

**“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE MULTIRRESÍDUOS DE
HERBICIDAS E SEUS METABÓLITOS EM ÁGUA E EM
SOLO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA”**

Tese de doutorado
Glaucia Maria Ferreira Pinto

Orientação: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim



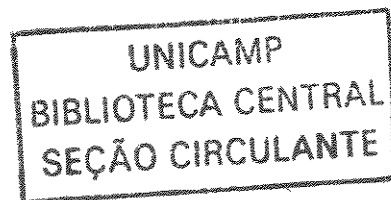
UNICAMP

Instituto de Química

UNICAMP

Agosto de 2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



200306579

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP P658d
V	EX
TOMBO BCI	52470
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00179848-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

BIB ID 281987

P658d

Pinto, Glaucia Maria Ferreira

Desenvolvimento de metodologia para determinação de multirresíduos de herbicidas e seus metabólitos em água e em solo por cromatografia líquida de alta eficiência / Glaucia Maria Ferreira Pinto. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientadora: Isabel Cristina S. F. Jardim.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Extração em fase sólida. 2. Amostras ambientais. 3. Validação dos métodos. I. Jardim, Isabel Cristina S.F. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*"Aos dois homens mais importantes da minha vida:
meu filho Samuel e meu marido Jefferson,
dedico esta tese"*

"Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensíveis.

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil as pessoas podem acusa-lo de egoísta, interesseiro.

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para

outra. Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.

Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode não ser o bastante.

Dê o melhor assim mesmo.

Veja que no final das contas, é entre você e Deus.

Nunca foi entre você e as outras pessoas."

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiro gostaria de agradecer a Deus, pelas oportunidades, pela sorte e pela perseverança que me deu.

Gostaria de agradecer ao meu marido, pela ajuda emocional e material, que foram essenciais para o cumprimento deste trabalho.

Aos meus pais que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha querida e excelente professora Bel Jardim pela orientação profissional e pessoal.

De todo o meu coração e alma

OBRIGADA

Agradecimentos

A todos aqueles que em algum momento cruzaram o meu caminho e facilitaram o meu
caminhar,

Aos professores da UNICAMP, principalmente o casal Collins, pelo auxílio constante,

Aos funcionários do Instituto de Química, principalmente o pessoal da CPG, da biblioteca e
técnicos de laboratório,

Aos funcionários da UNICAMP,

À FAPESP pelo apoio financeiro,

Aos meus colegas do LABCROM, que já saíram ou que permanecem,

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão e sucesso deste trabalho...

Muito obrigada!!!!

Índice Geral

1	INTRODUÇÃO.....	3
1.1	OS PESTICIDAS.....	3
	Tabela 1. Desenvolvimento de alguns pesticidas modernos.....	5
	Tabela 2. Classificação química de alguns pesticidas de acordo com o uso ou ação.....	6
	Tabela 3. Classificação de substâncias químicas baseada nos valores.....	8
	de LD ₅₀ oral aguda em ratos.....	8
1.2	OS HERBICIDAS.....	10
1.2.1	Os herbicidas estudados.....	10
1.2.1.1	As triazinas.....	10
1.2.1.1.1	Cianazina.....	11
1.2.1.1.2	Simazina.....	12
1.2.1.1.3	Atrazina.....	13
1.2.1.2	As tiodiazinas.....	14
1.2.1.2.1	Bentazona.....	14
1.2.1.3	Os ácidos clorofenóxidos acéticos.....	15
1.2.1.3.1	2,4-D.....	15
1.2.1.4	As uréias substituídas.....	17
1.2.1.4.1	Diuron.....	17
1.2.1.4.2	Linuron.....	18
1.2.2	Os metabólitos estudados.....	19
1.2.2.1	3,4-DCA.....	20
1.2.2.2	2,4-DCP.....	20
1.2.2.3	2-HA.....	21
1.3	OS PESTICIDAS E O MEIO AMBIENTE.....	22
	Tabela 4 – Visão da complexidade do uso dos pesticidas.....	24
	Figura 1. Rotas de movimentação e perda dos pesticidas no ambiente.....	25
1.4	O SOLO.....	25
	Figura 2. Perfil do solo mostrando os horizontes característicos.....	27
	Figura 3. Diagrama de textura de solos.....	28
1.5	OS PESTICIDAS NO SOLO.....	29
	Figura 4. Principais caminhos de poluição ambiental.....	29
	Figura 5. Processos característicos de herbicidas em solos.....	31
1.5.1	A acumulação e persistência dos pesticidas no solo.....	31
1.5.2	Características do solo que afetam a persistência dos pesticidas.....	32
1.5.3	A degradação e perda dos pesticidas no solo.....	34
1.5.3.1	Triazinas.....	35
	Figura 6. Caminho de degradação proposto para a simazina.....	36
	Figura 7. Degradação do herbicida atrazina.....	36
1.5.3.2	Fenoxialcanoatos.....	37
	Figura 8. Esquema de degradação para o herbicida 2,4-D.....	37
	Figura 9. Decomposição fotoquímica do 2,4-D.....	38
1.5.3.3	Feniluréias.....	38
	Figura 10. Rota de degradação no solo proposta para as feniluréias.....	39

