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

RICARDO DE PRÁ URIO

CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO POR INJEÇÃO SEQUENCIAL PARA A DETERMINAÇÃO DE HERBICIDAS TRIAZÍNICOS E METABÓLITOS DA ATRAZINA EXPLORANDO O USO DE CELA DE LONGO CAMINHO ÓPTICO E MONITORAMENTO *ON-LINE* EM ESTUDOS DE ADSORÇÃO

São Paulo

05/04/2011

RICARDO DE PRÁ URIO

Cromatografia a líquido por injeção sequencial para a determinação de herbicidas triazínicos e metabólitos da atrazina explorando o uso de cela de longo caminho óptico e monitoramento *on-line* em estudos de adsorção

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

2011

Dedicatória

Dedico essa Dissertação 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 Mestrado.

Ao colega e amigo Doutor Carlos Infante, pelo auxilio no planejamento e condução dos experimentos, sempre disposto a discussões para o desenvolvimento dos trabalhos.

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: Luís, Sandro, Ana Cláudia, Ausberta, Marilda, Fernando, Kamila, Maurício e Carlos Eduardo.

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

À 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. **Cromatografia a Líquido por Injeção Sequencial para a determinação de herbicidas triazínicos e metabólitos da atrazina explorando o uso de cela de longo caminho óptico e monitoramento *on-line* em estudos de adsorção**. 2011. 100 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Química Analítica, Universidade De São Paulo, São Paulo.

Estudou-se o emprego da Cromatografia a Líquido por Injeção Seqüencial (SIC) explorando o uso de uma cela de longo caminho óptico com guia de onda (LCW) de 100 cm para a melhora dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) na determinação de atrazina (ATR), propazina (PRO) e simazina (SIM). Para isto, utilizou-se uma fase móvel com composição de 44:56 (v v^{-1}) metanol : tampão acetato de amônio 1,25 mM, pH 4,7, coluna monolítica e a detecção espectrofotométrica em 238 nm. Obtiveram-se valores de LOD e LOQ, respectivamente, de 1,76 e 5,86 µg L^{-1} para ATR, 4,51 e 15 µg L^{-1} para PRO e 2,25 e 7,5 µg L^{-1} para SIM. Com o emprego da cela de longo caminho óptico os valores de LOD ficaram abaixo dos recomendados pela US-EPA, que permite para águas potáveis uma concentração de 3 µg L^{-1} para ATR, 4 µg L^{-1} para SIM e 10 µg L^{-1} para PRO.

Realizaram-se estudos de adsorção de SIM, PRO e ATR e seus metabólitos desisopropilatrazina (DIA), desetilatrazina (DEA) e 2-hidroxiatrazina (HAT) em solo, ácido húmico e solo modificado com ácido húmico. Para isso foi utilizado um sistema de monitoramento *on-line* composto por um filtro tangencial e uma bomba peristáltica para circulação da suspensão. Foram realizados estudos cinéticos em duas etapas e, em ambas, foi utilizado um mix dos compostos com concentração inicial de 1,0 mg L^{-1} e gradiente de eluição passo a passo para a separação dos compostos utilizando três fases móveis com composições de 15 ou 28, 40 e 50% (v v^{-1}) metanol : tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7. Na primeira etapa o tempo de contato entre triazinas e adsorventes foi de 90 min. Na segunda etapa foi utilizado apenas o solo como adsorvente e o tempo de contato foi de 24 h. Para a primeira etapa do estudo só foi possível aplicar modelo cinético de pseudo-segunda ordem, o qual permitiu estimar os valores de massa adsorvida de triazina por massa de adsorvente, sendo que o ácido húmico é o material com maior capacidade adsortiva (1470 ± 43µg g^{-1} para DIA a 2380 ± 51 µg g^{-1} para PRO). O composto mais adsorvido em solo é PRO (26,5 ± 0,1 µg g^{-1}). A presença de ácido húmico no solo aumentou a adsorção de ATR (de 19,4 ± 0,7 para 23 ± 2 µg g^{-1}), de HAT (10,9 ± 0,7 para 18 ± 2 µg g^{-1}) e de PRO (26,5 ± 0,7 para 29,8 ±0,2 µg g^{-1}), mas diminuiu a adsorção de SIM e não afetou DIA e DEA. No estudo com tempo de contato de 24 h foi possível aplicar modelos de pseudo-primeira e segunda ordem. Os resultados obtidos confirmaram a maior adsorção de PRO, seguidos da ATR. HAT, SIM, DEA e DIA apresentaram as menores taxas de adsorção em solo, sendo que os dois últimos apresentaram uma tendência de dessorção após 4 h de contato, tendo maior potencial de lixiviação para corpos d'água próximos aos locais de aplicação.

Palavras-chave: Cromatografia por Injeção seqüencial, cela de longo caminho óptico, coluna monolítica, adsorção, triazinas, solos, ácido húmico.

ABSTRACT

Urio, R. De P. **Sequential Injection Liquid Chromatography for the determination of triazine herbicides and metabolites of atrazine exploring the use of long optical pathlength flow cell and *on line* monitoring of adsorption studies.** 2011. 100 p. Dissertation. Post-graduate Program in Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

This work describes the use of Sequential Injection Liquid Chromatography (SIC) coupled to a long path length optical flow cell with 100 cm long Liquid Core Waveguide (LCW) to improve the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for determination of atrazine (ATR), propazine (PRO) and simazine (SIM). Separation was achieved with a mobile phase composition of 44:56 (v v^{-1}) methanol:1.25 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7, monolithic column and spectrophotometric detection at 238 nm. The values of LOD and LOQ were, respectively, 1.76 and 5.86 µg L^{-1} for ATR, 4.51 and 15 µg L^{-1} for PRO and 2.25 and 7.5 µg L^{-1} for SIM. The LOD values achieved with the employment of long optical path cell were lower than those recommended by US-EPA, which allows for drinking water, maximum concentration levels of 3 µg L^{-1} for ATR, 4 µg L^{-1} for SIM and 10 µg L^{-1} for PRO.

Adsorption of SIM, PRO and ATR, as well as their metabolites desisopropylatrazine (DIA), desethylatrazine (DEA) and 2-hidroxyatrazine (HAT) on soil, humic acid and soil modified with humic acidic was studied. An on-line monitoring system was assembled, composed of a tangential filter and a peristaltic pump for circulation of the suspension. Kinetic studies were carried out in two steps, and in both, it was used a mix of compounds with initial concentration of 1,0 mg L^{-1} and a stepwise gradient elution for separation of the compounds using three mobile phases with compositions of 15 or 28, 40 and 50% (v v^{-1}) methanol: 1.25 mM ammonium acetate buffer, pH 4.7. In the first step the contact time between triazines and adsorbents was 90 minutes. In a second study made only with soil, the contact time was 24 h. Data obtained in the first stage of the study was only fitted to pseudo-second order kinetic equation, which allowed one to estimate the values of the adsorbed mass of triazine per mass of adsorbent. Humic acid was the material with higher adsorptive capacity (from 1470 ± 43 µg g^{-1} for DIA to 2380 ± 50 µg g^{-1} for PRO). In soil, PRO exhibited the highest adsorption (26.5 ± 0.1 µg g^{-1}). The presence of humic acid in the soil increased adsorption of ATR (19.4±0.7 to 23±2 µg g^{-1}), HAT (10.9 ± 0.7 to 18 ± 2 µg g^{-1}) and PRO (26.5 ± 0.7 to 29.8 ± 0.2 µg g^{-1}), but decreased adsorption of SIM, not affecting DIA and DEA. In the study with contact time of 24 h, it was possible apply pseudo-first and pseudo-second order equations for SIM, ATR and PRO. The results confirmed the greatest adsorption of PRO, followed by ATR. HAT, SIM, DEA and DIA had low rates of adsorption on soil, the latter two showed a trend of desorption after 4 h of contact, having the greatest potential for leaching to water bodies near to the places of application.

Keywords: Sequential Injection chromatography, optical long path cell, monolithic column, adsorption, triazines, soils, humic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Representação da fórmula estrutural das triazinas em estudo..... 16

Figura 02 - Ligação de hidrogênio entre substâncias húmicas do solo e um herbicida triazinico..... 25

Figura 03 - Mecanismo de troca de ligante na adsorção de *s*-triazinas em substâncias húmicas via ponte catiônica..... 26

Figura 04 - Ligação iônica entre substância húmica e triazina..... 27

Figura 05 – Reação de formação da 2-hidroxiatrazina..... 28

Figura 06 - Reação de formação da Desetilatrazina e da Desisopropilatrazina..... 29

Figura 07 - Micrografias de fases monolíticas baseadas (a) em poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etileno) e (b) em sílica..... 36

Figura 08 - Sistema SIChrom^{TM} de cromatografia a líquido para a separação e determinação de triazinas..... 46

Figura 09 - Representação da cela de longo caminho óptico..... 47

Figura 10 - Sistema SIChrom^{TM} de cromatografia a liquido por injeção sequencial 50

Figura 11 - Representação da fórmula estrutural dos herbicidas e metabólitos em estudo..... 51

Figura 12 - Sistema utilizado para o estudo cinético..... 53

Figura 13 - Visão geral do sistema utilizado para os estudos estudos cinéticos..... 53

Figura 14 - Sistema de filtração tangencial..... 56

Figura 15 - Detalhe do filtro tangencial..... 57

Figura 16 - Estudo da composição da fase móvel na separação da simazina, atrazina e propazina para uma concentração de 50 $\mu g\ L^{-1}$..... 62

Figura 17 - Comparação do sinal analítico para cela de 100 cm e para cela de 4 cm..... 63

Figura 18 - Sobreposição de cromatogramas obtidos no SIC..... 69

Figura 19 - Cromatograma de um branco para água deionizada..... 71

Figura 20 - Cromatograma para um padrão de 1 mg L^{-1} dos seis compostos em estudo..... 72

Figura 21 - Cromatogramas obtidos em um estudo de adsorção em solo..... 74

Figura 22 - Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO e SIM..... 76

Figura 23 - Cromatograma obtido para a análise da suspensão de ácido húmico 0,25 g L^{-1} em meio $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}..... 77

Figura 24 - Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em ácido húmico da primeira alíquota do estudo cinético..... 78

Figura 25 - Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em ácido húmico da última alíquota do estudo cinético..... 79

Figura 26 - Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO..... 79

Figura 27 - Cromatograma obtido para a análise da suspensão de solo na presença de ácido húmico em meio $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}..... 80

Figura 28 - Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em solo na presença de ácido húmico da primeira alíquota do estudo cinético..... 81

Figura 29 - Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em solo na presença de ácido húmico da última alíquota do estudo cinético..... 82

Figura 30 - Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO..... 82

Figura 31 - Gráficos de cinética de pseudo-segunda obtidos no experimentos de adsorção em (a) solo, (b) ácido húmico e (c) solo na presença de ácido húmico..... 84

Figura 32 - Cromatograma de um branco para água deionizada..... 87

Figura 33 - Cromatograma obtido para o mix dos compostos em estudo em uma concentração de 1 mg L^{-1}..... 88

Figura 34 - Alguns cromatogramas obtidos no estudo de adsorção on-line de triazinas em solo em meio de $CaCl_2$ 0.01 mol L^{-1} na concentração inicial de 1,0 mg L^{-1} dos compostos em estudo..... 91

Figura 35 - Gráfico demonstrando a massa adsorvida de DIA, DEA, ATR, PRO e SIM em µg por grama de solo a cada intervalo de tempo..... 92

Figura 36 - Gráfico para a cinética de adsorção de pseudo-primeira ordem, para os compostos em estudo em uma suspensão de solo..... 93

Figura 37 - Gráfico para a cinética de adsorção de pseudo-segunda ordem, para os compostos em estudo em uma suspensão de solo..... 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Características físico-químicas para as triazinas em estudo..... 17

Tabela 02 - Valores máximos permitidos em águas potáveis para a simazina, atrazina e propazina..... 18

Tabela 03 - Quantidades de água deionizada, solução de $CaCl_2$, solução de ácido húmico e massa de solo, utilizadas para a preparação de suspensões e sua concentração final..... 55

Tabela 04 - Parâmetros analíticos avaliados para curva analítica de referência para a atrazina, propazina e simazina com concentrações entre 5 e 700 µg L^{-1}..... 64

Tabela 05 -Valores de concentração obtidos em amostras de água de rio e de torneira enriquecidas com 50 µg L^{-1} das três triazinas em estudo 68

Tabela 06 - Parâmetros analíticos avaliados para a curva analítica de referência, para as triazinas e metabólitos da atrazina em estudo, com concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}..... 73

Tabela 07 - Parâmetros cinéticos de pseudo-segunda ordem calculados para adsorção dos compostos triazínicos em solo, ácido húmico e solo modificado com ácido húmico..... 85

Tabela 08 - Parâmetros analíticos avaliados para a curva analítica de referência, para as triazinas e metabólitos da atrazina em estudo, com concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}..... 89

Tabela 09 - Avaliação da recuperação para um mix dos compostos em estudo, na concentração de 1000 µg L^{-1}..... 90

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de adsorção para modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem..... 95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATR: Atrazina

B: coeficiente de inclinação da reta

CONAMA = Conselho Nacional do Meio Ambiente

DEA: Desetilatrazina

DIA: Desisopropilatrazina

DL_{50}: Dose aguda oral

GC: Cromatografia a gás, do inglês *Gas Chromatography*

GC-MS: Cromatografia à gás com espectrometria de massa, do inglês *Gas Chromatography with mass spectrometry*

GC-NPD: Cromatografia a gás acoplada a um detector de nitrogênio-fósforo, do inglês *Gas Chromatography coupled with nitrogen-phosphorus detector*

HAT: 2-hidroxiatrazina

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

K_a: Constante de ionização ácido

K_b: Constante de ionização base

K_H: Constante da lei de Henry

K_{ow}: Coeficiente de partição n-octanol-água

LOD: Limite de detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ: Limite de quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LWCC (LCW): Cela de longo caminho óptico com guia de onda, do inglês *Liquid Waveguide Capillary Cell ou Liquid Core Waveguide (LCW)*

MeOH: Metanol

MS = Ministério da Saúde

pK_a: Constante de equilíbrio de ionização ácido

PRO: Propazina

r: coeficiente de correlação linear

RSD: Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviations*

SD: Desvio padrão, do inglês *Standard Deviation*

SIA: Sistema de análise por injecção sequencial, do inglês *Sequential Injection Analysis*

SIC: Cromatografia por injeção sequencial, do inglês *Sequential Injection Chromatography*

SIM: Simazina

SPE: Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

S_w: solubilidade em água

t_R: tempo de retenção

USB: Porta universal, do inglês *Universal Serial Bus*

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

UV: Ultravioleta

V: Visível

Sumário

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Solo: principais características e composição 18

1.2 Propriedades físico-químicas dos pesticidas 19
1.2.1 Solubilidade em água (Sw) 19
1.2.2 Pressão de vapor (P) 20
1.2.3 Coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow}) 20
1.2.4 Constante de ionização ácido/base 21
1.2.5 Constante da lei de Henry (K_H) 21

1.3 Retenção de pesticidas no solo 22
1.3.1 Mecanismos de interação 23
1.3.1.1 Adsorção química 24
1.3.1.1.1 Ligação de hidrogênio 24
1.3.1.1.2 Ligação Covalente 25
1.3.1.1.3 Troca de ligante 26
1.3.1.1.4 Ligação iônica 26
1.3.1.2 Adsorção física 27

1.4 Transformações de pesticidas no solo 27
1.4.1 Transformação química 28
1.4.2 Fotodegradação 28
1.4.3 Biodegradação 29

1.5 Transporte de pesticidas no solo 30
1.5.1 Lixiviação 31
1.5.2 Escoamento superficial 31
1.5.3 Volatilização 32

1.6 Toxicidade da atrazina e da simazina 33

1.7 Separação, identificação e quantificação de pesticidas 33
1.7.1 Cromatografia por injeção seqüencial 34
1.7.2 Fases estacionárias monolíticas 35
1.7.3 Detecção espectrofotométrica 37
1.7.4 Cela de longo caminho óptico com guia de onda 38
1.7.5 Aumento do volume de amostra 38

2 OBJETIVOS 40

2.1 Objetivos gerais 40

3 PARTE EXPERIMENTAL 41

3.1 Materiais 41

3.2 Métodos **45**
3.2.1 Determinação de triazinas por Cromatografia por Injeção Sequencial empregando cela de longo caminho óptico. 45
3.2.1.1 Procedimento para a cromatografia por injeção seqüencial 45
3.2.1.2 Análise por HPLC 48
3.2.1.3 Amostras 48
3.2.2 Cinética de adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico empregando monitoramento on-line por Cromatografia por Injeção Sequencial 49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO **60**

4.1 Determinação de triazinas por Cromatografia por Injeção Sequencial empregando cela de longo caminho óptico **60**

4.1.1 Utilização da cela de longo caminho óptico com guia de onda **60**
4.1.2 Amostras 66

4.2. Adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo empregando monitoramento on-line por Cromatografia por Injeção Sequencial **70**
4.2.1 Estudo com as suspensões de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico 70
4.2.1.1 Curva analítica de referência 73
4.2.1.2 Ensaios de adsorção com as suspensões de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico 74
4.2.2 Estudo cinético de 24 h em uma suspensão de solo 86
4.2.2.1 Curva analítica de referência 88
4.2.2.2 Avaliação do extrato de solo e da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1} 89
4.2.2.3 Estudo de adsorção com 24 h de contato com a suspensão de solo 90

5 CONCLUSÃO **97**

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **98**

1 Introdução

O uso cada vez mais frequente de pesticidas na agricultura resulta, muitas vezes, na presença de seus resíduos e de seus metabólitos no ambiente. Assim a determinação da presença e dos níveis de concentração dos resíduos de pesticidas em diversas matrizes ambientais é de fundamental importância nos programas de monitoramento ambiental (Matallo, 1997; Haque e Freed, 1975).

Triazinas como a atrazina, propazina e simazina têm sido amplamente utilizadas em todo o mundo (Martínez *et al.*, 2002) para o controle de ervas daninhas em diversas culturas agrícolas. As triazinas, especialmente atrazina, simazina e propazina, apresentam similaridade de propriedades físico-químicas tais como, solubilidade em água, alto grau de polaridade, baixo grau de adsorção em solos e alta persistência, sendo que as duas últimas propriedades, aliadas à vasta utilização, são a causa da frequente ocorrência desses produtos químicos e seus metabólitos em águas subterrâneas (Martínez *et al.*, 2002; Loss e Niessner, 1999; Bagheri e Khalilian, 2005). A atrazina foi proibida na Alemanha desde 1991, como consequência da contaminação das águas subterrâneas e solos (Färber *et al.*, 1994; Townsend e Young, 2000).

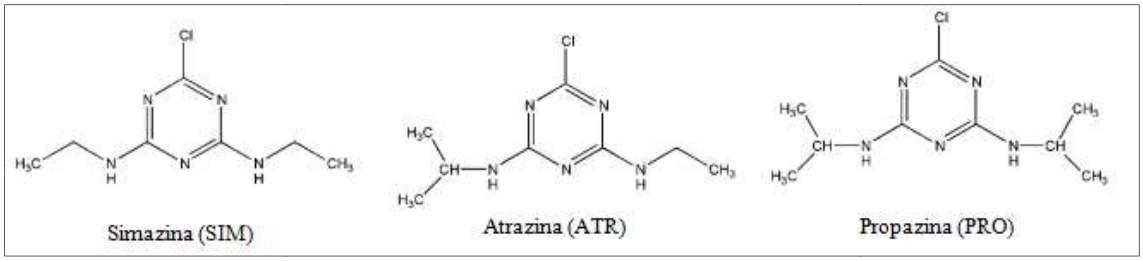


Figura 01: Representação da fórmula estrutural das triazinas em estudo

Tabela 1: Características físico-químicas para as triazinas em estudo.

	Massa Molar ($g\ mol^{-1}$)	Densidade ($g\ cm^{-3}$)	Pressão de vapor (mPa a 20 ° C)	Solubilidade em água ($mg\ L^{-1}$ à 20°C)
Simazina	201,66	1,3	$8,1x10^{-4}$	5
Atrazina	215,68	1,2	$4x10^{-2}$	30
Propazina	229,71	1,16	$3,9x10^{-3}$	5

Quando um herbicida é aplicado no ambiente, seja da forma que for essa aplicação, uma fração significativa atinge o solo. Quando no solo, as moléculas dos pesticidas podem seguir diferentes rotas, isto é, podem ser retidas nos colóides minerais e orgânicos e tornarem-se indisponíveis, processo este conhecido como adsorção, ou podem ser liberadas para a solução solo, processo este conhecido como dessorção. As moléculas também podem ser transformadas em outras, chamadas de produtos de transformação ou metabólitos. O ponto final dessa transformação, naturalmente para moléculas que atingem essa fase, é a mineralização à CO_2, H_2O e íons minerais, o que se dá, fundamentalmente via microrganismos. Se as moléculas se encontram na solução do solo, elas podem ser adsorvidas por raízes de plantas, ou serem lixiviadas para camadas subsuperficiais do perfil do solo ou sofrer escoamento superficial, ou ainda serem volatilizadas. Tudo isso ocorre no solo simultaneamente, em intensidades diferentes e dependem das propriedades físico-químicas da molécula, propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e dos fatores climáticos (Prata, 2002).

A avaliação dos possíveis prejuízos ambientais causados pela presença de um pesticida no solo depende de estudos em que se estabeleça o destino final deste pesticida. Entre os pesticidas, os herbicidas do grupo triazínico, atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina, com fórmula molecular que pode ser representada por $C_8H_{14}N_5Cl$), propazina (6-cloro-*N*2,*N*4-diisopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, com fórmula molecular que pode ser representada por $C_9H_{16}ClN_5$) e simazina (2-cloro-4,6-di(etilamino)-1,3,5-triazina, com fórmula molecular que pode ser representada por

$C_7H_{12}ClN_5$) têm sido os mais utilizados durante os últimos 30 anos no controle não seletivo de ervas daninhas em solo não cultivado e para controle seletivo de ervas daninhas em culturas como: milho, sorgo, cana de açúcar e abacaxi (Radosevich *et al*., 1995). Assim, o estudo do comportamento da atrazina, simazina e propazina no solo é de interesse prático, dadas as possibilidades de contaminação ambiental, e também para possibilitar o conhecimento da melhor forma de utilização desses herbicidas na agricultura.

A legislação brasileira (CONAMA/MS) e as legislações internacionais (US-EPA e Comunidade Europeia) determinam valores máximos permitidos em águas potáveis para a atrazina, propazina e simazina. Como pode-se observar na tabela abaixo (Tabela 2) a Comunidade Européia é a mais restritiva.

Tabela 2: Valores máximos permitidos em águas potáveis (em $\mu g\ L^{-1}$) para a simazina, atrazina e propazina.

	Simazina	Atrazina	Propazina
US-EPA	4	3	10
CONAMA/MS	2	2	-
Comunidade Européia	0,1	0,1	0,1

1.1 Solo: principais características e composição

O solo é composto por uma fase sólida, uma líquida e uma gasosa. A fase sólida é composta por minerais e matéria orgânica. A fase líquida é constituída de água, minerais (argila, íons) e compostos orgânicos nela dissolvidos formando a solução do solo. A fase gasosa ocupa o espaço aéreo do solo, o qual é preenchido pelo ar que está “dissolvido” no solo (Adams, 2002).

As partículas minerais e orgânicas que constituem a fase sólida do solo estão envoltas por películas de solução aquosa, na qual estão dissolvidos íons, moléculas e gases, sendo este o meio do qual as plantas retiram as espécies necessárias à sua nutrição e onde devolvem os seus resíduos. A maioria das reações químicas que ocorrem no solo acontece nesta interface sólido-solução (Adams, 2002).

1.2 Propriedades físico-químicas dos pesticidas

As propriedades físico-químicas de um pesticida relacionadas ao seu comportamento ambiental são: solubilidade em água (S_w), pressão de vapor (P), coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow}), constante de equilíbrio de ionização ácido (pK_a) ou base (pK_b) e constante da lei de Henry (K_H). Essas propriedades químicas são normalmente determinadas em laboratório sob condições controladas e por métodos muito bem conhecidos (Prata, 2002).

1.2.1 Solubilidade em água (Sw)

A solubilidade de um pesticida em água refere-se à concentração máxima da substância (pura) que pode ser solubilizada em água, a uma determinada temperatura. Acima destas concentrações, duas fases distintas existirão. Dos vários parâmetros que afetam o destino de pesticidas no solo, a S_w é um dos mais importantes. Pesticidas altamente solúveis, com algumas exceções como, por exemplo, o glifosato (Picolo *et al*., 1994), tendem a apresentar baixos coeficientes de sorção em solos e sedimentos, em função da baixa afinidade pelos colóides do solo, principalmente os colóides orgânicos. Os estudos de Kawamoto e Urano (1989) mostraram que quanto maior a solubilidade em água, menor a afinidade da molécula com a matéria orgânica do solo. Outros meios de transformação do pesticida no solo, como a fotólise, a hidrólise e a oxidação também são afetadas pela extensão da S_w (Wolfe *et al*., 1990).

1.2.2 Pressão de vapor (P)

A pressão de vapor de um pesticida é uma medida da tendência de volatilização no seu estado normal puro, sendo função direta da temperatura. No entanto o valor de *P* não indica em qual taxa o pesticida se volatilizará (Prata, 2002)

De formal geral, pesticidas com valores de $P > 10^{-2}$ mmHg são considerados muito voláteis à temperatura ambiente; $10^{-4} \leq P \leq 10^{-3}$, mediamente voláteis; $10^{-7} \leq P \leq 10^{-5}$, pouco voláteis e $P < 10^{-8}$, são pouco voláteis (Deuber, 1992).

1.2.3 Coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow})

O coeficiente de partição n-octanol-água é definido como a relação da concentração de um pesticida na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Valores de K_{ow} não tem unidade e são expressos, normalmente, na forma logarítmica (log K_{ow}) (Prata, 2002).

O coeficiente de partição n-octanol-água é um parâmetro muito importante nos estudos relacionados ao destino de moléculas orgânicas no ambiente. Observou-se que ele está relacionado com a solubilidade em água (Dai *et al*., 1998), com o coeficiente de partição solo/solução (Chiou *et al*., 1979; Kawamoto e Urano, 1989), com o fator de bioconcentração para a vida aquática (Montgomery, 1997; Lu *et al.*, 1999), com o fator de retenção em cromatografia líquida de fase reversa (Woodburn *et al*., 1992), com o tempo de retenção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (Burkhard e Kuehl, 1986) e com muitos outros indicadores de interesse ambiental e metodológico. Por exemplo, o transporte de uma molécula de pesticida no solo depende, além de outros fatores, do balanço entre suas

propriedades hidrofílicas e lipofílicas. Este balanço, normalmente, é estimado através do uso de K_{ow}.

