®, Siptran® 800 SC, Stauzina® 500 SC

Nome químico: 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

Número CAS : 1912-24-9

Fórmula molecular: C₈H₁₄ClN₅

Peso molecular: 215,7 g mol⁻¹

Densidade: 1,2 g cm⁻³

Ponto de fusão: 175-177 °C

Pressão de vapor: 3,87x10⁻⁵ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 70 mg L a 20°C

pK_a: 1,7

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 1869-3000 mg kg⁻¹

MCL: 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (US-EPA)/2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (CONAMA/MS)/1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (EC)

A atrazina é um herbicida pertencente, também, a família das triazinas, empregados em culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, fumo, milho, pinus, trigo, seringueira, sisal e sorgo. O mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese. É indicado em pré ou pós-emergência das plantas daninhas, para controlar principalmente espécies com folhas largas. Em pré-emergência, a aplicação é realizada imediatamente antes, simultaneamente ou logo após a semeadura da cultura. No preparo convencional do solo, deve ser aplicado no máximo três dias após a última gradagem. Em pós-emergência a aplicação deve ser feita preferencialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (pós-emergência precoce) de plantas daninhas. É absorvido pelas raízes e partes aéreas de plantas e translocado via apoplasto, quando absorvido pelas raízes e pouco translocado, quando absorvido pelas folhas. É adsorvido pelos colóides da argila e da matéria orgânica do solo. Sua degradação ocorre, principalmente, via hidrólise enzimática, transformando-o em hidroxiatrazina. É pouco lixiviável, não sendo comumente encontrado nos solos cultivados em profundidade superior a 30 cm. Possui considerável potencial de escoamento superficial para superfície de rios e lagos. Apresenta persistência média no solo entre cinco a sete meses nas doses indicadas. Nas condições tropicais e subtropicais, a persistência pode ser maior que 12 meses, se usado em doses elevadas ou em casos de estiagem prolongada.

1.5.3 Bromacil

Nome comum: Bromacil

Abreviação: BRO

Nome comercial: Borea®, Bromax® 4G, Bromax® 4L, Borocil®, Rout®, Croptex®; Cynogan®, Du Pont 976®; Isocil®; Hyvar® L; Hyvar® X; Hyvar® X 80W; Hyvar® X-L; Hyvar® XL 2L; Hyvarex®; Krovar® II; Nalkil®; OnyxBorocil® 1V; Uragan®; Urox® 'B'.

Nome químico: 5-bromo-3-sec.butil-6-metiluracila

Número CAS : 314-40-9

Fórmula molecular: C₉H₁₃BrN₂O₂

Peso molecular: 261,1 g mol⁻¹

Densidade: 1,55 g cm⁻³

Ponto de fusão: 157-160°C

Pressão de vapor: 4,09x10⁻⁵ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 815 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 9,3

Classe toxicológica: IV **LDo₅₀:** > 5000 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

O bromacil é um herbicida pertencente à família das uracilas, empregado em culturas de abacaxi e citros. Seu mecanismo de ação é através da inibição da fotossíntese. É indicado em pré ou pós-emergência para o controle de ervas daninhas em áreas não cultivadas. Tem rápida absorção através das raízes de plantas. Sua absorção no solo se dá pelos coloides orgânicos da argila e da matéria orgânica. Tem alto potencial de lixividade, devido a sua elevada solubilidade em água. Quando aplicado nas doses recomendadas apresenta persistência baixa em solo, em torno de 60 dias, sendo que em doses elevadas sua persistência no solo

pode chegar a 8 meses. Sua degradação no solo é essencialmente microbiana, ocorrendo, principalmente, via hidrólise enzimática, gerando radical hidroxila.

1.5.4 Diuron

Nome comum: Diuron

Abreviação: DIU

Nome comercial: Diuron® Nortox 500 SC; Diuron 900 DF; Du Pont Diuron Técnico; Drexel Diuron 80; AGRPO Diuron 800.

Nome químico: 3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetiluréia

Número CAS : 330-54-1

Fórmula molecular: C₉H₁₀Cl₂N₂O

Peso molecular: 233,1 g mol⁻¹

Densidade: 1,48 g cm⁻³

Ponto de fusão: 158-160°C

Pressão de vapor: 7,99x10⁻⁶ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 40 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 13,5

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 500 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

O diuron é um herbicida pertencente à família das ureias. É empregado em pré ou pós-emergência para o controle de plantas daninhas. É indicado para as culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, seringueira, milho, soja, trigo e uva. Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese. A absorção ocorre, predominantemente, pelas raízes da planta, sendo baixa a absorção pelas folhas. A translocação ocorre via xilema. O diuron é

fortemente absorvido pelos coloides de argila ou matéria orgânica do solo. Sua persistência em solos é em média de 40 a 70 dias quando aplicado na dosagem recomendada, podendo chegar a mais de 12 meses se aplicado em dosagens elevadas. É moderadamente lixiviável. Sua degradação no solo é essencialmente microbiana. Tanto em solos como na água a degradação do diuron ocorre, principalmente, via hidrólise gerando, majoritariamente, dicloroanilina.

1.5.5 Desetilatrazina

Nome comum: Desetilatrazina

Abreviação: DEA

Nome comercial: N.A.

Nome químico: 2-amino-4-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

Número CAS : 6190-65-4

Fórmula molecular: C₆H₁₀ClN₅

Peso molecular: 187,6 g mol⁻¹

Densidade: 1,5 g cm⁻³

Ponto de fusão: 124-126°C

Pressão de vapor: 1,24x10⁻² Pa a 20°C

Solubilidade em água: 340 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 1,65

Classe toxicológica: IV **LDo₅₀:** >5000 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

A desetilatrazina é um metabólito da atrazina. Sua formação ocorre, principalmente, pela degradação microbiológica da atrazina promovida pela bactéria *Rhodoccus corallinus* e via fotólise, que promovem a desalquilação da atrazina (Figura 7).

Figura 07: Reação de formação da desetilatrazina promovida pela desalquilação da atrazina.

1.5.6 Desisopropilatrazina

Nome comum: Desisopropilatrazina

Abreviação: DIA

Nome comercial: N.A.

Nome químico: 2-amino-4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazina

Número CAS : 1007-28-9

Fórmula molecular: C₅H₈ClN₅

Peso molecular: 173,6 g mol⁻¹

Densidade: 1,6 g cm⁻³

Ponto de fusão: 112-114°C

Pressão de vapor: 3,2x10⁻² Pa a 20°C

Solubilidade em água: 650 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 1,6

Classe toxicológica: IV **LDo₅₀:** >5000 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

A desisopropilatrizona também é um metabólito da atrazina. Assim como ocorre com DEA, a formação de DIA ocorre, principalmente, pela degradação microbiológica da atrazina promovida pela bactéria *Rhodoccus corallinus* e via fotólise, que promovem a desalquilação da atrazina (Figura 8).

Figura 08: Reação de formação da desisopropilatrizona promovida pela desalquilação da atrazina.

Tanto DIA, formada pela remoção do grupo isopropil da ATR, como DEA, formada pela remoção do grupo etil da ATR, têm um menor potencial de adsorção em solos, sendo mais solúveis em água do que ATR. Entre esses dois metabólitos o mais frequente é DEA, devido a maior facilidade da remoção do grupo etil do que da remoção do grupo isopropil. A persistência de DEA e DIA em águas superficiais depende das características hidrológicas dos rios e lagos. Em geral DEA e DIA tem uma persistência de 2 a 3 meses em águas superficiais. A persistência em solos é dependente do índice pluviométrico, da profundidade e das características físico-químicas dos mesmos. Em águas subterrâneas a ocorrência da presença de DIA e DEA é maior do que a presença de ATR.

1.5.7 Hidroxiatrazina

Nome comum: Hidroxiatrazina

Abreviação: HAT

Nome comercial: N.A.

Nome químico: 2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

Número CAS : 2163-68-0

Fórmula molecular: $C_8H_{15}N_5O$

Peso molecular: $197,24 \text{ g mol}^{-1}$

Densidade: $1,2 \text{ g cm}^{-3}$

Ponto de fusão: $310-312^\circ\text{C}$

Pressão de vapor: $2,4 \times 10^{-5} \text{ Pa}$ a 20°C

Solubilidade em água: 7 mg L^{-1} a 20°C

pK_a: 5,15

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 1750 mg kg^{-1}

MCL: N.A.

A hidroxiatrazina é um dos mais importantes metabólitos da ATR, sua formação de dá pela hidrólise da ATR, promovida por ação enzimática, microbiológica ou por fotólise (Figura 9).

Figura 09: Reação de formação da hidroxiatrazina promovida pela hidrólise da atrazina.

Enquanto DEA é o metabólito mais frequente da ATR presente em águas, a HAT é o metabólito da ATR mais frequentemente presente em solos. A formação da HAT é fortemente dependente do pH e da temperatura do meio, do teor de matéria orgânica, argila e da presença de ácido húmico e fúlvico no solo. A hidrólise de ATR à HAT aumenta como o aumento da temperatura, em meios ácidos ou extremamente básicos, em solos com elevado teor de matéria orgânica e argila e na presença de ácido húmico e fúlvico. Em solos com elevado teor de argila a hidrólise de ATR à HAT é extremamente facilitada, porém resulta em uma forte adsorção da HAT ao mesmo. Sua solubilidade em águas é baixa, o que dificulta a sua lixiviação para o leito de rios e lagos, no entanto sua presença em águas superficiais próximas a áreas agrícolas em que o solo possui uma baixa quantidade de matéria orgânica e argila pode ocorrer.

1.5.8 Linuron

Nome comum: Linuron

Abreviação: LIU

Nome comercial: Afalon®; Farmalinx®; Farmoz®; Linurex®; Lorax®

Nome químico: 3-(3,4-Diclorometil)-1-metoxi-1-metilureia

Número CAS : 330-55-2

Fórmula molecular: C₉H₁₀Cl₂N₂O₂

Peso molecular: 240,09 g mol⁻¹

Densidade: 1,49 g cm⁻³

Ponto de fusão: 93-95°C

Pressão de vapor: 1,9x10⁻⁴ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 75 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: N.A.

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 1146 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

O linuron é um herbicida pertence à família das ureias. É empregado em pré ou pós emergência para o controle de ervas daninhas nas culturas de abacaxi, aipo, alho, amendoim, aspargo, batata, cacau, café, cana-de-açúcar, cebola, cenoura, ervilha, eucalipto, mandioca, milho, soja e sorgo. Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese. A absorção ocorre, predominantemente, pelas raízes da planta, sendo baixa a absorção pelas folhas. A translocação ocorre via xilema. Sua adsorção em solos é considerada baixa, uma vez que é altamente solúvel em água. Sua persistência em solos varia de 30 a 210 dias. Sua degradação é essencialmente microbiana. O linuron possui uma elevada mobilidade em solos, podendo atingir a superfície de rios, lagos e o lençol freático contaminado águas subterrâneas.

1.5.9 Metribuzina

Nome comum: Metribuzina

Abreviação: MET

Nome comercial: Sencor®; Meticrop®, Metacare®; Senate®; Raptor®; Metron®; Glory®; Metrala®; Nikon®

Nome químico: 4-amino-6-(1,1-dimetiletil)-3-metilmercapto-1,2,4-triazina

Número CAS : 21087-64-9

Fórmula molecular: C₈H₁₄N₄OS

Peso molecular: 214,29 g mol⁻¹

Densidade: 1,28 g cm⁻³

Ponto de fusão: 125-128°C

Pressão de vapor: 5,79x10⁻⁴ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 1000 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 1,0

Classe toxicológica: III **LDo₅₀:** 1100 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

A metribuzina é um herbicida da família das triazinas, recomendado para o controle de plantas daninhas em pré-emergência nas culturas de aspargo, batata, café, cana-de-açúcar, mandioca, soja, tomate e trigo. O seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese. A metribuzina é absorvida pelas raízes da planta daninha, podendo apresentar alguma absorção pelas folhas. Sua translocação é via xilema. É moderadamente adsorvido em solos com elevado nível de matéria orgânica e argila. Sua persistência é baixa, variando de 30 a 60 dias. Sua degradação é essencialmente microbiológica. Tem alto potencial de lixiviação, podendo atingir o lençol freático e contaminar águas subterrâneas. Devido a sua elevada solubilidade em água apresenta considerável potencial de escoamento superficial podendo atingir facilmente a superfície de rios e lagos.

1.5.10 Simazina

Nome comum: Simazina

Abreviação: SIM

Nome comercial: Princep®, Gesatop®, Herbazin®, Sipazina®; Extrazim®; Banvel®

Nome químico: 2-cloro-4,6-di(etilamino)-1,3,5-triazina

Número CAS : 122-34-9

Fórmula molecular: C₇H₁₂N₅Cl

Peso molecular: 201,7 g mol⁻¹

Densidade: 1,3 g cm⁻³

Ponto de fusão: 225-227 °C

Pressão de vapor: 2,9x10⁻⁶ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 6,2 mg L a 20°C

pK_a: 1,7

Classe toxicológica: IV **LDo₅₀:** >5000 mg kg⁻¹

MCL: 3 µg L⁻¹(US-EPA)/2 µg L⁻¹ (CONAMA/MS)/1 µg L⁻¹ (EC)

A simazina é um herbicida pertencente à família das triazinas, empregado em culturas de abacaxi, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, pinus, soja, sorgo, seringueira, sisal e uva. É indicado para o controle pré-emergencial de plantas daninhas. Sua absorção é basicamente pelo sistema radicular das plantas. Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese. Devido à sua baixa solubilidade, apresenta maior atividade e índice residual em solos arenosos. É adsorvido pelos colóides da argila e da matéria orgânica do solo. É pouco lixiviável, não sendo comum ser encontrado nos solos cultivados, em profundidade superior a 10 cm. Sua degradação no solo é essencialmente

microbiana, mas também ocorre via hidrólise, com formação de hidroxisimazina. Apresenta persistência média no solo de cinco a sete meses, nas condições tropicais e subtropicais, podendo ser maior que 12 meses, se usado em doses elevadas. Em razão da baixa solubilidade em água e da pequena movimentação no perfil do solo, usa-se a mistura com atrazina para minimizar efeitos do clima, principalmente relacionados a oscilações pluviométricas, sobre a eficiência do tratamento no controle de plantas daninhas e também para aumentar o espectro de controle.

1.5.11 Tebuthiuron

Nome comum: Tebuthiuron

Abreviação: TIU

Nome comercial: Combine® 500 SC, Skipe® 20 P, Tebuthiuron Zhechem®, Tebuthiuron 20 P Alligare®.

Nome químico: 1-(5-tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilureia

Número CAS : 34014-18-1

Fórmula molecular: C₉H₁₆N₄OS

Peso molecular: 228,31 g mol⁻¹

Densidade: 0,7 g cm⁻³

Ponto de fusão: 161-164°C

Pressão de vapor: 4x10⁻⁵ Pa a 20°C

Solubilidade em água: 2500 mg L⁻¹ a 20°C

pK_a: 1,20

Classe toxicológica: IV **LDo₅₀:** >5000 mg kg⁻¹

MCL: N.A.

O tebuthiuron é um herbicida pertencente à família das ureias, empregado para o controle de plantas daninhas, em pré ou pós-emergência, nas culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, milho, seringueira, soja e trigo. Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese e a sua absorção pelas plantas se dá via sistema radicular, com translocação via xilema. É absorvido pelos coloides orgânicos do solo, sendo pouco lixiviável. Apesar de apresentar elevada solubilidade em água apresenta baixa movimentação lateral em solos. Tem uma persistência em solos que varia de 12 a 15 meses. A principal forma de degradação é química, via hidrólise e fotólise.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver métodos simples, rápidos e de baixo custo para a extração de herbicidas empregando métodos de extração que utilizem volumes reduzidos de solventes orgânicos, contribuindo dessa forma, com métodos em prol da química verde, empregando cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia por injeção sequencial com fases estacionárias monolíticas e superficialmente porosas,.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver métodos de extração por banho de ultrassom para a extração de triazinas de amostras de solo.

Otimizar métodos de extração por ponto de nuvem para simazina e atrazina em amostras de águas reais e, através disto, demonstrar a aplicabilidade do emprego de surfactantes para a extração de herbicidas, uma vez que o mesmo é predominantemente empregado em matrizes biológicas e para a extração de metais.

Demonstrar e comparar o desempenho de colunas monolíticas e superficialmente porosas em sistemas de cromatografia por injeção sequencial e cromatografia líquida de alta eficiência, frente à separação, identificação e

quantificação de herbicidas da família das triazinas, avaliando a seletividade dos métodos frente a ureias e uracilas.

Demonstrar a aplicabilidade da utilização do método de focalização na coluna (*on column focusing*) para a eliminação da possível interferência de ácido húmico e fúlvico na determinação de simazina e atrazina.

3 Parte Experimental

3.1 Materiais

- Ácido Acético, 100 % P. A, Merck®, Darmstadt, Germany.
- Acetato de amônio, P. A., Merck®, Darmstadt, Germany.
- Acetonitrila, J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, United States
- Agitador Magnético, Metrohm®, Switzerland.
- Agitador Vortex, Heidolph®, Germany.
- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, Mettler Toledo, Switzerland.
- Balança semi-analitica com precisão de 0,001 g, Marte®, São Paulo, SP, Brasil.
- Banho ultratermostato criostato 521 TD, Ethik Technology, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil.
- Bomba de vácuo, Gast®, Benton Harbor, Michigan, United States.
- Cella com 4 cm de caminho óptico, capacidade interna de 10 µL, FIALab® Instruments, Bellevue, Wosington, United States.
- Centrifuga Excelsa, Fanem®, São Paulo, SP, Brasil.
- Centrifuga de laboratório Sorvall ST16R, Thermo Fischer Scientific, São Paulo, SP, Brasil.
- Cloreto de sódio, grau p.a., Merck®, Darmstadt, Alemanha.
- Coluna *Core-Shell* Ascentis® Express C₁₈ (30 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm), Supelco® Analytical, Bellfonte, PA.

- Coluna monolítica Onyx™ C₁₈ (25 x 4,6 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, United States.
- Coluna monolítica Onyx™ C₁₈ (50 x 4,6 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, United States.
- Coluna monolítica Onyx™ C₁₈ (100 x 4,6 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, United States.
- Cromatógrafo a Líquido Shimadzu, modelo LC 9A, equipado com detector UV modelo SPD 6AV, Shimadzu, Japão; placa PCA; software para aquisição de dados e alça de amostragem de 20 µL Rheodyne®, Rohnert Park, CA, United States.
- Cromatógrafo a Líquido Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, equipado com detector UV/VIS DAD e autosampler, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, United States.
- Cromatógrafo a Líquido Shimadzu, composto de duas bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20, detector UV-VIS SPD-20 acoplado a um detector de massas íon trap Amazon Speed ETD (Bruker Daltonics®) operando em modo positivo, interfaciado por um ionizador por eletronebulização.
- Dessecador a vácuo.
- Destilador de Água, Marconi, São Paulo, SP, Brasil.
- Espectrofotômetro UV/VIS 200-850 nm USB 4000, Ocean Optics com grade de difração de 600 linhas mm⁻¹, resolução de 1,5 nm e abertura de fenda 25 µm com altura de 1000 µm, Dunedin, FL, United States.
- Estufa de Secagem, Quimis®, São Paulo, SP, Brasil.
- Estufa a vácuo, Vacucenter, Salvis Lab, Renggli, Schweiz.

- Extran®, neutro, Merck®. Rio de Janeiro, Brasil.
- Fonte de Deutério/Tungstênio Halogênio DH 2000, Mikropak GmbH, Germany. A transmissão da radiação proveniente da fonte para a cela de fluxo e desta para o espectrofotômetro foram feitas através de cabos de fibra óptica de 600 µm de diâmetro e 51 cm de comprimento.
- Gás Hélio, ultra puro, Air Products, São Paulo, SP, Brasil.
- Incubadora refrigerada, Marconi, São Paulo, SP, Brasil.
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,2 µm, 47 mm, Sartorius BioLab Products, Sartorius Stedim Biotech, Germany.
- Membrana filtrante de acetato de celulose regenerada 0,45 µm, 47 mm, Sartorius BioLab Products, Sartorius stedim Biotech, Germany.
- Membrana filtrante para seringa de acetato de celulose 0,2 µm, 26 mm, Simplepure®, Allcrom, São Paulo, SP, Brasil.
- Membrana filtrante para seringa de PVDF 0,45 µm, 13 mm. Simplepure®, Allcrom, São Paulo, SP, Brasil.
- Metanol, J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, United States.
- pHmetro Metrohm, Switzerland.
- Pipetadores de diversas capacidades, Eppendorf®, LabMate^{HT}, Pipetman®, Gilson®.
- Ponteiras com diversas capacidades.
- Pré Coluna Onyx^{TM} C₁₈ (5 x 4,6 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, United States.
- Pré Coluna Onyx^{TM} C₁₈ (10 x 4,6 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, United States.

- Pré Coluna Ascentis® Express C₁₈ (5 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm), Supelco® Analytical, Bellefonte, PA.
- Seringas plásticas e de vidro com capacidades de 5 e 10 mL.
- Sistema de cromatografia líquida SIChrom™, FIALab®, Bellevue, WA, United States (maiores detalhes do sistema estão descrito no item 3.2.1 e na Figura 10).
- Sistema de filtração à vácuo para fase móvel, HA, Hengao T&O.
- Sistema de purificação de água Milli-Q, Simplicity 185, ligado a uma lâmpada UV, Millipore, São Paulo, SP, Brasil.
- Sistema de purificação de água por Osmose Reversa, OS LXE, Gehaka, São Paulo, SP, Brasil.
- Sistema de Ultrassom com potência de 35 KHz, Retsch GmbH & Co., Haan, Dusseldorf, Germany.
- Sistema de Ultrassom Branson 2510 com potência de 42 KHz, Branson®, Danbury, United States.
- Software para controle de operações e aquisição de dados FIALab for Windows®, version 5.9.320, FIALab®, Bellevue, WA, United States.
- Software para controle e aquisição de dados Chromeleon®, version 6.80, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, United States.
- Softwares para tratamento de dados Microsoft® Office Excel® 2007 e Origin® 8.
- Soluções HCl e NaOH.
- Triton X-114, Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil.
- Tubos Falcon de polipropileno com capacidade de 15 mL, Corning®, São Paulo, SP, Brasil).