1.5.3.4	Tiodiazinas	39
	Figura 11. Esquema de degradação do herbicida bentazona	39
1.6	ADSORÇÃO-DESSORÇÃO E DESSORÇÃO DE PESTICIDAS NO SOLO	40
	Figura 12. Esquema da estrutura do ácido húmico	44
	Figura 13. Superfície de um solo, mostrando grupos carboxílicos carregados na superfície	44
	Tabela 5. Estudos realizados sobre a adsorção /dessorção de herbicidas em solo.	45
1.7	CONTAMINAÇÃO DAS ÁGUAS POR PESTICIDAS	46
	Tabela 6. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo a EPA	49
	Tabela 7. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo o Brasil	50
	Tabela 8. Pesticidas incluídos na Diretriz 76/464/EEC (Lista Negra)	51
1.7.1	Vulnerabilidade da água	51
1.8	ANÁLISE DOS PESTICIDAS	54
1.8.1	Emprego da CLAE na Análise de Pesticidas	55
1.8.2	Emprego de Técnicas de Extração e Pré-Concentração na Análise de Pesticidas	57
1.8.2.1	Tipos de sorventes	57
1.8.2.2	Formatos dos dispositivos de EFS	58
1.8.2.3	Modo de extração "on-line"	59
1.8.2.4	Etapas envolvidas na extração:	59
	Figura 14. Representação das etapas envolvidas na EFS	61
1.8.3	Propriedade dos sorventes	61
1.8.3.1	Volume de breakthrough	62
1.8.4	Revisão Sobre Análise de Pesticidas em Solo e Água Empregando CLAE e Técnicas de Extração	63
	Tabela 9 . Revisão bibliográfica sobre a análise de herbicidas em solo e água .	63
	utilizando CLAE e técnicas de extração.	63
1.9	VALIDAÇÃO DE MÉTODO	72
1.9.1	Curva Analítica	74
1.9.2	Linearidade	74
1.9.3	Exatidão e Precisão	75
1.9.4	Recuperação	76
1.9.5	Detectabilidade (Limite de Detecção e de Quantificação)	76
1.9.6	Robustez	77
2	OBJETIVOS	81
3	PORTE EXPERIMENTAL	85
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	85
3.1.1	Reagentes e solventes	85
3.1.2	Solos utilizados	85
3.1.3	Herbicidas selecionados	86
	Tabela 10. Herbicidas, fornecedores, grau de pureza e família química.	86
3.1.4	Metabólitos	87

Tabela 11. Metabólitos, fornecedores, grau de pureza e herbicidas pai.	87
3.1.5 Coluna cromatográfica	87
3.1.6 Dispositivos de extração em fase sólida	88
3.1.7 Equipamentos	88
3.2 ANÁLISES DOS SOLOS	89
3.3 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS HERBICIDAS	92
3.3.1 Preparo de sol. padrão para análise dos herbicidas em solo e em água	92
3.3.2 Escolha da melhor fase móvel	92
3.3.3 Curvas analíticas	93
3.4 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO	94
Figura 15. Sistema de agitação rotatória dos tubos contendo os solos estudados. ...	96
3.4.1 Análise fatorial	96
Tabela 12. Parâmetros estudados na análise fatorial	96
Tabela 13. Esquema de experimentos e efeitos para o fatorial 2^3	97
3.5 PRÉ-CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	98
3.5.1 Procedimento de extração com tubos tipo seringa	98
Figura 16. Esquema com as principais etapas de extração em fase sólida.	99
Figura 17. Dispositivo Supelco para 12 extrações simultâneas e bomba de vácuo. .	99
3.5.2 Procedimentos de extração com discos	100
Figura 18. Suporte para extração utilizando discos.	100
3.5.3 Procedimentos de extração "on-line"	101
Figura 19. Esquema utilizado para extração "on-line"	101
3.5.4 Regeneração dos tubos de extração	102
3.5.5 Determinação do melhor volume de extração	103
Tabela 14. Volumes e respectivas concentrações das soluções de herbicidas empregadas na determinação do melhor volume de extração.	103
3.5.6 Influência da adição de cloreto de sódio	104
3.5.7 Recuperação	104
3.6 METABÓLITOS	105
3.7 BIBLIOTECA DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV	105
3.8 AMOSTRAS REAIS	105
Figura 20 - Açude no sítio Grota Funda, São João da Boa Vista - SP.....	106
Figura 21 - Amostragem do solo do sítio Grota Funda, São João da Boa Vista - SP	107
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
4.1 ANÁLISE DE SOLOS	111
Tabela 15. Resultados de pH, H+Al, concentração cálcio, magnésio, potássio e fósforo, SB, CTC, V, M.O. e %C, para os solos 1 e 2	111
Tabela 16. Limites para interpretação de classes de acordo com acidez e a saturação por bases	113
4.2 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS HERBICIDAS	113
Figura 22. Cromatograma obtido com FM MeOH:H ₂ O 60:40, v/v de pH = 3,0 (a 25 °C), para separação simultânea de herbicidas.....	114
Figura 23. Cromatograma obtido com FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v de pH = 3,50 (a 25 °C), para separação da mistura de herbicidas.	115