Pesticidas lipofílicos, com valores de log K_{ow} > 4.0, tendem a se acumular nos materiais lipídicos, assim como na fração orgânica do solo (Montgomery, 1997). Pesticidas hidrofílicos, com valor de log K_{ow} < 1.0, são mais solúveis em água e, portanto, não são atraídos aos materiais lipídicos, apresentando deste modo baixa sorção ao solo/sedimento e baixa bioconcentração em relação à vida aquática (Farmer e Aochi, 1974; Grover, 1977; Montgomery, 1997). Para compostos ionizáveis, os valores de K_{ow} dependem do pH e, portanto, esses valores devem sempre acompanhar os valores de K_{ow}.

1.2.4 Constante de ionização ácido/base

A constante de ionização ácido/base (K_a ou K_b) é empregada para moléculas que possuem caráter de ácido fraco ou base fraca, respectivamente, e representa a maior ou menor tendência (força) do pesticida em se ionizar. Os valores destas constantes indicam dentro de qual faixa de pH da solução do solo o pesticida se ionizará. Isso é muito importante, pois as formas ionizadas de pesticidas se comportam diferentemente das não ionizadas (neutras) (Prata, 2002).

1.2.5 Constante da lei de Henry (K_H)

A constante da lei de Henry refere-se ao coeficiente de partição ar-líquido ou vapor-líquido. Quanto maior o valor de K_H, maior o potencial de volatilização da molécula e, geralmente, este valor diminui com o aumento da solubilidade do composto (Prata, 2002).

De acordo com Lyman *et al.* (1982), a molécula apresenta baixa volatilidade se $K_H < 10^{-7}$ atm m^3 mol^{-1}. Entre 10^{-7} e 10^{-5}, volatilidade média. A partir de 10^{-5}, esse parâmetro começa a ser considerável, sendo de que acima de 10^{-3}, a volatilização torna-se extremamente importante.

A taxa de volatilização também pode variar com o aumento da temperatura. Hulscher *et al*. (1992) estudaram a relação entre a temperatura e o valor K_H para três clorobenzenos, três bifenóis clorados e seis hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. Eles observaram que a cada aumento de 10°C, o valor de K_H dobrava. No entanto, para a grande maioria dos pesticidas os valores de K_H são inferiores a 10^{-5} (Montgomery, 1997).

1.3 Retenção de pesticidas no solo

Quando uma molécula de pesticida alcança o solo, ela pode seguir diferentes rumos. Pode ser absorvida pelas plantas e manifestar o seu mecanismo de ação, o que é desejável, pode ser transformada, pode ser retida e, caso nenhum desses processos ocorra, a molécula pode ser transportada para diferentes compartimentos do ambiente.

O processo de retenção retarda, ou em alguns casos até mesmo impede a migração das moléculas no perfil do solo. Pode ser reversível ou parcialmente irreversível, podendo afetar os processos de transformação e transporte. Assim sendo, devido à presença prolongada de muitas moléculas no solo, a retenção desempenha um papel preponderante na determinação da eficiência agronômica dos pesticidas, assim como na segurança do ambiente (Prata, 2002).

O termo sorção refere-se aos fenômenos de absorção ou adsorção, sendo que absorção é a incorporação de uma substância em um estado físico em outro estado (por exemplo, um líquido sendo absorvido por um sólido, ou um gás sendo absorvido por um

líquido). Em química, absorção pode ser descrita como o fenômeno no qual íons, moléculas ou átomos penetram no volume de um gás, sólido ou líquido, sem ocorrência de reações. Adsorção é a retenção física ou química de íon e moléculas na superfície de um material sólido, sendo que esse processo de retenção pode ocorrer por interações físicas, eletrostáticas, ou mesmo por formação de ligações químicas entre essas substâncias e a superfície do sólido. O termo sorção descreve a "retenção" de um soluto pela matriz do solo, sem indicar o mecanismo envolvido (Bouchard *et al*., 1989). Quando sorvidos, determinada concentração de moléculas pode novamente retornar para a solução do solo, sendo esse processo conhecido como dessorção. Nesse caso, certa concentração do pesticida sorvido encontra-se em equilíbrio com a concentração dele na solução do solo.

Quando um pesticida encontra-se sorvido aos colóides, dependendo da energia e do mecanismo da interação, pode-se apresentar na forma de resíduo-ligado (não disponível). Entretanto, em alguns casos, parte dessa fração ligada do pesticida pode retornar a solução do solo, sendo esse processo conhecido como remobilização (Lavorenti, 1997). Resíduo-ligado é definido como sendo composto que persiste no solo, planta ou animal, na forma da substância original ou de seus metabólitos, após extrações que não alteram significativamente a natureza da substância nem a estrutura da matriz (Führ *et al*., 1998).

1.3.1 Mecanismos de interação

O mecanismo de interação avalia a maneira como o pesticida se liga a outro componente do ambiente no qual ele é aplicado. A energia de ligação entre os pesticidas e os colóides do solo pode variar. Desta forma, os pesticidas podem ser atraídos e adsorvidos com diferentes intensidades, o que depende do mecanismo de adsorção. Esses mecanismos podem ser subdivididos em químicos, físicos e de interações hidrofóbicas (Prata, 2002).

1.3.1.1 Adsorção química

As ligações químicas resultam de interações a pequenas distâncias. São caracterizadas por envolver elevadas energias de adsorção e se dão em tempos relativamente curtos. Dentre estes mecanismos, destacam-se as ligações covalentes e as ligações de hidrogênio (Prata, 2002).

A adsorção de um pesticida reduz a sua concentração diminuindo a sua ação potencial. Cada pesticida, devido a suas propriedades químicas, possui um mecanismo de adsorção e de degradação singular (Silva, 2009).

Dec e Bollang (1994), estudando o comportamento de várias substâncias organocloradas, concluíram que a liberação de íons Cl^- da molécula evidencia a formação da ligação covalente entre os clorofenóis e as substâncias húmicas. De acordo com esses autores, a formação de ligações covalentes dos organoclorados no solo envolve reações oxidativas, as quais podem ser mediadas por enzimas produzidas por microrganismos. Adicionalmente, Katayama *et al*. (1991) e Katayama *et al*. (1997) mostraram que o fato do fungicida clorotalonil não ser dissipado em solos autoclavados reforça a idéia de que a atividade microbiana do solo é requerida para a formação de resíduos-ligados de organoclorados e que sua formação está intimamente relacionada à ligação covalente.

1.3.1.1.1 Ligação de hidrogênio

O hidrogênio quando ligado covalentemente a um átomo eletronegativo, normalmente F, O, Cl ou N, pode ser atraído por outro átomo eletronegativo, formando uma ponte, convencionada como ligação de hidrogênio. Aparentemente, a maioria das moléculas de pesticidas possui grupos com potencial para formar ligações de hidrogênio. Quando moléculas de água estão presentes há uma tendência dos pesticidas formarem

ligações mais fortes com elas do que com a superfície adsorvente. De qualquer modo, a possibilidade de pontes de água ligadas ao hidrogênio entre o soluto e o adsorvente parece possível, embora até o momento, há apenas evidências indiretas de sua ocorrência. As ligações de hidrogênio possuem polaridade, e sua energia de ligação é da ordem de 5 Kcal mol^{-1} (Solomons, 1991). Um exemplo clássico deste mecanismo é a ligação entre a sílica e o herbicida 2,4-D (Koskinen e Harper, 1990). A formação de ligações de hidrogênio é um importante processo governando a adsorção, ocorrendo principalmente em pesticidas não-iônicos, como é o caso das triazinas. A Figura 2 mostra um modelo de adsorção de um herbicida triazínico com substâncias húmicas do solo (Javaroni *et al*., 1999).

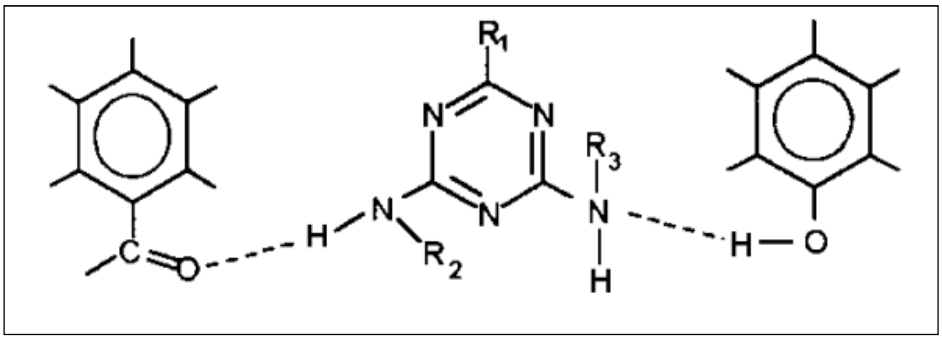


Figura 02: Ligação de hidrogênio entre substâncias húmicas do solo e um herbicida triazinico.

1.3.1.1.2 Ligação Covalente

É uma ligação que ocorre através de catálise química, fotoquímica ou enzimática, levando a uma estável e irreversível incorporação do pesticida no solo (Silva, 2009). A ligação é tipicamente bastante forte, com energia de 50 a 100 kcal mol^{-1}, caracterizando-se pela sobreposição dos orbitais dos átomos envolvidos.

1.3.1.1.3 Troca de ligante

Este mecanismo envolve a associação de cátions metálicos e água de hidratação em substâncias húmicas presentes no solo. Ocorre em herbicidas triazinicos (Figura 3) e pesticidas aniônicos (Prata, 2002). Grupos superficiais Si-OH ou Al-OH em solos exercem papel semelhante ao mostrado para os grupos carboxílicos de substâncias húmicas na Figura 3.

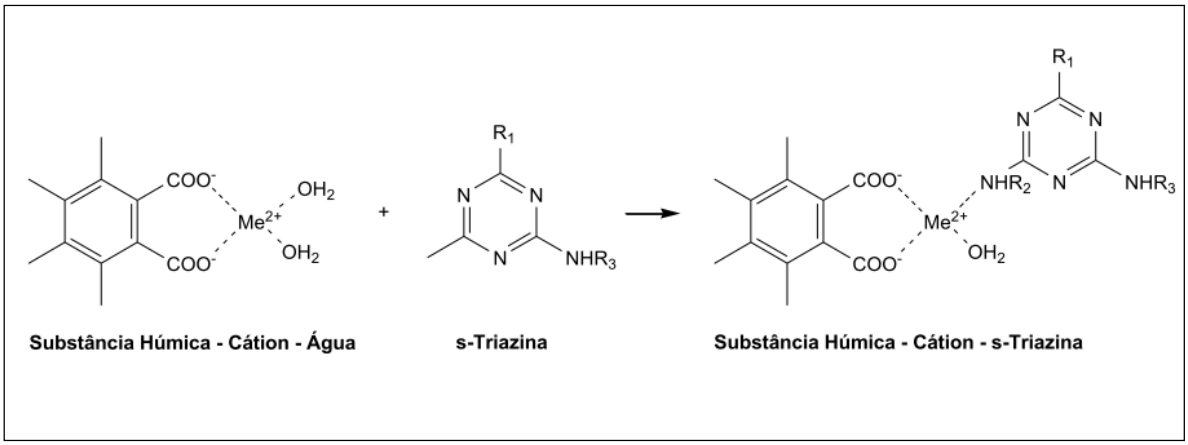


Figura 03: Mecanismo de troca de ligante na adsorção de *s*-triazinas em substâncias húmicas via ponte catiônica.

1.3.1.1.4 Ligação iônica

Essa ligação ocorre basicamente em pesticidas com forma catiônica em solução e em pesticidas básicos (dependendo da sua basicidade e do pH do sistema) que aceita um próton, tornando-se catiônico, como os herbicidas triazinicos (Figura 4) (Javaroni *et al*., 1999).

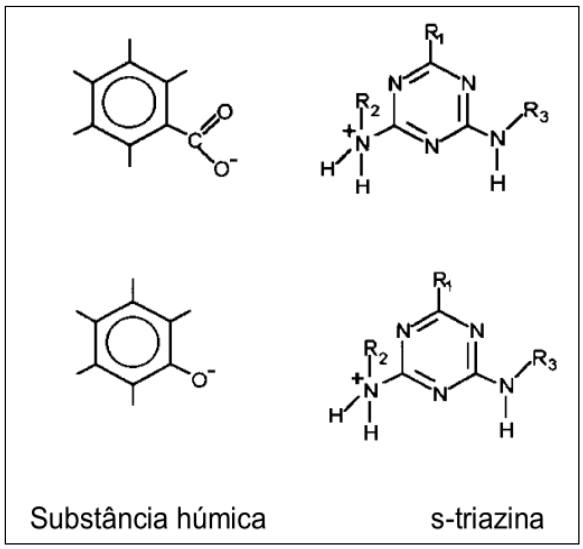


Figura 04: Ligação iônica entre substância húmica e triazina.

1.3.1.2 Adsorção física

Os processos físicos são caracterizados por envolver baixa energia de adsorção (20 Kcal mol^{-1} ou menos). Muitos pesticidas e moléculas dipolares são atraídas para a superfície desta maneira. Estão incluídas nesta categoria as forças de van der Waals (Prata, 2002).

1.4 Transformações de pesticidas no solo

A transformação de pesticidas no solo consiste na alteração da estrutura molecular, por meios bióticos ou abióticos. Quando a transformação é total, dando origem a CO_2, H_2O e íons minerais, é chamada de mineralização. Por outro lado, quando é parcial, dando origem a subprodutos (metabólitos), recebe o nome de metabolização. Os subprodutos resultantes da transformação tendem a diminuir a toxicidade do pesticida, embora possa, ocasionalmente, resultar em componentes mais tóxicos do que a própria molécula original (Cox, 1997). Muitas vezes o termo transformação é tratado como degradação.

1.4.1 Transformação química

O principal mecanismo de reação química importante na transformação de pesticida no solo é a hidrólise. Ela 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 uma molécula orgânica reage com a água, formando uma nova ligação carbono-oxigênio e rompendo e rompendo uma ligação carbono-X na molécula original (Wolfe *et al*., 1990).

A presença de íons metálicos no solo, como Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Al^{+3} etc., também pode contribuir para a catálise da hidrólise de alguns pesticidas, Blanchet e St-George (1982) mostraram que a quelação de Cu^{2+} e Mn^{2+} pelo S e N do clorpirifós, pode resultar em hidroxilação e desmetilação no radical éster dessa molécula.

A 2-hidroxiatrazina, um metabólito da atrazina, é formada pela hidroxilação da atrazina. A reação de formação está representada na Figura 5 (adaptada de Meakins *et al.*, 1995).

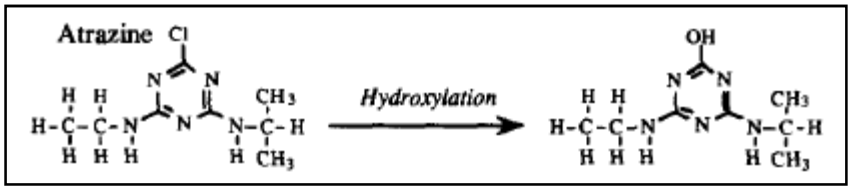


Figura 05: Reação de formação da 2-hidroxiatrazina.

1.4.2 Fotodegradação

É possível observar fotodegradação (fotólise) da estrutura molecular de um pesticida na superfície do solo quando ocorre a ação da luz. Geralmente, a luz apresenta um papel de catalisador de reações químicas como a hidrólise, oxidação, redução etc., e os produtos de transformação resultantes destas reações são, algumas vezes, os mesmos que são encontrados em decorrência dos processos enzimáticos (Prata, 2002).

1.4.3 Biodegradação

A maioria das moléculas de pesticida é transformada pela ação do metabolismo dos microrganismos no solo. O termo biodegradação refere-se à transformação microbiológica de um composto orgânico para outra forma, sem se referir à extensão (Monteiro, 1997).

A biodegradação pode acontecer por reações metabólicas diretas ou indiretas com as propriedades físicas e químicas do solo (Prata, 2002).

A biodegradação ocorre em função da produção de enzimas por microrganismos degradadores de pesticidas, as 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, desalcoxilação, etc (Lavorenti, 1996).

A desetilatrazina e desisopropilatrazina, outros dois metabólitos da atrazina, são formados por desalaquilação devido à ação microbriana sobre a atrazina. A reação de formação destes metabólitos está representada na Figura 6 (adaptada de Meakins *et al.*, 1995).

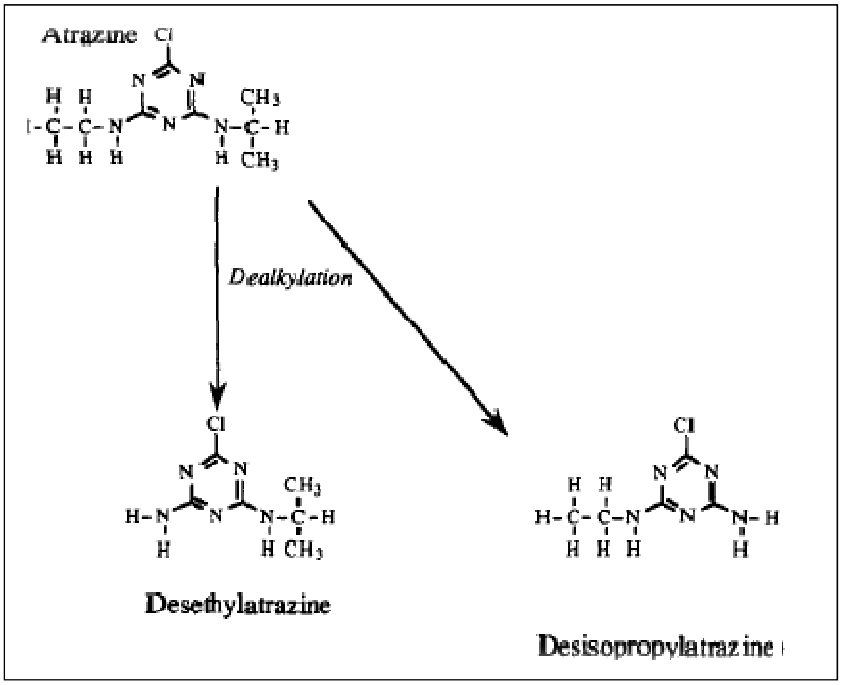


Figura 06: Reação de formação da Desetilatrazina e da Desisopropilatrazina.

O termo dissipação é bastante utilizado no estudo do comportamento do pesticida no ambiente. Esse termo se refere à fração do pesticida que é mineralizada ou permanece no solo em formas que não a original, ou seja, a dissipação abrange a mineralização, a metabolização, a formação do resíduo-ligado, a adsorção e o transporte do pesticida. O tempo de meia via ($t_{1/2}$) expressa o tempo em que 50% da concentração total aplicada encontra-se dissipada no solo (Prata, 2002).

Existem casos em que a molécula é rapidamente dissipada, sendo transformada em metabólitos ou apresentando rápida cinética de formação de resíduo-ligado, mas tais metabólitos podem ser tão quão ou mais tóxicos que a própria substância original, podendo haver a remobilização de seus resíduos-ligados, tornando-se novamente ativos. O herbicida atrazina é um exemplo de molécula que pode apresentar remobilização de sua fase resíduo-ligado (Printz *et al*., 1995; Lavorenti, 1997; Liebich *et al*., 1999; Peixoto *et al*., 2000; Lavorenti *et al*., 2001).

A degradação de um pesticida no solo muitas vezes está relacionada a microrganismos específicos. Por exemplo, Kontchou e Gschwind (1995) mostraram que a degradação da atrazina em vários solos foi aumentada em 50% após a incubação com a linhagem YAYA6, *Pseudomonas*, crescida em meio líquido contendo somente atrazina como fonte de carbono. Nos solos com alto teor de matéria orgânica, a biodegradação da atrazina foi limitada pelos mecanismos de adsorção.

1.5 Transporte de pesticidas no solo

O transporte de pesticida no ambiente pode ocorrer através da sua movimentação vertical no solo, processo conhecido como lixiviação, da volatilização da molécula, ou através do escorrimento superficial (Enfield e Yates, 1990).

1.5.1 Lixiviação

A lixiviação é a principal forma de transporte no solo das moléculas não voláteis e solúveis em água (Enfield & Yates, 1990; Ayeni *et al*., 1998). Essas moléculas caminham no perfil, acompanhando o fluxo de água, o qual é governado pela diferença de potencial da água entre dois pontos.

Quando uma molécula orgânica é lixiviada, pode atingir zonas superficiais no perfil e, em alguns casos, pode até mesmo alcançar o lençol freático, acarretando em impactos ambientais (Prata, 2002).

A disponibilidade e, conseqüentemente, o transporte de pesticidas no solo são governadas pelos processos de sorção, transformação e absorção radicular das moléculas, aliados às condições ambientes (pluviosidade, temperatura, etc.). Assim, as propriedades físico-químicas das moléculas, e os atributos físicos, químicos e biológicos do solo, refletem diretamente na movimentação das moléculas no perfil do solo (Bouchard *et al*., 1989).

A extensão da mobilidade da atrazina e da simazina está relacionada ao conteúdo de matéria orgânica do solo (Moreau e Mouvet, 1997; Mersie e Seybold, 1996), o qual, por sua vez, também está envolvido na metabolização destes herbicidas.

1.5.2 Escoamento superficial

O movimento do pesticida ao longo da superfície do solo, juntamente com o escorrimento da água da chuva ou até mesmo pelo vento, até a superfície das águas dos rios, lagos e terrenos de menor declividade, é conhecida como escoamento superficial ou "*runoff*" (Prata, 2002).

A concentração do pesticida e a distância que ele é transportado são influenciadas por fatores como: taxa de aplicação, propriedades físico-químicas do pesticida e do solo, tempo antes que ocorra a erosão, quantidade de precipitação x taxa de infiltração, topografia do terreno e tipo de cobertura vegetal (Leonard, 1990). A disposição de pesticidas é resultado final do transporte de massa superficial, a qual é influenciada pela velocidade da força carregadora (água ou vento) e o tamanho da partícula na qual o pesticida pode estar adsorvido.

O plantio direto é a prática cultural de maior importância na redução do escoamento superficial. O plantio direto é um sistema de manejo do solo onde palha e demais restos vegetais de outras culturas, são mantidos na superfície do solo, tornando-o mais compacto superficialmente e garantido cobertura e proteção do mesmo contra processos danosos, tais como a erosão e o escoamento superficial diminuindo assim, o transporte de nutrientes e defensivos agrícolas para partes mais baixas do terreno, rios e lagos. Os estudos de Tripllet *et al*. (1978) mostraram a redução do transporte de atrazina e simazina devido ao “runoff”, em áreas sob este sistema de cultivo.

1.5.3 Volatilização

É o processo responsável pela distribuição do pesticida na superfície do solo, planta ou água para a atmosfera. Cada pesticida tem uma tendência a mudar da fase sólida para a liquida e desta para vapor devido ao movimento ou energia da molécula que o compõe. A tendência de uma molécula no estado líquido passar para o estado gasoso é indicada por sua pressão de vapor (Montgomery, 1997). Quanto mais próximo de 760 mmHg (1 atm), for o valor da pressão de vapor do pesticida, maior a sua tendência de passar para o estado

gasoso. A atrazina, propazina e simazina possuem, respectivamente, pressões de vapor em torno de 300, 30 e 6 mmHg, sendo considerados pouco ou não voláteis.

1.6 Toxicidade da atrazina e da simazina

A atrazina e a simazina são herbicidas que apresentam toxicidade alta, podendo causar doenças degenerativas em seres humanos entre elas o câncer de mama em mulheres e o câncer de próstata em homens (Devos *et al*., 2003). A atrazina e a simazina são excretadas pela urina e fezes.

Para a atrazina a dose aguda oral (em ratos) DL_{50} é entre 1869-3080 mg kg^{-1}. Para a simazina a DL_{50} é superior a 5000 mg kg^{-1} (Worthing, 1991).

1.7 Separação, identificação e quantificação de pesticidas

Devido aos baixos níveis de concentrações das triazinas no ambiente, sua monitoração exige técnicas analíticas capazes de quantificar tais níveis. Entre essas técnicas destacam-se a cromatografia gasosa (GC – do inglês *Gas Chromatography*) acoplada a um detector de nitrogênio-fósforo (GC-NPD – do inglês *Gas Chromatography coupled with nitrogen-phosphorus detector*) ou espectrometria de massas (GC-MS – do inglês *Gas Chromatography with mass spectrometry*) (Loss, 1999; Jiang, 2005). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) também tem sido frequentemente empregada para a determinação de triazinas. Ambas as técnicas exigem etapas de pré-concentração devido às baixas concentrações dos herbicidas e seus metabólitos no solo, no sedimento e na água (Dean, 1996; Nogueira, 2004).

Recentemente surgiu a cromatografia por injeção sequencial (SIC – do inglês *Sequential Injection Chromatography*), que é uma técnica de separação e consiste no aclopamento de sistemas de análise por injeção sequencial (SIA – do inglês *Sequential Injection Analisys*) com fases estacionárias monolíticas, que permitem realizar análises em vazões elevadas, sem perdas significativas da eficiência de separação, o que é umas das principais vantagens oferecidas por essas fases, implicando em redução do tempo de análise sem comprometimento da resolução cromatográfica (Faria *et al*¸ 2006).

1.7.1 Cromatografia por injeção seqüencial

A cromatografia por injeção seqüencial foi desenvolvida por Satinsky *et al* (2003), que propuseram a utilização das colunas monolíticas em sistemas SIA, permitindo separações cromatográficas com perfil similar a de HPLC. Estes autores propuseram então o acrônimo SIC para a nova técnica. Satinsky *et al.* (2003) demonstraram que a bomba de pistão utilizada nos sistemas de injeção seqüencial é capaz de impulsionar a solução transportadora através de colunas monolíticas de sílica modificada com octadecilsilano usando vazões que possibilitam a separação de componentes de misturas simples. Com isso, a solução transportadora passa a exercer a função de fase móvel, e separações simples podem ser efetuadas. A utilização das colunas monolíticas em sistemas de injeção sequencial ou em HPLC leva a uma significativa redução de tempo e custo nas análises, principalmente considerando-se a diminuição no consumo de fase móvel em comparação com sistemas de HPLC.