3.1.2 Amostras e padrões

- Amostra de solo proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), coletada em área agrícola sem histórico de aplicação de herbicidas. Composição do solo: 53% argila, 29% areia, 18% silt. Maiores informações sobre a caracterização do solo podem ser encontradas em Abate *et al*, 2004.
- Amostra de solo com a presença de atrazina, proveniente da cidade de Pato Branco, PR, coletada em área agrícola com histórico de aplicação do herbicida atrazina (formulação comercial Primóleo®, Syngenta Brasil). Composição do solo: 75% argila, 22% silt, 3% areia.
- Amostra de sedimento coletada na represa Pedro Beicht, Sistema Alto Cotia, Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia, SP. Amostra de sedimento do ponto de coleta PB404. Informações sobre a caracterização do sedimento podem ser encontradas em De Oliveira, 2011.
- Padrões analíticos, grau Pestanal®, de Ametrina, Atrazina, Bromacil, Desetilatraxina, Desisopropilatraxina, Diuron, Hidroxiatraxina, Linuron, Metribuzina, Simazina e Tebuthiuron, Riedel-deHaën®, Germany; adquiridos da Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia por Injeção Sequencial

3.2.1.1 Avaliação da composição de fase móvel para a separação de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.

Em uma primeira etapa dos trabalhos foram avaliadas e definidas a composição adequada de fase móvel para a separação de atrazina (ATR), desetilatrastina (DEA), desisopropilatrastina (DIA), hidroxiatrazina (HAT) e simazina (SIM) empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial com coluna monolítica C₁₈ (50 x 4,6 mm) ou com coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 µm). O sistema de Cromatografia por Injeção Sequencial empregado neste e nos demais estudos apresentados nesta primeira parte, está representado na Figura 10:

Figura 10: Sistema SIChrom™ onde: PP = bomba de pistão; P = pistão de cerâmica; VA = válvula de alívio para pressões > 500 psi; CV = check-valve; BC = bobina coletora; VS = válvula seletora de alta pressão (5000 psi); F = Filtro; PC = Pré-coluna C₁₈ (5 x 4,6 mm), quando usada a coluna monolítica e Pré Coluna C₁₈ (5 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm), quando usada a coluna core-shell; C = coluna monolítica C₁₈ (50 x 4,6 mm) ou coluna core-shell C₁₈ (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm) D = Detector, W= Descarte, FM₁ e FM₂ = fases móveis.

Foram testadas diversas composições de fase móvel utilizando-se acetonitrila (ACN) e água deionizada tamponada com acetato de amônio (NH₄Ac) e acidificada. Para a separação dos compostos avaliados nesse estudo, ATR; DEA; DIA; HAT e SIM, foi necessária a realização da eluição passo a passo com duas fases móveis (FM₁ e FM₂), com concentração de solvente orgânico crescente. Após a definição da composição adequada, partiu-se para a avaliação da concentração e do pH do tampão acetato de amônio utilizado na fase aquosa.

Foram avaliadas quatro concentrações diferentes de tampão (1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mM). Para cada uma delas, empregado a coluna monolítica, foi construída uma curva analítica de referência dos compostos em estudo com concentrações variado

de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram avaliados também, diferentes valores de pH (3,5; 4,2 e 4,7) para a concentração de tampão otimizada.

Para a coluna core-shell a curva analítica de referência foi construída apenas para a condição escolhida, devido ao elevado tempo de análise.

Todas as fases móveis utilizadas foram filtradas com membrana de 0,45 μm LCR-PTFE, levadas ao ultrassom por 15 min e purgadas por 5 min com gás Hélio. A purga foi repetida durante o experimento. O tampão para a utilização na fase móvel foi preparado na concentração de 100 mM e teve o seu pH ajustado de acordo com os valores testados no experimento. Para atingir a concentração desejada do tampão na fase móvel foi retirada a alíquota correspondente do tampão de 100 mM.

As soluções estoque dos compostos em estudo foram preparadas individualmente na concentração de 500 mg L^{-1} em metanol e armazenadas em freezer à -18°C . As soluções de trabalho para construção das curvas analíticas de referência foram preparadas na forma de uma mistura das triazinas a partir das soluções estoque, diluídas em água deionizada em concentrações entre 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Foram preparadas também soluções individuais de cada triazina em estudo para a confirmação dos tempos de retenção e consequentemente da ordem de eluição.

As condições cromatográficas e as composições de fases móveis definidas após os estudos de avaliação de diferentes composições foram as seguintes:

- **Para a coluna monolítica:** composição de fase móvel, $\text{FM}_1 = 15:85$ ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 e $\text{FM}_2 = 35:65$ ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2; fluxo de fase móvel = 35 $\mu\text{L s}^{-1}$ (2,1 mL min^{-1}); comprimentos de onda

monitorados em 223, 238 e 300 nm; volume de amostra de 200 μL ; tempo de corrida de 7 min.

- **Para a coluna core-shell:** composição de fase móvel, $\text{FM}_1 = 13:85$ ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 e $\text{FM}_2 = 35:65$ ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2; Fluxo de fase móvel = 8 $\mu\text{L s}^{-1}$ (0,48 mL min^{-1}); comprimentos de onda monitorados em 223, 238 e 300 nm; volume de amostra de 80 μL ; tempo de corrida de 20 min.

Os procedimentos de análise descritos a seguir foram realizados no sistema descrito na Figura 10, com a utilização do software FIALab for Windows® para controle do instrumento e aquisição de dados.

- **Para a coluna monolítica:** inicialmente a válvula seletora é conectada à porta 9 e então a válvula de 2 vias é ligada (posição “on”) e aspiram-se para a seringa 3900 μL da FM_1 ; a válvula de duas vias é desligada (posição “off”). A válvula seletora é então conectada na porta 5 (amostra/padrão) e aspiram-se 100 μL de padrão para a bobina coletora (previamente preenchida com FM_1). A válvula seletora é conectada na porta 1 (descarte) e são descartados 200 μL da bobina coletora (restam 3800 μL na seringa e 2000 μL na bobina coletora). A válvula seletora é conectada novamente à porta 5 e são aspirados para a bobina coletora 200 μL de padrão (seringa preenchida com 4000 μL), todos esses passos são realizados a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada na porta 10 (porta da coluna) e são enviados para a coluna 4000 μL da bobina coletora e do reservatório da bomba a uma vazão de 35 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada a porta 6 e são aspirados, a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, 4000 μL da FM_2 para a bobina coletora. A válvula

seletora é conectada na porta 10 e são enviados para a coluna 4000 μL da bobina coletora e do reservatório da bomba a uma vazão de 35 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada na porta 9, a válvula de 2 vias é ligada e são aspirados para a seringa 3000 μL da FM_1 (esta etapa é realizada para o acondicionamento da coluna) à uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora conecta-se à porta 10 e são enviados os 3000 μL da FM_1 a uma vazão de 35 $\mu\text{L s}^{-1}$. O sistema está pronto para a próxima análise.

- **Para a coluna core-shell:** inicialmente a válvula seletora é conectada à porta 9 e então, a válvula de 2 vias é ligada (posição “on”) e aspiram-se para o reservatório da bomba 3920 μL da FM_1 ; a válvula de duas vias é desligada (posição “off”). A válvula seletora é então conectada na porta 5 (amostra/padrão) e aspiram-se 80 μL de padrão para a bobina coletora. A válvula seletora é conectada à porta 1 (descarte) e são descartados 80 μL da bobina coletora. A válvula seletora é conectada novamente à porta 5 e são aspirados para a bobina coletora 80 μL de padrão, todos esses passos são realizados a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada à porta 10 (porta da coluna) e são enviados para a coluna 4000 μL da bobina coletora e do reservatório da bomba a uma vazão de 8 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada na porta 6 e são aspirados, a uma vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, 2500 μL da FM_2 para a bobina coletora. A válvula seletora é conectada à porta 10 e são enviados para a coluna 2500 μL da bobina coletora e do reservatório da bomba a uma vazão de 8 $\mu\text{L s}^{-1}$. A válvula seletora é conectada na porta 9, a válvula de 2 vias é ligada e são aspirados para o reservatório da bomba 2500 μL da FM_1 (esta etapa é realizada para o acondicionamento da coluna) a

uma vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$. A válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora conecta-se a porta 10 e são enviados os $2500 \mu\text{L}$ da FM_1 a uma vazão de $8 \mu\text{L s}^{-1}$. O sistema está pronto para a próxima análise.

3.2.1.2 Estudos de interferentes em Cromatografia por Injeção Sequencial empregando coluna monolítica e coluna core-shell.

Com o objetivo de avaliar o efeito de potenciais interferências dos métodos desenvolvidos para a coluna monolítica e para a coluna core-shell, empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial, foi realizado um estudo utilizando outros herbicidas, os quais foram: ametrina (AMA) e metribuzina (MET), da família das triazinas; bromacil (BRO), da família das uracilas; diuron (DIU), linuron (LIU) e tebuthiuron (TIU), pertencentes à família das ureias.

Para a realização do estudo, soluções na concentração de 1 mg L^{-1} dos herbicidas acima foram analisadas separadamente em cada coluna nas condições estabelecidas para as mesmas, ou seja, para a coluna monolítica composição de fase móvel com 15:85 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM_1) para a separação de DIA, HAT e DEA, e 35:65 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM_2) para a separação de SIM e ATR, volume de amostra $200 \mu\text{L}$, vazão de fase móvel $2,10 \text{ mL min}^{-1}$, comprimento de ondas monitorados 223, 238 e 200 nm; e para a coluna core-shell composição de fase móvel com 13:87 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM_1) para a separação de DIA, HAT e DEA, e 35:65 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM_2) para

a separação de SIM e ATR, volume de amostra de 80 μL , vazão de fase móvel de 0,48 mL min^{-1} , comprimentos de onda monitorados 223, 238 e 300 nm.

O procedimento de análise para o sistema SIC empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell está descrito no item 3.2.1.1.

3.2.1.3 Estudo de fortificação e extração de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina em solo, empregando banho de ultrassom, Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.

As metodologias desenvolvidas para a separação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM por SIC com as colunas monolítica e core-shell foram avaliadas em um estudo de fortificação (*Spike*) e extração dos herbicidas em amostra de solo, empregando a extração por banho de ultrassom. As fortificações empregadas, assim como o solvente empregado e a concentração da solução extratora, basearam-se em estudos anteriores realizados por Konda & Pastzor (2001) e Amadori *et al* (2013). Para realização do estudo foram utilizados 17 tubos de ensaio. A onze destes tubos de ensaio foram adicionados uma massa de 2 g de solo (amostra proveniente da ESALQ-USP) e realizada a fortificação do mesmo, a partir de soluções da mistura de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, em água, na concentração de 10 mg L^{-1} , adicionando-se o volume necessário para que se obtivessem concentrações no solo de 100, 250, 500, 750 e 1000 kg L^{-1} . Após a realização da fortificação, os tubos de ensaio foram deixados em repouso por um período de 24 h e, após esse período foram

adicionados aos tubos 3 mL de uma solução com 80% ACN e 20% H₂O (solução extratora, % em v v⁻¹).

Os demais tubos foram utilizados como brancos para o monitoramento de todo o processo de extração. Em um destes tubos foi adicionado somente 3 mL da solução extratora. Em um segundo destes tubos, foi adicionado além dos 3 mL da solução extratora, 2 g de solo. A nenhum destes tubos foi adicionado quaisquer volumes de solução mistura dos compostos em estudo, pois os mesmos tinham por objetivo a obtenção dos brancos analíticos. Nos demais tubos foram adicionados os 3 mL da solução 80% (v v⁻¹) ACN e realizadas adições da solução da mistura de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM em água, na concentração de 10 mg L⁻¹, adicionando-se o volume necessário desta para que se obtivessem soluções nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg L⁻¹.

A Tabela 2 descreve as quantidades adicionadas de solo e solução da mistura dos compostos em estudo, assim como a concentração final das amostras fortificadas.

Tabela 2: Quantidades adicionadas solo, solução mistura das triazinas em estudo e a concentração teórica das amostras empregadas no estudo de extração por banho de ultrassom

Amostra/tubo	Solo (g)	Vol. sol. mix comp. (μL)	Conc. solução (mg L^{-1}) Conc. solo (mg Kg^{-1})
B1	2	-	-
B2	-	-	-
B3	-	20	$0,10 \text{ mg L}^{-1}$
B4	-	50	$0,25 \text{ mg L}^{-1}$
B5	-	100	$0,50 \text{ mg L}^{-1}$
B6	-	150	$0,75 \text{ mg L}^{-1}$
B7	-	200	1 mg L^{-1}
A1	2	20	$0,10 \text{ mg Kg}^{-1}$
A2	2	20	$0,10 \text{ mg Kg}^{-1}$
C1	2	50	$0,25 \text{ mg Kg}^{-1}$
C2	2	50	$0,25 \text{ mg Kg}^{-1}$
D1	2	100	$0,50 \text{ mg Kg}^{-1}$
D2	2	100	$0,50 \text{ mg Kg}^{-1}$
E1	2	150	$0,75 \text{ mg Kg}^{-1}$
E2	2	150	$0,75 \text{ mg Kg}^{-1}$
F1	2	200	1 mg Kg^{-1}
F2	2	200	1 mg Kg^{-1}

Após a preparação dos tubos foi realizado o procedimento de extração por banho de ultrassom, conforme abaixo:

- Adicionaram-se aos tubos de ensaio, contendo o solo enriquecido com a mistura das triazinas em estudo, e aos demais tubos, os 3 mL da solução extratora (80:20 ACN:H₂O v v⁻¹).
- Os tubos de ensaio foram levados ao banho de ultrassom (frequência 42 kHz) por 30 min.
- Os tubos de ensaio foram então levados a centrifugação (5000 rpm) por 10 min.
- Retirou-se 3 mL do sobrenadante e transferiu-se os mesmos para *vials* de vidro. Os mesmos foram deixados abertos em capela para a evaporação do solvente orgânico.

- O conteúdo dos *vials* foi ressuspendido a 3 mL com água deionizada e submetidos à análise cromatográfica.

Os extratos foram submetidos à análise cromatográfica empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell, conforme condições cromatográficas e protocolo experimental descritos no item 3.2.1.1.

3.2.1.4 Estudos de focalização em coluna monolítica empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial

O termo focalização na coluna (*on column focusing*) é usado para descrever a concentração de analitos de interesse no topo da fase estacionária. Este conceito foi explorado com o objetivo de se realizar a extração em fase sólida diretamente na coluna cromatográfica, na tentativa de melhorar a sensibilidade e a seletividade para a determinação de simazina e atrazina em amostras aquosas, empregando Cromatografia por Injeção Sequencial e coluna monolítica.

Para a realização desse estudo foi empregado uma coluna monolítica C₁₈ (25 x 4,6 mm). A composição de fase móvel foi definida em 5:95 ACN:NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM₁) e 40:60 ACN:NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2 (FM₂). Os comprimentos de onda monitorados foram 223, 238 e 300 nm. Foram avaliados volumes de amostra entre 50 e 2000 µL. Definido o melhor volume de amostra (1400 µL), partiu-se para a avaliação da menor concentração quantificável usando soluções da mistura de ATR e SIM com concentrações variando entre 5 e 100 µg L⁻¹. Em seguida foi avaliada a

seletividade do método para interferências de metabólitos (DEA, DIA e HAT), de outros herbicidas (AMA, BRO, DIU, LIU, MET e TIU) e de ácido húmico (HA) e ácido fúlvico (HFI). Por fim foi realizada a aplicação da metodologia desenvolvida a uma amostra de água da torneira e, a extratos aquosos de amostras de sedimento (coletada na represa Pedro Beicht, Cotia, SP, ponto de coleta PB 404) e solo (proveniente da ESALQ-USP). Os extratos de solo e sedimento foram preparados da seguinte maneira: em dois erlenmeyers foram pesados $10 \pm 0,2$ g de uma amostra de solo e de uma amostra de sedimento, a estes foram adicionados 40 mL de água deionizada, em seguida os mesmos foram levados à agitação em incubadora por um período de 24 h (200 rpm, 25°C). Após esse período o conteúdo dos erlenmeyers foi transferido para tubos de ensaio com capacidade de 50 mL e centrifugados por 10 min a 5000 rpm. Foi então retirado o sobrenadante (extrato) de cada tubo e filtrado em membrana de 0,2 μ m. Os extratos de solo e sedimento foram então adicionados a 6 balões volumétricos de 10 mL onde, em 4 deles (dois para o extrato de solo e dois para o extrato de sedimento) foram realizadas fortificações de simazina e atrazina nas concentrações de 40 e 100 μ g L⁻¹. Nos outros dois balões não foram realizadas fortificações (branco analítico). Foram também coletados 40 mL de uma amostra de água da torneira e filtrados em membrana de 0,2 μ m. Em 2 balões de 10 mL contendo alíquotas desta amostra foram realizadas fortificações de simazina e atrazina nas concentrações de 40 e 100 μ g L⁻¹. Também foi adicionado a um balão de 10 mL apenas a amostra de água filtrada (branco analítico). Todas as amostras foram então submetidas à análise cromatográfica empregando a metodologia desenvolvida.

A seguir é descrito o protocolo experimental para o volume de amostra utilizado (1400 μ L), empregando o sistema descrito na Figura 10, com a utilização do

software FIALab for Windows®. Inicialmente a bobina coletora, a coluna e a cela de detecção são preenchidos com FM₁. Para início da análise a válvula seletora é conectada à porta 9 e então, a válvula de 2 vias é ligada (posição “on”) e aspiram-se para a seringa 2800 µL da FM₁ e então a válvula de duas vias é desligada (posição “off”). A válvula seletora é então conectada à porta 5 (amostra/padrão) e aspiram-se 100 µL de padrão para a bobina coletora. A válvula seletora é conectada à porta 1 (descarte) e são descartados 400 µL da bobina coletora. A válvula seletora é conectada novamente à porta 5 e são aspirados para a bobina coletora 1400 µL de padrão (seringa preenchida com 4000 µL), todos esses passos são realizados a uma vazão de 100 µL s⁻¹. A válvula seletora é conectada na porta 10 (porta da coluna) e são enviados para a coluna 4000 µL da bobina coletora e do reservatório da bomba a uma vazão de 20 µL s⁻¹. A válvula seletora é conectada à porta 6 e são aspirados, a uma vazão de 100 µL s⁻¹, 4000 µL da FM₂ para a bobina coletora. A válvula seletora é conectada na porta 10 e são enviados para a coluna 4000 µL da fase móvel contida na bobina coletora e no reservatório da bomba a uma vazão de 20 µL s⁻¹. A válvula seletora é conectada à porta 9, a válvula de 2 vias é ligada e são aspirados para a bobina coletora 2000 µL da FM₁ (esta etapa é realizada para o condicionamento da coluna) à uma vazão de 100 µL s⁻¹. A válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora conecta-se na porta 10 e são enviados os 2000 µL da FM₁ a uma vazão de 20 µL s⁻¹. O sistema está pronto para a próxima análise.

3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.2.2.1 Estudos de fortificação e extração de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina em solo com a presença de atrazina, empregando banho de ultrassom, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell

Para a realização destes estudos foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido LC 9A Shimadzu, equipado com detector UV modelo SPD 6AV, placa PCA, software para aquisição de dados e alça de amostragem de 20 μL . Para as separações foram utilizadas uma coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna C_{18} (5 x 4,6 mm) de mesmo material e a coluna core-shell C_{18} (30 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 μm) acoplada a uma pré-coluna C_{18} (5 x 4,6 mm) do mesmo material.

Foram avaliadas diversas composições de fase móvel utilizando duas fases móveis, compostas de NH_4Ac 2,5 mM tamponada com ácido acético (HAc) em pH 4,2 (A) e (B) ACN. A eluição, em ambas as colunas, foi realizado em gradiente de eluição, conforme abaixo:

- **Para a coluna core-shell:** isocrática de 0 a 5 min com 10% (v v^{-1}) de ACN; gradiente linear de 10 a 35% (v v^{-1}) ACN de 5 a 7 min; isocrático em 35% (v v^{-1}) de ACN, entre 7 e 9,5 min; novo gradiente linear até 12 min variando a composição da fase móvel de 35 para 10% ACN, permanecendo com essa composição até o final da corrida (15 min). A vazão de fase móvel empregada durante toda a corrida cromatográfica foi de 1,5 mL min^{-1} . A detecção foi

realizada a 223 nm. Para a injeção dos padrões e amostras utilizou-se uma alça de amostragem de 20 μL .

- **Para a coluna monolítica:** O gradiente de eluição foi realizado de maneira semelhante ao realizado para a coluna core-shell (descrito acima), com a diferença de que a proporção de ACN variou de 13 para 35% ACN. A vazão de fase móvel empregada, durante toda a corrida cromatográfica, foi de 1,5 mL min^{-1} . A detecção foi realizada a 223 nm. Para a injeção dos padrões e amostras utilizou-se uma alça de amostragem de 20 μL .

A metodologia desenvolvida foi aplicada para a determinação de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina, em estudo de fortificação e extração, empregando uma amostra de solo com presença de atrazina e a extração por banho de ultrassom. A amostra de solo com presença de atrazina foi classificada como latossolo vermelho e foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Gilberto Abate, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. O solo foi coletado em uma área agrícola da cidade de Pato Branco, onde o milho é a principal cultura cultivada. A amostra foi coletada dois dias após a aplicação da formulação comercial do herbicida atrazina (Primóleo®, Syngenta Brasil), em profundidades de 0 a 10 cm em diferentes pontos de coleta e, foram então, misturadas para compor uma única amostra e enviadas para o nosso laboratório. A amostra de solo foi então seca em estufa a vácuo, a uma temperatura de 50°C, até peso constante, macerada e peneirada em peneira de 250 μm para garantir a homogeneidade da amostra e facilitar o processo de extração.