	Figura 24. Cromatograma obtido com FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ajustado com ácido fosfórico), temperatura de 25 °C, vazão de 0,8 mL/min, coluna (3,9 x 150 mm) e coluna de guarda (3,9 x 20 mm) Nova Pak C18, 4 µm, para separação da mistura de herbicidas.....	115
	Tabela 17. Valores de k e R _s para a separação da mistura de herbicidas utilizando FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ácido fosfórico) à 25 °C.....	116
	Tabela 18. Comparação de valores de R _s entre os picos de bentazona e cianazina utilizando diferentes pH de FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v.....	117
4.3	ANÁLISE FATORIAL PARA A ADSORÇÃO DOS HERBICIDAS	118
	Tabela 19. Valores de adsorção (%) dos herbicidas estudados, de acordo com os experimentos do fatorial 2 ³	118
	Tabela 20. Efeitos (Ef) referentes ao fatorial 2 ³ calculados para cada herbicida.	119
4.4	ISOTERMAS DE ADSORÇÃO/DESSORÇÃO	120
4.4.1	Solo 1	120
	Figura 25. Cromatograma do branco obtido após o teste de adsorção no solo 1. Condições idem às da Figura 24.	120
	Figura 26. Cromatograma obtido após o teste de adsorção dos herbicidas no solo 1. Condição idem às da Figura 24.....	121
	Tabela 21. Resultados de adsorção e parâmetros calculados para obtenção da..... isoterma de adsorção do solo 1.	122
	Figura 27. Isotermas de adsorção dos herbicidas estudados no solo 1.....	123
	Tabela 22. Resultados de dessorção e parâmetros calculados para obtenção da..... isoterma de dessorção no solo 1.	124
	Figura 28. Isotermas de dessorção dos herbicidas estudados no solo 1.....	125
	Tabela 23. Valores de K _{ads} , K _D , K _{oc} , K _{des} e 1/n calculados a partir das isotermas de adsorção e de dessorção para o solo 1.	126
4.4.2	Solo 2	127
	Tabela 24. Resultados de adsorção e parâmetros calculados para obtenção da isoterma de adsorção dos herbicidas estudados no solo 2.	127
	Figura 29. Isoterma de adsorção dos herbicidas estudados no solo 2.....	128
	Tabela 25. Resultados de dessorção e parâmetros calculados para obtenção da..... isoterma de dessorção no solo 2.	129
	Figura 30. Isoterma de dessorção dos herbicidas estudados no solo 2.....	130
	Tabela 26. Valores de K _{ads} , K _D , K _{oc} , K _{des} e 1/n calculados a partir das isotermas de adsorção e de dessorção para o solo 2.	131
4.5	PRÉ-CONCENTRAÇÃO UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	132
	Figura 31. Cromatograma do extrato do solo após pré-concentração utilizando EFS. Condições idem às da Figura 24.	132
	Tabela 27. Recuperações para os herbicidas estudados, em diferentes níveis de fortificação, obtidas após a EFS dos extratos dos solos 1 e 2.....	133
4.5.1	Regeneração dos tubos de extração.....	134
	Figura 32. Gráfico de colunas mostrando a recuperação obtida após EFS dos herbicidas utilizando o mesmo tubo de extração C-18, de 1 a 6 vezes e o mesmo disco de extração C-18, de 1 a 19 vezes.	134
	Figura 33. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após extração dos herbicidas utilizando tubo de extração regenerado. Condições idem às da Figura 24.	135