A cromatografia por injeção seqüencial tem sido aplicada, com sucesso, principalmente em análises de compostos farmacêuticos, análises estas relativamente simples, e tem mostrado eficiência de separação similar as obtidas por HPLC, tendo como

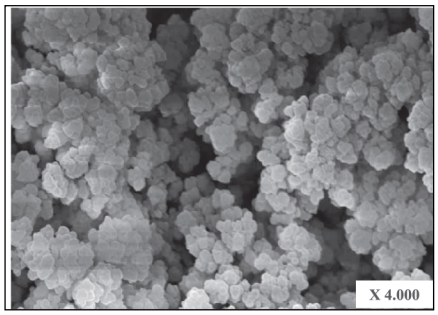
vantagens comparada a esta curtos tempos de análise, possibilidade de realização de análises on-line, monitoramento de processos industriais, uso de reagentes durante a análise, redução do custo de análise, menor custo instrumental, e como principais vantagens a menor produção de resíduos e a economia de solventes, visto que em SIC o fluxo de fase móvel é descontinuo e os volumes utilizados são pequenos devido a capacidade limitada da bomba de pistão, sendo esta característica da bomba, por outro lado, uma desvantagem do SIC em relação a HPLC. Outras desvantagens do SIC em relação à HPLC são a sua menor robustez, falta de um programa próprio para tratamento dos dados obtidos e por ser uma técnica relativamente nova a parte instrumental ainda requer melhorias (Chocholous *et al.*, 2007).

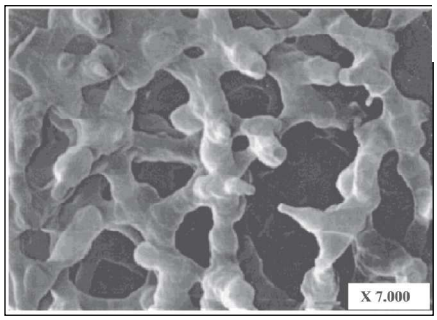
1.7.2 Fases estacionárias monolíticas

Uma fase monolítica é um meio contínuo de separação, comumente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa de pequenos domínios e canais relativamente grandes, que fornecem alta permeabilidade e eficiência de coluna, permitindo análises a altas vazões e com baixa pressão (Faria, *et al.*, 2006; Guiochon, 2007).

Existem, basicamente, dois tipos de colunas monolíticas. Colunas baseadas em sílica e colunas baseadas em polímeros (Figura 7). Os materiais baseados em sílica são constituídos de macroporos (de 1 a 2 µm de largura) e mesoporos (de 13 nm de largura) que são os principais responsáveis pela separação cromatográfica. Os materiais baseados em polímeros, principalmente poli meta-acrilatos ou poli-estireno-divinilbenzeno, podem ser produzidos na forma de discos ou tubos. Os monólitos a base de polímeros são empregados, principalmente, na separação de macromoléculas, entre elas as proteinase, os

monólitos baseados em sílica são aplicados para a separação de moléculas menores (Faria *et al*, 2006).

a) 



b)

Figura 07: Micrografias de fases monolíticas baseadas (a) em poli(metacrilato de butila-co-dimetacrilato de etileno) e (b) em sílica.

As fases estacionárias monolíticas, baseadas em sílica, são constituídas de pequenos domínios internos (chamados de esqueletos ou glóbulos) e longos canais, apresentando uma sequência ordenada e ininterrupta. Já para os monolitos baseados em polímeros são constituídos de microglóbulos. Os longos canais internos (> 1 μm de diâmetro) são responsáveis pela baixa resistência ao fluxo da fase móvel, gerando uma alta permeabilidade (Engelhardt e Götzinger, 2004). Com isso, são geradas baixas pressões nas colunas monolíticas, permitindo separações em altas vazões de fase móvel diminuindo consideravelmente os tempos de análise (Faria *et al.*, 2006; Svec, 2003; Martinez *et al.*, 2004). Os domínios de sólido dentro dos monolitos podem conter poros que contribuem para a área superficial especifica e para a separação cromatográfica.

Devido à menor quantidade de sílica dentro das colunas, as fases estacionárias monolíticas apresentam menor área superficial específica quando comparados às colunas de materiais particulados, variado de 50 a 300 m^2 g^{-1} (Faria *et al*, 2006; Ikegami e Tanaka, 2004).

As colunas monolíticas apresentam altura de prato teórico tipicamente na faixa de 5 a 20 μm. Trabalhos na literatura têm demonstrado o bom desempenho destas colunas em vazões elevadas (Faria *et al.*, 2006; Tanaka e Kobayashi, 2003; Oberacher *et al.*, 2004;

Lämmerhofer *et al.*, 2001; Engelhardt e Götzinger, 2004; Ikegami e Tanaka, 2004). Assim, a contribuição do termo de transferência de massa da fase móvel é maior, enquanto que da fase estacionária é menor quando comparado às colunas convencionais (Faria, 2006; Ikegami e Tanaka, 2004). Outro fator que contribui para as altas eficiências é a transferência de massa que ocorre por convecção e difusão nas fases monolíticas, uma vez que esse tipo de fluxo permite uma maior rapidez na transferência de massa graças aos poros bastante largos (Faria, 2006; Zou *et al.*, 2002).

Cada fase monolítica é única e sua preparação ocorre diretamente dentro da coluna cromatográfica, portanto a reprodutibilidade de colunas é um fator de extrema importância e que vem sendo sistematicamente avaliada tanto para fases monolíticas fabricadas em laboratório, como para fases monolíticas comerciais (Engelhardt e Götzinger, 2004), tendo como principal parâmetro avaliado o tempo de retenção de vários compostos. Dentre os diversos parâmetros analíticos avaliados, as estimativas dos desvios padrão relativo (RSD – do inglês *Relative Standard Deviations*) para as retenções não excederam a 5% para todos os compostos avaliados (Hoegger e Freitag, 2001; Jiang *et al.*, 2001; Engelhardt, Götzinger, 2004; Svec, 2003). Estes valores são aceitáveis, levando em consideração o modo de preparo das colunas monolíticas (Faria *et al.*, 2006).

1.7.3 Detecção espectrofotométrica

A detecção espectrofotométrica é amplamente utilizada em separações cromatográficas, mas fornecem limites de detecção que podem ser considerados elevados, especialmente para análises de traços em amostras ambientais (Gimbert e Worsfold, 2007). O aumento do caminho óptico é uma estratégia para a melhoria dos limites de detecção. No entanto, a atenuação do feixe de radiação por processos de refração e reflexão com a

interface resulta em um aumento de ruído e, conseqüentemente, piora do limite de detecção (Li *et al*, 2003).

1.7.4 Cela de longo caminho óptico com guia de onda

Segundo a lei de Lambert-Beer a absorbância é proporcional ao caminho óptico. Isso ocorre porque o aumento do caminho óptico implica no aumento da população de espécies capazes de interagir com o feixe de radiação. Em celas convencionais, este aumento é limitado devido à atenuação do feixe de radiação por processos outros além da absorção pela espécie de interesse, tais como refração e reflexão (Li *et al.*, 1983).

Para evitar a atenuação do feixe de luz em celas de longo caminho óptico com guia de onda (LWCC – do inglês *Liquid Waveguide Capillary Cell*), a solução interna deve ter um índice de refração (n) maior que o material utilizado na confecção da cela. Existem dois tipos de materiais empregados na confecção do guia de onda destas celas. As celas do tipo I são confeccionadas com um fluorpolímero amorfo de Teflon AF2400 (n=1,29) tendo desvantagens e poucos trabalhos foram publicados com a sua utilização (Gooijer *et al*, 1998). As celas do tipo II são confeccionadas com um capilar de sílica revestido com Teflon AF2400 e são amplamente utilizadas em soluções aquosas (n=1,33) tendo alta resistência contra a adsorção de substâncias e retenção de bolhas.

1.7.5 Aumento do volume de amostra

Outra estratégia adotada para melhoria dos limites de detecção e quantificação, além do emprego de celas de longo caminho óptico, é o aumento do volume de amostra (Hutta, 2006; Hutta, 2009). Usualmente utilizam-se volumes pequenos de injeção que

variam de 20 a 100 µL de amostra. Em alguns casos, onde se deseja realizar uma cromatografia preparativa ou obterem-se melhores limites de detecção o volume de injeção pode chegar até a 10 mL de amostra. Por outro lado, o aumento de volume pode causar efeitos nos tempos de retenção dos analitos da amostra, além de perda de resolução cromatográfica devido ao alargamento de bandas. Pode ocorrer também o chamado “efeito memória” entre a injeção de diferentes amostras, que é a retenção de parte dos analitos na coluna cromatográfica em função do grande volume utilizado. O aumento do volume de injeção pode causar também a diminuição da vida útil da coluna.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver um método simples, rápido e de baixo custo para a separação de simazina, propazina, atrazina e seus metabólitos empregando colunas monolíticas e cromatografia por injeção sequencial, visando a aplicação em águas e em suspensões de solo.

Obter a melhora dos limites de detecção e quantificação, através do emprego de cela de longo caminho óptico.

Demonstrar a aplicabilidade do sistema de cromatografia por injeção sequencial (SIC) em estudos ambientais, onde as concentrações dos analitos de interesse estão em faixas de $\mu g\ L^{-1}$ e $ng\ L^{-1}$, uma vez que o mesmo é predominantemente utilizado em estudos farmacêuticos, onde a concentração dos analitos de interesse é alta.

Utilizar os recursos do SIC, similares aos de sistemas de análise por injeção seqüencial (SIA), originalmente proposto para o monitoramento de processos industriais, em estudos de adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina.

3 Parte experimental

3.1 Materiais

- Acetato de amônio, P.A., Merck®, Darmstadt, Germany.
- Agitador magnético, Metrohm, Switzerland.
- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, Mettler Toledo (Switzerland).
- Balança semi-analítica com precisão de 0,001 g, Marte®, Brasil.
- Bomba de vácuo, Modelo 0AA-V174-EB, Gast®, Benton Harbor, Michegan, USA.
- Bomba peristáltica, Ismatec®, Switzerland.
- Cela com 4 cm de caminho óptico, capacidade interna de 10 µL, FIAlab Instruments, Bellevue, WA, USA.
- Cela de longo caminho óptico Tipo II com 100 cm, volume interno de 250 µL, constituída de um capilar de sílica fundida revestida com Teflon AF-2400® com 0,6 mm d.i., LPC-1; Ocean Optics, Dunedin, FL, USA.
- Centrífuga Excelsa (Mod. 206BL), Fanem®, São Paulo, Brasil.
- Coluna empacota C_{18} (4 µm, 150 mm x 4,60 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, USA.
- Coluna monolítica Onyx™ C_{18} (25 mm x 4,3 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, USA.
- Computador, com software para controle de operações e aquisição de dados FIAlab for Windows, Version 5.9.320, FIAlab®, Bellevue, WA, USA.

- Cromatógrafo a líquido modelo LC 9A Shimadzu equipado com detector UV modelo SPD 6AV, LC Workstation, Class-LC 10 software para aquisição dos dados, alça de amostragem de 20 µL Rheodyne®, USA.
- Dessecador a vácuo.
- Destilador de água, MA 078, Marconi, Brasil.
- Espectrofotômetro UV/VIS 200-850 nm USB 4000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA, com grade de difração de 600 linhas mm^{-1}, resolução de 1,5 nm e abertura de fenda de 25 µm (altura de 1000 µm).
- Estufa de secagem, Quimis®, Brasil.
- Estufas a vácuo, Vacucenter, Salvis Lab, Renggli, Schweiz.
- Extran® MA 02 Neutro, Merck®, RJ, Brasil.
- Fonte de Deutério/Tungstênio Halogênio DH 2000 (Mikropack GmBH, Alemanha). Transmissão da radiação da fonte para as celas de fluxos, convencional ou guia de onda, e destas para o espectrômetro foram feitas com cabos de fibra óptica de 600 µm de diâmetro e 51 cm de comprimento
- Gás Hélio, ultra puro, Air Products, SP, Brasil.
- Geladeira, com congelador.
- Incubadora refrigerada, Marconi, Brasil.
- Membrana filtrante de acetato de celulose 0,2 µm, 47 mm, Sartorius Biolab Products, Sartorius Stedim Biotech, Germany.
- Membrana filtrante 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, Minisart®, Sartorius Stedim Biotech, Germany.
- Metanol, J.T.Baker, México.

- Padrões analíticos, grau Pestanal®, de Simazina, Atrazina, Propazina, Desetilatrazina, Desisopropilatrazina e 2-hidroxiatrazina, Riedel-deHaën®, Germany.
- pH metro, Metrohm, Switzerland.
- Pipetadores de diversas capacidades, Eppendorf Research; LabMate HT; Pipetman, Gilson.
- Ponteiras com diversas capacidades.
- Pré-coluna, Onyx™ C_{18} (10 mm x 4,5 mm), Phenomenex®, Torrance, CA, USA.
- Seringas de vidro com capacidade de 10 mL.
- Sistema de cromatografia líquida SIChrom™, FIAlab®, Bellevue, WA, USA. O sistema é esquematizado nas Figuras 8 e 10, sendo constituído por uma bomba de pistão modelo S17 PDP da Saphire Engineering™ (Pocasset, MA, USA) com capacidade de 4,0 mL, construída em ULTEM®, tendo um pistão de cerâmica para injeção e aspiração de soluções. Na primeira parte do trabalho utilizou-se uma válvula seletora (VS, Figura 8) de 10 portas Cheminert® da Valco Instruments (Houston, TX, USA). A conexão entre a válvula seletora e porta frontal da bomba de pistão (Figura 8) é feita por uma bobina coletora (BC), constituída de tubo de Teflon de 0,8 mm de diâmetro e 4 m de comprimento com capacidade de armazenamento de 2 mL. Às diferentes portas da válvula seletora são conectadas, além da fase móvel nas portas 9 e 10, o tubo de amostragem, o sistema de pré-coluna, coluna e detector, reservatório de descarte auxiliar, reagentes e fases móveis auxiliares, quando necessárias. A conexão da porta 2 de VS com PC, MC e detector foram feitas com tubo de Teflon de 0,25 mm de diâmetro interno. Conexões do frasco de fase móvel com

a porta 9 da VS foi feita com tubo de Teflon com 1/8 de diâmetro externo, enquanto a conexão da porta 10 de VS com o reservatório da bomba foi feita com tubo de PEEK de 1 mm de diâmetro interno. Todas as ouras conexões de VS, com soluções e amostras foram feitas com tubo de Teflon de diâmetro interno de 0,5 mm. Portas não usada foram mantidas fechadas usando tubo de Teflon sólido. Os movimentos da bomba de pistão (aspiração e injeção) são sincronizados com os da válvula seletora, comandados pelo software FIAlab For Windows 5.0, o qual efetua também a aquisição de dados do detector. Na segunda parte do trabalho a válvula seletora Cheminert® foi substituída por outra do mesmo fabricante, mas construída em aço inoxidável, resistente a pressões de até 5000 psi. Para isso uma check-valve e uma válvula de duas vias adicional foram incluídas no sistema (Figura 10), conforme será descrito no item 3.2.1.1.

- Sistema de filtração a vácuo para fase móvel, HA, Hengao T & O.
- Sistema de filtração tangencial A-sep Applikon®, Dependable Instruments, Schiedam, Holanda.
- Sistema de purificação de água Milli-Q, Simplicity 185, ligado a uma lâmpada UV (ultravioleta), Millipore, Brasil.
- Softwares para tratamento de dados, Microsoft® Office Excel® 2007; Origin® 8, OriginLab Corporation.
- Soluções de HCl e NaOH para ajustes de pH.
- Tubos para centrífuga, com capacidade de 15 mL, CentriStar™ Cap, Corning®, Corning Incorporated, México.
- Ultra-som, Retsch GmbH & Co., Germany.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação de triazinas por Cromatografia por Injeção Sequencial empregando cela de longo caminho óptico.

3.2.1.1 Procedimento para a cromatografia por injeção seqüencial

As soluções estoque de atrazina (ATR), propazina (PRO) e simazina (SIM), foram preparadas, individualmente, em uma concentração de 500 mg L^{-1} em metanol.

A composição da fase móvel utilizada foi de 44:56 MeOH:acetato de amônio 1,25 mM com pH 4,7. A fase móvel foi filtrada com membrana de 0,45 µm LCR-PTFE, levada ao ultra-som por 15 min e, durante o experimento foi utilizado Hélio como desgaseificador. O tampão de acetato de amônio foi preparado na concentração de 100 mM e o pH ajustado para 4,7. Para sua utilização na fase móvel foi retirada uma alíquota deste para que na solução final da fase móvel sua concentração ficasse em 1,25 mM.

Foram utilizadas duas celas, uma com 4 cm e outra com 100 cm de caminho óptico. A detecção das triazinas, na cela de 4 cm, foi realizada a 223 nm, já para a cela de 100 cm foi realizada a 238 nm, usado um espectrofotômetro UV/VIS 200-850 nm USB 4000.

As soluções trabalho, para construção da curva analítica de referência, foram preparadas na forma de um mix das triazinas em estudo a partir das soluções estoque, e diluídas em água, em concentrações entre 5 e 700 µg L^{-1}. Para a cela de 4 cm a faixa linear avaliada variou de 50 a 700 µg L^{-1}. Para a cela de 100 cm a faixa linear avaliada variou de 5 a 200 µg L^{-1}.

O procedimento a seguir foi desenvolvido utilizando o sistema de cromatografia a líquido SIChrom™ esquematizado na Figura 8.

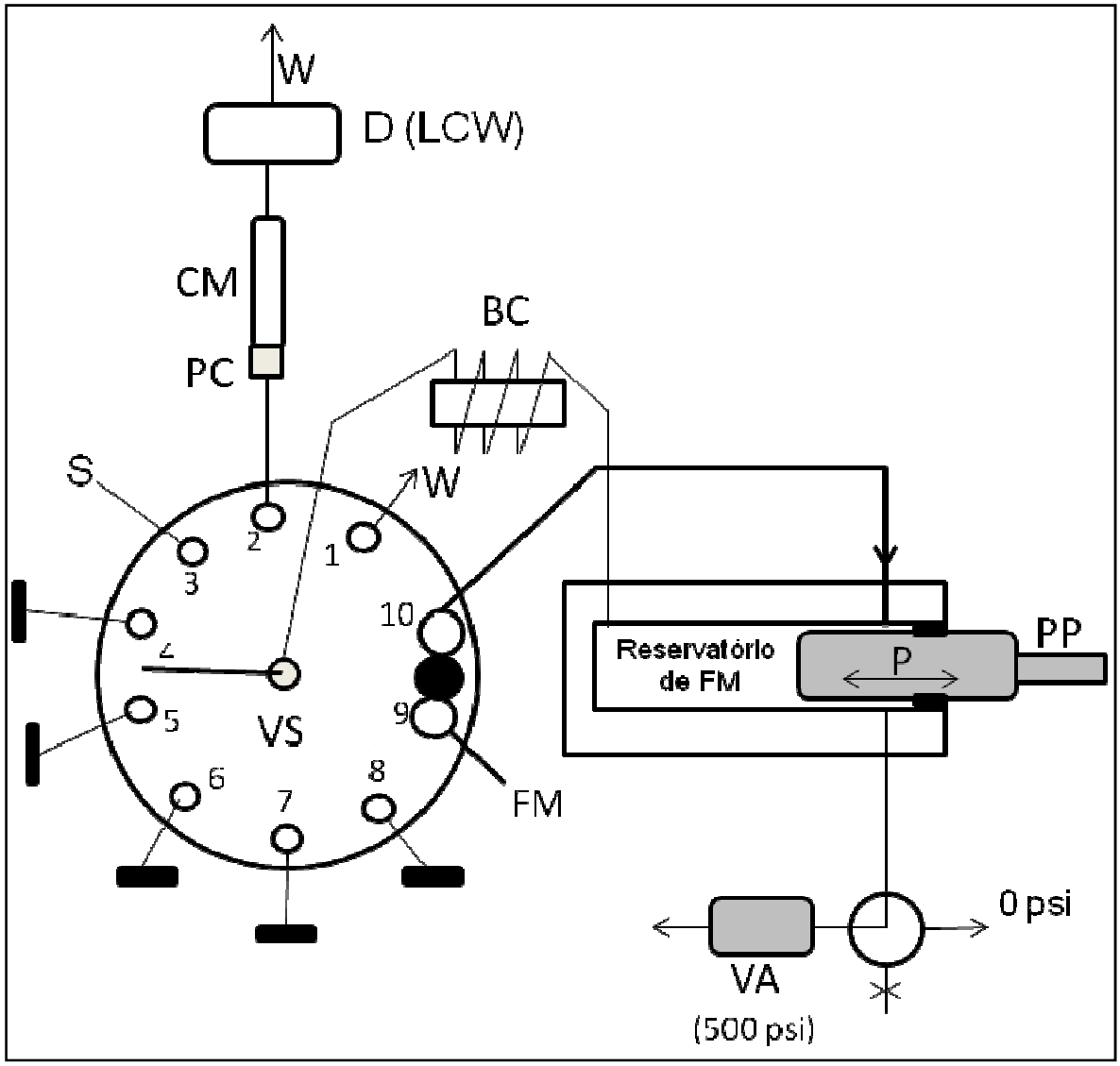


Figura 8: Sistema SIChrom^{TM} de cromatografia a líquido para a separação e determinação de triazinas: PP = Bomba de Pistão, P = Pistão de Cerâmica, VA = Válvula de Alívio para pressões > 500 psi, FM = fase móvel (MeOH:acetato de amônio 1,25 mmol L^{-1}, pH 4,7, na proporção volumétrica 44:56), BC = Bobina Coletora, construída com 4 m de tubo de Teflon de 0,8 mm de diâmetro interno, S = Amostra, W = Descarte, VS = Válvula Seletora de 10 posições, PC = Pré coluna (5 x 4,3 mm), CM = Coluna monolítica (25 x 4,3 mm), D = Detector, usando cela de 4 cm de caminho óptico, ou guia de onda (LCW) com 100 cm de caminho óptico. Na posição mostrada, o sistema está configurado para preenchimento do reservatório da bomba com a fase móvel. Para isso a válvula seletora é posicionada na porta 9, de modo que uma ranhura circular (circulo preto) estabelece conexão interna entre a portas 9 e 10, e dessa última com o reservatório da bomba. A ranhura central aparece entre as portas 4 e 5, ou seja sem acesso às soluções. Em qualquer outra posição de VS, a ranhura circular não estabelece contato entre portas adjacentes e a ranhura central comunica a solução escolhida com a bobina coletora.

A cela de longo caminho óptico com guia de onda foi conectada na saída da coluna monolítica. Foram conectadas à cela duas fibras ópticas, uma na entrada da cela vinda da

fonte de deutério/tungstênio halogênio para a transmissão da radiação da fonte para a cela, e outra na saída da cela que transmite a radiação para o espectrômetro. Os cabos de fibra óptica possuem 600 µm de diâmetro e 51 cm de comprimento (Figura 9).

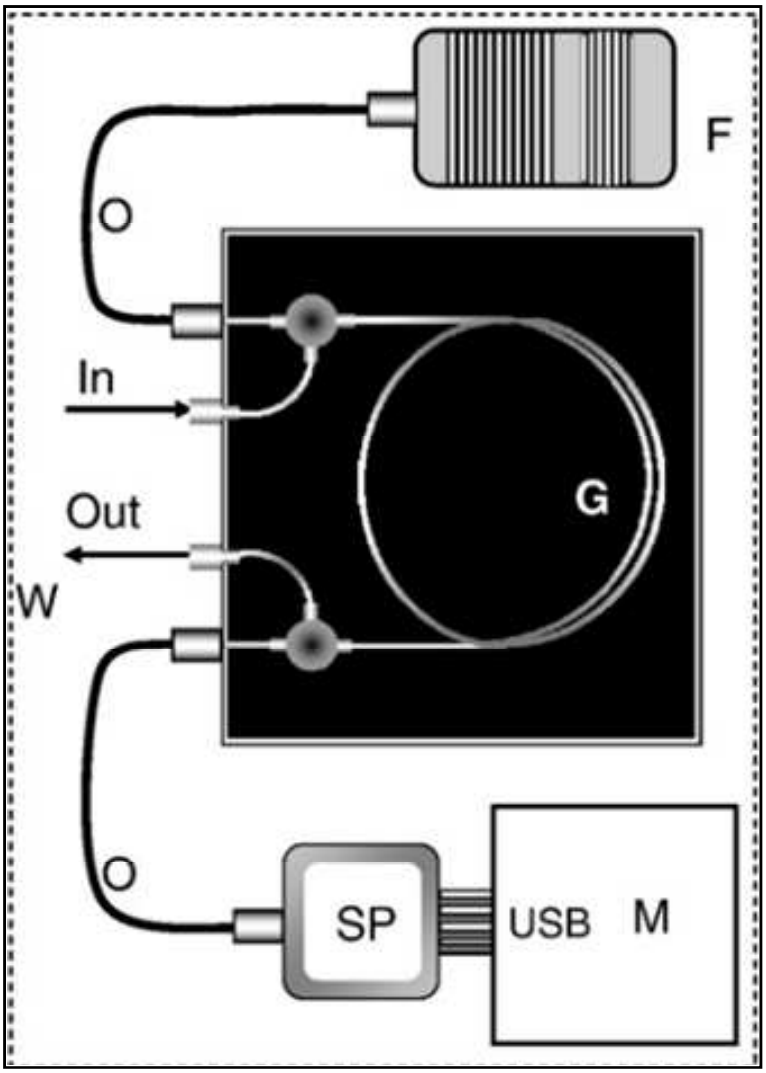


Figura 9: Representação da cela de longo caminho óptico, onde: F = fonte de deutério/tungstênio halogênio, O = fibras ópticas, G = capilar de sílica fundida revestida com Teflon AF2400, SP = Detector, M = computador.

Na análise, inicialmente o reservatório da bomba é preenchido com fase móvel e procede-se ao condicionamento da coluna. Para isso são realizados 3 ciclos de preenchimento do reservatório a vazão de 100 µL s^{-1}, seguido de seu esvaziamento pela porta 2 de VS, na qual estão conectados a pré-coluna (PC), coluna (MC) e detector (D) à vazão de 30 µL s^{-1}. Para calibração e análise, 3800 µL de fase móvel são aspirados para o

reservatório da bomba a 100 µL s^{-1} pelas portas 9 e 10 de SV (Figura 8), seguidos de 100 µL da amostra ou solução padrão pela porta 3 de SV. Com isso a linha de amostragem conectada à porta 3 de SV fica preenchida com a solução a ser analisada. Em seguida o excesso de amostra/padrão que penetrou na bobina coletora (Figura 8) é descartado, bombeando-se 300 µL (fase móvel mais o excesso de solução de amostra/padrão) pela porta 1 de VS, que é usada para descarte. Todas essas operações são feitas à vazão de 100 µL s^{-1}. Em seguida, o volume de amostra a ser analisada (20 a 200 µL, dependendo da sensibilidade requerida) é aspirado para o interior da bobina coletora a 100 µL s^{-1} e então injetada e bombeada através da coluna e detector a 30 µL s^{-1}. Simultaneamente a aquisição de dados do detector é acionada. O tempo de integração do detector foi de 50 ms no caso de emprego de celas convencionais de 10 ou 40 mm de caminho óptico (223 nm). Para a cela de longo caminho óptico (100 cm) o tempo de integração utilizado foi de 500 ms em 238 nm. Todas as operações e configurações são comandadas pelo software FIAlab For Windows 5.0.