A amostra de solo com presença de atrazina, seca e macerada, foi então submetida à extração por banho de ultrassom. Para isto foram utilizados 5 tubos de

ensaio. Em 4 tubos de ensaio foram pesados 2 g de solo. Em 3 destes tubos foi realizado a fortificação (*Spike*) com os herbicidas em estudo ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, no outro tubo de ensaio não foi realizada fortificação alguma (solo com a presença de atrazina) (Amostra 1). A fortificação foi realizada da seguinte maneira: a um dos 3 tubos de ensaio contendo os 2 g de solo adicionou-se 50 μL de uma solução referência de uma mistura dos compostos em estudo na concentração de 10 mg L^{-1} , perfazendo-se uma concentração no solo de 0,25 mg kg^{-1} (Amostra 2); a outro dos 3 tubos de ensaio foram adicionados 100 μL da mesma solução referência, perfazendo-se uma concentração no solo de 0,50 mg kg^{-1} (Amostra 3) e, por fim, ao 3° tubo de ensaio foram adicionados 200 μL da solução referência, perfazendo-se uma concentração no solo de 1 mg kg^{-1} (Amostra 4). Após a realização da fortificação os tubos de ensaio ficaram em repouso por um período de 24 h, após esse período foram adicionados aos tubos de ensaio 3 mL de uma solução extratora com 80% ACN e 20 % H_2O . Esta solução extratora também foi adicionada ao tubo de ensaio sem fortificação (Amostra 1) e ao 5° tubo de ensaio sem solo (branco analítico). Feito isto, foi realizado o procedimento de extração por banho de ultrassom, conforme abaixo:

- Os 5 tubos de ensaio foram levados ao banho de ultrassom (sonicação) (frequência de 35 KHz) por 30 min;
- Os tubos de ensaio foram centrifugados (5000 rpm) por 10 min;
- O sobrenadante de cada tubo de ensaio foi retirado e transferido para um balão de 10 mL;
- Foram adicionados aos tubos de ensaio, novamente, 3 mL da solução extratora e, foram repetidas as etapas acima por mais duas vezes, totalizando

90 min de sonicação, 3 etapas de centrifugação e 3 alíquotas de sobrenadante retirada de cada tubo e transferidas para os balões de 10 mL;

- Os balões de 10 mL foram avolumados com a solução extratora e seu conteúdo foi transferido para vials de 15 mL;

Estes vials foram levados então ao dessecador para a evaporação do seu conteúdo, sob vácuo, até a secura. Em seguida o conteúdo dos vials foi dissolvido com 3 mL de água deionizada e o seu conteúdo (extrato) submetido a análise cromatográfica.

Foram realizadas 3 bateladas de extração (em diferentes períodos) e em cada uma delas os extratos obtidos foram analisados em triplicata ($n = 9$), empregando-se HPLC com coluna monolítica e coluna core-shell.

A presença de ATR e HAT foi confirmada pelo emprego da espectrometria de massas. Para tal, foi utilizado um sistema HPLC Shimadzu, composto de duas bombas LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, controlador CBM-20A, forno de coluna CTO-20 e detector UV-VIS SPD-20 acoplado a um detector de massas íon trap Amazon Speed ETD – Bruker Daltonics operando em modo positivo, interfaciado por um ionizador por eletronebulização (ESI). As condições experimentais empregadas foram as seguintes: voltagem do capilar 4,5 kV; pressão do nebulizador 40 psi; fluxo de gás 9 L min^{-1} , temperatura 300°C . Foram utilizadas a coluna monolítica e core-shell empregadas no presente trabalho, assim como composição do gradiente de eluição foi o mesmo empregada para ambas as colunas. Operação do íon-trap em modo full scan 75-600 m/z.

3.2.2.2 Estudos de fortificação e extração de atrazina e simazina em amostras de água, empregando ponto nuvem, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell

Para a realização deste estudo foi utilizado o Cromatógrafo a Líquido Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, equipado com detector UV-VIS DAD, autosampler, software para controle e aquisição de dados Chromeleon (version 6.80). Para as separações foram utilizadas a coluna monolítica C₁₈ (100 x 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna C₁₈ (5 x 4,6 mm), de mesmo material e, a coluna core-shell C₁₈ (30 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm) acoplada a uma pré-coluna (C₁₈ 5 x 4,6 mm) do mesmo material.

A separação da simazina e atrazina foi obtida empregando-se duas fases móveis compostas de: (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e (B) ACN. Para a coluna core-shell foi empregado um gradiente de eluição de 10 a 90% ACN em 16,3 min, já para a coluna monolítica a composição de (B) variou de 13 à 90% também em 16,3 min. O gradiente de eluição, para ambas as colunas, foi realizado da seguinte forma: de 0 a 5 min de corrida, a composição de fase móvel era de 10% (core-shell) ou 13% (coluna monolítica) ACN, de 5 a 7 min foi realizado um gradiente linear de 10 (13) para 35% ACN, permanecendo com essa composição até 9,5 min quando então, um novo gradiente linear foi realizado até 10,5 min variando a composição da fase móvel de 35 para 90% ACN permanecendo com essa composição por 1 min (essa etapa foi necessária para a remoção do surfactante da coluna), em seguida foi realizado outro gradiente linear de 11,5 até 13,5 min variando a composição de fase móvel de 90 a 10 ou 13% ACN, com o objetivo de recondicionar a coluna para a condição inicial, e permanecendo nessa composição até o final da corrida (16,3 min). A vazão de fase móvel empregada, durante toda a corrida cromatográfica, para

ambas as colunas, foi de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. A detecção foi realizada a 223, 238 e 300 nm. O volume de injeção foi de $20 \text{ }\mu\text{L}$. Todas as soluções (padrões, amostras/extratos, soluções “branco”) foram analisadas em duplicata e na presença de 90% MeOH:H₂O (v v⁻¹).

Para este estudo foram empregadas 2 diferentes amostras de água de rio coletadas na Chapada Diamantina, BA.

A extração por ponto nuvem foi realizada da seguinte maneira: em tubos de ensaio com capacidade de 15 mL foram adicionados 9 mL da amostra de água (amostra 1, amostra 2), volumes de $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução mistura de simazina e atrazina na concentração de 1 mg L^{-1} e volumes de 5, 15 ou $50 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução mistura de simazina e atrazina na concentração de 10 mg L^{-1} , 1 mL de uma solução NaCl 30% (w/v) e 5 mL de uma solução 5% (w/v) de Triton X-114. Nos tubos em que a solução da mistura foi adicionada, a concentração dos mesmos foi de 1, 5, 15 e $50 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de simazina e atrazina. Cada nível de fortificação foi realizado em dois tubos de ensaio, para cada amostra. Foi utilizado também, um tubo de ensaio sem a adição da solução mistura de simazina e atrazina para cada amostra (branco) e um tubo de ensaio contendo somente a solução surfactante e a solução de NaCl (branco analítico), totalizando 19 tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram então agitados vigorosamente por 1 min e levados ao banho termostatizado a 60°C por 30 min. Em seguida foram centrifugados a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante (fração aquosa pobre em surfactante) foi removido e foi adicionado, a cada tubo, 1 mL de uma solução 90% (v/v) MeOH:H₂O. Os tubos foram novamente agitados por 1 min e levados a centrifugação a 13000 rpm por 10 min. Por fim, o volume final (2 mL) foi submetido a análise cromatográfica.

4 Resultados e discussão

4.1 Cromatografia por Injeção Sequencial

4.1.1 Avaliação da composição de fase móvel para a separação de atrazina, desetilatrizona, desisopropilatrizona, hidroxiatrizona e simazina empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell.

Inicialmente foi decidido o solvente orgânico para a fase móvel. Os solventes mais empregados para a separação de herbicidas triazínicos são o metanol (MeOH) e a acetonitrila (ACN). Foi optado por se utilizar a acetonitrila, pois este solvente apresenta um menor corte no UV (190 nm), permitindo trabalhar em menores comprimentos de onda, além de ter menor viscosidade, gerando pressões mais baixas para uma mesma vazão no cromatógrafo. Além disso, tem menor toxicidade quando comparado ao metanol.

Definido o solvente partiu-se para a avaliação da melhor composição de fase móvel empregando o sistema de Cromatografia por Injeção Sequencial, esquematizado na Figura 10, inicialmente empregando coluna monolítica C₁₈ (50 x 4,6 mm). Para isto, utilizou-se acetonitrila (ACN) e, como tampão, ácido acético/acetato de amônio 1,25 mM com pH 4,7. Foi utilizada, primeiramente, essa concentração de tampão com esse valor de pH, em função dos resultados obtidos em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (Infante *et al*, 2011; Urio *et*

al, 2013). Para a eluição dos cinco compostos em estudo, SIM, ATR, DIA, DEA e HAT, foi necessária a utilização da eluição passo a passo (emprego de etapas de eluição com diferentes composições de fase móvel). Foram testadas diversas composições de fase móvel, variando de 10 a 80% de ACN. Foram avaliados também, diferentes valores de pH (3,5; 4,2 e 4,7), em função da separação dos metabólitos da atrazina (DIA, DEA e HAT), mais especificadamente em função de HAT, pois o mesmo é um composto passível de protonação, de modo que o pH influencia na retenção do analito na fase estacionária.

Em função dos resultados obtidos nas diferentes avaliações realizadas, se optou pela seguinte condição: 15% (v v⁻¹) ACN para a separação dos metabólitos DIA, DEA e HAT e 35% ACN (v v⁻¹) para a separação de SIM e ATR. Partiu-se então para a avaliação da concentração do tampão da fase móvel. Optou-se por usar como tampão o acetato de Amônio, pois o mesmo é um melhor tampão para a espectrometria de massas, uma vez que é facilmente volatilizado e não gera adutos que possam causar problemas na ionização dos analitos de interesse. Foram avaliados quatro diferentes concentrações do tampão para a fase móvel, 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mM. Cada uma das quatro diferentes concentrações do tampão para a fase móvel foi avaliada através da construção da curva analítica de referência para ATR, DEA, DIA, HAT e SIM nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg L⁻¹. Cada solução foi avaliada em triplicata. O protocolo experimental para a análise cromatográfica das soluções padrão está descrito no item 3.2.1.1.

Os valores dos tempos de retenção (t_R), dos coeficientes angulares das retas (B), dos coeficientes de correlação linear (R) e dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais obtidos para curva analítica, em cada concentração de tampão avaliada, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência, para cada tampão avaliado, para as triazinas e metabólitos da atrazina em estudo, com concentração entre 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, empregando SIC com coluna monolítica.

Herbicida/ Metabólito	t_R (s)	$B(x10^{-5})$ ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ácido Acético/Acetato de amônio 1,25 mM					
DIA	64,5±0,2	198±6	0,996	11	34
HAT	91±1	166±5	0,997	7	22
DEA	106,5±0,2	205±6	0,996	10	32
SIM	219,2±0,5	309±15	0,991	3	11
ATR	250,6±0,5	265±9	0,995	15	47
Ácido Acético/Acetato de amônio 2,5 mM					
DIA	65,9±0,4	195±4	0,998	5	16
HAT	86,3±0,2	170±5	0,996	8	24
DEA	109,9±0,2	199±3	0,999	3	9
SIM	219,1±0,7	311±6	0,998	6	18
ATR	250,9±0,4	265±5	0,998	5	16
Ácido Acético/Acetato de amônio 5,0 mM					
DIA	65,1±0,6	165±2	0,999	1	5
HAT	81,7±1,	171±2	0,999	2	6
DEA	107,4±0,8	186±6	0,995	10	31
SIM	219,5±0,8	270±8	0,996	14	57
ATR	251,3±0,6	237±2	0,999	0,8	2
Ácido Acético/Acetato de amônio 10,0 mM					
DIA	65,0±0,7	137±4	0,995	8	24
HAT	79,7±1	178±5	0,996	9	27
DEA	107,4±1,2	152±7	0,990	20	61
SIM	219,6±0,6	216±4	0,998	4	13
ATR	251,5±0,5	185±1	0,974	29	92

A linearidade foi estimada em função das áreas de pico dos compostos em estudo, para a faixa de concentração avaliada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais foram calculados empregando-se $\text{LOD} = 3S/B$ e $\text{LOQ} = 10S/B$, onde S corresponde ao desvio padrão do ruído da linha base, nos tempos de retenção dos compostos em estudo, obtido para um branco de água deionizada e, B corresponde ao valor do coeficiente angular da reta em função das alturas de pico. Os valores obtidos de LOD e LOQ, para a atrazina e simazina, estão acima dos valores de concentração máxima (MCL, do inglês *Maximum Contaminant Level*) permitidos pela US-EPA e pelo CONAMA para águas potáveis, que são de 3

e $2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Para atingir tais níveis seria necessária a realização de etapas de pré-concentração, porém os níveis de LOD e LOQ obtidos nos permitem a realização de estudos para a determinação de resíduos desses compostos em amostras de solo (Konda & Pásztor, 2001; Amadori *et al*, 2013; Urio *et al*, 2013).

Diante dos resultados obtidos optou-se por trabalhar, deste ponto em diante, com a concentração de **2,5 mM** de acetato de amônio, uma vez que este apresenta valores de R maiores de 0,99, o que segundo Pimentel & Barros Neto (1996) indica que o modelo empregado é linear e adequado para os pesticidas em estudo. Outro fato relevante para a escolha da concentração de 2,5 mM foi esta apresentar uma linha base menos ruidosa do que as concentrações de 5 e 10 mM, além de preservar melhor a coluna, uma vez que a concentração do tampão é baixa.

Ficou então definida a composição para a separação dos compostos em estudo, 15:85 (v v⁻¹) ACN:HAc/NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2 para a separação de DIA, HAT e DEA, e 35:65 (v v⁻¹) ACN: HAc/NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2 para a separação de SIM e ATR.

O volume de injeção de amostra/padrão utilizado foi de 200 μL em função dos resultados obtidos em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa (Dos Santos *et al*, 2009; Infante *et al*, 2011). A utilização desse volume não causou perda de linearidade, assimetria de pico ou efeitos de memória.

A Figura 11 mostra um cromatograma obtido, para um branco de água deionizada, realizada com a composição de fase móvel definida.

Figura 11: Cromatograma obtido para um branco de água deionizada, demonstrando o gradiente de eluição definido para os estudos. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm); volume de amostra 200 μL ; vazão de fase móvel 35 $\mu\text{L s}^{-1}$.

A Figura 12 mostra um cromatograma obtido para uma solução padrão de uma mistura, na concentração de 1 mg L^{-1} dos compostos em estudo, com a composição de fase móvel definida.

Figura 12: Cromatograma obtido para uma solução mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde DIA = Deseisopropilatrizona; HAT = Hidroxiatrizona; DEA = Desetilatrizona; SIM = Simazina; ATR = Atrazina; a = monitoramento a 223 nm; b = monitoramento a 238 nm. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm); volume de amostra 200 μL ; composição de fase móvel 15:85 ACN:HAc/ NH_4Ac pH 4,2 para a separação de DIA, HAT e DEA, 35:65 ACN:HAc/ NH_4Ac pH 4,2 para a separação de SIM e ATR; vazão de fase móvel 35 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Os compostos em estudo absorvem em 223 e 238 nm, sendo que para DIA, DEA, SIM e ATR a maior absorção ocorre a 223, já para HAT a maior absorção ocorre a 238 nm. Para a quantificação das áreas obtidas foram utilizados os comprimentos de onda de maior absorção para cada composto. O comprimento de onda de 300 nm não é absorvido por nenhum composto e foi utilizado para um monitoramento constante da linha base e, dessa forma, tornar mais fácil a quantificação das áreas dos compostos em estudo. Em 300 nm os compostos em estudo não absorvem, mas os efeitos de gradiente de índice de refração, que ocorrem nas zonas de interpenetração das fases móveis com diferentes composições (Figura 13), também chamados de efeito Schlieren, são observados com a mesma magnitude que nos comprimentos de onda de 223 e 238 nm (Rocha *et al*, 1996). Este procedimento foi adotado para todos os estudos realizados utilizando os referidos compostos e comprimentos de onda.

Figura 13: Cromatograma obtido para uma solução mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: a = 300 nm; b = 223 nm; c = cromatograma resultante da subtração da absorvância de 223 nm frente a de 300 nm; DIA = Desisopropilatrazina; HAT = Hidroxiatrazina; DEA = Desetilatrazina; SIM = Simazina; ATR = Atrazina. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm); volume de amostra 200 μL ; composição de fase móvel 15:85 ACN:HAc/ NH_4Ac pH 4,2 para a separação de DIA, HAT e DEA, 35:65 ACN:HAc/ NH_4Ac pH 4,2 para a separação de SIM e ATR; vazão de fase móvel 35 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Definida a composição de fase móvel para a coluna monolítica partiu-se para a definição da composição de fase móvel para a coluna core-shell. Submetendo a coluna core-shell as composições definidas para a coluna monolítica ($\text{FM}_1 = 15:85 \text{ ACN:HAc/NH}_4\text{Ac } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; $\text{FM}_2 = 35:65 \text{ ACN:HAc/NH}_4\text{Ac } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$). Não foi possível obter uma separação entre DIA e HAT, sendo necessária a reavaliação da composição da fase móvel. Para tal, partindo-se da concentração e do valor de pH do tampão na fase móvel definidas para a coluna monolítica, ou seja $\text{HAc/NH}_4\text{Ac } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$, testaram-se diferentes composições de fase móvel, com concentrações de ACN variando de 10 a 20%. Também foi avaliado o volume de amostra/padrão a ser empregado, uma vez que o volume de 200 μL , empregado na

coluna monolítica, ocasionou coeluição de picos e alargamentos de bandas. Foram avaliados volumes entre 20 e 80 μL .

A Figura 14 mostra a relação área de pico x volume de amostra obtida para os volumes avaliados.

Figura 14: Relação área de pico x volume de amostra para a injeção de uma mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} empregando a coluna core-shell, onde: DIA = Desisopropilatrizona; HAT = Hidroxiatrizona (monitorado a 238 nm); DEA = Desetilatrizona; SIM = Simazina; ATR = Atrazina.

Com o aumento do volume de amostra ocorreram ganhos significativos de áreas de pico. Volumes superiores a 80 μL causaram coeluição de picos entre DIA e HAT, além de alargamentos de banda. Foi necessário o emprego de uma vazão de fase móvel de $8 \mu\text{L s}^{-1}$, devido a geração de elevadas pressões ($> 500 \text{ psi}$), que ocasionaram vazamentos pela válvula de alívio (Figura 10), em função do tamanho de partícula de $2,7 \mu\text{m}$ da coluna core-shell.

A Figura 15 mostra um cromatograma obtido para uma solução padrão mistura, na concentração de 1 mg L^{-1} dos compostos em estudo, com as condições cromatográficas escolhidas.

Figura 15: Cromatograma obtido para uma solução mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde DIA = Deseisopropilatrazina; HAT = Hidroxiatrazina; DEA = Desetilatrazina; SIM = Simazina; ATR = Atrazina; a = monitoramento a 233 nm; b = monitoramento a 238 nm. Condições cromatográficas: Coluna core-shell C_{18} (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula $2,7 \text{ }\mu\text{m}$); volume de amostra $80 \text{ }\mu\text{L}$; composição de fase móvel 13:87 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 para a separação de DIA, HAT e DEA, 35:65 ACN:HAc/ NH_4Ac 2,5 mM pH 4,2 para a separação de SIM e ATR; vazão de fase móvel $8 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$.

Definidas as condições cromatográficas para a separação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, a linearidade do método foi avaliada através da construção das curvas analíticas de referência para as triazinas em estudo. A mesma foi construída em água na forma de uma solução da mistura dos padrões triazínicos, a partir da solução estoque de 500 mg L^{-1} em metanol, em concentrações que variaram de 100 a $1000 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Cada solução foi avaliada em triplicata. O protocolo experimental para a análise cromatográfica das soluções padrão está descrito no item 3.2.1.1.

Os valores dos tempos de retenção (t_R), dos coeficientes angulares das retas (B), coeficientes de correlação linear (R) e dos limites de detecção (LOD) e

quantificação (LOQ) instrumentais obtidos para curva analítica estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência dos compostos em estudo empregando-se SIC empregando coluna core-shell.

Herbicida/ Metabólito	t_R (s)	$B(x10^{-4})$ ($L \mu g^{-1}$)	R	LOD ($\mu g L^{-1}$)	LOQ ($\mu g L^{-1}$)
DIA	175,8 $\pm$ 0,6	21 $\pm$ 1	0,9997	10	31
HAT	194,4 $\pm$ 0,6	31 $\pm$ 1	0,9936	16	50
DEA	332,4 $\pm$ 0,6	35 $\pm$ 1	0,9999	10	31
SIM	606,6 $\pm$ 0,8	62 $\pm$ 2	0,9992	20	61
ATR	727,8 $\pm$ 0,7	49 $\pm$ 3	0,9975	25	77

A linearidade foi estimada em função das áreas de pico dos compostos em estudo, para a faixa de concentração avaliada. Os coeficientes de correlação lineares (R) obtidos, como pode se observar na tabela acima, estão entre 0,993 e 0,999, o que segundo Ribani *et al* (2004), evidenciam um ajuste adequado dos dados para a linha de regressão. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais foram calculados conforme descrito no item 4.1.1. Os valores de LOD e LOQ obtidos para SIM e ATR, apesar de estarem acima do MCL permitido para águas potáveis pela US-EPA (3 $\mu g L^{-1}$) e pelo CONAMA (2 $\mu g L^{-1}$), nos permitem a realização de estudos de determinação de resíduos desses compostos em amostras de solo (Konda & Pásztor, 2001; Amadori *et al*, 2013; Urio *et al*, 2013).