4.5.2	<i>Determinação do melhor volume de extração</i>	136
	Figura 34. Recuperações obtidas na determinação do melhor volume de extração	137
4.5.3	<i>Influência da adição de cloreto de sódio</i>	137
	Figura 35. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma de EFS do branco com NaCl. Condições idem às da Figura 24.....	138
	Figura 36. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatogram de EFS do branco sem NaCl. Condições idem às da Figura 24.	138
	Figura 37. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma da EFS dos herbicidas realizada sem adição de NaCl. Condições idem às da Figura 24.	139
	Figura 38. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma da EFS dos herbicidas realizada com a adição de NaCl. Condições idem às da Figura 24.	139
	Tabela 28. Recuperações obtidas para EFS com (C) e sem (S) adição de NaCl.	140
	Figura 39. Gráfico mostrando as recuperações médias, obtidas para os herbicidas estudados, sem e com adição de NaCl na etapa de extração.	141
4.5.4	<i>Recuperação</i>	141
	Figura 40. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido para uma amostra de controle (p2000). Condições idem às da Figura 24.....	142
	Figura 41. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após EFS com uma amostra fortificada com herbicidas na ordem de 0,5 µg. Condições idem às da Figura 24.	142
	Figura 42. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após EFS para o branco. Condições idem às da Figura 24.	143
	Tabela 29. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando tubos C-18, vazão de extração de 3 mL/min e modo "off-line".	144
	Tabela 30. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando discos C-18, vazão de extração de 50 mL/min e modo "off-line".	145
	Tabela 31. Recuperação e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com 0,5 µg dos herbicidas e submetidas à EFS, utilizando coluna de DVB, vazão de extração de 4 mL/min e modo "off-line."	145
	Tabela 32. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando colunas C-18, vazão de extração de 4 mL/min (N= 3).....	146
	Figura 43. Gráficos massa adicionada x massa recuperada nos níveis da ordem de 0,05 a 1,0 µg de herbicidas.	147
	Tabela 33. Parâmetros das curvas analíticas de recuperação dos herbicidas estudados.	148
4.6	<i>METABÓLITOS</i>	148
	Figura 44. Cromatograma obtido para a separação de uma amostra contendo os herbicidas em estudo e os metabólitos 3,4-DCA; 2,4-DCP e 2-HA. Condições idem às da Figura 24.....	148
4.7	<i>BIBLIOTECA DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV</i>	149
	Figura 45. Espectros de absorção no UV dos metabólitos 2-HA; 3,4-DCA e 2,4 DCP.....	149
	Figura 46. Espectros de absorção no UV dos herbicidas estudados.	150

	Tabela 34. Valores de comprimento de onda de absorção máxima para os herbicidas e metabólitos estudados.	151
	Figura 47. Espectros 3D de absorção no UV dos herbicidas. Ordem dos espectros: metanol, bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron e linuron.	152
4.8	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS	152
	Tabela 35. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de solo 1, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).	153
	Tabela 36. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise do solo 2, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).	153
	Tabela 37. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).	154
	Tabela 38. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com discos C-18, seguido de CLAE (N=3).	154
	Tabela 39. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com coluna C-18 "on-line" (N=3).	155
4.9	AMOSTRAS REAIS	156
	Figura 48. Cromatograma obtido após análise de água de torneira fortificada com herbicidas na ordem de 0,067 µg/L. Condições idem às da Figura 24.	157
	Figura 49. Cromatograma obtido após análise de água de filtro fortificada com... herbicidas na ordem de 0,33 µg/L Condições idem às da Figura 24.	157
	Figura 50. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de água de córrego em região de lavoura de café. Condições idem às da Fig. 24.	158
	Figura 51. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de água de córrego em região de lavoura de cana-de-açúcar. Condições idem às da Figura 24.	159
	Figura 52. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de água de açude de sítio de plantação de culturas diversas. Condições idem às da Figura 24.	160
	Figura 53. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de solo, coletado em sítio de plantação de culturas diversas. Condições idem à Figura 24.	161
5	CONCLUSÕES:	165
	Tabela 40. Comparação entre os diferentes dispositivos de EFS utilizados.	166
	Figura 54. Gráfico comparativo sobre custos de técnicas e modos de extração.	167
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	173