3.2.1.2 Análise por HPLC

Os procedimentos por HPLC foram realizados com eluição isocrática com fase móvel composta por 70:30 MeOH: tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7, usando alça de amostragem de 20 µL. A vazão de fase móvel foi de 1,2 mL min^{-1}. A detecção foi realizada a 223 nm.

3.2.1.3 Amostras

As amostras de água foram coletadas em dois reservatórios utilizados para o abastecimento de água da região metropolitana de São Paulo (Brasil). Outras amostras

foram coletadas nos reservatórios do Rio Atibaia, próximo ao município de Americana (Estado de São Paulo), em uma área agrícola com cultivo de cana-de-açúcar, onde triazinas são usadas extensivamente. Uma amostrada de água de torneira também foi coletada para análise. As amostras de água foram filtradas através de uma membrana de acetato de celulose de 0,45 µm e estocadas em geladeira a 4^0C.

3.2.2 Cinética de adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico empregando monitoramento on-line por Cromatografia por Injeção Sequencial

Para estes estudos foi utilizado o sistema de cromatografia líquida (descrito no item 3.1., Figura 8) com modificações. Para contornar problemas crônicos de vazamentos, a válvula seletora Cheminert® foi substituída por uma válvula de aço inox resistente a pressões de 5000 psi. Para isso foi necessário reconfigurar o sistema de preenchimento do reservatório da bomba e de eluição da coluna. Conforme mostra a Figura 10, essas reconfigurações foram:

1- Uma check-valve foi adaptada à entrada do reservatório da bomba.
2- A ckeck-valve foi ainda conectada a uma válvula de duas vias de acionamento eletrônico através do software FIAlab for Windows.
3- A porta 9 da VS foi fechada com tubo de Teflon sólido.

Assim, para preenchimento do reservatório, a porta 9 de VS é selecionada e a válvula de duas vias é ligada (posição “on” na Figura 10). Com a retração do pistão, a solução do frasco de fase móvel (FM_1) entra no reservatório através da válvula de duas vias e da check-valve. Todas as outras operações são feitas com a válvula de duas vias desligada (posição “off”), de modo que para aspirar soluções para o interior da bobina coletora, aciona-se a porta desejada de VS e envia-se o comando de aspiração para a

bomba. Como a válvula de duas vias na posição “off” fecha o contato com o frasco de fase móvel (FM_1), essa não é aspirada para o interior do reservatório da bomba. Já durante as etapas de eluição, durante a qual a pressão aumenta, a check-valve impede que a solução de fase móvel retorne ao frasco de origem (a válvula de duas vias nesse caso não resistiria à pressão).

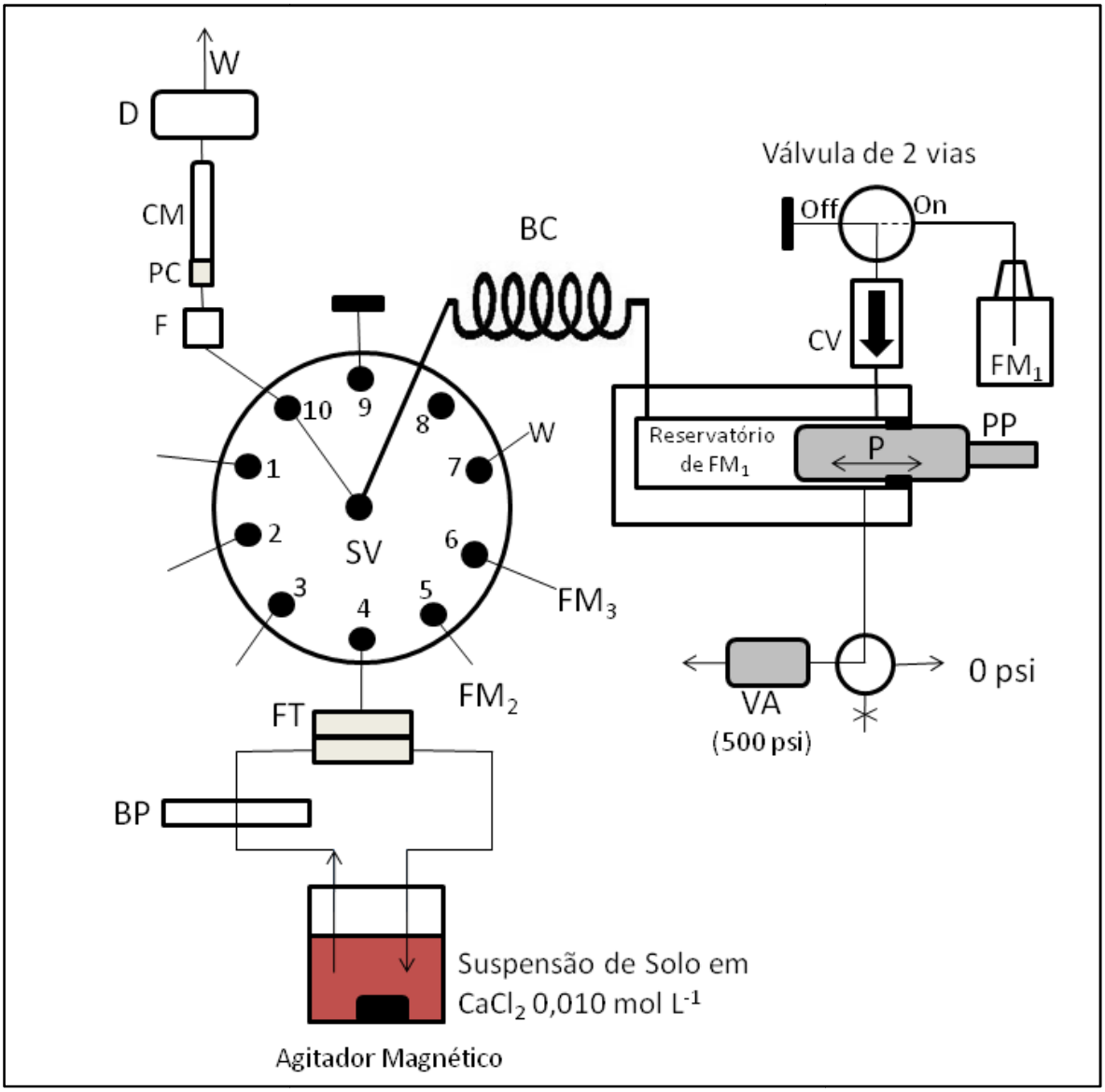


Figura 10: Sistema SIChrom™ de cromatografia a liquido por injeção seqüencial com válvula seletora (VS) de alta pressão (5000 psi). A entrada de fase móvel no reservatório da bomba é feito selecionando-se a porta 9 de VS (fechada com Teflon sólido) e acionando-se a válvula de duas vias (“on”). Com a retração do pistão a fase móvel é aspirada do frasco passando pela válvula de duas via e pela check-valve (CV na entrada do reservatório. As demais notações são idênticas às da Figura 08, com a adaptação do sistema de amostragem para estudos de adsorção, onde FT = Filtro Tangencial, BP = Bomba Peristáltica. Para a eluição foram usadas três composições de fase móvel: FM_1 = 28% (v v^{-1}) MeOH: NH_4Ac 1,25 mmol L^{-1} pH 4,7; FM_2 = 40% (v v^{-1}) MeOH: NH_4Ac 1,25 mmol L^{-1} pH 4,7 e FM_3 = 50 % (v v^{-1}) MeOH: NH_4Ac 1,25 mmol L^{-1} pH 4,7.

Para a determinação simultânea de seis compostos (as três triazinas, simazina, atrazina e propazina, além dos metabólitos hidroxiatrazina, desetilatrazina e desisopropilatrazina, cujas estruturas são mostradas na Figura 11) foi desenvolvida uma metodologia baseada na eluição passo a passo (Rigobello-Masini *et al*, 2008) com concentrações crescentes de metanol, seguida de etapa final de recondicionamento da coluna.

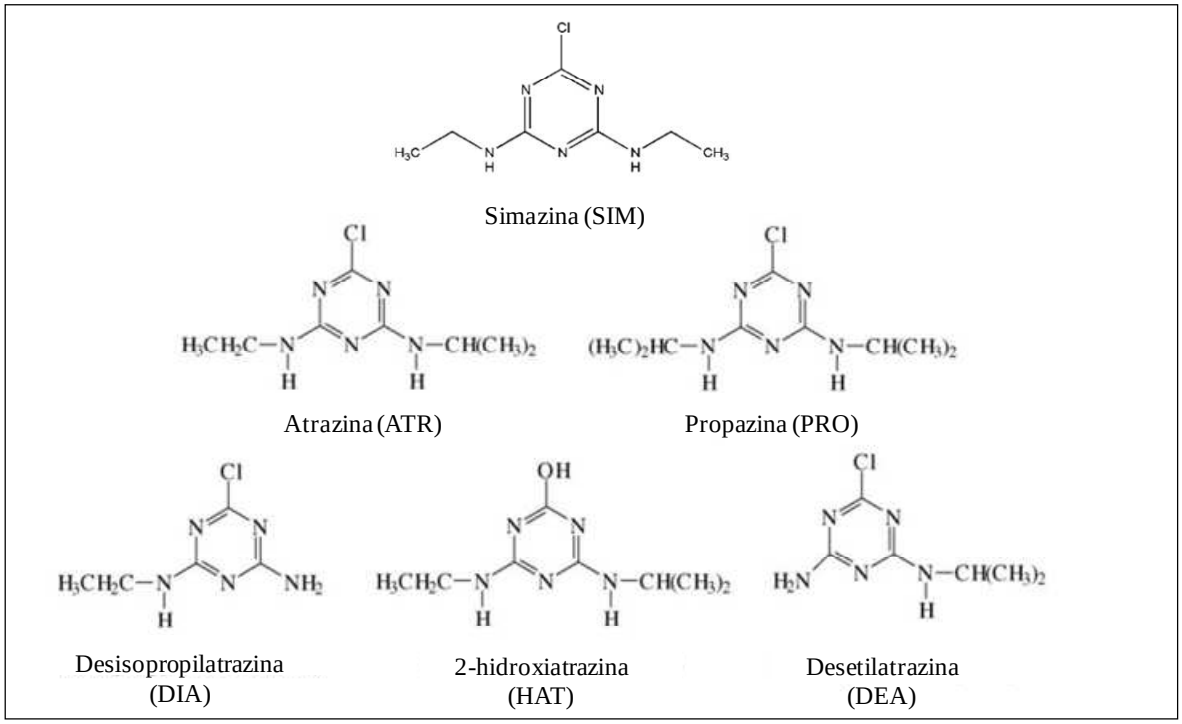


Figura 11: Representação da fórmula estrutural dos herbicidas e metabólitos em estudo.

O procedimento de análise é descrito a seguir: inicialmente a válvula seletora é conectada à porta 9 e então, a válvula de 2 vias é ligada e aspiram-se para a bobina coletora 3700 µL da FM_1, a válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora é então conectada à porta 4 (porta da amostra/padrão) e aspiram-se 100 µL de amostra ou padrão para a bobina coletora (agora com 3800 µL). A válvula seletora é conectada à porta 1 (descarte) e são descartados 200 µL da bobina coletora (restam 3600 µL na bobina coletora). A válvula seletora é conectada à porta 4 e são aspirados para a bobina coletora 400 µL de amostra ou

padrão (bobina coletora totalmente preenchida com 4000 µL), todos estes passos são realizados à uma vazão de 100 µL 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 30 µL s^{-1}. A válvula seletora é conectada à porta 9. A válvula de 2 vias é novamente ligada, aspiram-se 2200 µL da FM_1 à uma vazão de 100 µL s^{-1}. A válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora conecta-se a porta 5 e são aspirados 1800 µL de FM_2 para a bobina coletora à uma vazão de 100 µL s^{-1}. A válvula seletora é conectada à porta 10 e são enviados para a coluna 1800 µL de FM_2 contida na bobina coletora a uma vazão de 30 µL s^{-1}. A válvula seletora é conectada à porta 6 e são aspirados 1800 µL da FM_3 para a bobina coletora à uma vazão de 100 µL s^{-1}. A válvula seletora conecta-se a porta 10 e são enviados para a coluna os 1500 µL de FM_3 a uma vazão de 30 µL s^{-1}. A válvula seletora é conectada novamente à porta 6 e são aspirados 1500 µL da FM_3 para a bobina coletora à uma vazão de 100 µL s^{-1}. A válvula seletora conecta-se a porta 10 e são enviados para a coluna 4000 µL a uma vazão de 30 µL s^{-1}A válvula seletora conecta-se a porta 9, a válvula de 2 vias é ligada e são aspirados para a bobina coletora 2000 µL da FM_1 (esta etapa é realizada para recondicionamento da coluna com a fase móvel principal) à uma vazão de 100 µL s^{-1}. A válvula de 2 vias é desligada. A válvula seletora conecta-se a porta 10 e são enviados para a coluna os 2000 µL da FM_1 a uma vazão de 30 µL s^{-1}. O sistema então está pronto para a próxima análise.

Para os estudos de adsorção on-line foi adaptado ao sistema, na porta de amostragem, um sistema de filtração tangencial (Figura 12 e 13) A-sep Applikon® (Dependable Instruments, Schiedam, Holanda) com uma membrana filtrante de acetato de celulose 0,2 µm, conectado a uma bomba peristáltica responsável pela recirculação através do sistema de filtração da suspensão, contida em um béquer, composta por solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}, o adsorvente (solo, ácido húmico, ou solo na presença de ácido

húmico) e um mix de atrazina (ATR), propazina (PRO), simazina (SIM), desisopropilatrazina (DIA), desetilatrazina (DEA), 2-hidroxiatrazina (HAT), sendo os três últimos metabólitos da atrazina.

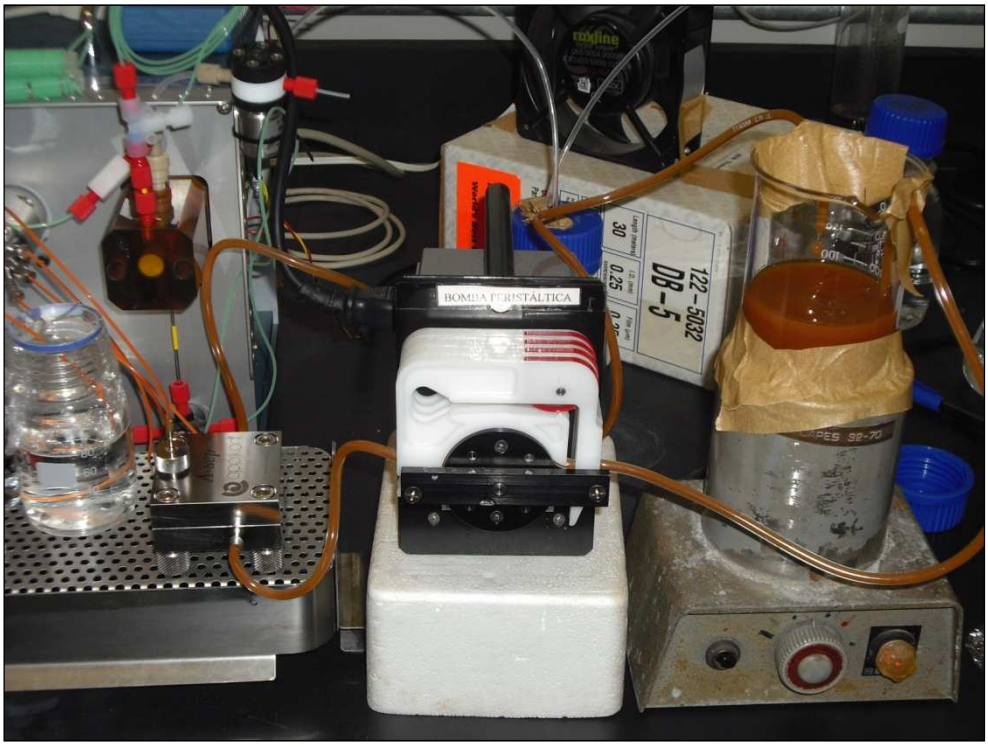


Figura 12: Sistema utilizado para os estudo cinéticos, em destaque da esquerda para a direita: filtro tangencial, bomba peristáltica, béquer com a suspensão em estudo, agitador.magnético.

Figura 13: Visão geral do sistema utilizado para os estudos cinéticos, da esquerda para a direita: computador para controle de operações e aquisição de dados, fonte UV/detector, SIC, filtro tangencial, bomba peristáltica, béquer com a suspensão em estudo, agitador magnético.

As soluções estoque de atrazina, propazina, simazina, desisopropilatrazina, desetilatrazina e 2-hidroxiatrazina, foram preparadas em uma concentração de 500 mg L^{-1} em metanol.

Para a preparação da fase móvel foi utilizado metanol grau HPLC, água deionizada e tampão acetato de amônio. A fase móvel foi filtrada com membrana de 0,45 µm LCR-PTFE, levada ao ultra-som por 15 min e, durante o experimento foi utilizado Hélio como desgasificador.

Foi preparada uma solução de $CaCl_2$ 0,02 mol L^{-1}, para utilização nas preparações das suspensões de solo, ácido húmico e ácido húmico na presença de solo. O $CaCl_2$ é utilizado em função das normas para os estudos de adsorção (OECD Guideline For The Testing Of Chemicals).

Foi preparada uma solução de ácido húmico 1,0 g L^{-1}, posteriormente usada para os estudos de adsorção em ácido húmico e em solo na presença de ácido húmico.

A amostra de solo foi previamente seca em estufa sob vácuo a uma temperatura de 60°C até peso constante, a mesma foi então armazenada em dissecador a vácuo até o momento da realização dos ensaios.

Foram realizados estudos de adsorção em duas etapas distintas. Na primeira etapa foram analisadas suspensões de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico. A cada suspensão foi adicionado uma determinada quantidade de DIA, DEA, HAT, SIM, ATR, PRO, para que a mesma tivesse uma concentração inicial de 1,0 mg L^{-1}. O pH de todas as suspensões foi ajustado para 5,3 valor este igual ao valor de pH da amostra de solo em $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}. Para os estudos na suspensão de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico foram realizadas 8 injeções consecutivas, com um tempo aproximado de 11 min cada, totalizando 1 h e 46 min (aproximadamente 90 min) de monitoramento. Os volumes das soluções de $CaCl_2$ e ácido húmico, assim como a massa

de solo utilizada para a preparação de cada suspensão, desta primeira etapa do estudo, estão descritos na Tabela 3, abaixo:

Tabela 3: Quantidades de água deionizada, solução de $CaCl_2$, solução de ácido húmico e massa de solo, utilizadas para a preparação de suspensões e sua concentração final.

	Volume de $CaCl_2$ 0,02 mol L^{-1} (mL)	Volume de H_2O deionizada (mL)	Volume de Ácido húmico 1g L^{-1} (mL)	Massa de Solo (g)	Concentração da suspensão
Ácido húmico	50	25	25	-	0,25 g L^{-1} de ácido húmico em $CaCl_2$ 0,001 mol L^{-1}
Solo + ácido húmico	50	25	25	2,5	0,025 g L^{-1} de solo, 0,25 g L^{-1} de ácido húmico em$CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}
Solo	50	50	-	2,5	0,025 g L^{-1} em $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}

Os ensaios, para cada suspensão em estudo, foram realizados em duplicata.

Numa segunda etapa, foi realizado o estudo apenas em uma amostra de solo. Em um béquer foram adicionados 100 mL de uma solução 0,010 mol l^{-1}de $CaCl_2$, 2,5 g de solo e uma determinada quantidade de DIA, DEA, HAT, SIM, ATR, PRO, para que a suspensão de solo tivesse uma concentração inicial de 1,0 mg L^{-1}. Para este estudo foi realizado, um monitoramento de 24 h, com análisess das alíquotas (filtradas) da suspensão contida no béquer, nos seguintes tempos: 1 min (logo após a adição do mix dos compostos), 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h.

Para o estudo de adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo foi montado o sistema com a bomba peristáltica e o filtro tangencial conectado à porta 4 de amostra do SIC (Figuras 14 e 15), ligados por mangueiras a um béquer contendo 50 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,02 mol L^{-1} e 50 mL de água deionizada, com o valor de pH ajustado à 5,3 que é valor do pH da amostra de solo disponível no laboratório. Inicialmente analisou-se um branco de água deionizada, em seguida, analisou-se uma alíquota da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}, logo após adicionou-se uma massa de 2,5 g de solo, procedeu-se a leitura de uma alíquota da suspensão contida no béquer, que durante a aspiração foi filtrada, para a remoção de partículas de solo presentes, pela membrana filtrante do sistema de filtração tangencial (Figura 15). Foi então, adicionado uma determinada quantidade dos seis compostos em estudo, de modo que a concentração inicial fosse de 1,0 mg L^{-1} e uma alíquota foi filtrada e analisada (tempo 1 min). A partir desse momento foram realizadas mais sete injeções consecutivas da suspensão contida no béquer.

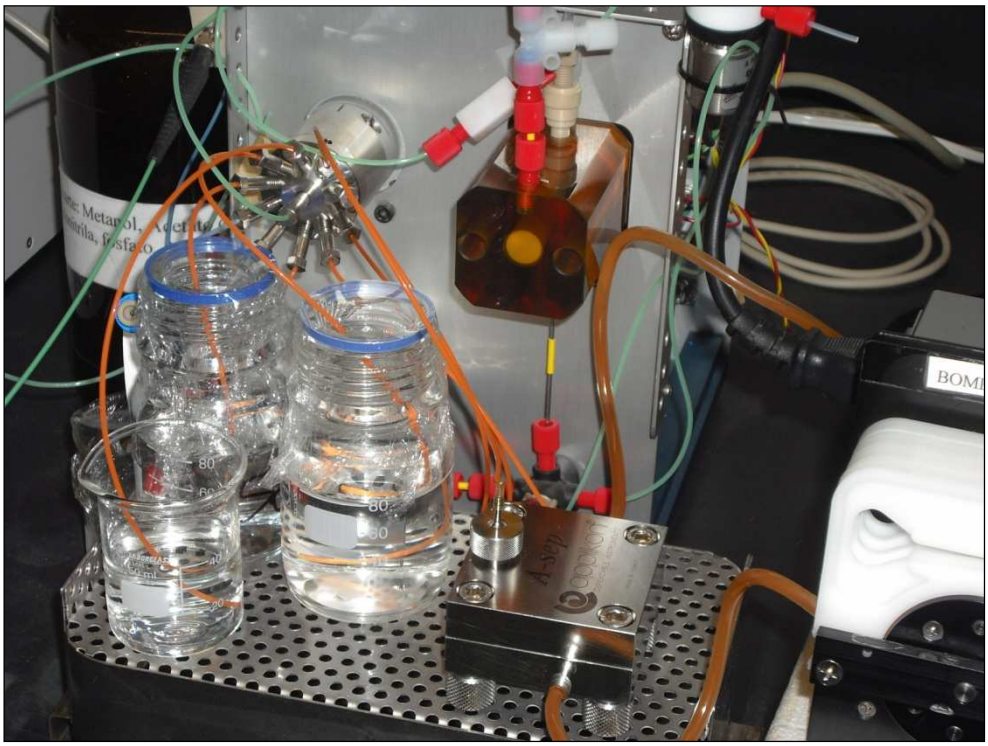


Figura 14: Sistema de filtração tangencial, em destaque, conectado ao SIC.

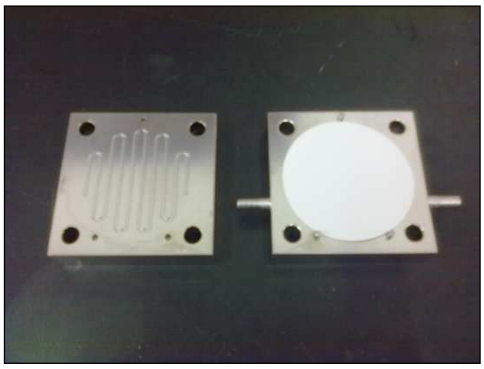
a)  b)

Figura 15: Detalhe do filtro tangencial. a) filtro tangencial com "caminhos" por onde percorre o liquido, b) filtro tangencial com a membrana filtrante colocada para remoção de partículas e impurezas da amostra.

Todas as alíquotas da suspensão, contida no béquer foram filtradas no momento da aspiração, antes de serem encaminhadas para a coluna monolítica. A suspensão contida no béquer permaneceu sob constante agitação e recirculação durante todo o estudo.

Para o estudo utilizando como adsorvente ácido húmico, o procedimento foi semelhante ao utilizado para o estudo em solo. A suspensão de ácido húmico foi preparada em béquer onde foram adicionados 50 mL da solução de $CaCl_2$ 0,020 mol L, 25 mL de uma solução de ácido húmico 1,0 g L^{-1} e 25 mL de água deionizada, o pH da suspensão foi então ajustado para 5,3. Inicialmente analisou-se um branco de água destilada, em seguida uma amostra da solução de $CaCl_2$ na concentração de 0,010 mol L^{-1} e, uma amostra da suspensão de ácido húmico contida no béquer, que durante a aspiração foi filtrada, para a remoção de partículas de ácido húmico presentes (na forma de um precipitado coloidal de humato de cálcio), pela membrana filtrante do sistema de filtração tangencial. Foi então, adicionado uma determinada quantidade dos compostos em estudo, de modo a obter uma concentração inicial de 1 mg L^{-1} e uma alíquota foi filtrada e analisada (tempo 1 min), a partir desse momento foram realizadas mais sete injeções consecutivas da suspensão contida no béquer. Por último, nesta primeira etapa do estudo, foi utilizado como adsorvente uma amostra de solo na presença de ácido húmico. Para a preparação da

suspensão foram adicionados em um béquer 50,0 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,020 mol L^{-1}, 25,0 mL de uma solução de ácido húmico 1,0 g L^{-1}, 2,50 g de solo e 25,0 mL de H_2O deionizada. A suspensão foi então deixada por 24 h sob agitação para que ocorressem as possíveis interações entre o solo e o ácido húmico. Após esse período o pH da suspensão foi ajustado pra 5,3. Procedeu-se então às análisess conforme descrito para o solo e para o ácido húmico.

Para a segunda etapa do estudo, com tempo de contato de 24 h entre os compostos e solo por, redefiniu-se a composição da fase móvel 1 (FM_1). As composições definidas foram de 15, 40 e 50% MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM, pH 4,7.

Após essas etapas, iniciou-se o estudo de adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo. Foi então, montado o sistema com a bomba peristáltica e o filtro tangencial. Em um béquer foram adicionados 100 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1} com o pH ajustado para 5,3. Então, foram adaptadas mangueiras ao béquer, bomba peristáltica e filtro tangencial, para que a solução/suspensão contida no mesmo permanecesse em recirculação pelo sistema durante todo o estudo.