Definidas as condições cromatográficas para a separação de ATR, DEA, DIA HAT e SIM, empregando SIC com colunas monolítica e core-shell, avaliaram-se os parâmetros cromatográficos para cada coluna, com base nos cromatogramas mostrados na Figura 12 para a coluna monolítica e Figura 15 para a coluna core-shell. Foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: Resolução (R_s); Fator de retenção (k), Fator de separação (α); Assimetria de pico (A_s); Número de

pratos efetivos por metro (**Neff**) e altura equivalente de um prato (**H**). Os parâmetros foram calculados pelas fórmulas abaixo:

- *Resolução:*

$$R_s = 2 \frac{(\Delta t_R)}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{Eq. (5)}$$

$$R_s = \frac{2(\Delta t_R)}{1,7(w_{1/2h(1)} + w_{1/2h(2)})} \quad \text{Eq. (6)}$$

- *Fator de retenção:*

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Eq. (7)}$$

- *Fator de separação:*

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Eq. (8)}$$

- *Assimetria:*

$$A_s = \frac{B}{A} \quad \text{Eq. (9)}$$

- *Número de pratos efetivos por metro:*

$$Neff = \frac{16 \left(\frac{t'_R}{w_b} \right)^2}{L} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$Neff = \frac{5,5 \left(\frac{t'_R}{w_{1/2h}} \right)^2}{L} \quad \text{Eq (10)}$$

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{Eq. (3)}$$

- *Altura de prato*

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Eq. (11)}$$

onde:

A = diferença entre o máximo do pico e o ponto de inflexão inicial do pico

B = diferença entre o ponto de inflexão final do pico e o máximo do pico

L = comprimento da coluna em metros (0,05 para coluna monolítica e 0,03 m para coluna *Fused-Core*)

Neff = Número de pratos efetivos por metro

t'_R = tempo de retenção ajustado

t_M = tempo que todos os solutos não retidos (sem interação com a fase estacionária) demorarão para percorrer a fase estacionária

t_R = tempo de retenção.

W_b = largura da base do pico, é obtida traçando-se as tangentes aos pontos de inflexão e medindo-se o comprimento da linha de base que fica compreendida entre os pontos que cortam a tangente

$W_{1/2h}$ = largura do pico na meia altura

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos para cada parâmetro cromatográfico avaliado.

Tabela 5: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial (SIC), com base em um cromatograma obtido, nas condições otimizadas, para uma solução da mistura de padrões dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L⁻¹.

Herbicida/Metabólito	R_s^a	k	α^a	A_s	Neff (m ⁻¹) ^e	H (μm) ^e
Coluna Monolítica^c						
DIA	-	1,1	-	1,7	2140	23
HAT	2,3	1,4	1,3	2,2	4482	11
DEA	2,2	2,1	1,5	1,8	11767	4
SIM	9,6	5	2,4	2,2	-	
ATR	2,4	6	1,2	2,4	-	
Coluna Core-shell^d						
DIA	-	1,1	-	1,6	6300	5
HAT	1,3 ^b	1,5	1,4	2,5	8069 ^b	4
DEA	2,9	3,3	2,2	1,8	17905	2
SIM	7,6	6,5	2	1,7		
ATR	4,6	7,9	1,2	1,2		

^a = R_s e α calculados entre HAT e DIA, DEA e HAT, SIM e DEA, ATR e SIM; ^b = R_s e Neff para HAT, empregando a coluna core-shell, calculados pelas equações 6 e 10, respectivamente; ^c = coluna monolítica (50 x 4,6 mm) composição de fase móvel (FM₁) 15:85 e (FM₂) 35:65 ACN:HAc/NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2 (demais condições cromatográficas descritas na Figura 12), tempo morto (t_M) = 36,7 s; ^d = coluna core-shell C₁₈ (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), composição de fase móvel (FM₁) 13:87 e (FM₂) 35:65 ACN:HAc/NH₄Ac 2,5 mM pH 4,2. (demais condições cromatográficas descritas na Figura 15) t_M = 89,2 s; ^e = Neff e H calculados para a etapa inicial (FM₁ = 15% ACN para a coluna monolítica e 13% para a coluna core-shell); DIA = Desisopropilatrazina; HAT = Hidroxiatrazina; DEA = Desetilatrazina; SIM = Simazina; ATR = Atrazina.

A Resolução R_s e N_{eff} entre HAT e DIA, para a coluna core-shell, foram calculados a meia altura de pico, pela equação 6 e 10 respectivamente, pois como pode ser observado na Figura 15, a separação entre DIA e HAT não ocorre na linha de base. Empregando a equação 6 para o cálculo de R_s do par DIA/HAT na coluna core-shell, obteve-se um valor igual a 1,3, valor este considerável aceitável apesar de não ideal. Para as demais triazinas em estudo, os valores de R_s , em ambas as colunas, foi superior a 1,5, indicando uma separação de linha base. Os valores de k obtidos variaram entre 1,1 e 7,9, indicando que os compostos apresentam retenção na fase estacionária e não estão sujeitos a interferências de substâncias polares com baixa retenção na fase estacionária. Os valores de α obtidos foram maiores que 1, indicando que um composto está separado do outro e que a fase líquida empregada é seletiva para os compostos em estudo. Os valores de A_s obtidos variaram entre 1,2 e 2,5, indicando que não ocorrem interferências (alargamentos de banda frontal ou caudal) que causem coeluição de picos (resoluções inferiores a 1) (Snyder *et al*, 1997; Ribani *et al*, 2004; Leite, 2008; Lanças, 2009).

No que se diz respeito aos valores de N_{eff} e H , parâmetros estes que estão relacionados com a eficiência da fase estacionária (quanto menor a altura de um prato, maior o número de pratos de uma coluna e maior a sua eficiência), a coluna core-shell obteve valores de N_{eff} variando entre 6300 e 17905 pratos por metro e, valores de H variando entre 2 e 5 μm , enquanto que a coluna monolítica obteve valores de N_{eff} variando entre 2140 e 11767 pratos por metro e H entre 4 e 23 μm . Os menores valores de H e, conseqüentemente maiores N_{eff} , obtidos pela coluna core-shell indicam uma maior eficiência das fases superficialmente porosas, proporcionando um elevado número de etapas de transferência de fase (distribuição do soluto entre fase móvel-fase estacionária-fase móvel).

4.1.2 Estudos de interferentes em Cromatografia por Injeção Sequencial empregando coluna monolítica e coluna core-shell.

Com o objetivo de avaliar o efeito de potenciais interferências da metodologia desenvolvida empregando Cromatografia por Injeção Sequencial com a coluna monolítica e a coluna core-shell para a determinação de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina, realizou-se a análise cromatográfica de soluções dos seguintes herbicidas: ametrina (AMA) e metribuzina (MET), que são herbicidas da família das triazinas; bromacil (BRO), pertencente à família das uracilas; diuron (DIU), linuron (LIU) e tebuthiuron (TIU), pertencentes à família das ureias. Cada solução foi avaliada individualmente, na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell, sob as mesmas condições cromatográficas e mesmo protocolo experimental empregados para a análise de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM (descritas no item 3.2.1.1).

A Figura 16 mostra os cromatogramas obtidos para cada solução dos herbicidas acima avaliadas, sobrepostos ao cromatograma obtido para a solução padrão da mistura de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, ambas na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando SIC com a coluna monolítica e à coluna core-shell.

Figura 16: Comparação dos cromatogramas obtidos para a avaliação cromatográfica por SIC para as soluções de ametrina, bromacil, diuron, linuron e tebuthiuron, na concentração de 1 mg L^{-1} ; e para uma solução padrão mistura de desisopropilatrazina (DIA), hidroxiatrazina (HAT), desetilatrazina (DEA), simazina (SIM) e atrazina (ATR), também na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: a) Cromatogramas obtidos empregando SIC com a coluna monolítica (condições cromatográficas descritas na Figura 12); b) Cromatogramas obtidos empregando SIC com a coluna core-shell (condições cromatográficas descritas na Figura 15).

Como pode se observar na Figura 16, os compostos que apresentaram eluição nas condições empregadas, para a coluna monolítica, foram ametrina, bromacil e diuron. Já para a coluna core-shell bromacil e diuron apresentaram eluição nas condições cromatográfica empregadas. Para os demais compostos, linuron, metribuzina e tebuthiuron, não são observados picos cromatográficos nas condições empregadas, indicando que estes compostos são fortemente retidos nas fases estacionárias avaliadas, ou não absorvem radiação no comprimento de onda selecionado.

A ametrina apresentou um pico cromatográfico na coluna monolítica, sendo que na coluna core-shell este composto não apresentou eluição. Como pode ser observado na Figura 16, apesar da presença do pico referente à ametrina na coluna monolítica, o mesmo é bem resolvido (separado) do pico do composto de interesse mais próximo, correspondente a atrazina. Bromacil, em ambas as colunas, eluiu no mesmo tempo de retenção correspondente a simazina, apresentando uma altura de pico com menos de 10% da altura de pico da mesma. Diuron apresentou eluição em ambas as colunas. Na coluna core-shell o pico correspondente ao diuron está bem resolvido do pico da atrazina. Já para a coluna monolítica a eluição do diuron ocorre próximo ao tempo de retenção da atrazina, apresentando um pico cromatográfico com 25% da altura de pico da mesma.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura,

presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse e que este esteja livre de quaisquer interferentes que por ventura estejam presentes na amostra (Ribani *et al*, 2004).

Apesar do bromacil, herbicida pertencente à família das uracilas, ter apresentado interferência em ambas as colunas e diuron, herbicida da família das ureias, apresentar interferência na coluna monolítica, a metodologia desenvolvida foi aplicada para o estudo de fortificação com ATR, DEA, DIA, HAT e SIM de uma amostra de solo, uma vez que a análise cromatográfica da mesma não apresentou picos nos tempos de retenção correspondentes a SIM e ATR, ou próximos a estes. Além disso, as fortificações das amostras foram realizadas com padrões certificados dos compostos em estudo, o que garante que os picos obtidos nos respectivos tempos de retenção para a SIM e ATR são efetivamente destes compostos. No caso da análise de amostras de solo que apresentem picos nos tempos de retenção correspondentes a SIM e ATR, a presença de tais compostos, ou de outros compostos que possuam tempos de retenção similares, pode ser confirmada com o auxílio da espectrometria de massas. Dessa forma, a metodologia empregando Cromatografia por Injeção Sequencial com a coluna monolítica e a coluna core-shell, para a determinação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, pode ser considerada seletiva para os compostos em estudo.

4.1.3 Estudo de fortificação e extração de atrazina, desetilatrizina, desisopropilatrizina, hidroxiatrazina e simazina em solo, empregando banho de ultrassom, Cromatografia por Injeção Sequencial, coluna monolítica e coluna core-shell

Uma amostra de solo, proveniente da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), coletada em uma área agrícola onde não há relatos da aplicação de herbicidas, foi submetida ao estudo de fortificação e extração das triazinas em estudo. O procedimento para realização da fortificação e posterior extração por banho de ultrassom da amostra de solo, está descrito no item 3.2.1.3.

Os extratos obtidos após a etapa de extração por banho de ultrassom foram submetidos à análise cromatográfica empregando SIC com a coluna monolítica e com a coluna core-shell. O protocolo experimental para a análise cromatográfica em ambas as colunas, está descrito no item 3.2.1.1.

A Figura 17 apresenta os resultados obtidos para a avaliação cromatográfica dos extratos.

Figura 17: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom de amostras de solo, empregando Cromatografia por Injeção Sequencial, onde: a) Resultados obtidos empregando SIC com coluna monolítica; b) Resultados obtidos empregando SIC com coluna core-shell; DIA = Desisopropilatrazina; HAT = Hidroxiatrazina; DEA = Desetilatrazina; SIM = Simazina. ATR = Atrazina.

Para cada nível de fortificação obtiveram-se dois extratos e cada extrato foi analisado em duplicata ($n = 4$). As barras de erro correspondem aos desvios das médias das recuperações obtidas para cada extrato avaliado em duplicata. Para a análise cromatográfica das soluções com fortificações entre 0,1 e 1 mg L⁻¹ e sem a presença de solo, soluções estas utilizadas para monitorar todo o processo de extração, as recuperações obtidas variaram entre 70-100% para ambas as colunas, demonstrando que o procedimento de extração por banho de ultrassom empregado não apresenta perdas e/ou degradação consideráveis dos analitos de interesse.

Os resultados obtidos com os extratos de solo, para ambas as colunas, de uma forma geral encontram-se dentro da faixa recomendada pela literatura para estudos de fortificação e extração de herbicidas em amostras de solo (Zanella *et al*, 2000; Ribani *et al*, 2004). A coluna monolítica apresentou recuperações variando entre 42%, obtida para uma fortificação do solo com SIM na concentração de 0,1 mg kg⁻¹, e 118%, obtida para uma fortificação do solo com SIM na concentração de 1 mg kg⁻¹. Já para a coluna core-shell as recuperações variaram entre 60%, obtida para uma fortificação do solo com DEA na concentração de 0,75 mg kg⁻¹, e 160%, obtida para uma fortificação do solo com DEA na concentração de 0,1 mg kg⁻¹.

Com a coluna monolítica se obteve recuperações fora da faixa recomendada pela literatura (70 a 120%) para o herbicida simazina nos níveis de fortificação de 0,10 e 0,25 mg kg⁻¹ (42 e 51%, respectivamente). Tais recuperações baixas podem ser justificadas pelo fato de que a eluição da SIM ocorre na zona de interpenetração da fase móvel com maior força de eluição (FM₂ = 35% ACN), o que pode ter prejudicado a quantificação das áreas da SIM para as referidas fortificações nos extratos.

Com a coluna core-shell se obteve recuperações satisfatórias (entre 60 e 120%) para a maior parte dos compostos, com exceção de DIA e DEA para o nível de fortificação de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (151 e 160%, respectivamente). Os valores elevados não podem ser explicados por uma eventual presença desses metabólitos no solo, uma vez que não foram detectados no solo sem fortificação. Assim, os valores altos de taxas de recuperação podem ser decorrentes de dificuldades de integração dos picos em cromatogramas obtidos com soluções que correspondem ao primeiro ponto da curva analítica (mais baixa concentração).

A retenção das triazinas em estudo foi fortemente afetada pela composição do extrato final (Figura 18). A eluição dos metabólitos da atrazina (DEA, DIA e HAT), foi seriamente afetada quando padrões desses compostos foram injetados diluídos em soluções contendo ACN. Isto pode ser justificado pelo grande volume de amostra empregado (200 μL para a coluna monolítica e 80 μL para a coluna core-shell), porém reduções nesses volumes acarretariam em perdas de sensibilidade. Este problema foi solucionado diluindo-se os extratos, amostras e padrões em soluções puramente aquosas.

Figura 18: Efeito na eluição de uma solução mistura padrão das triazinas em estudo, na concentração de 1 mg L^{-1} , diluída em acetonitrila, onde: a) Coluna monolítica (condições cromatográficas descritas na Figura 12); b) Coluna core-shell (condições cromatográficas descritas na Figura 15).

A Figura 19 mostra a sobreposição dos cromatogramas obtidos para a análise cromatográfica do extrato do solo sem fortificação e fortificado com 1 mg L^{-1} dos

compostos em estudo, obtidos após a extração por banho de ultrassom e, de um branco de água deionizada.

Figura 19: Comparação dos cromatogramas obtidos para os extratos da amostra de solo sem fortificação e fortificada com 1 mg L^{-1} e de um branco de água deionizada, onde: a) Cromatogramas obtidos empregando SIC com a coluna monolítica (condições cromatográficas descritas na Figura 12); b) Cromatogramas obtidos empregando SIC com a coluna core-shell (condições cromatográficas descritas na Figura 15); DIA = Desisopropilatrizona; HAT = Hidroxiatrizona; DEA = Desetilatrizona; SIM = Simazina; ATR = Atrazina.

Na Figura 19, acima, é possível notar, além da presença dos picos dos herbicidas e metabólitos em estudo, a presença de outros picos nos cromatogramas do solo fortificado e do solo sem fortificação. Esses picos correspondem aos coextrativos orgânicos presentes no solo (substâncias húmicas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros). A maioria desses compostos eluíram no volume morto, tanto da coluna monolítica como da coluna core-shell. No entanto, pode-se observar um pico referente a esses compostos antes do pico correspondente a SIM, o que causou erros na quantificação deste. Esta interferência poderia ser minimizada pela diminuição da proporção de ACN na fase móvel, aumentando assim a retenção de SIM, porém isto acarretaria em um aumento do tempo de análise prejudicando a frequência de amostragem. Em função disto e, como os resultados de recuperação obtidos encontram-se dentro da faixa recomendada (Ribani *et al*, 2004), esta abordagem não foi adotada.

Observando a Figura 19 é possível notar a presença dos picos das triazinas em estudo no extrato do solo fortificado, demonstrando, juntamente com os resultados apresentados na Figura 17, a aplicabilidade do banho de ultrassom para a extração de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM em amostras de solo.

O emprego de colunas superficialmente porosas em Cromatografia por Injeção Sequencial é possível, como apontado por Chocholous e colaboradores (2011), podendo ser exploradas para análises ambientais, como provado no presente estudo. Essa coluna apresentou uma melhor eficiência do que a coluna monolítica, no entanto devido à elevada pressão gerada e a limitações da instrumentação SIC, a eficiência da fase superficialmente porosa não pôde ser totalmente explorada. Apesar da melhor eficiência para a separação e determinação de atrazina, desetilatraxina, desisopropilatraxina, hidroxiatraxina e simazina obtidas

pela coluna core-shell, a coluna monolítica tem a vantagem de promover análises mais rápidas. Enquanto que na coluna monolítica o tempo de análise por amostra é de 8 min, a coluna core-shell leva em torno de 20 min para a análise da mesma amostra. Sendo assim, o emprego da coluna monolítica no SIC é vantajoso em relação ao da coluna core-shell.

4.1.4 Estudos de focalização em coluna monolítica empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial

Inicialmente foram definidas as composições de fase móvel para a realização deste estudo. Como nos estudos anteriores, foram empregadas duas fases móveis com composições diferentes. A primeira composição de fase móvel (FM₁) foi composta de 5:95 ACN:NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e teve por objetivo promover a eluição de compostos com baixa retenção na fase estacionária deixando SIM e ATR retidos na coluna. A segunda composição de fase móvel (FM₂) foi composta de 40:60 ACN:NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e teve por objetivo promover a eluição e separação de ATR e SIM retidos na fase estacionária. Definida a composição de fase móvel partiu-se para a avaliação do melhor volume de amostra para o prosseguimento dos estudos. Foram avaliados volumes de amostra entre 50 e 2000 µL. A Figura 20 mostra a relação área de pico x volume de amostra obtida para os volumes avaliados e apresenta os cromatogramas obtidos para alguns dos volumes avaliados, obtidos com base em uma solução mistura de ATR e SIM na concentração de 1 mg L⁻¹.

Figura 20: (A) - Áreas de pico em função do volume de amostra para a injeção de uma mistura padrão de SIM e ATR na concentração de 1 mg L^{-1} . **(B)** Cromatogramas obtidos para a análise de uma solução mistura dos compostos em estudo em diferentes volumes de amostra, onde: a) 50 μL ; b) 600 μL ; c) 1000 μL ; d) 1400 μL ; e) 2000 μL ; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} (25 x 4,6 mm); $\text{FM}_1 = 5:95 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$ e $\text{FM}_2 = 40:60 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; vazão de fase móvel $20 \mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm.

Com o aumento do volume de amostra, ocorreram ganhos significativos nas alturas (e áreas) dos picos correspondentes a simazina e atrazina. Podemos também observar que os ganhos relativos a áreas dos picos de SIM e ATR ocorrem até o volume de 1400 μL , e que para volumes maiores que este começam a ocorrer perdas nas áreas de pico para os compostos avaliados. Diante disto optou-se pela escolha do volume de 1400 μL de amostra, pois além de apresentar uma elevada altura de pico ($> 1 \text{ UA}$), neste volume a resolução obtida foi de 1,4 (a meia altura).

Definido o melhor volume de amostra, partiu-se para a análise da faixa linear de trabalho. Para tal, avaliaram-se solução padrão mistura de ATR e SIM com concentrações variando entre 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 21 apresenta um cromatograma obtido para uma solução padrão mistura de simazina e atrazina na concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, sobreposto a um cromatograma de água deionizada.

Figura 21: Cromatograma obtido para uma solução mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para um branco de água deionizada, onde: SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} (25 x 4,6 mm); FM_1 = 5:95 ACN: NH_4Ac /HAc 2,5 mM pH 4,2 e FM_2 = 40:60 ACN: NH_4Ac /HAc 2,5 mM pH 4,2; vazão de fase móvel 20 $\mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm; volume de amostra 1400 μL .

A faixa linear de trabalho escolhida para o prosseguimento de estudos variou de 40 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. A concentração de 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 21, proporcionou altura de sinal analítico, para SIM e ATR, em torno de 10 vezes maior do que o ruído da linha base para um branco de água deionizada. Para concentrações menores que 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ a altura de sinal da simazina ficou prejudicada. Em função disto, a referida concentração foi empregada como o menor ponto da faixa linear determinada para o prosseguimento dos estudos, que variou de 40 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. As equações da reta obtidas foram, para a SIM ($y = 0,0019x + 0,0722$), e para a ATR ($y = 0,0047x + 0,0642$), onde y representa a altura de pico, e x a concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$. Os valores dos coeficientes de correlação lineares foram de 0,9943 para SIM e 0,9851 para ATR. Os tempos de retenção foram de $5,5 \pm 0,2$ min (330 ± 9 s) para SIM e, $6,0 \pm 0,2$ min (360 ± 12 s) para ATR.

Definida a faixa linear de trabalho, foi realizado a avaliação da seletividade da metodologia através do estudo de interferentes empregando soluções dos metabólitos da atrazina (DEA, DIA e HAT), ametrina (AMA), metribuzina (MET), bromacil (BRO), diuron (DIU), linuron (LIU), tebuthiuron (TIU), ácido húmico (HA) ácido fúlvico (HFI),

Os metabólitos da atrazina (DEA, DIA e HAT) não causaram interferências na separação de SIM e ATR nas condições empregadas. Para os demais herbicidas avaliados na forma de interferente, com exceção da AMA e LIU, os demais compostos apresentaram picos nos tempos de retenção próximos a SIM e ATR, como pode ser verificado na Figura 22 abaixo.