Inicialmente foi realizada a leitura de um branco de água deionizada, em seguida a leitura de um branco da solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}, a leitura do extrato de solo em meio de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1} previamente filtrado e, um mix do compostos na concentração de 1,0 mg L^{-1} (1000 µg L^{-1}) em um extrato filtrado da amostra de solo em meio $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}. Os extratos foram preparados da seguinte forma: em dois tubos de centrifuga adicionaram-se a cada tubo, 0,25 g de solo e 10 mL da solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}, os mesmos foram deixados sob agitação por um período de 24 h. Após este período, os tubos foram levados a centrifugação a 3500 rpm por 15 min. Em seguida, foi retirado o sobrenadante de cada tubo e os mesmos foram filtrados. Uma fração do sobrenadante filtrado foi separada para posterior análise, outra fração foi utilizada para a

preparação do mix dos compostos na matriz da amostra. Para isso foi retirada uma alíquota de 20 µL de cada padrão, da solução estoque de 500 mg L^{-1} em meio MeOH, levadas a um balão volumétrico de 10 mL e o volume do mesmo foi completado com a fração filtrada do extrato do solo em meio $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}.

Após estas leituras, foi adicionado ao béquer contendo 100 mL de uma solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1} o mix dos compostos em estudo perfazendo-se uma concentração de 1,0 mg L^{-1} de DIA, DEA, HAT, SIM, ATR, PRO. Ligou-se a bomba peristáltica e a agitação magnética e a solução começou a circular pelo sistema de filtração tangencial. Procedeu-se então a leitura de uma alíquota de 400 µL da solução contida no béquer. No momento da aspiração desta alíquota pelo SIC a mesma, foi filtrada pela membrana filtrante de acetato de celulose 0,2 µm presente no sistema de filtração tangencial. O mesmo ocorreu com as demais alíquotas analisadas sendo que, a filtragem ocorre somente no momento da aspiração da alíquota.

Finalmente adicionou-se ao béquer contendo a solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1} na presença de um mix dos compostos em estudo na concentração de 1,0 mg L^{-1}, 2,5 g de solo, obtendo-se dessa forma uma suspensão de 100 mL de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}, na presença de 2,5 g de solo, com uma concentração inicial de 1,0 mg L^{-1} de DIA, DEA, HAT, SIM, ATR, PRO. Após a homogeneização da suspensão no béquer e da mesma percorrer toda a linha do sistema composto pela bomba peristáltica e pelo filtro tangencial, aspirou-se a primeira alíquota (t_0 ~1min) dando-se inicio ao estudo de adsorção. O sistema permaneceu em constante agitação e circulação pelo sistema. As demais alíquotas foram aspiradas, filtradas para remoção das partículas de solo presentes e, analisadas nos seguintes intervalos de tempo (a partir de t_0): 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h.

4 Resultados e discussão

4.1 Determinação de triazinas por Cromatografia por Injeção Sequencial empregando cela de longo caminho óptico

4.1.1 Utilização da cela de longo caminho óptico com guia de onda

Inicialmente utilizou-se uma cela convencional com 4 cm de caminho óptico e a detecção foi realizada a 223 nm. Ao utilizarmos a cela com 100 cm de caminho óptico e o mesmo comprimento de onda utilizado com a cela de 4 cm não se observou ganho de sinal analítico, ao contrário do que ocorreu com o ruído, que aumentou. O comprimento de onda então foi alterado para 238 nm, onde se observou ganho de sinal analítico e não o aumento do ruído. Essa alteração foi necessária, pois a transmissão da LCW para comprimentos de onda menores que 225 nm é muito baixa, apresentando um aumento intenso a partir de 230 nm. A fase móvel utilizada foi de 44:56 MeOH:1,25 mM acetato de amônio pH 4,7. A mudança de comprimento de onda pode estar relacionada com o mecanismo de transporte da radiação no interior da cela de longo caminho óptico. O sinal analítico foi monitorado em dois diferentes comprimentos de onda e o mesmo comportamento foi observado em todas as injeções. Assim, a obtenção dos espectros de absorção para a LCW, utilizando o comprimento de máxima absorção, observando a fase móvel utilizada, é uma recomendação para o desenvolvimento de métodos cromatográficos empregando SIC e LCW.

Ocorreu um aumento de área e de altura de pico com aumento do volume de amostra de 50 µL até 200 µL. Perda de linearidade e efeitos de memória passaram a ser observados para volumes de amostra > 200 µL. O volume de amostra utilizado para o restante do estudo, diante do observado, foi de 200 µL.

Para definição da composição da fase móvel para a cela de 100 cm foi realizado um estudo da mesma. Foram utilizadas duas composições uma com 50% de MeOH e outra com 44% de MeOH (Figura 16). A composição de 50% de MeOH separa os compostos em estudo na cela de 4 cm porém, não ocorre separação satisfatória na cela de 100 cm onde a simazina não se separa totalmente do pico referente ao volume morto da coluna, tendo a sua resolução prejudicada, assim como a resolução entre simazina e atrazina. Essa perda de resolução pode ser causada pela maior dispersão das zonas de soluto que ocorre dentro da cela, a qual tem um volume interno de 250 µL (a cela de 4 cm possui um volume interno de 10 µL), levando a uma remistura parcial dos analitos separados na coluna. Outro problema observado para essa composição é a linha base que não está bem definida, dificultando a integração dos picos e o cálculo das áreas dos mesmos, problema este causado pelo gradiente de índice de refração (diferentes índices de refração na mesma zona de amostra) e pelo efeito de lente (diminuição da absorção de luz) que intensifica o sinal do volume morto (sinal com absorbância negativa) (Infante, Rocha, 2008). O efeito Schlieren, poderia ser contornado monitorando-se as diferentes absorbâncias obtidas no comprimento de onda analítico e em um comprimento de onda onde não ocorre absorção. No entanto, não foi possível utilizar esta estratégia pois para a LCW em 238 nm necessita-se um alto tempo de integração (500 ms) o que satura o detector em comprimentos maiores que 300 nm.

Estes problemas foram resolvidos diminuindo-se a proporção de metanol de 50 para 44 % de MeOH, levando a um aumento dos tempos de retenção. Com a proporção de 44% de MeOH os três compostos em estudo são eluidos em menos de 300 s (tempo de separação, sem contar o tempo de amostragem) apresentando boa separação entre os picos da simazina atrazina e propazina.

Para a composição com 44% de MeOH se observou uma diminuição da intensidade do sinal em relação ao observado para a composição anterior, porém, na análise de um mix das três triazinas em estudo ocorreu a total separação entre pico do sistema e a simazina, bem como entre esta e a atrazina. A linha base também ficou mais bem definida facilitando a localização dos picos e o cálculo da área dos mesmos, ficando então a composição definida para o estudo tendo 44% MeOH. Devido ao aumento dos tempos de retenção para a composição definida em relação a composição de 50 % de MeOH, a bomba coletora precisou ser preenchida novamente após a eluição da atrazina para que ocorresse a eluição e a detecção da propazina.

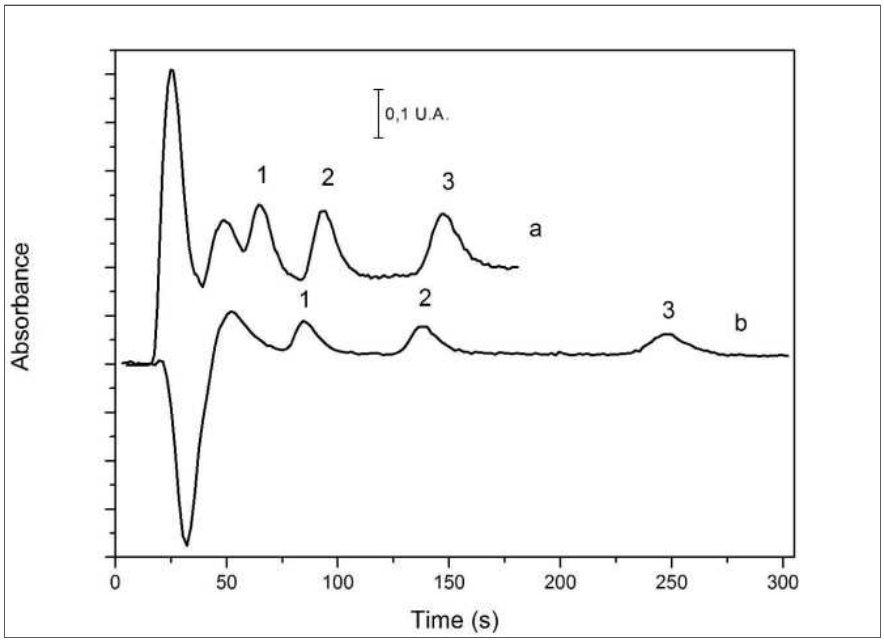


Figura 16: Estudo da composição da fase móvel na separação da simazina (1), atrazina (2) e propazina (3) para uma concentração de 50 µg L^{-1}. (a) 50:50 MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7. (b) 44:56 MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7.

Após a definição da composição da fase móvel, foi avaliada a vazão considerando que colunas monolíticas permitem trabalhar a altas vazões sem o aumento significativo de pressão, porém com fluxos superiores a 30 µL s^{-1} ocorre sobrepressão no sistema e a fase móvel vaza pela válvula de alívio, o que não pode ocorrer. Definiu-se então como vazão de

fase móvel 30 µL s^{-1} (1,8 mL min^{-1}). Com esta vazão as alturas de picos e as resoluções não foram afetadas.

Na etapa do estudo onde foram comparados os sinais analíticos utilizando-se a cela convencional de 4 cm e a cela de longo caminho óptico com 100 cm (Figura 17) a concentração do mix de simazina, atrazina e propazina utilizado foi de 50 µg L^{-1}, o volume de amostra utilizado foi de 200 µL, a vazão de fase móvel utilizada foi de 30 µL s^{-1}, a composição da mesma foi de 44:56 (v v^{-1}) MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7.

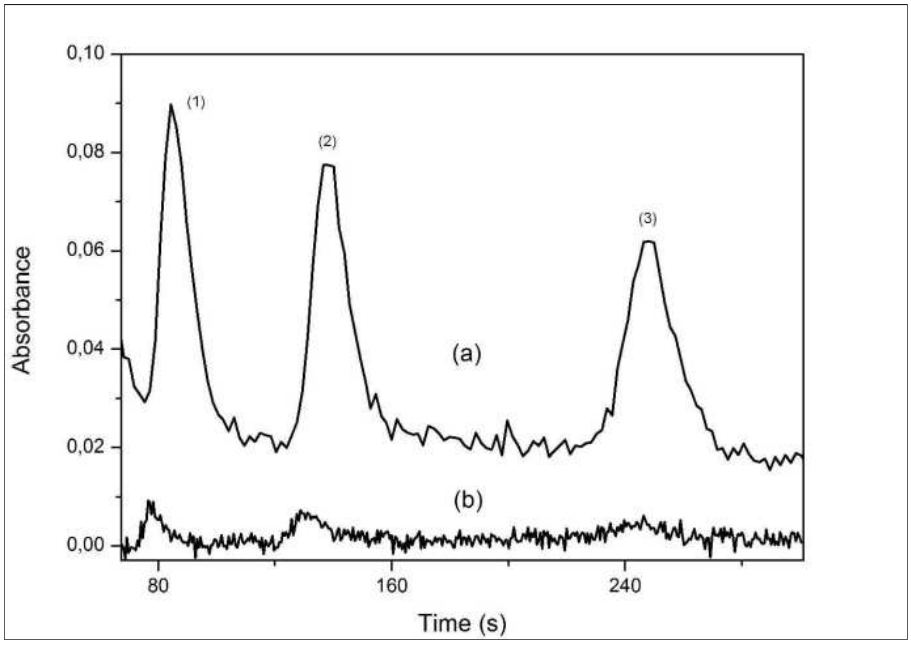


Figura 17: Comparação do sinal analítico para cela de 100 cm (a) e para cela de 4 cm (b). (1) simazina, (2) atrazina, (3) propazina.

O ganho de sinal analítico, ao utilizarmos a cela de longo caminho óptico, fica evidente. O caminho óptico aumentou 25 vezes e era esperado um aumento proporcional do sinal analítico, porém isto não ocorreu devido à maior dispersão das zonas de soluto que ocorre dentro da cela de 100 cm.

Os limites de detecção e quantificação (LOD – do inglês *Limit of Detection,* LOQ – do inglês *Limito of Quantification*) para as triazinas em estudo, obtidos com a cela de

longo caminho óptico foram cerca de 8 vezes menores para a simazina e atrazina e cerca de 5 vezes menores para a propazina (Tabela 4), ficando estes valores abaixo dos recomendados pela US-EPA (US-EPA, 2006) que permite para águas potáveis uma concentração de 3 µg L^{-1} para a atrazina, 4 µg L^{-1} para a simazina e 10 µg L^{-1} para a propazina. Em trabalhos relatados na literatura utilizando HPLC/UV, os valores de LOD obtidos para a atrazina e simazina variam entre 2 a 32 µg L^{-1} (Martínez *et al.*, 2002; Zarpon *et al.*, 2006; Tran *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2007) e até 55 µg L^{-1} para a propazina (Tran *et al.*, 2007), de modo que na maioria dos casos, uma etapa de pré-concentração, como a extração em fase sólida (SPE – do inglês *Solid Phase Extraction*), é necessária para a quantificação de triazinas em águas. A curva analítica de referência para simazina, atrazina e propazina foi construída, a partir da solução estoque de 500 µg L^{-1}, em concentrações que variaram 50 à 700 µg L^{-1} para a cela de 4 cm e, 5 à 200 µg L^{-1} para cela de 100 cm. Os valores dos coeficientes de correlação linear (r), dos coeficientes de inclinação da reta (B), dos tempos de retenção (t_R) e os valores de LOD e LOQ estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros analíticos avaliados para curva analítica de referência para a atrazina, propazina e simazina com concentrações entre 5 e 700 µg L^{-1}, tempo de retenção (t_R), coeficiente angular da reta (B), coeficiente de correlação linear (r), limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ).

Padrão	t_R (s)	B	r	LOD (µg L^{-1})	LOQ (µg L^{-1})
		Cela de 100 cm			
Simazina	64,1±0,7	0,039±0,001	0,998	2,3	7,5
Atrazina	97,9±0,8	0,044±0,001	0,997	1,8	5,9
Propazina	187,9±0,7	0,038±0,001	0,997	4,55	15
		Cela de 4 cm			
Simazina	68,5±2	0,0046±0,0002	0,996	17	56
Atrazina	98,7±2,7	0,0053±0,0001	0,999	15	49
Propazina	188,1±5,4	0,0048±0,0001	0,997	24	81

Neste estudo o LOD e o LOQ foram calculados multiplicando-se por 3 vezes o valor do desvio padrão de 10 injeções consecutivas do menor ponto da curva e, dividindo-se o valor obtido pelo coeficiente de inclinação da reta (B).

Comparado as duas técnicas utilizadas, a cromatografia por injeção sequencial ganha destaque em alguns pontos como curtos tempos de análise, baixo consumo de solventes e menor custo instrumental. Os tempos de retenção obtidos em HPLC (utilizando coluna empacotada com partículas de 4 µm, fase móvel com composição de 70:30 MeOH:1,25 mM acetato de amônio pH 4,7, cela convencional de 1 cm, eluição isocrática, vazão de fase móvel igual a 1,2 mL min^{-1} e detecção a 223 nm) foram 347, 555 e 941 s para a simazina, atrazina e propazina, respectivamente. O consumo de MeOH, para eluir a propazina que é o último composto a ser eluido, é de 13,2 mL. O tempo de retenção da propazina em SIC foi de 187,9 s, obtido utilizando fase móvel com 44:56 MeOH:1,25 mM acetato de amônio pH 4,7 com uma vazão de 1,8 mL min^{-1}, consumindo ao final da eluição da propazina 2,48 mL de MeOH. Assim, é possível estimar que a metodologia do SIC é cerca de cinco vezes mais rápida do que o método empregando HPLC e consome cerca de 5 vezes menos solvente orgânico por análise. Está comparação só é valida se utilizarmos em HPLC colunas empacotadas com partículas de 4-5 µm. Se forem utilizadas colunas monolíticas em HPLC será possível empregar vazões muito superiores às empregadas em SIC, sem limitações de contrapressão, com a possibilidade de utilizar colunas de diversos tamanhos, o que conduziria a maiores frequências de amostragens e melhores eficiências de separação. Por outro lado, mesmo usando colunas monolíticas em HPLC, o menor consumo de solventes é um ponto a favor do SIC, uma vez que neste o fluxo de fase móvel é descontinuo, dispensando solvente apenas durante o tempo de análise, diferentemente do que ocorre em HPLC que opera em fluxo contínuo durante o carregamento do loop de amostragem.

4.1.2 Amostras

Foi realizado um estudo de adição e recuperação das triazinas em estudos em amostras de águas naturais. O estudo foi realizado por *Spike* das amostras com 50 µg L^{-1} de simazina, atrazina e propazina. Esse estudo foi realizado de maneira comparativa entre o sistema SIC e o HPLC/UV. Para o estudo realizado no HPLC utilizou-se uma coluna C_{18} convencional empacotada (4 µm, 150 mm x 4,60 mm), a composição da fase móvel foi de 70:30 MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM pH 4,7 com uma vazão de 1,2 mL min^{-1}, cela convencional de 1 cm, eluição isocrática, e detecção a 223 nm Para os estudos no SIC os parâmetros utilizados foram os mesmo da construção da curva analítica. Os resultados com os valores de recuperação obtidos (em µg L^{-1}) estão descritos na Tabela 5.

Os valores de recuperação obtidos para o estudo utilizando-se o SIC ficaram entre 76 e 113,2%, já para o HPLC os valores ficaram entre 86 e 104%. Para ambas as técnicas os valores de recuperação obtidos podem ser considerados aceitáveis (Zanella *et al.*, 2000).

É importante comentar que no HPLC foi utilizada uma coluna convencional e não uma coluna monolítica como a usado no SIC. Colunas monolíticas podem ser utilizadas em HPLC tendo um melhor desempenho do que quando utilizadas no SIC, pois em HPLC pode-se trabalhar a vazões mais elevadas do que no SIC devido a configurações do sistema, porém em questão de economia de solventes o SIC leva vantagem, pois o bombeamento da fase móvel não é constante como ocorre com o HPLC, promovendo assim uma considerável economia de solventes.

A Figura 18 mostra a sobreposição de cromatogramas obtidos no SIC usando uma vazão de fase móvel de 30 µL s^{-1} com composição de 44:56 MeOH:tampão acetato, tendo como volume de injeção de padrão/amostra 200 µL. No cromatograma da água de rio observa-se um pico muito intenso na região do volume morto da coluna (aproximadamente em 30s), o qual é devido a compostos polares presentes na amostra e com alta absorção no

ultravioleta, mas que não interagem com a fase estacionária apolar (C_{18}) da coluna monolítica. Tais compostos são provavelmente constituintes da matéria orgânica dissolvida, constituída por substâncias húmicas, polissacarídeos, nitrato, etc, demonstrando uma eficiente eliminação das interferências de matriz no método proposto.

Tabela 5: Valores de concentração obtidos para amostras de água de rio e de torneira enriquecidas com 50 µg L^{-1} das três triazinas em estudo.

Triazina	Amostra										t [b]
	1 [c]		2 [c]		3 [d]		4 [c]		5 [c]		
	HPLC	SIC	HPLC	SIC	HPLC	SIC	HPLC	SIC	HPLC	SIC	
Simazina	47 ± 0,2 [a]	42 ± 1	51 ± 1	38,1 ± 2	52 ± 4	41 ± 2	50,7 ± 0,4	41 ± 1	50,4 ± 10	53 ± 1	2,59
Atrazina	46,7 ± 0,2	49,6 ± 1,3	43 ± 7	46,4 ± 1	50 ± 5	53 ± 1	49 ± 4	51 ± 2	47,5 ± 0,6	43,5 ± 0,5	-0,92
Propazina	47 ± 1	52 ± 2	50 ± 4	48 ± 1	44 ± 7	52 ± 1	44 ± 2	53 ± 2	49 ± 10	56,6 ± 0,1	-2,38

[a] = Desvio padrão da triplica para os experimentos;
[b] = Valor critico de |t| para 4 graus de liberdade e nível de confiança de 95% = 2,78;
[c] = amostra de água de rio ou represa;
[d] = amostra de água de torneira.

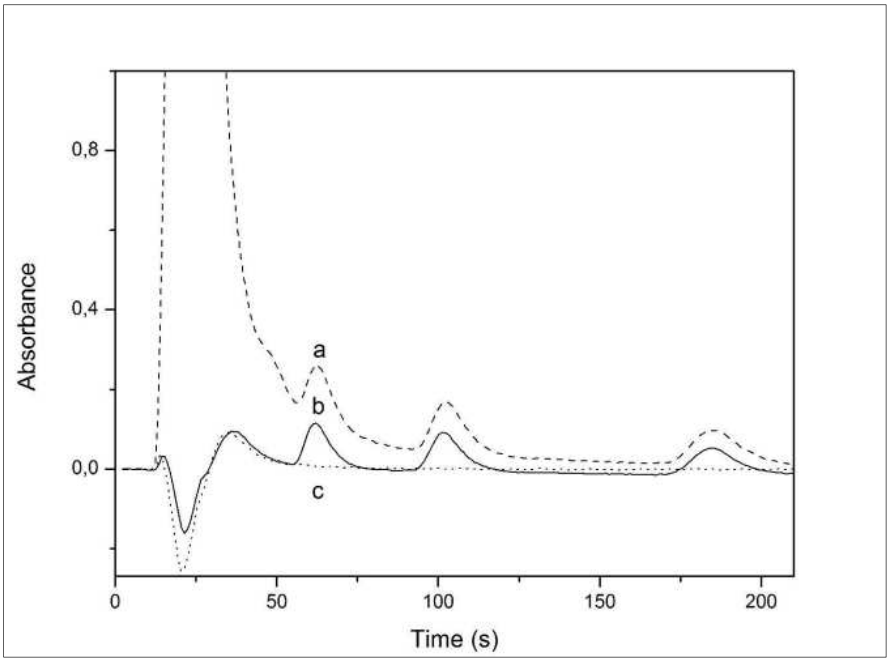


Figura 18: Sobreposição de cromatogramas obtidos no SIC onde (a) amostra de rio fortificada com o padrão de 50 µg L^{-1} das triazinas, (b) padrão de 50 µg L^{-1} em água deionizada, (c) branco de água deionizada.

O acoplamento da cela de longo caminho óptico com guia de onda (LCW) em cromatografia por injeção sequencial (SIC) permitiu que se atingissem limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) melhores do que os obtidos em HPLC e abaixo dos níveis recomendados pela US-EPA para águas potáveis, sem a necessidade de realização de etapas de pré-concentração. Foi necessária uma pequena mudança na composição da fase móvel em relação à composição para celas convencionais de 1 e 4 cm. Vale ressaltar aqui que o SIC obteve menor consumo de solventes orgânicos do que o consumo obtido por HPLC. Os tempos de análise em SIC foram mais rápidos dos que os tempos de análise em HPLC (utilizando em HPLC uma coluna empacota convencional com partículas de 4 µm e 15 cm de comprimento, possibilitando uma frequência de amostragem maior). Outra característica relevante do SIC é o menor custo instrumental em relação ao elevado custo instrumental de sistemas HPLC.

4.2. Adsorção de triazinas e metabólitos da atrazina em solo empregando monitoramento on-line por Cromatografia por Injeção Sequencial

4.2.1 Estudo com as suspensões de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico

Para este estudo foi utilizada a cela convencional com 4 cm de caminho óptico. Inicialmente, foram realizados estudos para avaliar a melhor composição de fase móvel para a separação de seis compostos em estudo: simazina (SIM), atrazina (ATR) e propazina (PRO), além dos metabólitos desisopropilatrazina (DIA), desetilatrazina (DEA) e 2-hidroxiatrazina (HAT). Para que ocorresse a separação dos seis compostos a eluição foi realizada em gradiente de eluição, sendo que na cromatografia por injeção sequencial isso é feito por eluição passo a passo (Rigobello-Masini *et al*, 2008) com incrementos discretos do modificador orgânico da fase móvel. Isso é necessário, pois contrariamente aos sistemas de HPLC em que o fluxo de fase móvel é contínuo, havendo disponibilidade de duas bombas que permitem a realização de gradientes lineares, o sistema SIC dispõe de uma única bomba e uma única válvula seletora. Foram realizados diversos testes com composições variando entre 10 e 70% MeOH. A partir desse estudo definiu-se a composição ideal para a eluição passo a passo, ficando a mesma em 28, 40 e 50% MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM, pH 4,7.

Foram realizados, também, diversos testes para a definição do melhor volume de injeção de amostra/padrão. Para isso variou-se o volume entre 50 a 500 µL, definindo-se então 400 µL como o volume de adequado, pois os melhores sinais analíticos para os compostos em estudo ocorreram com os volumes de 400 e 500 µL, sendo que não ocorreram diferenças significativas nos sinais analíticos entre os volumes de 400 e 500 µL, optando-se por utilizar o volume de 400 µL para as demais etapas dos estudos, em função da economia de padrão e amostra. Utilizando-se esse volume ocorreram alargamentos de

banda, porém sem afetar significativamente a resolução dos compostos em estudo, diferentemente do que ocorreu no estudo anterior onde foi empregada a LCW que com volumes superiores a 200 µL apresentaram alargamento de banda que afetava a resolução dos compostos em estudo, causando também perda de linearidade e efeitos de memória que podem ser causados pela maior dispersão das zonas de soluto que ocorre dentro da cela de 100 cm. A Figura 19 mostra um cromatograma obtido para um branco de água deionizada, realizado com a composição da fase móvel e o volume de amostra definidos.