Figura 22: Cromatogramas de uma solução dos herbicidas em estudo, SIM e ATR, na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$, frente à análise de soluções interferentes de outros herbicidas na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$, onde: SIM = simazina; ATR = atrazina; AMA = ametrina; BRO = bromacil; DIU = diuron; LIU = linuron; MET = metribuzina; TIU = tebuthiuron. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} (25 x 4,6 mm); $\text{FM}_1 = 5:95 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$ e $\text{FM}_2 = 40:60 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; vazão de fase móvel $20 \mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm; volume de amostra $1400 \mu\text{L}$.

Como pode ser observado na Figura 22, AMA apresentou eluição próximo ao tempo de retenção da ATR e LIU apresentou eluição próximo ao tempo de retenção da SIM, porém os picos de AMA e LIU encontram-se bem resolvidos em relação aos picos de ATR e SIM. Para BRO, DIU, MET e TIU, os picos correspondentes às eluições destes compostos apresentam tempos de retenção similares aos tempos de retenção de SIM e ATR, sendo considerados interferentes para a determinação de simazina e atrazina na metodologia proposta. No entanto, a metodologia desenvolvida foi aplicada para a fortificação com SIM e ATR de soluções aquosas de solo e sedimento e de uma amostra de água, uma vez que a análise de ambas não apresentaram picos nos tempos de retenção correspondentes a SIM e ATR, ou

próximos a estes, além de que as fortificações foram realizadas com padrões certificados de simazina e atrazina, o que nos garante que os picos obtidos nos respectivos tempos de retenção para a SIM e ATR são efetivamente destes compostos.

Foram avaliadas também, as possíveis interferências da presença de ácido húmico (HA) e ácido fúlvico (HFI). Para tal foram preparadas soluções de HA e HFI nas concentrações de 1, 5, 25 e 50 mg L⁻¹, na presença de SIM e ATR na concentração de 40 µg L⁻¹. A Figura 23 e 24 apresentam os cromatogramas obtidos para as análises das soluções de HA e HFI.

Figura 23: Cromatogramas obtidos para o estudo de interferência de ácido húmico (HA), onde: a) solução padrão mistura de SIM e ATR na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$; b) solução de HA na concentração de 1 mg L^{-1} ; c) solução de HA na concentração de 5 mg L^{-1} ; d) solução de HA na concentração de 25 mg L^{-1} ; e) solução de HA na concentração de 50 mg L^{-1} ; SIM = simazina; ATR = atrazina. As soluções de HA foram analisadas na presença de SIM e ATR na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} ($25 \times 4,6 \text{ mm}$); $\text{FM}_1 = 5:95 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$ e $\text{FM}_2 = 40:60 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; vazão de fase móvel $20 \mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm; volume de amostra $1400 \mu\text{L}$.

Figura 24: Cromatogramas obtidos para o estudo de interferência de ácido fúlvico (HFI), onde: a) solução padrão mistura de SIM e ATR na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$; b) solução de HFI na concentração de 1 mg L^{-1} ; c) solução de HFI na concentração de 5 mg L^{-1} ; d) solução de HFI na concentração de 25 mg L^{-1} ; e) solução de HFI na concentração de 50 mg L^{-1} ; SIM = simazina; ATR = atrazina. As soluções de HFI foram analisadas na presença de SIM e ATR na concentração de $40 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} ($25 \times 4,6 \text{ mm}$); $\text{FM}_1 = 5:95 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$ e $\text{FM}_2 = 40:60 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; vazão de fase móvel $20 \mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm; volume de amostra $1400 \mu\text{L}$.

Como pode se observar nas Figuras 23 e 24, com o aumento da concentração de HF ou HFI a interferência aumenta. Pode-se observar um aumento na absorbância da linha base na etapa inicial (de 0 a 300 s, FM_1), e conforme se aumenta a concentração de HA ou HFI, esse aumento se prolonga, atingindo a etapa onde a composição da fase móvel muda para FM_2 e onde, também, a simazina e atrazina são eluídos da fase estacionária. Nesse ponto se observa que HA e HFI eluem completamente da fase estacionária juntamente com SIM e ATR, sendo que em seguida a absorbância retorna a linha base. Acredita-se que essa interferência possa ser sanada pelo acréscimo de uma composição intermediária

entre FM₁ e FM₂, porém isto acarretaria em um aumento do tempo de análise e, consequentemente, na perda da frequência de amostragem. Como as amostras analisadas não apresentaram esse tipo de interferência promovida pela presença de ácido húmico e ácido fúlvico em concentrações maiores que 1 mg L⁻¹ esta abordagem não foi adotada.

Por fim, os extratos aquosos de solo e sedimento e a amostra de água da torneira, ambos fortificados com 40 e 100 µg L⁻¹ de SIM e ATR, foram submetidos à análise cromatográfica empregando a metodologia desenvolvida para a separação de SIM e ATR por Cromatografia por Injeção Sequencial aplicando o conceito de focalização na coluna. O protocolo experimental e a forma de preparo das amostras analisadas estão descritos no item 3.2.1.4. A Figura 25 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise cromatográfica das amostras fortificadas com 100 µg L⁻¹.

Figura 25: Cromatogramas da amostra de água e extratos aquosos fortificados com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos em estudo, onde: a) solução padrão de SIM e ATR na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$; b) extrato aquoso de sedimento fortificado; c) extrato aquoso de solo fortificado; d) água da torneira fortificada; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} (25 x 4,6 mm); $\text{FM}_1 = 5:95 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$ e $\text{FM}_2 = 40:60 \text{ ACN:NH}_4\text{Ac/HAc } 2,5 \text{ mM pH } 4,2$; vazão de fase móvel $20 \mu\text{L s}^{-1}$; comprimentos de onda monitorados 223, 238, 300 nm; volume de amostra $1400 \mu\text{L}$.

Como podemos observar na Figura 25, os cromatogramas da amostra de água e dos extratos aquosos do solo e sedimento fortificados com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de SIM e ATR apresentam os picos referentes à eluição dos compostos de interesse. Os picos estão bem resolvidos (separação na linha base) e se mostram livres de interferências, que poderiam ser causadas pela presença de outras substâncias, como por exemplo, ácido húmico e ácido fúlvico.

A Figura 26 apresenta as recuperações obtidas para a fortificação da amostra e água e dos extratos aquosos do solo e do sedimento.

Figura 26: Recuperações obtidas para as fortificações de extratos aquosos de solo e sedimento e, para a amostra de água da torneira, empregando Cromatografia por Injeção Sequencial explorando o conceito de focalização na coluna.

Não foi possível obter-se recuperação para o extrato aquoso de sedimento fortificado com 40 µg L⁻¹ de SIM e ATR. As recuperações para as fortificações realizadas variaram entre 50-100% para SIM e 78-100% para a ATR, valores estes dentro da faixa recomendada pela literatura para estudos de fortificação de amostras e extratos ambientais (Ribani *et al*, 2004).

O conceito de focalização na coluna, apesar de ser conhecido há décadas, é pouco explorado devido a fatores comprometedores da resolução cromatográfica como, por exemplo, alargamento de banda e coeluição de compostos. O número de trabalhos encontrados na literatura explorando esse conceito em cromatografia líquida é reduzido (Stass & Dalhoff, 1997; Mills *et al*, 1997; Groskreutz & Weber, 2015). Batista e colaboradores (2015) empregaram o conceito de focalização na coluna em SIC para a determinação de parabenos, obtiveram limites de detecção de

3,1 ng mL⁻¹ para o metilparabeno, 3,3 ng mL⁻¹ para o etilparabeno e 4,6 ng mL⁻¹ para o propilparabeno. Além disso, empregando um volume de amostra de 5000 µL obtiveram valores para os coeficientes de inclinação da reta entre 405 e 435 vezes maiores do que os valores obtidos quando empregado um volume de amostra de 10 µL.

Não foram encontrados trabalhos na literatura explorando o conceito de focalização em coluna empregando Cromatografia por Injeção Sequencial empregando a coluna monolítica para a determinação de simazina e atrazina. Dessa forma não temos comparar os resultados obtidos com trabalhos da literatura.

O que podemos observar é que a metodologia empregada explorando o conceito de focalização na coluna se mostrou aplicável para a determinação de simazina e atrazina em amostras ambientais, além de remover possíveis interferência causadas por ácidos húmico e fúlvico em concentrações inferiores a 1 mg L⁻¹, assim como a eliminação de interferência de outros compostos com características similares aos compostos em estudo (polares), através do estudo de fortificação, no qual se obteve percentuais de recuperação dentro da faixa recomendada pela literatura.

4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.2.1 Estudos de fortificação e extração de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina em solo com a presença de atrazina, empregando banho de ultrassom, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell

Para a realização destes estudos foi utilizado um Cromatógrafo a Líquido LC 9A Shimadzu, equipado com detector UV modelo SPD 6AV, placa PCA, software para aquisição de dados e alça de amostragem de 20 μ L. Inicialmente foram definidas as condições cromatográficas para os estudos empregando HPLC utilizando a coluna monolítica (50 x 4,6 mm) e a coluna core-shell. Foram testadas diferentes composições de fase móvel, compostas por (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e (B) ACN, em gradiente de eluição.

A Figura 27 mostra os cromatogramas obtidos para as diferentes composições de gradiente de fase móvel avaliadas para a coluna monolítica.

Figura 27: Cromatogramas de uma mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: a) gradiente de fase móvel de 15 à 35% ACN; b) gradiente de fase móvel de 13 à 35% ACN; c) gradiente de fase móvel com 10 à 35; DIA = desisopropilatrizona; DEA = desetilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \text{ }\mu\text{L}$, monitoramento a 223 nm .

Como podemos observar na Figura 27, as composições avaliadas promoveram a separação dos compostos em estudo. Na composição avaliada em **a** o pico da SIM sofre um alargamento de banda, afetando sua altura. Na composição avaliada em **b** os picos dos compostos em estudo apresentam uma separação satisfatória, com alargamentos de banda minimizados, resultando em picos estreitos. Na composição avaliada em **c** o pico da HAT sofre um alargamento de banda, o que afeta a sua altura de pico. Diante disto optou-se por empregar a composição avaliada em **b** para o prosseguimento dos estudos.

O gradiente de eluição foi realizado da seguinte maneira: de 0 a 5 min de corrida, a composição de fase móvel era de 13% ACN, de 5 a 7 min foi realizado um gradiente linear de 13 para 35% ACN, permanecendo com essa composição até 9,5

min quando então, um novo gradiente linear foi realizado até 12 min variando a composição da fase móvel de 35 para 13% ACN permanecendo com essa composição até o final da corrida (15 min).

A Figura 28 apresenta um cromatograma para uma solução padrão mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando HPLC com coluna monolítica, obtido com a composição de gradiente de eluição otimizada.

Figura 28: Cromatograma obtido para uma solução padrão mistura dos compostos em estudo em uma concentração de 1 mg L^{-1} , onde: DIA = desisopropilatrizona; DEA = desetilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm), gradiente de eluição 13 à 35% ACN, vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \mu\text{L}$, monitoramento à 223 nm.

Empregando-se o sistema de HPLC (Shimadzu) não foi possível monitorar o comprimento de onda de 238 nm, comprimento de onda este o de maior absorção para HAT, devido a limitações do detector que permite o monitoramento de apenas

um comprimento de onda. O comprimento de onda monitorando foi o de 223 nm, que é o de maior absorção para os demais compostos em estudo.

Definida a composição do gradiente de eluição para a coluna monolítica, partiu-se para a avaliação do gradiente de eluição para a coluna core-shell. A Figura 29 mostra os cromatogramas obtidos para as diferentes composições de gradiente de fase móvel avaliadas.

Figura 29: Cromatogramas de uma mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: a) gradiente de fase móvel de 15 à 35% ACN; b) gradiente de fase móvel de 15 à 30% ACN; c) gradiente de fase móvel com 13 à 35; d) gradiente de fase móvel de 10 à 35% ACN; DIA = desisopropilatrastina; DEA = desetilatrastina; HAT = hidroxiatrastina; SIM = simastina; ATR = atrastina. Vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \text{ }\mu\text{L}$, monitoramento a 223 nm.

Como se pode observar na Figura 29, as composições avaliadas em **a** e **b** não apresentaram separação entre DIA e HAT. A composição avaliada em **c** por sua vez apresentou coeluição entre os picos de DIA e HAT. A composição avaliada em **d** apresentou uma separação em linha de base para compostos em estudo,

resolvendo a coeluição e a não separação de DIA e HAT das outras composições avaliadas, além de apresentar picos bem definidos, sem alargamentos de bandas. Diante disso optou-se por empregar a composição avaliada em **d** para o prosseguimento dos estudos empregando HPLC com coluna core-shell.

O gradiente de eluição foi realizado da seguinte maneira: de 0 a 5 min de corrida, a composição de fase móvel era de 10% ACN, de 5 a 7 min foi realizado um gradiente linear de 10 para 35% ACN, permanecendo com essa composição até 9,5 min quando então, um novo gradiente linear foi realizado até 12 min variando a composição da fase móvel de 35 para 10% ACN permanecendo com essa composição até o final da corrida (15 min).

A Figura 30 apresenta um cromatograma para de solução de uma mistura padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , empregando HPLC com a coluna core-shell, obtido com a composição de gradiente de eluição otimizada.

Figura 30: Cromatograma de uma mistura dos compostos em estudo em uma concentração de 1 mg L^{-1} , onde: DIA = desisopropilatrizona; DEA = desetilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula $2,7 \text{ }\mu\text{m}$), gradiente de eluição 10 à 35% ACN, vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \text{ }\mu\text{L}$, monitoramento à 223 nm.

A separação empregando HPLC com a coluna core-shell proporcionou picos mais estreitos, com menores alargamentos de banda e maior altura do que os picos obtidos empregando a coluna monolítica (Figura 28). Isto se deve ao fato de que a coluna core-shell, devido a sua característica de ser superficialmente porosa e por possuir partículas com tamanho de $2,7 \text{ }\mu\text{m}$, possibilita melhores taxas de transferência de massa, (diminuindo o termo **C** da equação de *Van Deemter*), proporcionando menores assimetrias de pico (Chocolous *et al*, 2011).

Observando os cromatogramas obtidos para a coluna core-shell (Figura 30) e para a coluna monolítica (Figura 29), obtidos para uma solução de mesma concentração dos compostos em estudo, notamos uma diferença na ordem de eluição dos metabólitos da atrazina, apesar das duas colunas serem do mesmo

material (sílica modificada com C_{18}). Na coluna monolítica a ordem de eluição é DIA – DEA – HAT, enquanto que para a coluna core-shell, a ordem de eluição é DIA – HAT – DEA. A explicação para este fato encontrada na literatura não é clara, mas este fato pode estar relacionado à presença de grupos silanois residuais na coluna monolítica que proporciona sítios de troca iônica ou possibilidade de formação de ligações hidrogênio, aumentando a retenção de HAT. O pK_a da HAT é de 5,4 enquanto que o pH da fase móvel é 4,2, dessa forma a HAT está protonada, comportando-se como uma base mais forte do que os outros metabólitos da atrazina que possuem $pK_a < 2$, apresentando uma menor retenção (Vermeulen *et al*, 1982; McCalley, 2002).

Definidas as condições cromatográficas para a coluna monolítica e para a coluna core-shell, foram construídas as curvas analíticas de referência para cada coluna. A mesma foi construída em água na forma de uma mistura dos compostos em estudo, a partir das soluções estoque individuais de 500 mg L^{-1} em metanol, em concentrações que variaram de 100 a $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Cada solução foi avaliada em triplicata. Os valores dos tempos de retenção (t_R), dos coeficientes angulares (B), coeficientes de correlação linear (R) e dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais obtidos para curva analítica estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros analíticos obtidos para a curva analítica de referência, com concentrações entre 0,1 e 1 mg L⁻¹, empregando-se HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell

Herbicida/ Metabólito	t _R (min)	B(x10 ⁻⁶) (L µg ⁻¹)	R	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
Coluna monolítica^a					
DIA	1,5±0,01	1,92±0,02	0,9997	1,1	3,7
DEA	3,1±0,01	1,96±0,04	0,9999	2,3	8,0
HAT	4,2±0,02	0,72±0,03	0,994	5,3	17
SIM	8,0±0,01	2,75±0,02	0,9999	4,4	15
ATR	9,4±0,01	2,22±0,02	0,9998	12	41
Coluna core-shell^b					
DIA	0,97±0,01	1,99±0,01	0,9995	2,2	7,5
HAT	1,1±0,03	0,86±0,01	0,9993	16	53
DEA	2,2±0,02	1,88±0,01	0,9998	3,3	11
SIM	7,0±0,01	2,73±0,01	0,9998	5,1	15
ATR	8,8±0,01	2,71±0,01	0,9998	7,1	24

^a = Coluna monolítica C₁₈ (50 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 13 à 35%; ^b = Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 µm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 10 à 35%; para ambas as colunas: vazão de fase móvel 1,5 mL min⁻¹, volume de amostra 20 µL, monitoramento à 223 nm.

A linearidade foi determinada a partir dos gráficos das áreas de pico dos compostos em função da concentração avaliada. Os coeficientes de correlação lineares (**R**) obtidos, como pode se observar na Tabela 6 (acima), variaram entre 0,994 e 0,9999, o que segundo Ribani *et al* (2004), evidenciam um ajuste adequado dos dados para a linha de regressão. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) instrumentais foram calculados conforme descrito no item 4.1.1. Os valores de LOD variaram entre 1,1 µg L⁻¹ para DIA (empregando a coluna monolítica) e 16 µg L⁻¹ para HAT (empregando a coluna core-shell). Os valores de LOD e LOQ obtidos para SIM e ATR encontram-se acima do MCL permitido para águas potáveis pela US-EPA (3 µg L⁻¹) e pelo CONAMA (2 µg L⁻¹), de modo que seria necessária uma etapa de pré-concentração para se atingir tais níveis. Por outro lado, os valores de LOD e LOQ obtidos para as ambas as colunas permitem a realização de estudos

para a determinação de herbicidas triazínicos em amostras de solo, bem como a realização do monitoramento da concentração de triazinas em estudos de adsorção (Konda & Pásztor, 2001; Amadori *et al*, 2013; Urio *et al*, 2013).

A linearidade (**R**) e a sensibilidade (determinada pelos valores dos coeficientes angulares da reta) foram similares para ambas às colunas, assim como os desvios dos tempos de retenção das triazinas em estudo. A HAT teve sua sensibilidade e detectabilidade afetada em função do seu monitoramento ter sido realizado em 223 nm e não em 238 nm, que é o seu comprimento de onda de maior absorção. Não foi possível monitorar os dois comprimentos de onda simultaneamente devido às limitações do detector que permite o monitoramento de apenas um comprimento de onda.

Foram avaliados os parâmetros cromatográficos com base nos cromatogramas mostrados na Figura 28 (para a coluna monolítica) e na Figura 30 (para a coluna core-shell). Foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: Resolução (**R_s**), calculado pela equação 5; fator de retenção (**k**), calculado pela equação 7; fator de separação (**α**), calculado pela equação 8; assimetria de pico (**A_s**), calculado pela equação 9; número de pratos efetivos por metro (**N_{eff}**), calculado pela equação 2, e altura equivalente de um prato (**H**), calculado pela equação 11. A Tabela 7 apresenta os valores obtidos para cada parâmetro cromatográfico calculado para a coluna monolítica e para a coluna core-shell.

Tabela 7: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando a Cromatografia por Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com base em um cromatograma obtido, nas condições otimizadas, para uma solução mix padrão dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L⁻¹.

Herbicida/Metabólito	R_s^a	k	α^a	A_s	$N_{eff} (m^{-1})^d$	$H (\mu m)^d$
Coluna Monolítica^b						
DIA	-	1,8	-	2,3	1667	31
DEA	3,2	4,2	2,3	1,8	6914	7
HAT	1,6	6	1,4	1,2	6303	8
SIM	6	12	2	1,9	-	-
ATR	3	15	1,2	2,5	-	-
Coluna Core-shell^c						
DIA	-	3,5	-	2,4	8427	4
HAT	3	6,4	1,8	2,5	18806	2
DEA	3	10,4	1,6	2,1	24029	1
SIM	14	25,8	2,5	1,8	-	-
ATR	4,8	29	1,1	1,6	-	-

^a = R_s e α calculados para coluna monolítica entre DEA-DIA, HAT-DEA, SIM-HAT e ATR-SIM; para a coluna core-shell calculados entre HAT-DIA, DEA-HAT, SIM-DEA, ATR-SIM. ^b = Coluna monolítica C₁₈ (50 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 13 à 35%; t_M = 0,6 min; ^c = Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 10 à 35%, t_M = 0,3 min. Para ambas as colunas: vazão de fase móvel 1,5 mL min⁻¹, volume de amostra 20 μL , monitoramento à 223 nm; ^d = N_{eff} e H calculados para a etapa inicial, onde a composição de fase móvel é isocrática (13% ACN para a coluna monolítica e 10% ACN para a coluna core-shell); DIA = desisopropilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; DEA = desetilatrizona; SIM = simazina. ATR = atrazina.

Os valores de R_s variaram entre 1,6 (obtido para separação entre HAT e DEA empregando a coluna monolítica) e 14 (obtido para a separação entre SIM e DEA empregando a coluna core-shell), valores estes que indicam uma separação dos compostos ao nível da linha base, estando os mesmos separados satisfatoriamente um do outro, livres de quaisquer coeluições. Os valores de k obtidos variaram entre 1,8 e 29, indicando que os compostos apresentam retenção nas fases estacionárias empregadas, estando livres de interferências proporcionadas por substâncias polares com baixa retenção. Os valores de α obtidos para ambas as colunas foram superiores a 1, indicando que um composto está satisfatoriamente separado do outro e, sendo assim, o método proposto é seletivo para os compostos em estudo.