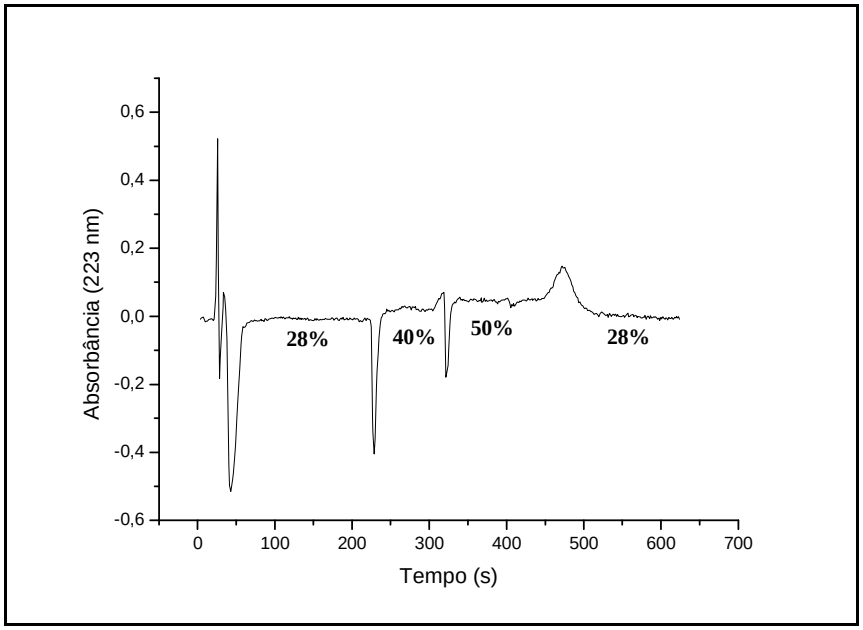


Figura 19: Cromatograma de um branco para água deionizada, demonstrando o gradiente de eluição definido para os estudos. Em ambas as etapas de eluição a vazão de fase móvel utilizada foi de 30 µL s^{-1}.

A Figura 20 mostra um cromatograma para um padrão de 1 mg L^{-1} dos seis compostos em estudo:

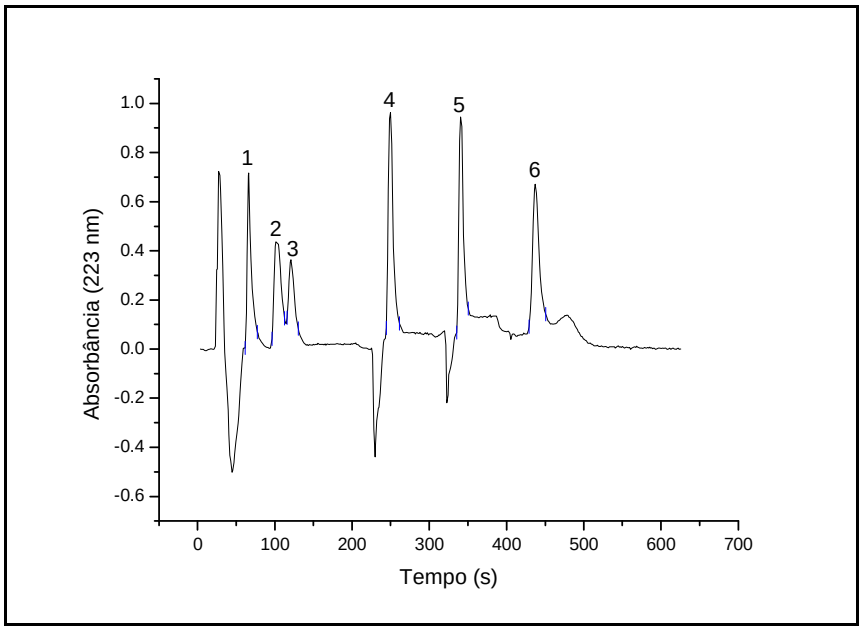


Figura 20: Cromatograma para um padrão de 1 mg L^{-1} dos seis compostos em estudo, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO). DIA, DEA, HAT eluídos com 28% de MeOH; SIM eluido com 40% de MeOH; ATR, PRO eluidos com 50% de MeOH. Em ambas as etapas de eluição a vazão de fase móvel utilizada foi de 30 $\mu L\ s^{-1}$.

A composição do gradiente de fase móvel, como já foi dito, utilizada para o estudo foi de 28, 40 e 50% MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM, pH 4,7. Para a eluição dos três primeiros compostos, dos seis em estudo, DIA, DEA e HAT foi necessária a composição com 28% MeOH. Para a eluição do quarto composto, SIM foi necessária a composição com 40% de MeOH. Para a eluição dos dois últimos compostos, ATR e PRO foi utilizada a composição com 50% MeOH. Antes do final de cada análise a coluna foi recondicionada com a composição de 28% de MeOH para a realização das próximas análises.

Os picos do sistema inicial e final, assim como a queda do sinal (absorbância negativa), são causados pelo gradiente de índice de refração causada pela mudança brusca da composição de fase móvel (efeito Schlieren).

4.2.1.1 Curva analítica de referência

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada para concentrações que variaram de 100 à 1000 µg L^{-1}.

Os valores dos coeficientes de correlação linear (r), dos coeficientes angulares da reta (B), dos tempos de retenção (t_R) e do limites de detecção (LOD) estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros analíticos avaliados para a curva analítica de referência, para as triazinas e metabólitos da atrazina em estudo, com concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}, tempo de retenção (t_R), limite de detecção (LOD), coeficiente angular da reta (B) e coeficiente de correlação linear (r).

	t_R (min)	LOD (µg L^{-1})	B ($x10^3$)	R
DIA	1,10 ± 0,01	67,1	4,38±0,13	0,9986
DEA	1,72 ± 0,02	68,8	3,95±0,12	0,9985
HAT	2,05 ± 0,02	82,1	2,23±0,08	0,9979
SIM	4,14 ± 0,02	57,3	6,88±0,18	0,9990
ATR	5,68 ± 0,02	66,5	5,38±0,16	0,9986
PRO	7,27 ± 0,03	17,2	5,97±0,05	0,9999

Os valores dos limites de detecção e quantificação estão altos, mas o objetivo deste estudo é demonstrar a aplicabilidade do sistema montado para monitoramento on-line de processos de adsorção de pesticidas em diferentes tipos de adsorventes. O limite de detecção foi calculado a partir da equação LOD = 3 SD/B, onde SD é o desvio padrão de sete medidas da área correspondente à solução de 100 µg L^{-1} das triazinas em estudo e B é o coeficiente angular da curva analítica obtida para a faixa de concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}. Os valores dos coeficientes de correlação lineares obtidos para cada composto em estudo foram maiores que 0,99 e, segundo Ribani *et al.*(2004), um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste adequado dos dados para a linha de regressão.

4.2.1.2 Ensaios de adsorção com as suspensões de solo, ácido húmico e solo na presença de ácido húmico

Inicialmente, foi utilizada como suspensão adsorvente, a suspensão de **solo**. Para esta, primeiramente, foi analisado um branco de água destilada, obtendo-se perfil cromatográfico similar ao da Figura 19. Em seguida, o sistema para monitoramento on-line (descrito no item 3.2.2) foi montado e ligado e, então, procedeu-se a leitura de um branco da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

Foi então adicionado o mix dos compostos na suspensão contida no béquer e efetuada a análise de uma alíquota da suspensão. A partir desse momento foram realizadas mais sete injeções, totalizando oito injeções em um tempo de monitoramento de aproximadamente 90 minutos. Os cromatogramas obtidos para o filtrado antes da adição do mix, logo após a adição e homogeneização da suspensão e ao final dos 90 min são mostrados na Figura 21.

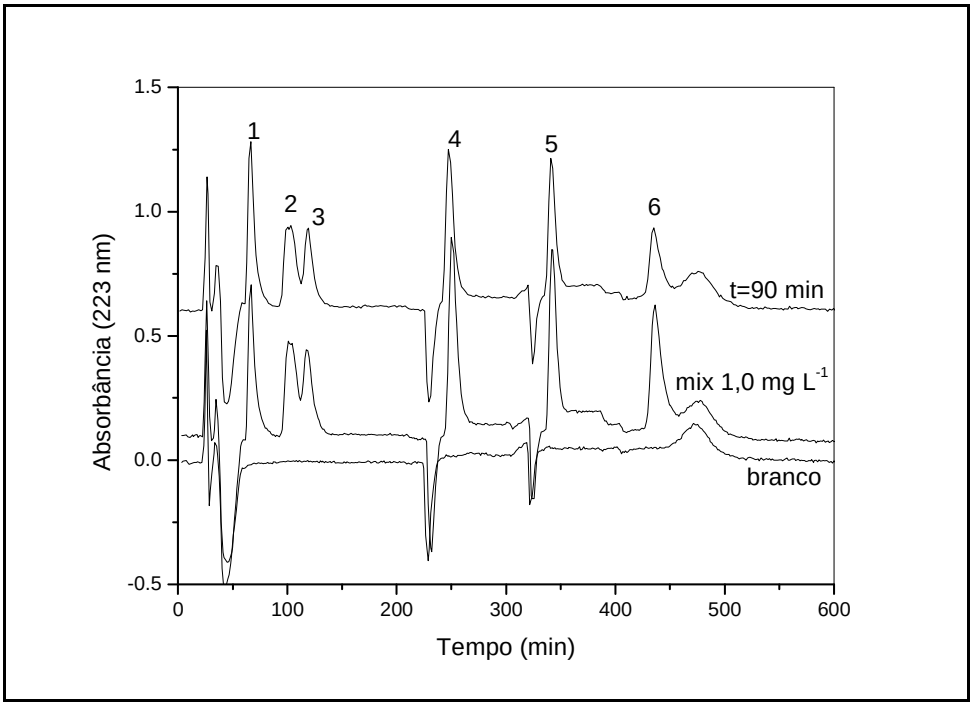


Figura 21: Cromatogramas obtidos em um estudo de adsorção em solo antes da adição do mix de triazinas (branco), de um mix 1000 µg L^{-1} de cada triazina (mix 1,0 mg L^{-1}) e após 90 min de tempo de contato com a suspensão (t = 90 min), onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO).

Com os dados obtidos no estudo tentou-se aplicar modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem (Fontecha-Cámara *et al*., 2008). Estes dois modelos têm sido aplicados a muitos processos de adsorção. Ambos os modelos supõem que a diferença entre a concentração da fase sólida no tempo *t*, representada por *q*, e a concentração na fase sólida no momento do equilíbrio, representada por q_e, é a força que conduz a adsorção. Quando a taxa total de adsorção é proporcional a esta diferença, a cinética obedece a um modelo de pseudo-primeira ordem, mas se for proporcional ao quadrado desta diferença, a cinética segue um modelo de pseudo-segunda ordem.

A ordem de reação e a constante de velocidade podem ser determinadas, a partir dos dados experimentais, pelas equações 1 e 2 abaixo:

$$\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t} = k_1\,(q_\mathrm{e} - q) \qquad (1)$$

$$\frac{\mathrm{d}q}{\mathrm{d}t} = k_2\,(q_\mathrm{e} - q)^2 \qquad (2)$$

onde:

k_1 = constante cinética de pseudo-primeira ordem, em min^{-1}.

k_2 = constante cinética de pseudo-segunda ordem, em g/mg min.

q_e e q = quantidade adsorvida em mg g^{-1}, no momento do equilíbrio e no instante *t*, respectivamente.

Após a integração das equações 1 e 2 obtemos, respectivamente, as equações 3 e 4 descritas abaixo:

$$\ln(q_\mathrm{e} - q) = \ln q_\mathrm{e} - k_1 t \qquad (3)$$

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (4)$$

Da equação 3 observa-se que um gráfico de ln(q_e-q) em função de t deve ser linear, com o coeficiente angular fornecendo a constante cinética k_1. O coeficiente linear permite calcular o valor de q_e. Entretanto, para aplicação desse modelo, o valor de q_e deve ser determinado experimentalmente para possibilitar o cálculo do primeiro termo da equação. Já da equação 4 se observa que o gráfico de t/q em função de t também deve ser linear, com coeficiente angular igual a $1/q_e$, obtendo-se a constante cinética a partir do coeficiente linear e do valor de q_e.

Para os resultados obtidos usando o solo como adsorvente, não foi possível ajustar a equação cinética de pseudo-primeira ordem, mas sim o de pseudo-segunda ordem. É possível estimar uma tendência de adsorção para cada composto (Figura 22). Esta tendência é estimada em µg de cada composto adsorvida por grama de solo (µg g^{-1}) ao final do tempo de contato.

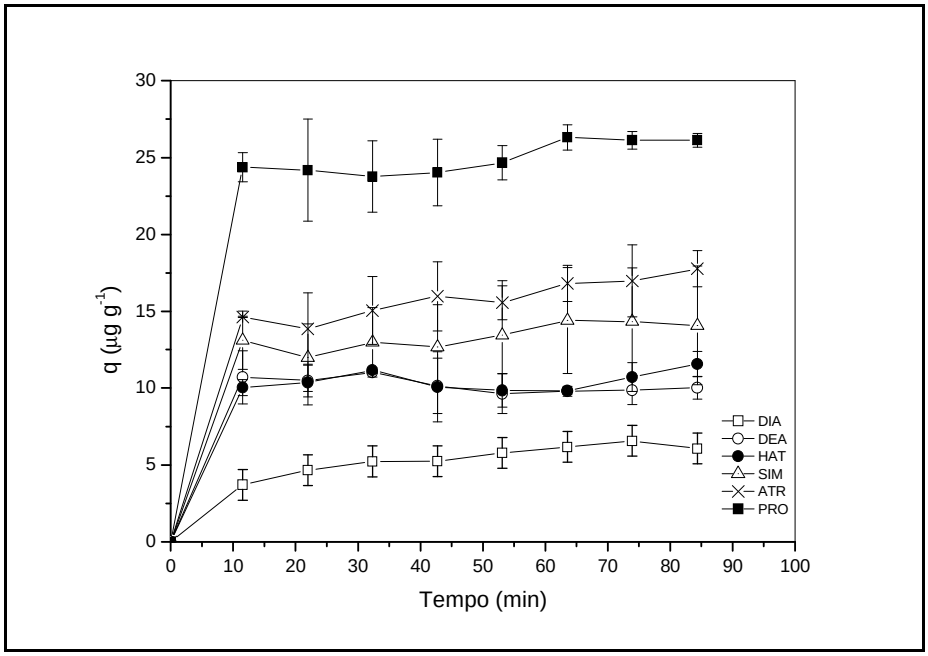


Figura 22: Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO e SIM (em µg de cada composto por grama de) em uma suspensão de solo.

Observando o gráfico pode-se verificar que a propazina (PRO) possui uma afinidade pelo solo bem maior frente aos demais compostos estudados, chegando a adsorver aproximadamente 25 µg por grama de solo, após 90 min de contato do herbicida com a suspensão de solo. Em seguida se observa que ATR e SIM são os herbicidas com maior afinidade pelo solo, com adsorções de cerca de 17 e 13 µg g^{-1}, respectivamente, após 90 min de tempo de contato. DEA e HAT apresentaram comportamento semelhante, com adsorção de cerca de 10 µg g^{-1} ao final do experimento. DIA apresentou uma adsorção de cerca de apenas 6 µg por grama de solo. O parâmetro q_e obtido aplicando-se a equação 4 (a serem mostrados na Tabela 7) é coerente com os valores estimados graficamente.

Para os estudos utilizando uma suspensão de **ácido húmico** como adsorvente, foi primeiramente analisado um branco de água deionizada e um branco da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}, obtendo-se cromatogramas com perfil semelhante ao mostrados na Figura 19.

Em seguida o sistema de monitoramento on-line foi montado e ligado. Uma alíquota da suspensão de ácido húmico contida no béquer foi analisada e obteve-se o cromatograma mostrado na Figura 23.

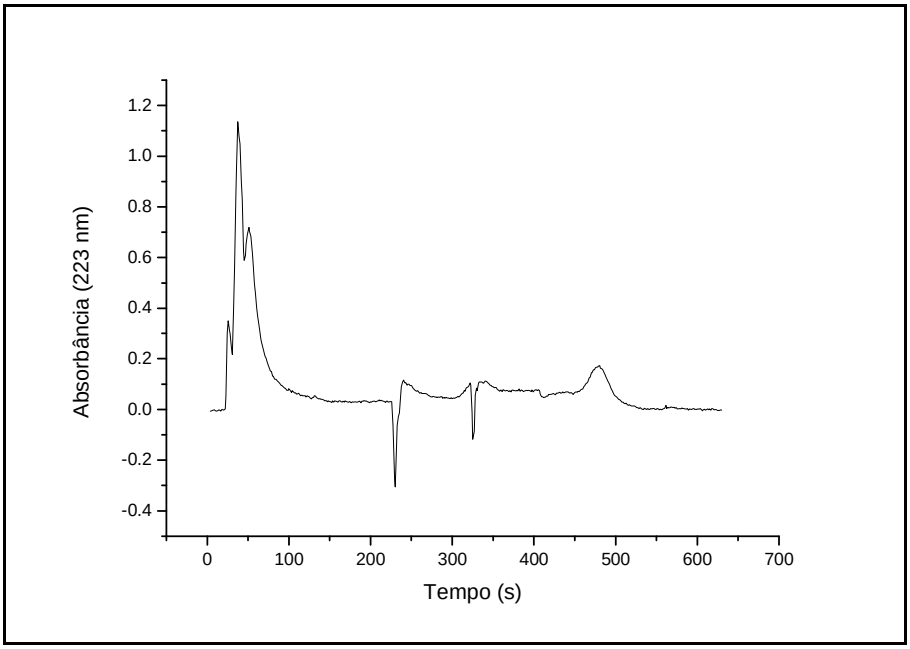


Figura 23: Cromatograma obtido para a análise da suspensão de ácido húmico 0,25 g L^{-1} em meio $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

Analisando o cromatograma acima, pode-se verificar a presença de um pico de absorção logo no início da análise cromatográfica. Este pico refere-se a compostos húmicos, provavelmente ácido fúlvico, presentes em grande concentração na suspensão em estudo, porém o mesmo não trouxe interferências na identificação e separação dos compostos, como se pode verificar na Figura 24.

Foi então adicionado o mix dos compostos na suspensão de ácido húmico contida no béquer e efetuada a análise de uma alíquota da suspensão. A partir desse momento foram realizadas mais sete injeções, totalizando oito injeções e um tempo de monitoramento de aproximadamente 90 minutos. Os cromatogramas da solução inicial do mix e da solução filtrada no final do experimento de adsorção são mostrados na Figura 24 e 25 respectivamente.

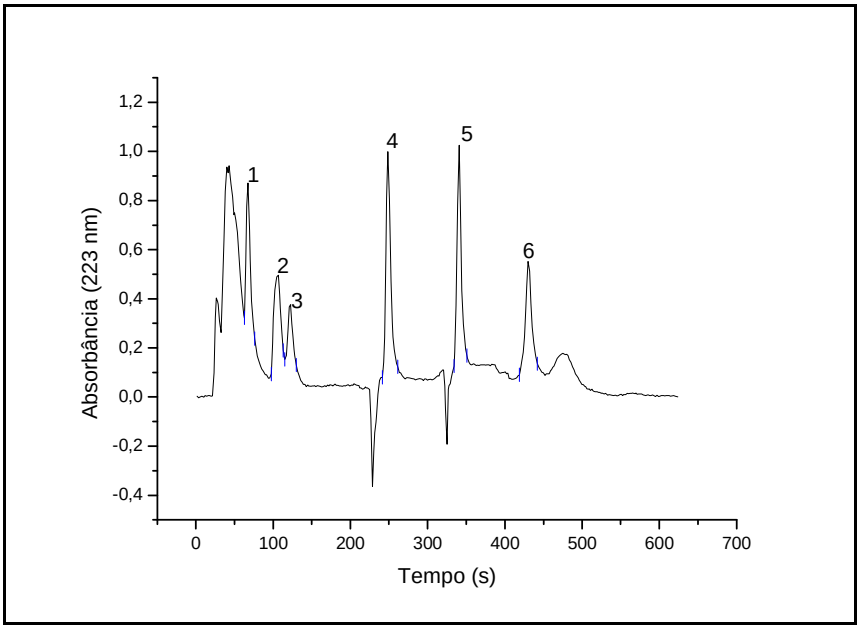


Figura 24: Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L-1 em ácido húmico da primeira alíquota do estudo cinético, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO).

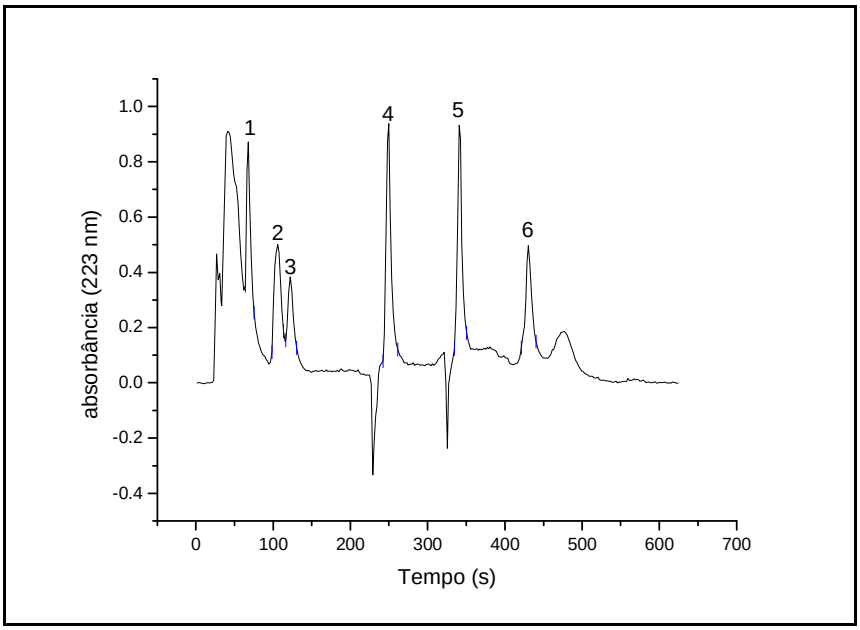


Figura 25: Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em ácido húmico da última alíquota do estudo cinético, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO).

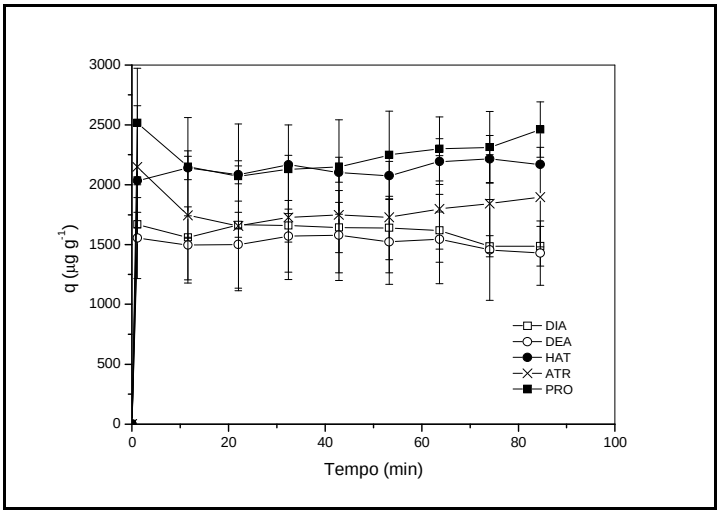


Figura 26: Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO (em µg de cada composto por grama de ácido húmico a cada unidade de tempo) em uma suspensão de ácido húmico.

Figura 26 mostra a variação de q (µg g^{-1}) em função do tempo de contato para os seis compostos estudados. A curva obtida se ajustou ao modelo cinético de pseudo-segunda ordem, permitindo avaliar que em comparação ao solo, tem-se maior adsorção de todos os compostos por massa de adsorvente (Tabela 7), com exceção de SIM, que não

apresentou adsorção. A adsorção utilizando-se ácido húmico variou entre 1500 a 2500 µg g^{-1} para os compostos em estudo enquanto que com o solo essa adsorção variou entre 5 e 25 µg g^{-1}. Nota-se também que a propazina (PRO) passou a ser o composto mais adsorvido (adsorção variando aproximadamente entre 2100 e 2500 µg de PRO por grama de ácido húmico), seguido pela HAT (adsorção variando, aproximadamente, entre 2000 e 2150 µg de HAT por grama de ácido húmico). O herbicida que menos adsorve ao ácido húmico, fora SIM, é a desisopropilatrazina (DIA) (adsorção em torno de 1500 µg por grama de ácido húmico), muito embora não exista uma diferença de adsorção estatisticamente significativa entre DEA e DIA (Tabela 7).

Para os estudos utilizando uma suspensão de **solo na presença de ácido húmico**, como adsorvente, foi primeiramente analisado um branco de água deionizada e um branco da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}, novamente obtendo-se cromatogramas com perfis semelhante ao mostrado na Figura 19.

A suspensão de solo na presença de ácido húmico, previamente preparada conforme o item *3.2.2*, foi então analisada, obtendo-se o cromatograma mostrado na Figura 27.

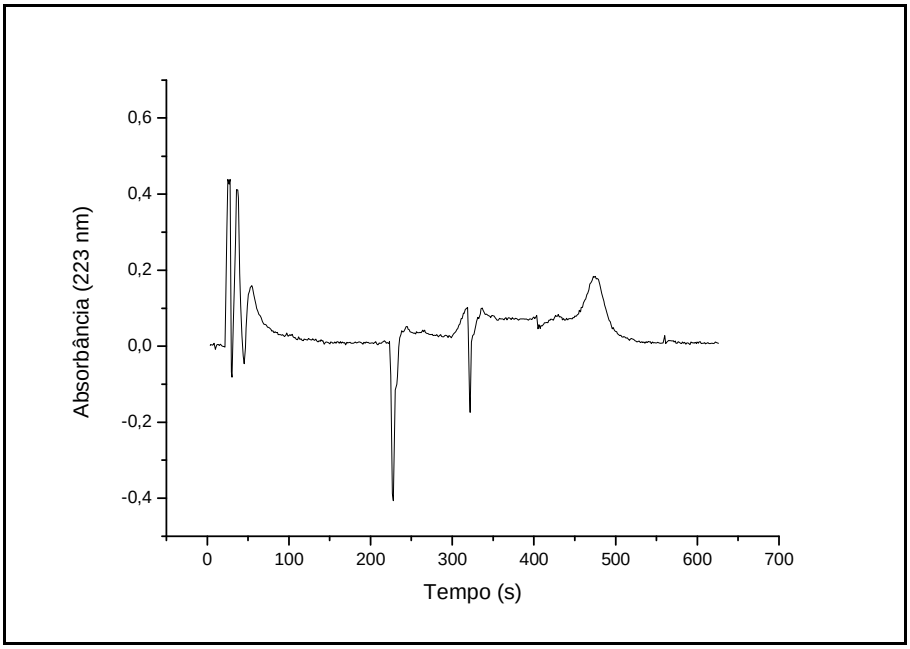


Figura 27: Cromatograma obtido para a análise da suspensão de solo na presença de ácido húmico em meio $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

Analisando o cromatograma acima pode-se observar que o pico de absorção devido às substâncias húmicas (Figura 23) diminuiu consideravelmente, indicando que essas substâncias foram significativamente adsorvidas pelas partículas de solo.

Foi então adicionado à suspensão de solo na presença de ácido húmico o mix dos compostos em estudo. A partir desse momento deu-se início ao monitoramento como descrito para as suspensões de solo e de ácido húmico. Os cromatogramas da solução inicial do mix e da solução filtrada no final do experimento de adsorção são mostrados na Figuras 28 e 29, respectivamente.