Os valores de A_s variaram entre 1,2 e 2,5, indicando que os picos são simétricos, contribuindo para uma separação satisfatória dos compostos em estudo (Snyder *et al*, 1997; Ribani *et al*, 2004; Leite, 2008; Lanças, 2009).

No que se diz a respeito da eficiência da coluna, determinada pelos valores de **Neff** e **H**, a coluna core-shell apresentou valores de **Neff** superiores aos valores obtidos pela coluna monolítica e, conseqüentemente menores valores de **H**, indicando uma maior eficiência das fases superficialmente porosas, devido ao fato das mesmas proporcionarem, em função da sua estrutura, elevado número de etapas de transferência de massa entre as fases, onde o soluto passa da fase móvel para a fase estacionária e desta retorna para a fase móvel, gerando picos mais estreitos e com maior altura.

Definidas as composições de gradiente de eluição para a separação de atrazina, desetilatrastina, desisopropilatrastina, hidroxiatrazina e simazina, para a coluna monolítica e para a coluna core-shell, e traçadas as curvas analíticas de referência para ambas às colunas, a metodologia desenvolvida foi aplicada em um estudo de fortificação e extração dos compostos em estudo, utilizando para tal uma amostra de solo com presença de atrazina e empregando a extração por banho de ultrassom. O procedimento para a realização da extração por banho de ultrassom está descrito no item 3.2.2.1.

Foi então realizada a análise cromatográfica dos extratos obtidos para o referido estudo. Cinco amostras foram submetidas ao estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom. Denominou-se “amostra branco” a amostra que não continha a amostra de solo e nem a solução mistura dos compostos em estudo, contendo somente a solução extratora 80:20 (v v⁻¹) ACN:H₂O, servindo esta para

monitorar possíveis interferentes durante o processo analítico, a qual não apresentou quaisquer interferências quantificáveis. A amostra denominada “amostra 1” continha o solo com presença de atrazina, sem fortificação. O resultado das quantificações de ATR foi somado ao valor da concentração esperada no solo fortificado, por exemplo, para uma fortificação de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, a concentração esperada (correspondendo a recuperação) para a ATR era de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ somada a concentração quantificada desta na “amostra 1”. A “amostra 2” corresponde a fortificação de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ dos compostos em estudo onde, $50 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução padrão mistura de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM na concentração de 10 mg L^{-1} foram adicionados ao solo. De modo similar, fortificações nos níveis de $0,5$ e $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ foram feitas no solo, gerando as amostras 3 e 4, respectivamente. A Figura 31 apresenta os cromatogramas obtidos para a análise cromatográfica, da “amostra 1” e ‘amostra 4” empregando a coluna monolítica e a Figura 32 apresenta os cromatogramas obtidos empregando a coluna core-shell.

Figura 31: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra de solo sem fortificação e com fortificação de 1 mg kg^{-1} dos compostos em estudo empregando HPLC com a coluna monolítica, onde: DIA = desisopropilatrizona; DEA = desetilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (50 x 4,6 mm); fase móvel composta de $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 (A) e ACN (B), com gradiente linear de B de 13 a 35%; vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra $20 \text{ }\mu\text{L}$; monitoramento em 223 nm; tempo de corrida 15 min.

Figura 32: Sobreposição dos cromatogramas obtidos para a amostra de solo sem fortificação e com fortificação de 1 mg kg^{-1} dos compostos em estudo empregando HPLC com a coluna core-shell, onde: DIA = desisopropilatrizona; DEA = desetilatrizona. HAT = hidroxiatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), fase móvel composta de $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 (A) e ACN (B), com gradiente linear de B de 10 a 35%; vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra 20 μL ; monitoramento em 223 nm; tempo de corrida 15 min.

Observando as Figuras 31 e 32, notamos a presença no cromatograma referente à amostra de solo sem fortificação a presença da ATR, proveniente da aplicação da formulação comercial do herbicida ao solo. Notamos também a presença de HAT, metabólito da atrazina. A presença de HAT no cromatograma do solo sem fortificação é proveniente da hidrólise da atrazina à hidroxiatrizona (representada na Figura 09). Segundo LeBaron e colaboradores (2008), a hidrólise da atrazina à hidroxiatrizona é favorecida em temperaturas superiores a 40°C . Fatores como a presença de ácidos e bases minerais, matéria orgânica e pH do solo também contribuem para a hidrólise da atrazina.

Os cromatogramas do extrato do solo e do extrato fortificado com 1 mg kg^{-1} dos compostos em estudo, obtidos para ambas as colunas, apresentam outros picos, além dos picos de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, que correspondem aos picos dos coextrativos orgânicos presentes no solo (ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros). É possível notar a presença de um pico no início do cromatograma (sem retenção na fase estacionária), que corresponde a substâncias húmicas ou ácidos carboxílicos de baixo peso molecular, que estão presentes em alta abundância em solos (Baziramakenga *et al*, 1995). O pico referente à eluição de DIA apresentou retenção suficiente, em ambas as colunas, fornecendo uma separação satisfatória das substâncias polares com baixa retenção (picos próximos). A alta eficiência das fases estacionárias empregadas, em especial a fase superficialmente porosa, permitiu a formação de picos bem definidos, simétricos e separados, tanto para o extrato do solo sem fortificação como para o fortificado, o que possibilitou a realização da análise cromatográfica direta dos extratos obtidos, sem a necessidade de etapas de tratamento (*clean-up*) dos mesmos. Para a análise cromatográfica dos extratos do solo sem fortificação ($n = 9$), foram quantificados para ATR $331 \pm 16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $273 \pm 12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, para a coluna monolítica e para a coluna core-shell respectivamente. Esta diferença pode estar relacionada à menor eficiência na separação entre a ATR e os coextrativos orgânicos do solo obtida pela coluna monolítica, em relação à separação obtida pela coluna core-shell, como pode ser observado nas Figuras 31 e 32, causando uma menor precisão na integração e quantificação do pico da ATR. Para a HAT as concentrações quantificadas foram $428 \pm 18 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ e $437 \pm 12 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$, empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell respectivamente, resultados estes que não apresentam evidências de diferenças estatísticas em um nível de confiança de 95%.

A presença de ATR e HAT foi confirmada por HPLC-MS/MS (protocolo experimental descrito no item 3.2.2.1). A presença de ATR foi confirmada pela presença do íon precursor $[M + H]^+$ 216 m/z e do íon da fragmentação $[M + H - C_3H_6]^+$ 198 m/z, derivado da perda de grupo isopropil. A presença de HAT foi confirmada pela presença dos picos do íon precursor $[M + H]^+$ 198 m/z e do íon da fragmentação $[M + H - C_3H_6]^+$ 156 m/z. A Figura 33 apresenta o espectro obtido empregando a coluna monolítica e a Figura 34 empregando a coluna core-shell.

Figura 33: (a) Cromatograma obtido empregando a coluna monolítica com o HPLC-MS/MS operando em modo positivo; (b) espectro de massas obtido para o tempo de retenção da ATR mostrando o pico característico do seu íon precursor $m/z = 216$; (c) espectro de massas mostrando o pico característico do íon de fragmentação para ATR $m/z = 174$; (d) espectro de massas obtido para o tempo de retenção da HAT mostrando o pico característico do seu íon precursor $m/z = 198$; (e) espectro de massas mostrando o pico característico do íon de fragmentação para HAT $m/z = 156$.

Figura 34: (a) Cromatograma obtido empregando a coluna core-shell com o HPLC-MS/MS operando em modo positivo; (b) espectro de massas obtido para o tempo de retenção da ATR mostrando o pico característico do seu íon precursor $m/z = 216$; (c) espectro de massas mostrando o pico característico do íon de fragmentação para ATR $m/z = 174$; (d) espectro de massas obtido para o tempo de retenção da HAT mostrando o pico característico do seu íon precursor $m/z = 198$; (e) espectro de massas mostrando o pico característico do íon de fragmentação para HAT $m/z = 156$.

Através da espectrometria de massas, confirmou-se a presença de ATR e de HAT na amostra de solo submetida ao estudo de fortificação (*Spike*) de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, e posterior extração por banho de ultrassom. Sendo assim, como já foi explanado anteriormente, as concentrações de ATR e HAT quantificadas no solo sem fortificação foram somadas ao valor da concentração esperada no solo fortificado.

Foram realizadas 3 bateladas de extrações em períodos diferentes e, em cada uma delas, os extratos obtidos foram avaliados em triplica ($n = 9$). A Figura 35 (abaixo) mostra a média dos resultados obtidos, com seus respectivos desvios, para a quantificação de ATR, DEA, DIA, HAT, SIM e ATR, empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell.

Figura 35: Recuperações obtidas para o estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom de amostras de solo com presença de atrazina, empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, onde: a) Resultados obtidos empregando HPLC com a coluna monolítica b) Resultados obtidos empregando HPLC com a coluna core-shell; DIA = Desisopropilatrazina; HAT = Hidroxiatrazina; DEA = Desetilatrazina; SIM = Simazina. ATR = Atrazina.

As recuperações variaram entre 40-82% para a coluna monolítica, enquanto que para a coluna core-shell as recuperações variaram entre 45-86%. Apesar de estas recuperações estarem abaixo do recomendado pela literatura, que recomenda intervalos de recuperação entre 70 e 120% (Ribani *et al*, 2004), as mesmas estão consistentes com as recuperações obtidas para estudos similares descritas na literatura.

Amadori e colaboradores (2013), empregando o banho de ultrassom para a extração de atrazina, desetilatraxina e desisopropilatraxina de amostras de solo, para fortificações de 2,5 mg Kg⁻¹, obtiveram recuperações entre 40-60% para a atrazina, 60-85% para desetilatraxina e 50-75% para desisopropilatraxina. Moreno *et al* (2009), empregando ultrassom para a extração de simazina em solo, para fortificações entre 0,75 e 3 µg g⁻¹, obtiveram recuperações entre 84-97 %. Villaverde *et al* (2008), também empregando banho de ultrassom para extração de simazina e atrazina em solo, para fortificações de 15 µg Kg⁻¹, obtiveram recuperações entre 66-96%. Lesueur *et al* (2008), utilizando ultrassom para extração de simazina, atrazina, desetilatraxina e desisopropilatraxina, em amostras de solo, para fortificações de 500 µg g⁻¹, obtiveram recuperações que variaram entre 30-55% para a simazina, 52-85% para a atrazina, 15-20% para desetilatraxina e, 15-30% para a desisopropilatraxina. Gong *et al* (1999) empregando ultrassom para a extração de atrazina e simazina em amostras de solo, para uma fortificação de 30 µg g⁻¹, obtiveram recuperações em torno de 90% tanto para simazina, quanto para atrazina. Stipicevic *et al* (2003), utilizando banho de ultrassom para a extração de atrazina, simazina, desisopropilatraxina e desetilatraxina em amostra de solo, para fortificações de 300 µg g⁻¹, obtiveram recuperações que variaram entre 58-88% para atrazina, 82-98% para a simazina, 86-104 % para a desisopropilatraxina e 80-94%

para desetilatrastina. Babié *et al* (1998), também utilizando ultrassom para a extração de atrastina em solo, para uma fortificação $40 \mu\text{g g}^{-1}$, obtiveram recuperações que variaram entre 100-106%.

A coluna monolítica e a coluna core-shell forneceram eficientes separações para os herbicidas triazínicos estudados, tendo a coluna core-shell apresentado um melhor desempenho proporcionando picos mais estreitos e uma maior resolução. Em função disso, a análise cromatográfica dos extratos obtidos no estudo de fortificação e extração por banho de ultrassom empregando a coluna core-shell proporcionou melhores percentuais de recuperação do que os obtidos pela coluna monolítica. Ambas as colunas foram facilmente conectadas ao sistema HPLC-MS/MS, gerando os espectros desejados para a confirmação de ATR e HAT na amostra de solo submetida ao estudo de fortificação.

As fases monolíticas podem ter seu desempenho melhorado através do aumento da vazão de fase móvel, que é possível devido a sua estrutura interna, composta de canais de aproximadamente $2 \mu\text{m}$ de diâmetro, que geram uma baixa resistência ao fluxo de fase móvel, promovendo alta permeabilidade, gerando baixas pressões, permitindo separações em altas vazões e consequentemente diminuindo os tempos de análise e aumentando a frequência de amostragem, porém isto eleva o consumo de fase móvel, vindo em direção oposta aos objetivos química verde, que tem por objetivo, entre outros, o baixo consumo de solventes orgânicos e a baixa geração de resíduos.

4.2.2 Estudos de fortificação e extração de atrazina e simazina em amostras de água, empregando extração em ponto nuvem, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, coluna monolítica e core-shell

Para realização deste estudo foi utilizado o Cromatógrafo a Líquido Dionex UltiMate 3000 (UHPLC), Thermo Fischer Scientific, equipado com detector UV-VIS DAD, autosampler, software para controle e aquisição de dados Chromeleon (version 6.80) com a coluna monolítica C₁₈ (100 x 4,6 mm) e à coluna core-shell C₁₈ (30 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm). Inicialmente foram empregadas as mesmas condições de gradiente de eluição para a separação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, empregadas no estudo anterior (item 4.2.1), tanto para a coluna monolítica como para a coluna core-shell. Durante a otimização do método, ao realizar-se a avaliação de um extrato obtido pelo procedimento de extração por ponto nuvem empregando o surfactante Triton X-114, notou-se que o mesmo permanecia retido na fase estacionária, sendo necessário, em função disto, um ajuste no gradiente de eluição para a remoção do surfactante após a separação dos herbicidas. A remoção do surfactante, tanto da fase estacionária monolítica como da fase estacionária superficialmente porosa, foi obtida elevando-se o gradiente de eluição até 90% (v v⁻¹) de ACN. As composições de gradiente de eluição para a separação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, ficaram então, assim definidas:

- Foram utilizadas duas fases móveis compostas de: (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e (B) ACN. Para a coluna core-shell foi empregado um gradiente de eluição de 10 a 90% ACN em 16,3 min, já para a coluna monolítica a composição de (B) variou de 13 a 90% também em 16,3 min. O gradiente de eluição, para ambas as colunas, foi realizado conforme descrito no item 3.2.2.2.

Todas as análises cromatográficas nesse estudo (padrões, soluções mistura, brancos e extratos) foram realizadas em solução 90:10 MeOH:H₂O (v v⁻¹), devido ao fato de que a fase rica em surfactante (extrato) obtida na extração por ponto de nuvem necessitou ser solubilizada em solução 90:10 MeOH:H₂O. Ao se analisar as soluções da mistura dos compostos diluídos em meio orgânico, e não mais em meio puramente aquoso como realizado nos estudos anteriores, não foram observadas quaisquer interferências nas retenções e eluições das triazinas, como as interferências observadas no estudo empregando SIC (item 4.1.3). Isso se deve ao fato de que nesse estudo o volume de amostra empregado foi de 20 µL, e não de 200 µL, e com este volume, a dispersão do metanol na fase móvel é maior, o que facilita a retenção dos solutos na coluna.

A Figura 36 mostra um cromatograma obtido de uma solução da mistura dos compostos em estudo empregando a coluna monolítica.

Figura 36: Cromatogramas de uma mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: (a) monitoramento a 223 nm; (b) monitoramento a 238 nm; DIA = desisopropilatrizona; HAT = hidroxiatrazina; DEA = desetilatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (100 x 4,6 mm), composição de fase móvel (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) de 13 à 90%; vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \text{ }\mu\text{L}$; tempo de corrida 16,3 min.

O gradiente de eluição definido proporcionou a separação das triazinas. Neste estudo foi possível o monitoramento do comprimento de onda de 238 nm que é o de maior absorção para a HAT, além do monitoramento em 223 nm. Nota-se um grande pico no início do cromatograma que corresponde a eluição de parte da fração orgânica da solução analisada, sem retenção na fase estacionária. É possível observar picos (um deles com elevada absorbância) em torno de 12 min, os quais correspondem a eluição do surfactante, obtida quando o gradiente de eluição atinge 90% (v v^{-1}) de ACN na fase móvel. Os picos das triazinas em estudo se encontram separados, sem alargamentos de banda significativos, finos e bem definidos.

A Figura 37 mostra um cromatograma obtido, sob a condição de gradiente de eluição adotada, de uma solução mistura dos compostos em estudo empregando a coluna core-shell.

Figura 37: Cromatogramas de uma mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L^{-1} , onde: (a) monitoramento a 223 nm; (b) monitoramento a 238 nm; DIA = desisopropilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; DEA = desetilatrizona; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna core-shell C_{18} (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula $2,7 \mu\text{m}$), composição de fase móvel (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) de 10 à 90%; vazão $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de amostra $20 \mu\text{L}$; tempo de corrida 16,3 min.

O gradiente definido para a coluna core-shell proporcionou a eluição dos compostos de interesse. Podemos notar o mesmo pico no início do cromatograma observado no cromatograma mostrado para a coluna monolítica (Figura 36), correspondente a eluição de parte da fração orgânica da solução analisada, sem retenção na fase estacionária. Empregando a coluna core-shell os picos das triazinas em estudo também obtiveram uma separação excelente entre eles, sem alargamentos de banda significativos, finos e bem definidos.

Foram avaliados os parâmetros cromatográficos, com base nos cromatogramas mostrados na Figura 36 (para a coluna monolítica) e na Figura 37 (para a coluna core-shell). Foram avaliados os seguintes parâmetros

cromatográficos: Resolução (R_s), calculado pela equação 5; fator de retenção (k), calculado pela equação 7; fator de separação (α), calculado pela equação 8; assimetria de pico (A_s), calculado pela equação 9; número de pratos efetivos por metro (N_{eff}), calculado pela equação 2, e altura equivalente de um prato (H), calculado pela equação 11. A Tabela 8 apresenta os valores obtidos para cada parâmetro cromatográfico calculado para a coluna monolítica e para a coluna core-shell.

Tabela 8: Parâmetros cromatográficos avaliados para a coluna monolítica e core-shell empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com base em um cromatograma obtido, nas condições otimizadas, para uma solução padrão mistura dos compostos em estudo na concentração de 1 mg L⁻¹.

Herbicida/Metabólito	R_s^a	k	α^a	A_s	$N_{eff} (m^{-1})^d$	$H (\mu m)^d$
Coluna Monolítica^b						
DIA	-	1,3	-	1,5	4420	11
HAT	2,1	2,3	1,8	1,6	4348	11
DEA	1,5	3,2	1,4	1,3	7332	7
SIM	7,8	6,7	2,1	2	-	-
ATR	3,7	7,9	1,2	1,4	-	-
Coluna Core-shell^c						
DIA	-	3	-	1,3	14133	2
HAT	3,4	6,7	2,2	2	8325	4
DEA	1,5	8,7	1,3	1,2	39397	1
SIM	19	22	2,5	1,2	-	-
ATR	5,1	25,6	1,2	1	-	-

^a = R_s e α calculados para coluna monolítica e core-shell HAT-DIA, DEA-HAT, SIM-DEA, ATR-SIM. ^b = Coluna monolítica C₁₈ (100 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 13 à 90%, t_M = 1,08 min; ^c = Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 10 à 90%, t_M = 0,28 min. Para ambas as colunas: vazão de fase móvel 1,5 mL min⁻¹, volume de amostra 20 μL , monitoramento à 223 e 238 nm; ^d = N_{eff} e H calculados para a etapa inicial, onde a composição de fase móvel é isocrática (13% ACN para a coluna monolítica e 10% ACN para a coluna core-shell); DIA = desisopropilatrizona; HAT = hidroxiatrizona; DEA = desetilatrizona; SIM = simazina. ATR = atrazina.

Os valores de R_s variaram entre 1,5 (obtido para separação entre DEA e HAT para ambas as colunas) e 19 (obtido para a separação entre SIM e DEA

empregando a coluna core-shell), valores estes que indicam uma separação eficiente. Os valores de **k** obtidos variaram entre 1,3 e 25,6, indicando que os compostos apresentam retenção nas fases estacionárias empregadas, estando livres de interferências proporcionadas por substâncias polares com baixa retenção. Os valores de **α** obtidos para ambas as colunas foram superiores a 1, indicando que a metodologia empregada é seletiva para os compostos em estudo. Os valores de **A_s** variaram entre 1 e 2, indicando que os picos são simétricos (Snyder *et al*, 1997; Ribani *et al*, 2004; Leite, 2008; Lanças, 2009).

Quanto à eficiência das colunas, determinada pelos valores de **Neff** e **H**, a coluna core-shell apresentou valores de **Neff** superiores aos valores obtidos pela coluna monolítica e menores valores de **H**, indicando uma maior eficiência das fases superficialmente porosas, conforme discutido na seção anterior. A eficiência da coluna core-shell quando utilizada no HPLC Dionex foi superior à eficiência obtida quando esta foi utilizada no HPLC Shimadzu (Tabela 7), apesar da vazão e da composição de fase móvel serem as mesmas. Uma justificativa para isso é o fato de que o HPLC Dionex é um cromatógrafo apto a se trabalhar em escala semi-micro, com tubos e conexões entre o injetor e a coluna e desta para o detector com 125 µm de diâmetro, o que proporciona uma diminuição dos volumes extra-coluna, gerando menores alargamentos de banda.

Definidas as condições cromatográficas para a separação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM, empregando HPLC com a coluna monolítica e à coluna core-shell, foram construídas as curvas analíticas de referência para ambas às colunas. No entanto as mesmas foram avaliadas somente para ATR e SIM, e não para os demais compostos (DEA, DIA e HAT). Isto foi feito em função do fato destes compostos causarem interferências significativas nas recuperações obtidas para a simazina e

atrazina empregando-se a extração por ponto de nuvem. Diante disto optou-se por realizar o estudo sem a presença dos metabólitos da atrazina. A curva analítica de referência para ATR e SIM foi então construída em concentrações que variaram de 5 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada solução foi avaliada em duplicata. Os valores dos tempos de retenção (t_R), dos coeficientes de inclinação da reta (B), coeficientes de correlação linear (R) e dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos para curva analítica estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros analíticos avaliados para a curva de referencia, com concentrações entre 5 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$, empregando-se HPLC com a coluna monolítica e a coluna core-shell

Herbicida	t_R (min)	B($\times 10^{-5}$) ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	R	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coluna monolítica^a					
SIM	8,23 $\pm$ 0,03	181 $\pm$ 4	0,997	1,1	3,6
ATR	9,46 $\pm$ 0,02	186 $\pm$ 5	0,996	1,3	4,3
Coluna core-shell^b					
SIM	7,01 $\pm$ 0,01	210 $\pm$ 9	0,991	1	3,3
ATR	7,93 $\pm$ 0,01	208 $\pm$ 9	0,991	1,4	4,7

^a = Coluna monolítica C₁₈ (100 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 13 à 90%; ^b = Coluna core-shell (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 10 à 90%; para ambas as colunas: vazão de fase móvel 1,5 mL min⁻¹, volume de amostra 20 μL , monitoramento à 223 nm e 238 nm.

Foi possível trabalhar-se com concentrações entre 5 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ devido a maior sensibilidade do detector do sistema empregado no estudo, em relação as sensibilidades dos detectores do SIC e do instrumento de HPLC usado nos estudos anteriores. A linearidade foi estimada em função das áreas de pico dos compostos em estudo, para a faixa de concentração avaliada. Os valores de LOD variaram entre 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SIM (empregando a coluna monolítica) e 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para SIM (empregando a coluna core-shell), alcançando os valores máximos permitidos pela

US-EPA ($3 \mu\text{g L}^{-1}$) e pelo CONAMA ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) para resíduos de simazina e atrazina em águas potáveis, possibilitando dessa forma, aplicação da metodologia desenvolvida para a análise de amostras de águas.

A Figura 38 mostra os cromatogramas obtidos para uma solução de SIM e ATR nas concentrações de 5 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando HPLC com a coluna monolítica.

Figura 38: Cromatogramas obtidos para soluções de simazina e atrazina empregando HPLC com a coluna monolítica, onde: a) Cromatograma obtido para uma solução na concentração de $250 \mu\text{g L}^{-1}$; b) Cromatograma obtido para uma solução na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$; c) zoom nas regiões dos tempos de retenção dos compostos em estudo para o cromatograma da solução de $250 \mu\text{g L}^{-1}$; d) zoom nas regiões dos tempos de retenção dos compostos em estudo para o cromatograma da solução de $5 \mu\text{g L}^{-1}$; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: coluna monolítica C_{18} (100 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e (B) ACN, com gradiente linear de B de 13 a 90%; vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL}^{-1}$; volume de amostra $20 \mu\text{L}$; monitoramento à 223 e 238 nm; tempo de corrida 16,3 min.

A Figura 39 mostra os cromatogramas obtidos para uma solução mistura de SIM e ATR nas concentrações de 5 e $250 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando HPLC com a coluna core-shell.

Figura 39: Cromatogramas obtidos para soluções mistura de simazina e atrazina empregando HPLC com a coluna core-shell, onde: a) Cromatograma obtido para uma solução na concentração de 250 µg L⁻¹; b) Cromatograma obtido para uma solução na concentração de 5 µg L⁻¹; c) zoom nas regiões dos tempos de retenção dos compostos em estudo para o cromatograma da solução de 250 µg L⁻¹; d) zoom nas regiões dos tempos de retenção dos compostos em estudo para o cromatograma da solução de 5 µg L⁻¹; SIM = simazina; ATR = atrazina. Condições cromatográficas: Coluna core-shell C₁₈ (30 x 4,6 mm, tamanho de partícula 2,7 µm), fase móvel composta de (A) NH₄Ac/HAc 2,5 mM pH 4,2 e (B) ACN, com gradiente linear de B de 10 a 90%; vazão de fase móvel 1,5 mL⁻¹; volume de amostra 20 µL; monitoramento à 223 e 238 nm; tempo de corrida 16,3 min.

No intervalo de 0 a 7 min ocorrem a eluição dos metabólitos da atrazina (Figura 36 e Figura 37), desetilatrazina, desisopropilatrazina e hidroxiatrazina, porém, como já dito, estes compostos causaram interferências significativas nas recuperações obtidas para ATR e SIM no estudo de fortificação e extração por ponto de nuvem, porém manteve-se as condições de gradiente de eluição e tempo de corrida, pois na análise de amostras reais pode ocorrer a presença de alguns destes metabólitos (LeBaron *et al*, 2008). A presença destes metabólitos em amostras reais pode ocasionar perdas significativas dos percentuais de recuperações para SIM e ATR, uma vez que a presença de um maior número de compostos em uma amostra ao que parece afeta a eficiência da extração por ponto nuvem, seja por efeitos de saturação do meio, por efeitos relacionados à competição na transferência das moléculas dos compostos de interesse para o interior hidrofóbico do agregado micelar devido a diferenças de polaridade dos compostos, ou por outros efeitos de natureza desconhecida.

Definidas as condições cromatográficas e traçadas as curvas analíticas de referência para SIM e ATR partiu-se para a realização do estudo de fortificação de amostras de água reais e extração por ponto nuvem.

O procedimento empregado para a fortificação das amostras de água e posterior extração por ponto nuvem está descrito no item 3.2.2.2.

A amostra “branco analítico” teve por função o monitoramento de possíveis interferências durante o processo analítico e não apresentou quaisquer interferências quantificáveis. A “amostra branco” continha a amostra de água (amostra 1 e amostra 2) sem fortificação e o resultado das análises cromatográficas das mesmas não apresentaram concentrações detectáveis de simazina ou atrazina.

Foram realizados 4 níveis de fortificação de simazina e atrazina (1, 5, 15 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), cada um deles em dois tubos de ensaio diferentes para cada amostra. Primeiramente os extratos obtidos foram analisados empregando-se a coluna monolítica e em seguida os mesmos extratos foram analisados empregando-se a coluna core-shell, cada extrato foi avaliado em duplicata, empregando as condições cromatográficas definidas para cada coluna (item 3.2.2.2).

Os resultados obtidos para a avaliação cromatográfica dos extratos da amostra 1 e amostra 2 são mostrados nas figuras abaixo.

Figura 40: Recuperações obtidas para o estudo de adição e recuperação empregando a extração por ponto de nuvem para a amostra 1. Coluna monolítica (100 x 4,6 mm); coluna core-shell (30 x 4.6 mm, tamanho de partícula 2.7 μm).

Figura 41: Recuperações obtidas para o estudo de adição e recuperação empregando a extração por ponto de nuvem para a amostra 2. Coluna monolítica (100 x 4,6 mm); coluna core-shell (30 x 4.6 mm, tamanho de partícula 2.7 µm).

Para a amostra 1 as recuperações variaram entre 65%, obtida para fortificação de SIM na concentração de 15 µg L⁻¹ empregando a coluna monolítica, e 122% obtida para fortificação de ATR na concentração de 50 µg L⁻¹ empregando a coluna core-shell. Para a amostra 2 as recuperações variaram entre 86%, obtida para fortificação de SIM na concentração de 1 µg L⁻¹ empregando a coluna monolítica, e 132% obtida para fortificação de ATR na concentração de 5 µg L⁻¹ em ambas as colunas.

A extração por ponto de nuvem é um método de extração muito empregado para a extração de compostos inorgânicos (principalmente metais), fármacos e proteínas em amostras de água, solo, vegetais, entre outras (Tang *et al*, 2004; Zhong *et al*, 2011; Sato *et al*, 2013; Zain *et al*, 2014; Samaddar & Sen, 2014; Gouda & Amin, 2014). São poucas as aplicações para a extração de compostos orgânicos,

entre eles os pesticidas, e mais especificadamente os herbicidas triazínicos (entre eles a simazina e atrazina), encontrados na literatura. Carabias-Martínez e colaboradores (2003), empregando a extração por ponto de nuvem para amostras de água deionizada, utilizando o Triton X-114 como surfactante, para fortificações entre 5 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de simazina e atrazina entre 3 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtiveram recuperações entre 18 e 60% para a simazina e entre 20 e 90% para a atrazina. Zhou e colaboradores (2009), para a extração de prometrina (herbicida da classe das triazinas) em amostras de água destilada, em concentrações de 0,4; 2 e 10 mg L^{-1} , obtiveram recuperações em torno de 90%. Wang e colaboradores (2010), para a extração de amostras de mel fortificadas com concentrações de 50, 100 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ de propazina (outro herbicida da classe das triazinas), obtiveram recuperações entre 45 e 80%. Liu e colaboradores (2014), para a extração de simazina em leite, em concentrações de 20; 50 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, obtiveram recuperações entre 70 e 90%.

Além de promover a extração de simazina e atrazina das amostras de águas, a extração por ponto nuvem promoveu a pré-concentração de SIM e ATR em torno de cinco vezes, uma vez que as concentrações iniciais adicionadas nas amostras de águas (10 mL) foram 1, 5, 15 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, já as concentrações quantificadas nos extratos (2 mL), após a extração por ponto de nuvem, seriam teoricamente de 5, 25, 75 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essa é uma das grandes vantagens da extração por ponto nuvem. Em métodos de análise de pesticidas em amostras de águas a pré-concentração dos analitos de interesse é de fundamental importância, uma vez que as concentrações de pesticidas, entre eles os herbicidas simazina e atrazina, são extremamente baixas e a pré-concentração se torna indispensável para o monitoramento de resíduos de pesticidas em águas. Outro fator relevante do método de extração por ponto nuvem é que o mesmo não emprega solventes orgânicos na

etapa de extração. No estudo apresentado foi necessária a adição de uma pequena quantidade de solvente orgânico (1 mL de uma solução 90:10 MeOH:H₂O) para a dissolução da fase rica de surfactante, para que o extrato obtido pudesse ser analisado por HPLC. A análise do extrato é possível sem a dissolução do mesmo em fase orgânica dependendo, para isso de fatores como a classe do analito de interesse investigada, as concentrações do mesmo, o tipo de matriz analisada, o tipo de surfactante utilizado e a técnica analítica empregada para a análise do extrato obtido.

As Figuras 42 e 43 mostram os cromatogramas obtidos na análise das amostras fortificadas com 50 µg L⁻¹ de SIM e ATR. Como o procedimento de extração promoveu a pré-concentração dos analitos de interesse, a concentração teoricamente esperada para este nível foi de 250 µg L⁻¹. A Figura 42 mostra os cromatogramas obtidos para a coluna monolítica e a Figura 43 os cromatogramas obtidos para a coluna core-shell.

Figura 42: Sobreposição dos cromatogramas de águas fortificadas com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de SIM e ATR, empregando HPLC com a coluna monolítica, onde: (a) amostra de água 1; (b) amostra de água 2. Condições cromatográficas: Coluna monolítica C_{18} (100 x 4,6 mm), fase móvel composta de (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 13 a 90%, vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL}^{-1}$; volume de amostra $20 \mu\text{L}$; monitoramento à 223 e 238 nm; tempo de corrida 16,3 min.

Figura 43: Sobreposição dos cromatogramas de águas fortificadas com $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de SIM e ATR, empregando HPLC com a coluna core-shell, onde: (a) amostra; (b) amostra 2. Condições cromatográficas: Coluna core-shell C_{18} (30 x 4.6 mm, tamanho de partícula 2,7 μm), fase móvel composta de (A) $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$ 2,5 mM pH 4,2 e ACN (B), com gradiente linear de (B) 10 à 90%, vazão de fase móvel $1,5 \text{ mL}^{-1}$; volume de amostra 20 μL ; monitoramento à 223 e 238 nm; tempo de corrida 16,3 min.

Observando os cromatogramas obtidos para a coluna monolítica e core-shell, é possível notar a presença dos picos de simazina e atrazina nas amostras de água fortificadas, comprovando a eficiência do procedimento de extração por ponto de nuvem. É possível notar também a presença de outros picos na análise cromatográfica do extrato da amostra de água, os quais correspondem aos coextrativos orgânicos da amostra, no entanto nenhum destes picos causou interferência na separação e quantificação dos compostos de interesse.

O emprego da coluna monolítica e da coluna core-shell no estudo de fortificação de SIM e ATR em amostras reais de água e posterior extração por ponto nuvem se mostrou eficiente. Os picos dos analitos de interesse, em ambas as colunas, apresentaram boa separação dos interferentes orgânicos presentes nas

amostras de água. A forte retenção do surfactante nas colunas inicialmente observada foi facilmente contornada elevando-se a proporção de ACN na fase móvel até 90%, promovendo assim a eluição do mesmo das fases estacionárias e possibilitando a realização do estudo.

As taxas de recuperação da extração por ponto de nuvem para a simazina e atrazina em amostras de águas reais foram semelhantes às recuperações obtidas em estudos similares descritos na literatura (Carabias-Martínez *et al*, 2003). Mostrou-se um método de fácil execução, que dispensa o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, gera um baixo volume de resíduos e, que além de promover a extração de simazina e atrazina, proporcionou a pré-concentração direta dos mesmos.

5 Conclusões

A Cromatografia por Injeção Sequencial empregando a coluna monolítica e a coluna core-shell mostrou-se eficiente para a separação e identificação de atrazina, desetilatrazina, desisopropilatrazina, hidroxiatrazina e simazina. Ambas as colunas provaram sua aplicabilidade em análises ambientais empregando amostras de solo, proporcionando picos cromatográficos das triazinas livres de interferências proporcionadas pela matéria orgânica, ácidos húmicos e fúlvicos e outros compostos orgânicos presentes no solo. A coluna core-shell apresentou uma melhor eficiência do que a coluna monolítica, porém o tempo de análise cromatográfica por amostra empregando a coluna core-shell com o SIC foi em torno de 2,5 vezes maior do que o tempo de análise quando empregada a coluna monolítica. Sendo assim, o emprego da coluna monolítica no sistema de Cromatografia por Injeção Sequencial é vantajoso em relação ao emprego da coluna core-shell.

O emprego da metodologia explorando o conceito de focalização na coluna, empregando a Cromatografia por Injeção Sequencial utilizando a coluna monolítica, mostrou-se aplicável para a determinação de simazina e atrazina. O uso de um grande volume de amostra não implicou em perda de resolução cromatográfica, proporcionando a separação de simazina e atrazina sem interferências. A eluição passo a passo empregando uma fase de baixa força de eluição promoveu com eficiência a concentração de simazina e atrazina na fase estacionária e a eluição, tanto quanto possível, de interferentes como ácido húmico e fúlvico em concentrações de até 1 mg L^{-1} , a utilização de uma segunda fase com maior força de

eluição promoveu a eluição da simazina e atrazina, proporcionando picos separados desses compostos.

O emprego da extração por banho de ultrassom para o estudo de fortificação de ATR, DEA, DIA, HAT e SIM em amostras de solo, proporcionou taxas de recuperação acima de 40%, mostrando ser um método extração aplicável para a extração de pesticidas de amostras de solo e que emprega quantidades reduzidas de solvente orgânico, quando comparado ao método oficial para a extração de pesticidas em solo, que é extração por sistema Soxhlet. O emprego da espectrometria de massas auxiliou na confirmação da presença de atrazina e hidroxiatrazina em uma das amostras de solo submetida à extração por banho de ultrassom.

O emprego de extração micelar em ponto nuvem mostrou-se aplicável para a extração de simazina e atrazina de amostras de água, proporcionando taxas aceitáveis de recuperação para esses compostos. Além de promover a extração de SIM e ATR, as micelas de surfactante possibilitaram a pré-concentração desses compostos, sendo essa etapa de fundamental importância para a determinação de pesticidas em amostras de água, uma vez que a concentração desses compostos em águas é extremamente baixa, tornando a pré-concentração uma etapa indispensável para o monitoramento de resíduos de pesticidas em águas. Outra grande vantagem da extração por ponto nuvem é o fato de ser um método que dispensa a utilização de solventes orgânicos durante a etapa de extração, contribuindo para a química verde, tão em evidência nos dias de hoje.

O emprego da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando a coluna monolítica e a coluna core-shell, proporcionou uma maior eficiência de coluna do

que as eficiências obtidas quando essas colunas foram utilizadas no sistema de Cromatografia por Injeção Sequencial. A coluna core-shell apresentou uma eficiência ainda maior pelo fato de que ao ser utilizada no HPLC foi possível o emprego de uma vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, enquanto que no SIC a vazão máxima possível de ser empregada com essa coluna foi de $0,48 \text{ mL min}^{-1}$, proporcionando maior rapidez nas análises.

6 Referências bibliográficas

ADAMS, M. M. **Estudo de diferentes métodos de extração por ultra-som de pesticidas em latossolo utilizando técnicas cromatográficas**. Dissertação de Mestrado em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2002.

ABATE, G. C.; PENTEADO, J. C.; CUZZI, J. D.; GODOFREDO, C. V.; LICHTING, J.; MASINI, J. C. Influence of Humic Acido on Adsorption and Desorption of Atrazine, Hydroxiatrazine, Deethylatrazine and Deisopropylatrazine onto a Clay-Rich Soil Sample. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6747-6754, 2004.

AMADORI, M. F.; CORDEIRO, G. A.; REBOUÇAS, C. C.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T.; ABATE, G. Extraction Method for the Determination of Atrazine, Deethylatrazine and Deisopropylatrazine in Agricultural Soil Using Factorial Desing. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 3, p. 483-491, 2013.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An introduction**. Jonh Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, Englad, 288 p., 2003.

BABIÉ, S.; PETROVIC, M.; KASTELAN-MACAN, M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 3-9, 1998.

BABIÉ, S.; PITROVIÉ, M.; KASTELAN-MACAN, M. Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 3-9, 1998.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som (I): Influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 4, n. 15, p. 302-316, 1992.

BATISTA, A. D.; ROCHA, F. R. P. On-column preconcentration in sequential injection chromatography: application to determination of parabens. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4371-4375, 2015.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Determonatio of organic acid in soil extracts by ion chromatography. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 349-356, 1995.

BECHTOLD, I. V. Cristias líquidos: Um sistema complexo de simples aplicação. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 27, n. 3, 333-342, 2005.

BOS, S. J.; VAN LEEUWEN, S. M.; KARST, U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 85-99, 2006.

CAI, Z.; RAMANUJAM, V. M. S.; GROSS, M. L.; MONSON, S. J.; CASSADA, D. A.; SPAÇDING, R. F. Liquid-solid extraction and fast atom bombardment high-resolution mass spectrometry for determination of hydroxyatrazine in water at low-ppt levels. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 4202-4209, 1994.

CARNEIRO, F F; PIGNATI, W; RIGOTTO, R M; AUGUSTO, L G S. RIZOLLO, A; MULLER, N M; ALEXANDRE, V P. FRIEDRICH, K; MELLO, M S C. **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Abrasco, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.

CHEM SERVICE. <http://www.chemservice.com/>. Acessado em Agosto de 2015.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, 623-636, 2008.

CHOCOLOUS, P.; SOLICH, P.; SATINKY, D. An overview of sequential injection chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 129-135, 2007.

CHOCOLOUS, P.; KOSAROVA, L.; SATINKY, D.; SKLENAROVA, H.; SOLICH, P. Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle columns and its comparison with narrow-bore monolithic column. **Talanta**, v. 85, p. 1129-1134, 2011.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº357/2005**. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acessado em Agosto de 2015.

COX, C. Chlorothalonyl. **Journal of Pesticide Reforms**, v. 17, p. 14-20, 1997.

DEAN, J. R.; WADE, G.; BARNABAS, I. J. Determination of triazina herbicides in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 295-335, 1996.

DELGADO-MORENO, L.; PEÑA, A.; MINGORANCE, M. D. Desing of experiments in environmental chemistry studies: Example of extraction of triazines from soil after cake amendment, **Journal of Hazordous Materials**, v. 162, p. 1121-1128, 2009.

DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas. Fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992, 431 p.

De OLIVEIRA, C. E. S. **Avaliação da composição isotópica do chumbo e da distribuição elementar nos sedimentos da represa Pedro Beicht, Cotia, São Paulo**. Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, SP. Dissertação de mestrado, 161 p., 2011.

Dos SANTOS, L. B. O.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of sequential injection chromatography (SIC) method for determination of simazine, atrazine and propazine. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 494-500, 2009.

EIJSACKERS, H. *Effects of glyphosate on the soil fauna*. In: GROSSBARD, E.; Atkinson, D. ed. **The herbicide glyphosate**. London, British Library, 1985. 490p.

ENGELHARDT, H.; GÖTZINGER, A. On the Reproducibility of *Chromolith*® RP Columns. **Chromatographia**, v. 60, p. s207-s211, 2004.

EUROPEAN COMMUNITY (EC). **Council Directive 98/83/EC of 3 november 1998 on the quality of water intended for human consumption**, Official Journal L 330, 05/12/1998, p. 0032-0054. Community legislation in force document 398L0083, 1998. www.zic.lv/hygiene/coundir98-83.pdf. Acessado em Agosto de 2015.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.

FLURY, M. J. Experimental evidence of transport of pesticides through field soils a review. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.25, p. 25-45, 1996.

GLOTFELTY, D. E.; SCHOMBURG, C. J. Volatilization of pesticides. In: Sawhney, B. L.; Brown, B. L. **Reactions and movement of organic chemical in soils**. Madison, Soil Science Society of America, p. 181-207, 1989.

GOELLNER, C. **Ecotoxicologia e toxicologia do herbicida paraquat**. Zêneca, São Paulo, SP, 104 p., 1995.

GONG, A. J.; YE, C-M.; LEI, Z-F.; LIU, J-A. Pre-column derivatization reaction coupled with ultrasonic wave extraction for the trace analysis of atrazine and simazine in soil and crops by liquid chromatography, ultraviolet detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 16, p. 2535-2545, 1999.

GOUDA, A. A.; AMIN, A, S. Cloud-point extraction, preconcentration and spectrophotometric determination of trace quantities of copper in food, water and biological samples. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 120, p. 88-96, 2014.

GRANBY, K.; ANDERSEN, J. H.; CHRISTENSEN, H. B. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 165-176, 2003.

GROSKREUTZ, S. R.; WEBER, S. G. Quantitative evaluation of models for solvent-based, on-column focusing in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1409, p. 116-124, 2015.

HALO Product Bulletin. Fused-Core® particle technology for hyper-fast and super-rugged HPLC columns. http://www.mz-at.de/resources/brochures/halo_hilic_etc.pdf . Acessado em agosto de 2015.