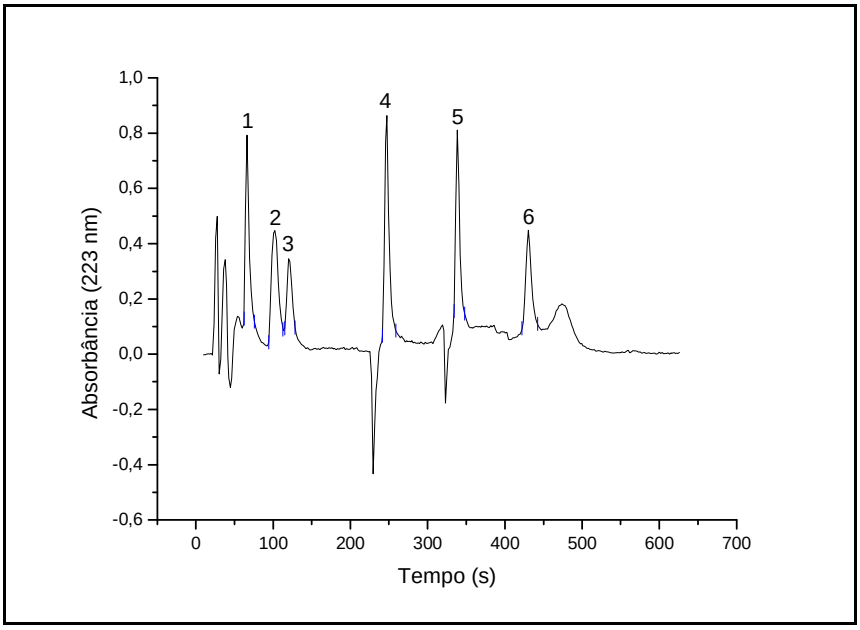


Figura 28: Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L-1 em solo na presença de ácido húmico da primeira alíquota do estudo cinético, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO).

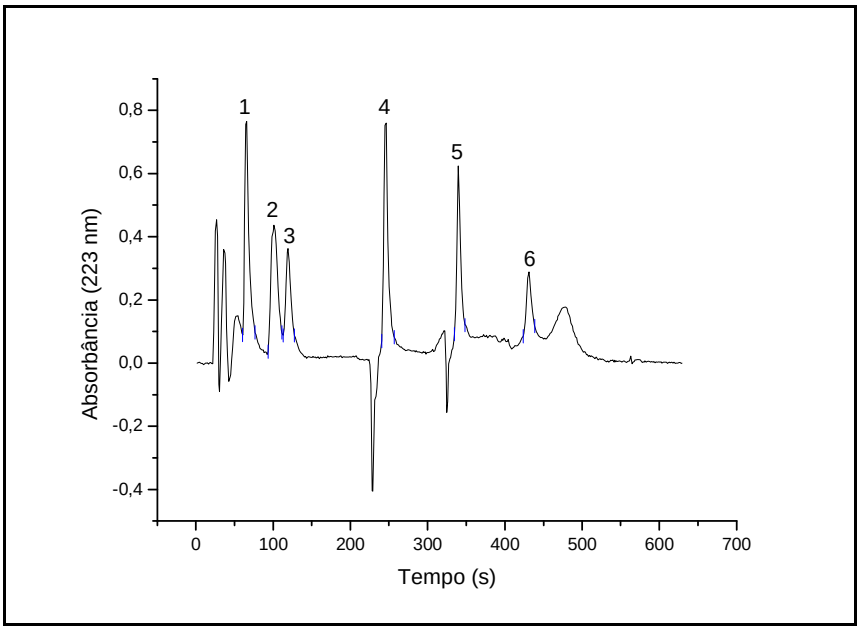


Figura 29: Cromatograma obtido para um mix de 1000 µg L^{-1} em solo na presença de ácido húmico da última alíquota do estudo cinético, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO).

Assim, como nos casos anteriores, os dados apresentaram um bom ajuste à equação de pseudo-segunda ordem. As curvas de adsorção em função do tempo são mostradas na Figura 30.

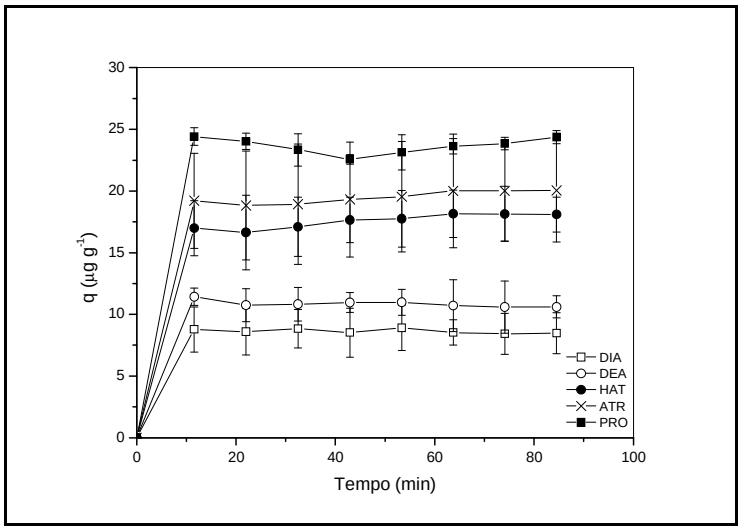
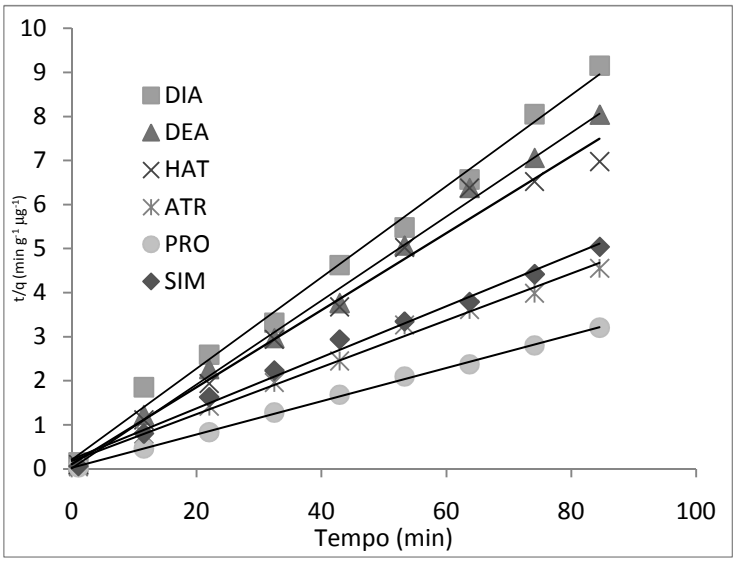
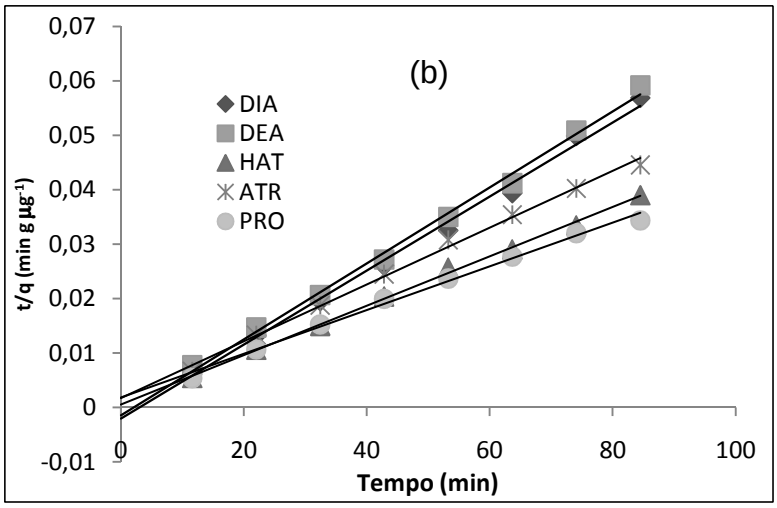


Figura 30: Gráfico demonstrando a tendência de adsorção para DIA, DEA, HAT, ATR, PRO (em µg de cada composto por grama de solo na presença de ácido húmico a cada unidade de tempo) em uma suspensão de solo na presença de ácido húmico.

Para esta suspensão a adsorção dos compostos em estudo é, aproximadamente, entre 8 e 25 µg por grama de adsorvente. O composto que mais é adsorvido, em torno de 25 µg por grama de solo, é a propazina (PRO), seguido pela atrazina (ATR) (adsorção variando, aproximadamente, entre 18 a 20 µg por grama de solo na presença de ácido húmico. O composto que é menos adsorvido pela suspensão de solo na presença de ácido húmico é a DIA com adsorção em torno de 8 µg. Para esta suspensão a simazina (SIM) também não sofreu adsorção e por isso não é apresentada no gráfico.

Os gráficos obtidos para o ajuste dos dados experimentais à equação cinética de pseudo-segunda ordem são mostrados na Figura 31. Os parâmetros k_2 e q_e obtidos do ajuste pro regressão linear são mostrados na Tabela 7. Valores de k_2 negativos não foram apresentados.





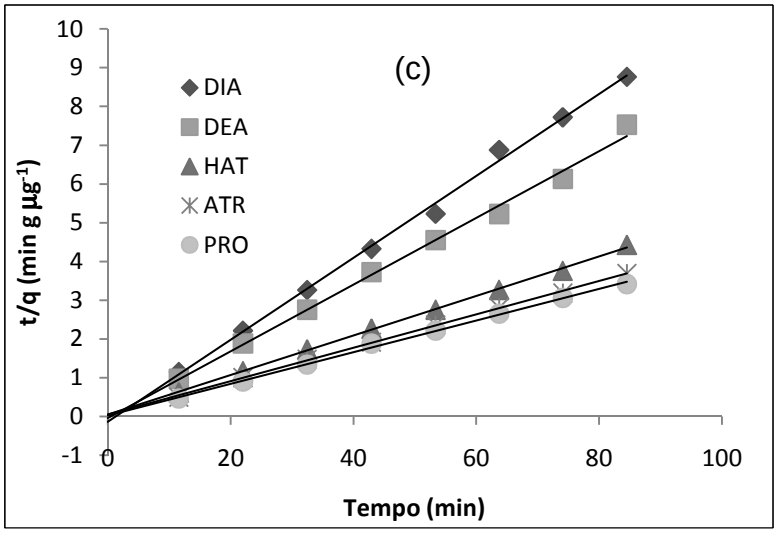


Figura 31: Gráficos de cinética de pseudo-segunda obtidos no experimentos de adsorção em (a) solo, (b) ácido húmico e (c) solo na presença de ácido húmico.

Tabela 7: Parâmetros cinéticos de pseudo-segunda ordem q_e (µg g^{-1}) e k_2 (min g µg^{-1}) calculados para adsorção dos compostos triazínicos em solo, ácido húmico e solo modificado com ácido húmico

Triazina	Parâmetro	Amostra		
		Solo	Ácido Húmico	Solo + Ácido Húmico
DEA	q_e	10,7 ± 0,1	1563 ± 25	10 ± 2
	k_2[a]	-	-	-
	R^2	>0,997	>0,998	>0,995
DIA	q_e	7,1 ± 0,5	1470 ± 43	8 ± 1
	k_2	(7,5 ± 0,9) x 10^{-3}	-	-
	R^2	>0,97	>0,992	> 0,990
HAT	q_e	10,9 ± 0.7	2203 ± 44	18 ± 2
	k_2	0,055 ± 0,02	-	-
	R^2	>0,998	>0,998	>0,992
SIM	q_e	15 ± 2	-	-
	k_2	0,03 ± 0,01	-	-
	R^2	0,993	-	-
ATR	q_e	19,4 ± 0,7	1924 ± 44	23 ± 2
	k_2	(5 ± 2) x 10^{-3}	(1,8 ± 0,8) x 10^{-4}	(8 ± 2) x 10^{-3}
	R^2	>0.992	>0.995	>0.992
PRO	q_e	26,5 ± 0,7	2380 ± 51	29.8 ± 0.2
	k_2	(8 ± 5) x 10^{-3}	(1,6 ± 0,5) x 10^{-4}	(2,4 ± 0,5) x 10^{-3}
	R^2	> 0,98	> 0,997	> 0,995

[a] Valores negativos de k_2 não foram apresentados

Após a análises das suspensões de **solo**, **ácido húmico** e **solo na presença de ácido húmico**, nota-se que a suspensão que mais adsorve os compostos em estudo é a suspensão

de ácido húmico. Dos herbicidas em estudo atrazina (ATR), desetilatrazina (DEA), desisopropilatrazina (DIA), 2-hidroxiatrazina (HAT), propazina (PRO) e simazina (SIM), o que é adsorvido em maior quantidade é a PRO seguida pela ATR. O composto menos adsorvido é a DIA seguido pela DEA. SIM sofreu adsorção apenas na suspensão de solo. A presença do ácido húmico incorporado ao solo interferiu na afinidade de alguns compostos, especialmente HAT, ATR, PRO e SIM, sendo que a presença de ácido húmico aumentou a afinidade dos três primeiros e diminuiu a de SIM pelo adsorvente.

Em termos comparativos, a adsorção de HAT foi a que mais aumentou com a presença de ácido húmico no solo. Os resultados obtidos sugerem que o aumento de matéria orgânica no solo tende a reduzir a mobilidade da ATR, HAT e PRO, aumentando a mobilidade de SIM.

O sistema de monitoramento on-line é de fácil e rápida montagem, desmontagem e limpeza. A filtração da amostra foi efetiva preservando assim a coluna monolítica. Os processos de adsorção mostraram uma primeira etapa muito rápida, na qual a frequência de amostragem do método (5,5 amostragens por hora) não permitiu uma resolução temporal adequada. Entretanto, após essa primeira etapa, os processos tornam-se lentos, com provável ocorrência do fenômeno de difusão intrapartícula. Visando obter maiores informações sobre a cinética dessas interações, optou-se por realizar um monitoramento de 24 horas com a suspensão de solo, conforme será descrito a seguir.

4.2.2 Estudo cinético de 24 h em uma suspensão de solo

Para este estudo cinético com tempo de contato de 24 h na suspensão de solo foi necessário redefinir as composições para a separação dos seis compostos. Isso ocorreu devido a mudanças no tempo de retenção que causaram dificuldades na separação e

identificação dos compostos. Tal mudança no tempo de retenção provavelmente ocorreu devido ao desgaste da coluna monolítica, com perda da capacidade de retenção, levando a perda da resolução entre DEA e HAT.

Como já foi dito anteriormente, para que ocorresse a separação dos seis compostos a eluição foi realizada passo a passo, promovendo a alteração da composição química da fase móvel durante a análise. Redefiniu-se a composição para a eluição passo a passo, ficando a mesma em 15, 40 e 50% MeOH:tampão acetato de amônio 1,25 mM, pH 4,7. O volume de amostra/padrão permaneceu o mesmo do estudo anterior, ou seja, 400 µL.

A Figura 32 mostra um cromatograma obtido para um branco de água deionizada, realizado com a composição da fase móvel e o volume de amostra definidos.

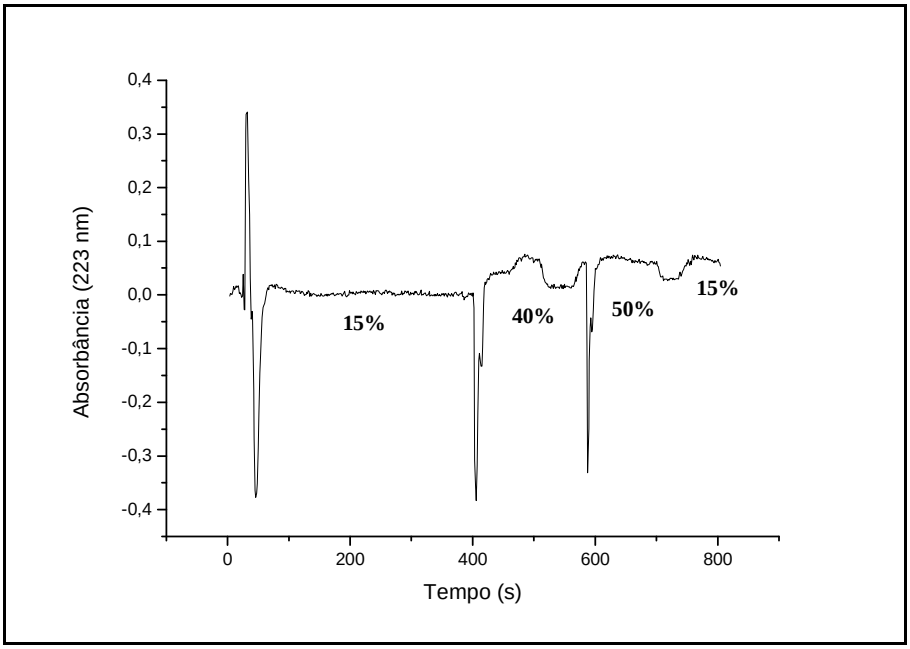


Figura 32: Cromatograma de um branco para água deionizada, demonstrando o gradiente de eluição definido para os estudos. Em ambas as etapas de eluição a vazão de fase móvel utilizada foi de 30 µL s^{-1}.

A Figura 33 mostra um cromatograma para um padrão de 1,0 mg L^{-1} dos seis compostos em estudo.

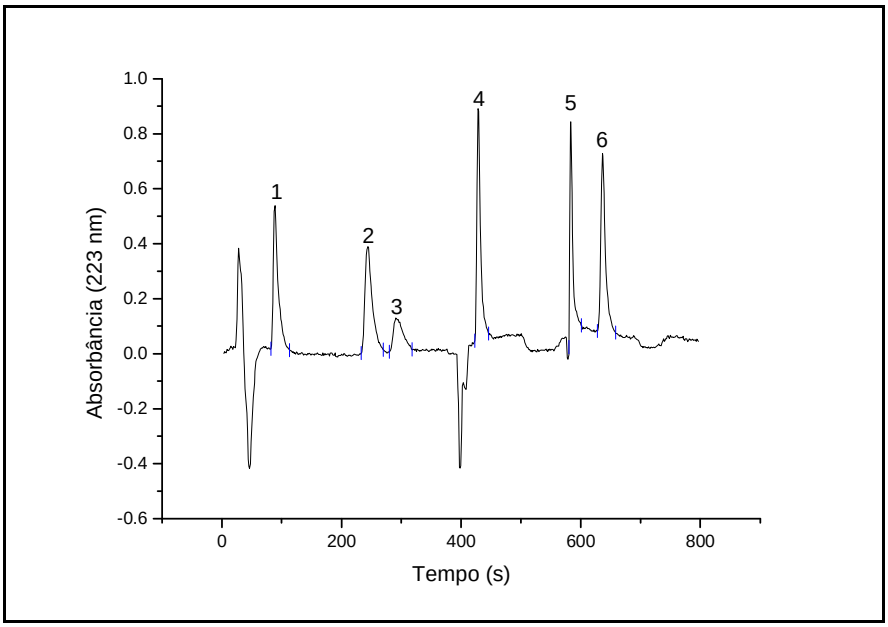


Figura 33: Cromatograma obtido para o mix dos compostos em estudo em uma concentração de 1 mg L^{-1}, onde: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO). DIA, DEA, HAT eluidos com 15% de MeOH; SIM eluido com 40% de MeOH; ATR, PRO eluidos com 50% de MeOH. Em ambas as etapas de eluição a vazão de fase móvel utilizada foi de 30 µL s^{-1}.

Assim, para a eluição e separação dos três primeiros compostos, DIA, DEA e HAT, foi necessária a composição com 15% MeOH (em duas etapas de preenchimento do reservatório da bomba). Para os outros compostos não houve alteração, ou seja, SIM foi eluída com a composição de 40% de MeOH, enquanto para os dois últimos compostos, ATR e PRO, foi utilizada a composição com 50% MeOH. Antes do final de cada análise a coluna foi recondicionada com a composição de 15% de MeOH.

4.2.2.1 Curva analítica de referência

A linearidade do método foi reavaliada através da construção da curva analítica de referência, para os seis compostos em estudo, em concentrações que variaram de 100 à 1000 µg L^{-1}.

Os valores dos coeficientes de correlação linear (r), dos coeficientes de inclinação da reta (B), dos tempos de retenção (t_R) e dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Parâmetros analíticos avaliados para a curva analítica de referência, para as triazinas e metabólitos da atrazina em estudo, com concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}, tempo de retenção (t_R), limite de detecção (LOD), coeficiente angular da reta (B) e coeficiente de correlação linear (r).

	t_R (min)	LOD (µg L^{-1})	B ($x10^3$)	r
DIA	1,50 ± 0,03	36,3	5,02 ± 0,08	0,9996
DEA	4,12 ± 0,05	62,5	5,41 ± 0,15	0,9988
HAT	5,01 ± 0,07	41,5	2,15 ± 0,04	0,9995
SIM	7,21 ± 0,04	47,1	5,66 ± 0,27	0,9969
ATR	9,83 ± 0,04	55,0	4,45 ± 0,26	0,9950
PRO	10,71 ± 0,04	23,9	5,79 ± 0,06	0,9998

*= valor do menor ponto da curva analítica de referência que foi facilmente quantificado.

O limite de detecção foi calculado a partir da equação LOD = 3 SD/B, onde SD é o desvio padrão de sete medidas da área correspondente à solução de 100 µg L^{-1} das triazinas em estudo e B é o coeficiente angular da curva analítica obtida para a faixa de concentração entre 100 e 1000 µg L^{-1}. Os valores dos coeficientes de correlação lineares obtidos para cada composto em estudo foram maiores que 0,99 e, segundo Ribani *et al.*(2004), um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

4.2.2.2 Avaliação do extrato de solo e da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}

Antes do inicio do estudo cinético de 24 h foram avaliadas as recuperações para os extratos de solo e para uma solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}. Foi preparado, utilizando-se a solução filtrada do extrato de solo, um mix dos compostos em estudo, na concentração de 1,0 mg L^{-1}. Também foi preparado um outro mix na mesma concentração utilizando uma

fração da solução de $CaCl_2$ 0,010 mol L^{-1}. O extrato do solo foi preparado conforme descrito no item *3.2.2., pg 59*. A Tabela 9 abaixo, demonstra os resultados obtidos, em µg L^{-1}, para a avaliação do extrato de solo e da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

Tabela 9: Avaliação da recuperação para um mix dos compostos em estudo, na concentração de 1000 µg L^{-1}, preparados com o extrato do solo filtrado e com uma solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

	DIA (µg L^{-1})	DEA (µg L^{-1})	HAT (µg L^{-1})	SIM (µg L^{-1})	ATR (µg L^{-1})	PRO (µg L^{-1})
Extrato solo [a]	97,37%	100,70%	96,87%	105,52%	104,47%	97,27%
$CaCl_2$ [b]	97,49%	93,38%	108,07%	100,30%	100,04%	101,30%

= [a] mix dos 6 compostos em estudo preparado em um extrato de solo em meio de $CaCl_2$ 0,01 mo L^{-1}. O extrato foi preparado conforme o item *3.2.2 pg. 58*.
= [b] mix dos compostos em meio $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}.

Observando a Tabela 9, pode-se notar que as recuperações obtidas, tanto para o extrato do solo como para a solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}, foram superiores a 90%, valor este considerado aceitável pela literatura (Zanella *et al*., 2000) e, demonstrando que nem o solo e nem a solução da $CaCl_2$ interferem significativamente na determinação dos compostos triazínicos utilizando o método de calibração externa.

4.2.2.3 Estudo de adsorção com 24 h de contato com a suspensão de solo

Após a avaliação de um branco de água deionizada, o sistema para o monitoramento foi montado e no béquer foram adicionados 100 mL da solução de $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1} com o pH ajustado para 5,3. Procedeu-se então a análise da solução do béquer e em seguida, adicionou-se à mesma, o mix dos compostos em estudo, para que a solução do béquer ficasse com uma concentração de 1,0 mg L^{-1} e em seguida a mesma foi analisa. Em seguida adicionou-se a massa de solo deu-se início ao monitoramento após 1 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2h, 4h, 8h, 12 h e 24 h de contato sob agitação. A Figura 34 exemplifica os cromatogramas obtidos nos tempos de contato 0 min (antes de adicionar o solo ao mix

de triazinas), 1 min (imediatamente após a adição do solo e homogeneização da suspensão), 12 h e 24 h.

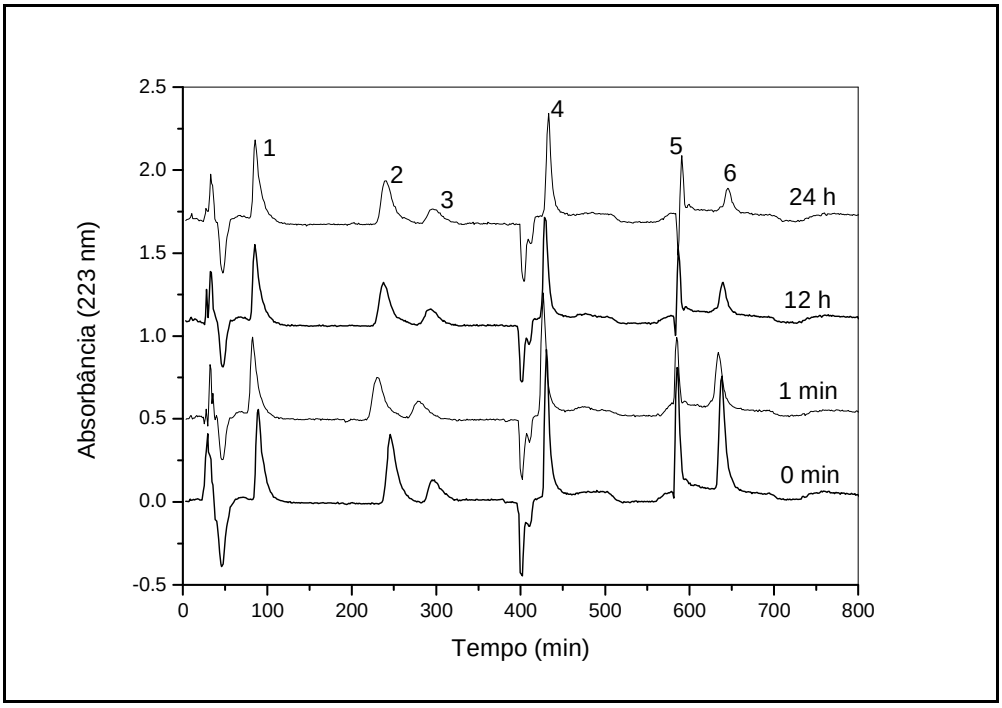


Figura 34: Alguns cromatogramas obtidos no estudo de adsorção on-line de triazinas em solo em meio de $CaCl_2$ 0.01 mol L^{-1} na concentração inicial de 1,0 mg L^{-1} de: 1 = Desisopropilatrazina (DIA); 2 = Desetilatrazina (DEA); 3 = 2-hidroxiatrazina (HAT); 4 = Simazina (SIM); 5 = Atrazina (ATR); 6 = Propazina (PRO). DIA, DEA, HAT eluídos com 15% de MeOH; SIM eluído com 40% de MeOH; ATR, PRO eluídos com 50% de MeOH.Os cromatogramas referem-se às amostragens feitas nos tempo de contato de 0 min, 1 min, 12 h e 24 h.

A Figura 35 mostra os gráficos de *q* em função de tempo para o estudo de tempo de contato de 24 h, podendo-se confirmar a confirmar a maior afinidade de PRO pelo solo. Com os maiores tempo de contato, as adsorções de ATR e SIM passaram a ser mais significativas, ao passo que para DEA e DIA, após cerca de 200 min de contato, parece haver um processo de dessorção do material adsorvido inicialmente. Nesse estudo a adsorção de HAT foi errática e pouco significativa, de modo que os dados não foram apresentados.

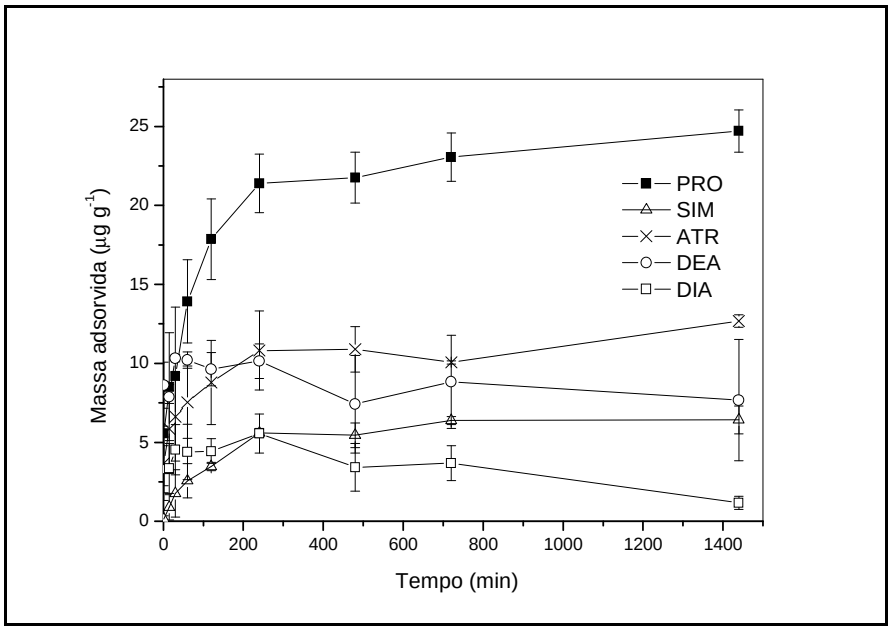


Figura 35: Gráfico demonstrando a massa adsorvida de DIA, DEA, ATR, PRO e SIM em µg por grama de solo a cada intervalo de tempo.

Para este estudo, diferentemente dos estudos anteriores já discutidos, foi possível ajustar os dados obtidos a modelos de equações cinéticas de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, pelo menos para os compostos SIM, ATR e PRO, conforme mostram as Figuras 36 e 37. Os gráficos foram obtidos usando-se as equações 3 e 4, respectivamente.

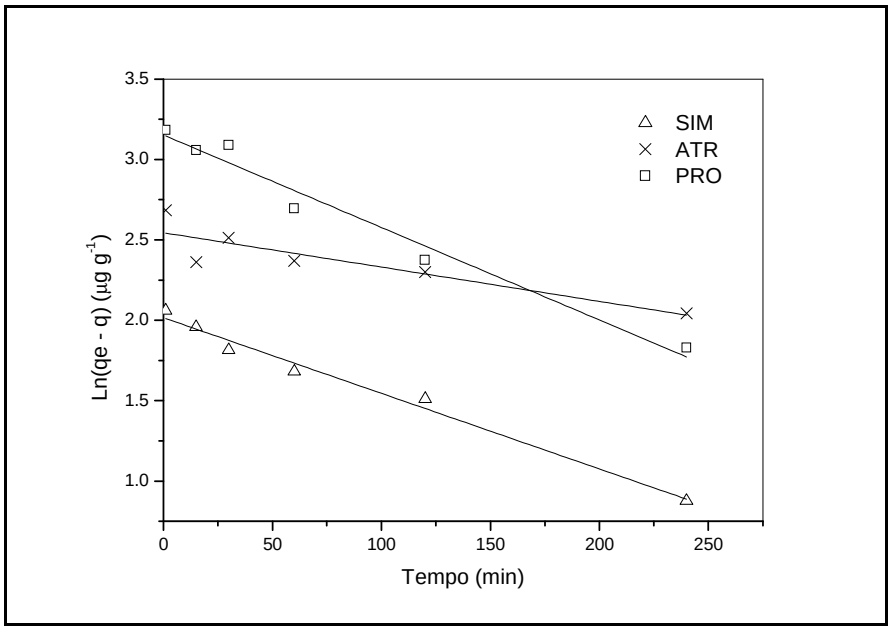


Figura 36: Gráfico para a cinética de adsorção de pseudo-primeira ordem, para os compostos em estudo em uma suspensão de solo.

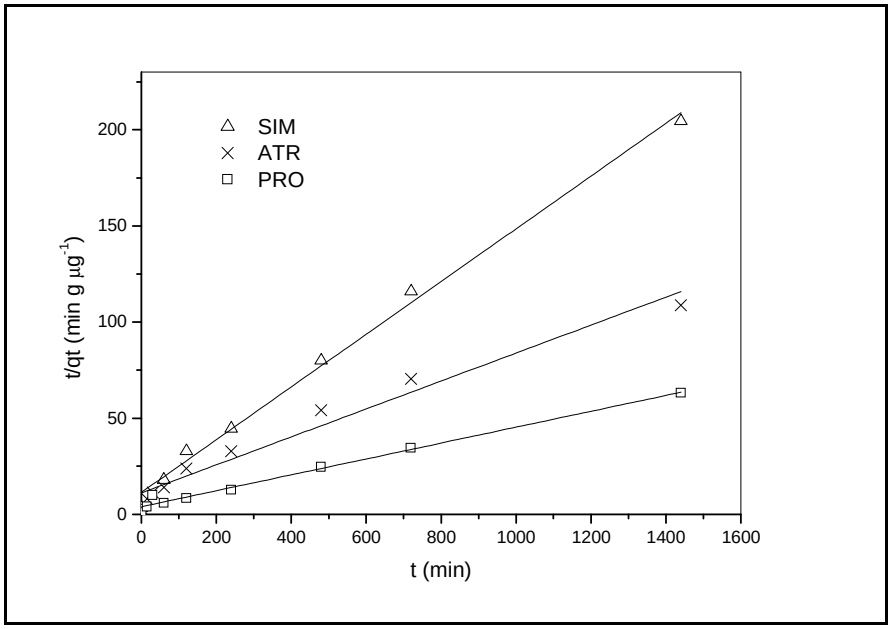


Figura 37: Gráfico para a cinética de adsorção de pseudo-segunda ordem, para os compostos em estudo em uma suspensão de solo.

Deve-se salientar, entretanto, que a equação cinética de pseudo-primeira ordem só se aplica nas primeiras 4 horas do estudo, ao passo que a equação de pseudo-segunda ordem se aplica a todo o período para os compostos SIM, ATR e PRO. Os parâmetros

cinéticos para a pseudo-primeira ordem e para a pseudo-segunda ordem, k_1 (constante cinética de pseudo-primeira ordem em min^{-1}), k_2 (constante cinética de pseudo-segunda ordem em g/mg min), q_e (concentração na fase sólida no momento do equilíbrio) foram calculados a partir dos dados experimentais e das equações 3 e 4, sendo apresentados na Tabela 10. O valor de q_e experimental foi estimado a partir do gráfico mostrado na Figura 38 e utilizado nos cálculos de k_1.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos de adsorção para modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem, k_1 (constante cinética de pseudo-primeira ordem em min^{-1}), k_2 (constante cinética de pseudo-segunda ordem em g/mg min), q_e (concentração na fase sólida no momento do equilíbrio), (R^2) coeficiente de correlação.

Triazina	q_e experimental ($\mu g\ g^{-1}$)	Pseudo 1ª Ordem			Pseudo 2ª Ordem		
		k_1 x 10^3 (min^{-1})	q_e ($\mu g\ g^{-1}$)	R^2	k_2 x 10^3 ($g\ \mu g^{-1}\ min^{-1}$)	q_e ($\mu g\ g^{-1}$)	R^2
SIM	6,4 ± 0,9	4,7 ± 0,3	7,5 ± 0,3	0,98	1,7± 0,5	7,3 ± 0,2	0,994
ATR	12,7 ± 0,4	2,5 ± 0,4	13,4 ± 0,2	0,91	0,5 ± 0,1	14 ± 1	0,97
PRO	25 ± 1	5,7 ± 0,4	23 ± 1	0,97	0,4 ± 0,1	24,2 ± 0,9	0,98

Comparando-se os resultados obtidos para as amostras de solo apresentados nas Tabelas 7 e 10, confirma-se que consistentemente PRO é a triazina de maior adsorção. Os valores de q_e obtidos por qualquer um dos modelos cinéticos, ou por extrapolação gráfica (q_e experimental) são coerentes entre si, independentemente do tempo de contato. Na sequencia se observa que o solo é capaz de adsorver cerca de 14 µg de ATR por grama, valor este também estimado a partir das equações de cinética de pseudo-primeira ou segunda ordem, independentemente do tempo de contato. No caso da simazina (SIM), se observou adsorção apenas em solo nos primeiros 90 min de contato. No estudo de 24 horas foi possível estimar valores de q_e entre 7,3 e 7,5 µg g^{-1} pelos dois modelos avaliados, valores estes que foram sistematicamente menores do que o obtido no estudo de 90 min de tempo de contato. No caso dos metabólitos DIA e DEA foi observada adsorção nos primeiros 90 min de tempo de contato (Tabela 7), ocorrendo uma tendência a dessorção para tempos maiores de 4 horas.

A partir de dados da literatura (Abate *et al.*, 2004) seria esperado que a maior interação fosse para HAT, o que tem sido explicado pelo seu valor de pK_a, em torno de 5,15, frente ao pK_a da ATR que é aproximadamente 1,7; ou seja, a HAT é mais facilmente protonável, facilitando o mecanismo de adsorção nos sítios do mineral ou da matéria húmica (Mc Bride, 1994; Stevenson, 1994). Assim, a baixa adsorção observada para HAT precisa ainda ser melhor investigada nas condições aqui empregadas. A dose de solo (2,5 g em 100 mL de solução) é significativamente menor do que a usada em outros trabalhos (1,0 g de solo em 5,0 mL de solução), de modo que efeitos de competição, especialmente com PRO, e baixa disponibilidade de sítios de adsorção, podem explicar os resultados observados em relação à HAT.

5 Conclusão

O acoplamento de cela de longo caminho óptico em sistema de cromatografia a líquido por injeção seqüencial permitiu diminuir os limites de detecção de método previamente publicado (dos Santos *et al*, 2009) de modo a atender os limites permitidos pela EPA para os herbicidas SIM, ATR e PRO. O método proposto tem limites de detecção similares a outros métodos baseados em cromatografia a liquido de alta eficiência, mas usando instrumentação de baixo custo e consumindo menos solvente, o que é uma demanda atual para o desenvolvimento de métodos analíticos limpos, ou seja, que gerem a menor quantidade possível de resíduos tóxicos.

A implantação da estratégia de eluição passo a passo (Rigobello-Masini *et al*, 2008) permitiu a separação e quantificação de três metabólitos da atrazina, além dos três herbicidas estudados com a cela de longo caminho óptico. O sistema SIC se mostrou bastante flexível, pois uma única bomba e uma única válvula seletora propiciam a amostragem, injeção de amostra e eluição, selecionando automaticamente fases móveis com diferentes concentrações de modificador orgânico.

O sistema proposto possibilitou o estudo de adsorção *on-line* dos seis compostos em solo, ácido húmico e solo modificado com ácido húmico, permitindo verificar que PRO é o composto mais fortemente adsorvido no solo. A incorporação de ácido húmico aumentou a adsorção de ATR, HAT e PRO, mas diminuiu a adsorção de SIM, sem afetar DIA e DEA. SIM, DEA e DIA apresentaram adsorções muito menores do que os outros compostos, sendo que DIA e DEA podem dessorver em tempos de contato maiores do que 4 horas, de modo que esses compostos são os que apresentam maior potencial para lixiviação e contaminação de águas naturais e subterrâneas próximas aos locais de aplicação dos herbicidas.

6 Referências Bibliográficas

ABATE, G.; PENTEADO, J. C.; CUZZI, J.; VITTI,G. C.; LICHTIG, J.; MASINI, J. C.. Influence of humic acid on adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine and deisopropylatrazine onto a clay rich soil sample. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 (22), p. 6747-6754, 2004.

ADAMS, Marisa Maria. **Estudo de diferentes métodos de extração por ultra-som de pesticidas em latossolo utilizando técnicas cromatográficas**. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

AYENI, A. O.; MAJEK, B. A.; HAMMERSTEDT, J. Rainfall influence on imazethapyr bioactivity in New Jersey soils. **Weed Science**, v.46, p. 581-586, 1998.

BAGHERI, H.; KHALILIAN, F. Immersed solvent microextraction and gas chromatography–mass spectrometric detection of *s*-triazine herbicides in aquatic media. **Analytica Chimica Acta**, v 537, p 81-87, 2005.

BLANCHET, P. F.; St-GEORGE, A. Kinetices of chemical degradation of organophosphorus pesticides*:* Hydrolysis of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in the presence of cooper (III). **Pesticide science**, v.13, p.85-91, 1982.

BOUCHARD, D. C.; ENFIELD, C. G.; PIWONI, M.D. Transport processes involving organic chemicals. In: SAWHNEY, B. L. & BROWN, B. L. ed. **Reactions and movement of organic chemicals in soil**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p.349-372

BURKHARD, W. A.; KUEHL, D. W. n-Octanol/water partition coefficients by reverse phase liquid cromatography/mass spectrometry for eight tetrachlorinated planar molecules. **Chemosphere**, v.15, p.163-167, 1986.

CHENG, J.; LIU, M.; ZHANG, X.; DING, L.; YU, Y.; WANG, X.; JIN, H.; ZHANG, H. Determination of triazine herbicides in sheep liver by microware-assisted extraction and high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 590, p. 34-39, 2007.

CHIOU, C. T.; PETERS, P. E.; FREED, V. H. A physical concept of soil-water equilibrium for nonionic organic compound**. Science**, v.4420, p.831-832, 1979.

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

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução n.º 357, de 17 de março de 2005. http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459 . Acessado em dezembro de 2010.

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

DAI, J. Y.; JIN, L.J.; WANG, L. S.; ZANG, Z. Determination and estimation of water solubilites and octanol/water partition coefficients for derivates of benzanilides. **Chemosphere**, v.37, p.1419-1426, 1998.

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

DEC, C.; BOLLANG, J. M. Degradation of chlorinated phenols during oxidative coupling. **Environmental Science and Technology**, v.28, p.448-490, 1994.

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

DEVOS, S.; BOSSCHER, K.; STAELS, Bart; BAUER, E.; ROELS, F.; BERGHE, W. V.; HAEGEMAN, G.; HOOGHE, R.; PETERS, E. L. H. Inhibition of cytokine production by the herbicide atrazine search for nuclear receptor targets. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p 303-308, 2003.

DOS SANTOS, L. B. O.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of a sequential injection chromatography (SIC) method for determination of simazina, atrazina and propazina. **Journal of separation Science**, v. 32, p. 494-500, 2009.

EC - EUROPEAN COMMUNITY. 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. http://zic.lv/hygiene/coundir98-83.pdf .Acessado em dezembro de 2010.

ENFIELD, C. G.; YATES, S. R. Organic Chemical transport to groundwater. In: CHENG, H.H.. ED. **Pesticides in the soil environment**: Processes, impacts, and modeling. 2 ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990. p.271-302.

ENGELHARDT, H.; GÖTZINGER, A.; On the reproducibility of Chromolith® RP columns. **Chromatographia**, v 60, p. 207-211, 2004.

FÄRBER, H.; NICK, K.; SCHÖLER, H. F. Determination of hydroxyl-s-triazines in water using HPLC or GC-MS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 350, p. 145-149, 1994.

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 (2), p. 300-309, 2006.

FARMER, W. J.; AOCHI, Y. Picloran sorption by soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, v.38, p.418-423, 1974.

FONTECHA-CÁMARA, M. A.; LÓPEZ-RAMÓN, M. V.; PASTRANA-MARTÍNEZ, MORENO-CASTILLA, C. Kinetics of diuron and amitrole adsorption from aqueous solutions on active carbons. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, p. 472-477, 2008.

FÜHR, F.; OPHOFF, H.; BURAUEL, P.; WANNER, U.; HAIDER, K. Modification of the definition of bound residues. In: FÜHR, F.; OPHOFF. H. **Pesticide bound residues in soil**. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p.175-176, 1998.

GIMBERT, L.J.; WORSFOLD, P.J. Environmental applications of liquid-waveguide-capillary cells coupled with spectroscopic detection. **Trends in Analitycal Chemistry**, vol. 26 (9), p.914-930, 2007.

GOOIJER, C.; HOORNWEG, G. P.; BEER, T.; BADER, A.; van IPEREN, D. J.; BRINKMAN, U. A. T. Detector cell based on plastic liquid-core waveguides suitable for aqueous solutions: one-to-two decades improved detection limits in conventional-size column liquid chromatography with adsorption detection. **Journal of Chromatography A**, v. 824, p. 1-5, 1998.

GROVER, R. Mobility of dicamba, picloram e 2,4-D in soil columns. **Weed Science**, v.25, p.159-162, 1997.

GUIOCHON, G. Monolitchic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, 101-168, 2007.

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

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

HUCLOVÁ, J., SATÍNSKÝ, D.; KARKICEK, R. Coupling of monolithic columns with sequential injection technique. A new separation approach in flow methods. **Analytica Chimica Acta, v. 494, p, 133-140, 2003.**

HULSCHER, T.E.M.; van der VELDE, L.E.; BRUGGEMAN, W.A. Temperature dependence of Henry´s law constants for selected chlorobenzenes, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 11, p. 1595-1603, 1992.

HUTTA, M.; CHALÁNYOVÁ, M.; HALKO, R.; GÓRA, R.; DOKUPILOVÁ, S.; RYBÁR, I. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 2034-2042, 2009.

HUTTA, M.; CHALÁNYOVÁ, M.; HALKO, R.; GÓRA, R.; RYBÁR, I.; PAJCHL, M.; DOKUPILOVÁ, S. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1977-1987, 2006.

IKEGAMI, T.; TANAKA, N.; Monolithic columns for high-efficienct HPLC separations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8 (5), p. 527-533, 2004.

INFANTE, C. M. C.; ROCHA, F. R. P. A critical evaluation of a long pathlength cell for flow-based spectrophotometric measurements. **Microchemical Journal**, v. 90, p. 19-25, 2008.

INFANTE, C. M. C; URIO, R. de P.; MASINI, J. C. Improving the decyanility of sequential injection chromatography (SIC): Determination of triazines by exploiting liquid core waveguide (LCW) detection. **Analytical Letters**, v. 44, p. 503-512, 2011.

JAVARONI, R. C. A.; LANDGRAF. M. D.; REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana de açúcar. **Química Nova**, v. 22(1), p. 58-64, 1999.

JIANG, H.; ADAMS, C. D.; KOFFSKEY, W. Determination of chloro-*s*-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 219-226, 2005.

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.

KATAYAMA, A.; ISEMURA, H.; KUWATSUKA, S. Suppression of chlorothalonyl dissipation in soil by repeated applications. **Journal of Pesticide Science**, v.16, p.233-238, 1991.

KATAYAMA, A.; ITOU, T.; UKAI, T. Ubiquitous capability to substitute chlorine atoms of chorothalonyl in bactéria. **Journal of Pesticide Science**, v. 22, p. 12-16, 1997.

KAWAMOTTO, K.; URANO, K. Parameters for predicting fate of organochlorine pesticides in the environment (II) Adsorption constant to soil. **Chemosphere**, v.19, p. 1223-1231, 1989.

KONTCHOU, C.Y. & GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a Pseudomonas strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2291-2294, 1995.

KOSKINEN, W. C; HARPER, S. The Retention process*:* Mechanisns. In: CHENG, H. H.. ed. **Pesticides in the soil environment**: Process, impacts, and modeling. 2ed. Madison, Soil Science Society of America, p. 51-78, 1990.

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

LAVORENTI, A. BURAUEL, P.; WAIS, A. & FÜHR, F. Remobilization of bound anilazine residues in humic acids. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY, 9, Adelaide, 1998. **Proceedings**. Adelaide, Australia, University of Adelaide, 2001. p.541-547.

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

LAVORENTI, A. Identificação de perigos de resíduos ligados de pesticidas em substáncia húmicas. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, São Carlos, 1997. **Anais**. São Carlos: EMBRAPA, 1997. p.66-71.

LEI, W.; FUJIWARA, K.; FUWA, K. Determination of phosphorus in natural waters by long-capillary-cell absorption spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 951-955, 1983.

LEONARD, R.A. Moviment of pesticides into surface waters. In: CHENG, H.H ED. **Pesticides in the soil environment**: Processes, impacts, and modeling. 2ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990. p. 303-349.

LI, Q.; MORRIS, K. J.; DASGUPTA, P. K.; RAIMUNDO Jr., I. M.; HENRYK, T. Portable flow-injection analyzer with liquid-core waveguide based fluorescence, luminescence, and long path length absorbance detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 479, p. 151-165, 2003.

LIEBICH, J.; BURAUEL, P.; FÜHR, F. Microbiological degradation of nonextractable anilazine residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p. 3905-3910, 1999.

LOSS, R.; NIESSNER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A,** v 835, p 217-229, 1999.

LU, X. X; TAO, S.; CAO, J.; PAWSON, R. W. Prediction of fish bioconcentration factors of nonpolar organic pollutants based on molecular connectivity indices. **Chemosphere**, v.39, p.987-999, 1999.

LYMAN, W. J.; REEHL,W.F.; ROSENBLATT, D. H. **Handbook of chemical property estimation methods: Environmental behavior of organic compounds**. New York: McGraw-Hill, Inc, 1982. 752 p.

MARTÍNEZ, J. M. H.; MÉNDEZ, A.; BOSCH, E.; ROSÉS, M.; Characterization of the acidity of residual silanol groups in microparticulate anda monolithic reversd-phase columns.**Journal of Chromatography A**, v. 1060, p. 135-145, 2004.

MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R; HERNÁDEZ, E. H; SAN ROMÁN, F. J. S S.; FLORES, M. G. P. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal of Chromatography A**, v. 950, p. 157-166, 2002.

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

MC BRIDE, M.B. **Environmental Chemistry of Soils**. Cornell University, Ithaca, New York State, USA: Oxford University Press. 1994. 406 p.

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**, Vol. 30, No. 12, p. 812-819, 1995.

MERSIE, W.; SEYBOLD, C. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, deisopropilatrazine, and hydroxyatrazine on levy wetland soil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** v.44, p.1925-1996, 1996.

MINIESTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n.º 518, de 25 de março de 2004. http://www.saneago.com.br/novasan/leis/port518.pdf . Acessado em dezembro de 2010.

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.

NOGUEIRA, J. M. F.; SANDRA, T.; SANDRA, P. Multiresidue screening of neutral pesticides in water sample by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 505, p. 209-215, 2004.

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

O.E.C.D Guideline For The Testing Of Chemicals: Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method. 21 January 2000.

PEIXOTO, M. F. S. P.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e formação de resíduos ligados de ^{14}C-atrazina em Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico. **Scientia Agrícola**, v.57, p.147-151, 2000.

PICOLO, A.; CELANO, G.; ARIENZO, M.; MIRABELLA, A. Adsorption and dessorption of glyphosate in some Europeans solis. **Journal of Environmental Science Health**, v.6, p. 1105-1115, 1994.

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

PRINTZ, H.; BURAUEL, P.; FÜHR, F. Influence of crop residues on degradation, formation of bound residues and transport of methabenzthiazuron in soil. In: WALKER, A. **Pesticide movement to water**. England: Coventry, 1995. p. 53-58.

RADOSEVICH, M. et al. Degradation and mineralization of a atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 297-302, 1995.

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

RIGOBELLO-MASINI, M.; PENTEADO, J. C. P.; MIRANDA, L. M. T. M.; MASINI, J. C. Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography flor fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae *Tetraselmis Gracilis***. Analytica Chimica Acta**, v. 628, p. 123-132, 2008.

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

SILVA, B. M. **Desenvolvimento de metodologia simples, rápida e sem etapa de *clean-up* para a determinação de glifosato em amostras ambientais de água e solo por HPLC/UV-VIS**. São Carlos, Sã Paulo: Mestrado em Ciências – Química Analítica, Universidade De São Paulo, Instituto de Química São Carlos, 2009.

SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, 8ª Edição, 2005, 1026 p.

SOLOMONS, T. W. G. **Química Orgânica I**. 6ed. Ed.: Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1991. 436 p.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions**. John Wiley & Sons, Inc. Second edition. 1994. 512 p.

SVEC, F.; Porous monoliths: The new geration of stationary phases for HPLC and related methods. **LC-GC Europe**, v. 16, p. 24-28, 2003.

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

TOWNSEND, M. A.; YOUNG, D. P. Atrazine and its metabolites as indicators of stream-aquifer interaction in Kansas, USA. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 78 (1), p. 9-23, 2000.

TRAN, A. T. K.; HYENE, R. V.; PLABO, F.; DAY, W. R.; DOBLE, P. Optimization of the separation of herbicides by linear gradient high performance liquid chromatography utilizing artificial neural networks. **Talanta**, v. 71, p. 1268-1275, 2007.

TRIPLET, 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.

US-EPA. Edition of the drinking water standards and health Advisories. 2006. http://www.epa.gov/waterscience/criteria/driking/dwstandards.pdf . Acessado em dezembro de 2010.

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.

WOODBURN, K. B.; DELFINO, J. J.; RAO, P. S. C. Retention of hydrophobic solutes on reversed-phase liquid chromatography supports: correlation with solute topology and hydrophobicity indices. **Chemosphere**, v.24, p.1037-1046, 1992.

WORTHING, C. R. **The PesticideManual**. The British Crop Protection Council, Farnham. 9ed., 1991. 1781 p.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F. 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.

ZARPON, L.; ABATE, G.; DOS SANTOS, L. B. O.; MASINI, J. C. Montmorillonite as an adsorbent for extraction and concentration of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, p. 81-87, 2006.

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.