HAQUE, R.; FREED, V. H. Environmental dynamics of pesticides, **Plenum**, New York, p. 1-3, 1975.

HAYES, J. D.; MALIK, A. Sol-Gel Monolithic Columns with Reversed Electroosmotic Flow for Capillary Electrocromatography. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 17; p. 4090-4099, 2000.

HAYES, R.; AHMED, A.; EDGE, T.; ZHANG, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 36-52, 2014.

HEYDARI, R.; HOSSEINI, M.; ZARABI, S. A simple method for determination of carmine in food samples based on cloud point extraction and spectrophotometric detection. **Spectrochimica Acta Parte A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 786-791, 2015.

HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. A critical review of surfactant-mediated phase separation (cloud-points extractions): theory and applications. **Critical Reviews in Analytical chemistry**, v. 2, n. 24, p. 133-137, 1993.

HOEGGER, D.; FREITAG, R. Acrylamid-based monolithic as robust stationary phases for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 914, p. 211-222, 2001.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A. CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, 6. ed., 1055 p., 2009.

IKEGAMI, T.; TANAKA, N. Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 527-533, 2004.

INFANTE, C. M. C.; URIO, R. de P.; MASINI, J. C. Improving the detectability of Sequential Injection Chromatography (SIC): Determination of Triazines by exploiting liquid core waveguide (LCW) detection. **Analytical Letters**, v. 44, p. 503-513, 2011.

INOUE, M. H. *et al.* Critérios para a avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 313-323, 2003.

JESSEN, F.; WULFF, T. Triton X-114 cloud point extraction to subfractionate blood plasma proteins for two-dimensional gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 485, p. 11-17, 2015.

JIANG, T.; JISKRA, J.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A. Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 923, p. 215-227, 2001.

JIANG, X.; WEN, S.; XIANG, G. Cloud point extraction combined with electrothermal atomic adsorption spectrometry for the speciation of antimony (III) and antimony (V) in food packing materials. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 146-150, 2010.

KHAN, S.; KAZI, T. G.; BAIG, J. A.; KOLACHI, N. F.; AFRIDI, H. I.; WADHWA, S. K.; SHAH, A.Q.; KANDHRO, G. A.; SHAH, F. Cloud point extraction of vanadium in pharmaceutical formulations, dialysate and parental solutions using 8-hydroxyquinoline and nonionic surfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 371-376, 2010.

KIRKLAND, J. J.; LANGLOIS, T. J.; DESTEFANO, J. J. **New Fused-Core™ Particles for Very Fast HPLC Separations**. Advanced Materials Technology, p. 1-6, 2008.

KITSON, F. G.; LARSEN B. S.; MCEWEN, C. N. **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide**. Academic Press, London, 611 p., 1996.

KONDA, L. N.; PÁSZTOR, Z. Environmental Distribution of Acetochlor, Atrazine, Chlorpyrifos and Propisochlor under Field Conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3859-3863, 2001.

KOSKINEN, W. C.; HARPER, S. S. The retention process: mechanisms. In: CHENG, H. H. (Ed.) **Pesticides in the soil environment: process, impacts and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, v. 2, p. 51-57, 1990.

KUBIN, M.; SPACEK, P.; CHROMLCEK, R. Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate). **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 32, p. 3881-3887, 1967.

LÄMMERHOFER, M.; SVEC, F.; FRÉCHET, J. M. J.; LINDNER, W. Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 925, p. 265-277, 2001.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Editora Átomo, 382 p., 2009.

LANGENBACH, T.; SCHROLL, R.; PAIM, S. Fate and distribution of ¹⁴C-atrazine in tropical soils. **Chemosphere**, v. 40, p. 449-455, 2000.

LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no meio ambiente. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO. Campinas, 1996. **Anais**. Jaguariuna: EMBRAPA, CNPMA, 1996. p.81-115.

LeBARON, H. M.; McFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture**, ed. Elsevier, 2008, 601 p.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Editora Átomo, 354 p., 2008.

LEONARD, R. A. Movement of pesticides into surface water. In: CHENG, H. H. **Pesticides in the soil environment: Process, impacts and modeling**. 2^a ed., Madison, Soil Science Society of America, 1990, p. 303-349.

LERCH, R. N.; BLANCHARD, P. E.; THURMAN, E.M. Contribution of hydroxylated atrazine degradation products to the total atrazine load in Midwestern streams. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 40-48, 1998.

LERCH, R. N.; THURMAN, E. M.; BLANCHARD, P. E. Hydroxyatrazine in soil and sediments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 10, p. 2161-2168, 1999.

LESUEUR, C.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil sample with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, p. 284-293, 2008.

LI, S.; WANG, M.; ZHONG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, B. Cloud point extraction for trace inorganic arsenic speciation analysis in water samples by hybriide generation atomic fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 111, 74-79, 2015.

LIU, T.; CAO, P.; GENG, J.; LI, J.; WANG, M.; WANG, M.; LI, X.; YIN, D. Determination of triazina herbicides in milk by cloud pont extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 142, p. 358-364, 2014.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 1559-1568, 2010.

MARCHESE, Luciana. **Sorção/dessorção e lixiviação do herbicida ametrina em solos canavieiros tratados com lodo de esgoto**. Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo, 2007.

MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; ÁLVAREZ, J. D.; PINTO, C. G.; MÉNDEZ, J. H. Prediction of behaviour of organic pollutants using cloud point extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1005, p. 23-34, 2003.

MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, R. G.; CORDERO, B. M.; PAVÓN, J. L. P.; PINTO, C.G.; LAESPADA, E. F. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 251-265, 2000.

MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D. G.; VAZ, C. M. P.; CRESTANA, S.; Sposito, G. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. **Journal of Environmental Quality**, v.30, n. 2, p. 520-525, 2001.

MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando Quechers modificado e LC-MS/MS**. Dissertação de Mestrado, UFSM, Santa Maria, RS, 2010.

MATALLO, M. B. **Estúdio comparado de la degradación y transporte de enantiómero de plaguicidas em el medio ambiente**. Córdoba: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Departamento de Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba, 1997

McCALLEY, D. V. Comparison of conventional microparticulate and monolithic reversed-phase column for high-efficiency fast liquid chromatography of basic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 965, p. 51-64, 2002.

MEAKINS, N. C.; BUBB, J. M.; LESTER, J. N. The Mobility, Partitioning and Degradation of Atrazine and Simazine In the Salt Marsh Environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 12, p. 812-819, 1995.

MERINO, F.; RUBIO, S.; BENDITO, D. P. Acid-included cloud point extraction and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples. **Journal of Chromatography A**, v. 962, p. 1-8, 2002.

MERSIE, W.; SEYBOLD, C.; TSEGAYE, T. Movement, adsorption and mineralization of atrazine in two soils with and without switchgrass (*Panicum virgatum*) roots. **European Journal of Soils Science**, v. 50, p. 343-349, 1999.

MILLS, M. J.; MALTAS, J.; LOUGH, W. J. assessment of injection volume limits when using on-column focusing with microbore liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 1-11, 1997.

MINAKUCHI, H.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; ISHIZUKA, N.; TANAKA, N. Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 3498-3501, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004.** www.saneago.com.br/novasan/leis/port518.pdf. Acessado em agosto de 2015.

MONTEIRO, J. H. **Agrochemicals, desk reference.** 2ed. Boca Raton, New York: Lewis Publishers, 1997. 656 p.

MONTGOMERY, J. H. **Agrochemicals, desk reference.** 2. Ed. Boca Raton, New York, Lewis Publishers, 1997, 656 p.

MOREAU, C.; MOUVET, C. Sorption and desorption of atrazine, deethylatrazine and hydroxyatrazine by soil and aquifer solids. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, p. 416-424, 1997.

MOTOHASHI, N.; NAGASHIMA, H.; PÁRKÁNYC, C.; SUBRAHAMNYAM, B.; ZHANG, G. Official multiresidue methods of pesticides analysis in vegetables, fruits and soil. **Journal of Chromatograph A**, v. 754, p. 333-346, 1996.

MUKHERJEE, I.; GOPAL, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 33-42, 1996.

MUKHERJEE, P; PADHAN, S. K.; DASH, S.; PATEL, S.; MISHIRA, B.K. Clouding behavior in surfactant systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, p. 59-79, 2011.

NETO, A. J. S. Como obter maior eficiência em partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 65-87, 2011.

NÜÑES, O.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 683-703, 2005.

OBERACHER, H.; PREMSTALLER, A.; HUBER, C. G. characterization pf some physical and chromatographic properties of monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1030, p. 201-208, 2004.

PEREIRA, W. E.; ROSTAD, C. E. Occurrence, distributions and transport of herbicides and their degradation products in the lower Mississippi River and its tributaries. **Environmental Science and Technology**, v. 24, p. 1400-1406, 1990.

PERES, B. T. **Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo na dissipação do ¹⁴C-paration metílico.** Dissertação de Mestrado. IPEN, São Paulo, SP, 2000.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 12, n. 3, p. 268-277, 1996.

PRATA, Fábio. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível da atrazina.** Piracicaba, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

QUINA, F. H.; HINZE, W. L. Surfactant Mediated Cloud Point Extractions: An Environmental Benign Alternative Separation Apporoach. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 4150-4168, 1999.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo da região de Bauru, SP. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 739-743, 2004.

ROBB, D. B; COVEY, T. R.; BRUINS, A. P. Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 15, p. 3653-3659, 2000.

ROBERTS, T.R.; HUTSON, D. H.; LEE, P. W.; NICHOLLS, P. H.; PLIMMER, J. R. **Metabolic pathways of agrochemical. Part 1: Herbicides and plant growth regulators**. London: The Royal Society of Chemistry, 1998. p.386-400.

ROCHA, R. P. F.; NÓBREGA, A. J. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 634-640, 1996.

ROSS, W. D.; JEFFERSON, R. T. In Situ – Formed Open-Pore Polyurethane as Chromatography Supports. **Journal of Chromatographic Science**, v. 8, n. 7, p. 386-389, 1970.

SAMADDAR, P.; SEN, K. Cloud point extraction: A sustainable method of elemental preconcentration and speciation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, p. 1200-1219, 2014.

SANTOS, C. A. **Efeito fotoelétrico**. <http://www.if.ufrgs.br/efeitofotoeletricoindex.html>. Acessado em Agosto de 2015.

SATÍNKÝ, D.; SOLICH, P.; CHOCHOLOUS, P.; KARLICEK, R. Monolithic columns – a new concept of separation in the sequential injection technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 205-214, 2003.

SATO, N.; MORI, M.; ITABASHI, H. Cloud point extraction of Cu(II) using a mixture of triton X-100 and dithizone with a salting-out effect and its application to visual determination. **Talanta**, v. 117, p. 376-381, 2013.

SCHUZ, R. Comparison of spray drift and runoff related input of azinphos-methyl and endosulfan from fruit orchards into the Lourens river, South Afric. **Chemosphere**, v. 45, p. 543-551, 2001.

SHU, X.; CHEN, L.; YANG, B.; GUAN, Y. Preparation and characterization of long methacrylate monolithic column for capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, p. 205-209, 2004.

SIEVERS, R. E.; HILEMAN, F. D.; HESS, G. G.; ROSS, W. D. *In Situ* Preparation and Evaluation of Open Pore Polyurethane Chromatographic Columns. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 7, 1973.

SIGMA-ALDRICH – SUPLECO® ANALYTICAL. **Fast Ascentis Express HPLC Columns**, Supplementary Material, 6 p., 2012.

SIGMA-ALDRICH BRASIL. <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acessado em Agosto de 2015.

SILVA, A. A.; SILVA, J. F. **Herbicidas: Comportamento no solo**. Tópicos em manejo de plantas daninhas, Viçosa, Ed. UFV, cap. 5, p. 189-248, 2007.

SILVA, A. A.; VIVIAN, R.; ANTONINO, L. **Dinâmica de herbicidas no solo**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 14 p., 2007.

SMERAGLIA, J.; BALDREY, S. F.; WATSON, D. Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. **Chromatographia**, v. 55, p. 595-599, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GIAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. John Wiley & Sons, New York, 2. Ed., 1997, 800 p..

STASS, H.; DALHOFF, A. Determination of BAY 12-8039, a new 8-metroxyquinolone, in human body fluids by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using on-column focusing. **Journal of Chromatography B**, v. 702, p. 163-174, 1997.

STEINHEIMER, R. T. High Performance Liquid Chromatography Determination of Atrazine and Principal Degradates in Agricultural Soils and Associated Surface and Ground Water. **Journal Agricultural and Food chemistry**, v. 41, p. 588-595, 1993.

STIPICEVIC, S.; FINGLER, S.; ZUPANCIC-KRALJ, L.; DREVENKAR, V. Comparison of gas and high performance liquid chromatography with selective detection for determination of triazina herbicides and their degradation products extracted ultrasonically from soil. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 1237-1246, 2003.

SVEC, F. Porous Monoliths: The Newest Generation of Stationary Phases for HPLC and Related Methods. **Recent Developments in LC Columns Technology**, v. 16, p. 1-6, 2003.

SVEC, F.; FRECHET, J. M. J. Continuous Rods of Macroporus Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 820-822, 1992.

TANAKA, N.; KOBAYASHI, H. Monolithic columns for liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 298-301, 2003.

TANG, A. N.; JIANG, D. Q.; YAN, X. P. Cloud point extraction preconcentration for capillary electrophoresis of metal ions. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 199-204, 2004.

TANG, T.; QIAN, K.; SHI, T.; WANG, F.; LI, J.; CAO, Y. Determination of triazole fungicides in environmental water samples by high performance liquid chromatography with cloud point extraction using polyethylene glycol 600 monoolate. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 26-31, 2010.]

TAYLOR, A. W.; SPENCER, W. F. Volatilization and vapor transport process. In: CHENG, H. H. ed. **Pesticides in the soil environment: Process, impacts and modeling**. 2. Ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990, p. 213-270.

THE PUBCHEM PROJECT. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acessado em Agosto de 2015.

THURMAN, E. M.; GOOLSBY, D. A.; MEYER, M. T.; KOLPIN, D. W. Herbicides in surface waters of Midwestern United States: the effect of spring flush. **Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 1794-1796, 1991.

THURMAN, E. M.; MEYER, M. T.; MILLS, M. S.; ZIMMERNAN, L. R.; PERRY, C. A. Formation and transport of deethylatrazine and desisopropilatrazina in surface water. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 2267-2277, 1994.

TRIPLETT, G. B.; CONNER, B. J.; EDWARDS, W. M. Transport of atrazine and simazine in runoff from conventional and no-tillage corn. **Journal of Environmental Quality**, v. 7, p. 77-84, 1978.

United States Environmental Protection Agency (US-EPA). **2011 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisores**. Office of Water U. S. Environmental Protection Agency. Washington, DC, Janeiro de 2011.

URIO, R. de P.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Online Sequential Injection Chromatography with Stepwise Gradient Elution: A Tool for Studying the Simultaneous Adsorption of Herbicides on Soil and Soil Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7909-7915, 2013.

VALE, M. G. R. **Extração de hidrocarbonetos em carvão mineral usando SFE, ultra-som e Soxhlet**. Tese de Doutorado em Engenharia de Minas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1997.

VARGAS, L.; PEIXOTO, M. C.; ROMAN, S. E. **Manejo de plantas daninhas na cultura de milho**. Embrapa Trigo: Documentos on-line, n. 61, 2006, 67 p.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227-236, 2001.

VERMEULEN, N. M. J.; APOSTOLIDES, Z.; POTGIETER, D. J. J.; NEL, P. C.; SMIT, S. H. Separation of atrazine and some of its degradation products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 240, p. 247-253, 1982.

VILLAVERDE, J.; HILDENBRANDT, A.; MARTÍNEZ, E.; LACORTE, S.; MORILLO, E.; MAQUEDA, C.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. **Science of the Total Environment**, v. 390, p. 507-533, 2008.

WANG, L. L.; WANG, J. Q.; ZHENG, Z. X.; XIAO, P. Cloud point extraction combined with high performance liquid chromatography for speciation of chromium (III) and chromium (VI) in environmental sediments samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 114-118, 2010.

WANG, Y.; YOU, J.; REN, R.; XIAO, Y.; GAO, S.; ZHANG, H.; YU, A. Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4241-4246, 2010.

WATANABE, H.; TANAKA, H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. **Talanta**, v. 25, p. 585-589, 1978.

WOLFE, N. L.; MINGELGRIN, U.; MILLER, G. C. Abiotic transformations in water, sediments, and soil. In: CHENG, H.H. ed. Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling. 2.ed. Madison, **Soil Science Society of América**, p.103-168, 1990.

ZAIN, N. N. M.; BAKAR, N. K. A.; MOHAMAD, S.; SALEH, N. Md. Optimization of a greener method for removal phenol species by cloud point extraction and spectrophotometry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 1121-1128, 2014.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, A. F.; MARTINS, A. F. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of chromatography A**, v. 904, p. 257-262, 2000.

ZHONG, S.; TAN, S. N.; GE, L. WANG, W.; CHEN, J. Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction, **Talanta**, v. 85, p. 488-492, 2011.

ZHOU, J.; CHEN, J.; CHENG, Y.; LI, D.; HU, F. LI, H. Determination of Prometryne in water and soil by HPLC-UV using cloud point extraction. **Talanta**, v. 29, 189-193, 2009.

ZHOU, J.; SUN, J. B.; XU, X. Y.; CHENG, Z. H.; ZENG, P.; WANG, F. Q.; ZHANG, Q. Application of mixed cloud point extraction for the analysis of six flavonoids in *apocyum venetum* leaf sample by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 273-279, 2015.

ZOU, H.; HUANG, X.; YE, M.; LUO, Q. Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 954, p. 5-32, 2002.

7 Anexos

Súmula Curricular

Dados pessoais

Nome: Ricardo De Prá Urio

Filiação: Jaime Urio e Zenilde Terezinha De Prá Urio

Nascimento: 05/03/1982 - Getúlio Vargas/RS - Brasil

Carteira de Identidade: 4060458579 SJS - RS - 13/02/1996

CPF: 004.060.720-86

Endereço residencial: Rua Válsom Lopes, 70/13-1
Butantã - São Paulo
05360-020, SP - Brasil
Telefone: 11 972203332

E-mail para contato: ricardourio@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

- 2009 - 2011** Mestrado em Química (Química Analítica).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Desenvolvimento, validação e aplicações de metodologia para a determinação de herbicidas triazínicos e seus metabólitos utilizando cromatografia por injeção seqüencial., Ano de obtenção: 2011
Orientador: Jorge César Masini
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2002 - 2008** Graduação em Bacharelado Em Química.
Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, Brasil
Título: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS EM SOLOS UTILIZANDO EXTRAÇÃO SOXHLET E BANHO DE ULTRA-SOM POR HPLC/UV
Orientador: Clóvia Marozzin Mistura
Bolsista PIBIC UPF

Atuação profissional

Laboratório de Análises Toxicológicas e Monitoramento Ambiental - TOXIMED LTDA

01/2003 – 12/2003: Estágio em Laboratório.

Funções: Análises químicas e biológicas em fluídos corporais e material ambiental.

Carga horária: 40 h semanais

Petronar Comércio de Derivados do Petróleo - PETRONAR

01/2004 – 12/2004: Estágio no Laboratório de Controle de Qualidade.

Funções Controle de qualidade de derivados do petróleo.

Carga horária: 40 h semanais.

Ativo Medicamentos E Manipulação Ltda - NATUPHARMA

2005 – 2008: Estágio no Laboratório de Controle de Qualidade.

Funções: Recebimento, conferência, análise e liberação ou reprovação de matérias-primas farmacêuticas.

Carga horária: 20 h semanais

Participação em Eventos

- **17º Encontro Nacional de Química Analítica**
Período: 06 a 09 de Outubro de 2013
Local: Belo Horizonte – Minas Gerais
Trabalho apresentado: URIO, R. De P.; MASINI, J.C. Desenvolvimento de método para a determinação de triazinas em solos por extração ultra-sônica e cromatografia por injeção sequencial.
- **38º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**
Período: 25 a 28 de maio de 2015
Local: Águas de Lindóia – São Paulo
Trabalho apresentado: URIO, R. De P.; MATETEIS, G. M; MASINI, J. C. Extraction and preconcentration of simazine and atrazine using cloud point extraction.
- **Flow Analysis XIII**
Período: 05 a 10 de julho de 2015
Local: Praga – República Tcheca
Trabalhos apresentados: URIO, R. De P.; MATETEIS, G. M; MASINI, J. C. On-column focusing in sequential injection chromatography (SIC) for analyte enrichment, matrix Exchange and separation of simazine and atrazine.
URIO, R. De P.; MASINI, J. C. High performance and sequential injection liquid chromatography for separation triazines herbicides in waters after cloud point extraction.

Artigos publicados

- INFANTE, C. M. C; URIO, R. De P.; MASINI, J. C. Improving the delectability of sequential injection chromatography (SIC): Determination of triazines by exploiting liquid core waveguide (LCW) detection. **Analytical Letters**, v. 44, p. 503-513, 2011.
- URIO, R. De P.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Online sequential-injection chromatography with setpwise gradient elution: A tool for studying the simultaneous adsorption of herbicides on soil and soil components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7909-7915, 2013.
- URIO, R. De P.; MASINI, J. C. Evaluation of sequential injection chromatography for reversed phase separation of triazine herbicides exploiting monolithic and core-shell columns. **Talanta**, v. 131, p. 528-534, 2015.
- URIO, R. De P.; MASINI, J. C. Evaluation of monolithic and core-shell columns for separation of triazines herbicides by reversed phase high

performance liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2331-2338, 2015.

- da SILVA, L. C. C; INFANTE, C. M. C; URIO, De P.; COSENTINO, I. C.; FANTINI, M. C. D.; MATOS, J. D.; do NASCIMENTO, F. H; MASINI, J. C. Adsorption/Desorption of Hg(II) on FDU-1 Silica and FDU-1 Silica Modified with Humic Acid. **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 7, p. 984-992, 2015.