LISTA DE ABREVIACÕES:

ADI = *acceptable daily intake*

AF = fator de atenuação

AT = atrazina

C = concentração

C-18 = grupo octadesil

CCD = cromatografia em camada delgada

CG = cromatografia gasosa

CG/EM = cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL/EM = cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência

CPG = cromatografia de permeação em gel

CTC = capacidade de troca catiônica

CV = coeficiente de variação

DAD = detector de arranjo de diodos

2,4-D = 2,4 diclorofenoxiacético

3,4-DCA = 3,4-dicloroanilina

2,4-DCP = 2,4-diclorofenol

3D = três dimensões

DDT = diclorodifeniltricloro-etano

DEA = dietilatrazina

DIA = deisopropilatrazina

DMCPU = N-3,4-diclorofenil-N-metiluréia

DT₅₀ = persistência

EC = Comunidade Européia

EFS = extração em fase sólida

EM = espectrometria de massas

EPA = *environmental protection agency* (agência de proteção ambiental)

F = vazão

FM = fase móvel

GUS = pontuação de onipresença de água subterrânea

2-HA = hidroxiatrazina

ICP = *Inductive Coupled Plasma* (Plasma Acoplado Indutivamente)

k = fator de retenção

K_{ads} = coeficiente de adsorção

K_D = coeficiente de distribuição

K_{des} = coeficiente de dessorção

K_H = constante da Lei de Henry

K_{oc} = coeficiente de adsorção normalizado para a quantidade de carbono

K_{ow} = coeficiente de adsorção octanol/água

LD₅₀ = dose letal

LI = índice de lixiviamento

LMD = limite de detecção do método

LOD = limite de detecção

LOQ = limite de quantificação

MAC = *maximum admissible concentration* (conc. máxima admissível)

MET = metil-etil triazina

M.O. = matéria orgânica

M_r = massa residual

N = número de medidas

PAH = hidrocarbonetos poliaromáticos

R = recuperação

r = coeficiente de correlação

R_s = resolução

RSD = estimativa de desvio padrão relativo

s = sinal instrumental/analítico

S = estimativa de desvio padrão absoluto

SB = soma de bases

SMP = tampão de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2CrO_4 , $\text{Ca}(\text{Ac})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e trietanolamina

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida

t_M = tempo de retenção de um composto não retido

t_R = tempo de retenção

UNEP = Programa Ambiental das Nações Unidas

UV = ultravioleta

V = saturação em bases

w_h = largura do pico a meia-altura

RESUMO**Desenvolvimento de Metodologia para Determinação de Multirresíduos de Herbicidas e Seus Metabólitos em Água e em Solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Autora: Gláucia Maria F. Pinto

Orientadora: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Com o crescimento da população mundial, a preocupação com o aumento da produção agrícola torna-se mais pronunciada. Para garantir um maior rendimento agrícola tem-se intensificado o uso de agrotóxicos, o que aumentou a contaminação ambiental causada por estes compostos químicos.

No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos envolvendo o uso de extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência, aplicados à análise de amostras ambientais de águas e solos, para a determinação dos herbicidas bentazona, cianazina, simazina, atrazina, 2,4-D, diuron e linuron e dos metabólitos 3,4-dicloroanilina, 2,4-diclorofenol e 2-hidroxi-atrazina. Estudou-se o uso de tubos, discos e colunas de extração em fase sólida de C-18 e também colunas de poliestireno divinilbenzeno. As condições cromatográficas, otimizadas para a análise, consistiram em uma coluna analítica de 150 x 3,9 d.i mm e uma coluna de guarda de 30 x 3,9 d.i. mm, ambas Nova-Pak C-18 (Waters) de 4 μ m, fase móvel metanol: água 50:50, v/v, pH= 3,75 (com ácido fosfórico), vazão de 0,8 mL/min e detecção com detector de arranjo de diodos.

A validação dos métodos desenvolvidos baseou-se nos seguintes parâmetros: curva analítica, linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limites de detecção e de quantificação e robustez. Os valores obtidos comprovaram que os métodos desenvolvidos são adequados para determinação dos multirresíduos estudados, permitindo atingir níveis de concentração baixos, como requerem as legislações internacionais.

ABSTRACT**Method Development for Determination of Multiresidues of Herbicides and some Metabolites in Water and Soil Using High Performance Liquid Chromatography**

Author: Glaucia Maria Ferreira Pinto

Advisor: Profª Drª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

With the growth of the world population, the need for an increase in agricultural production becomes more acute. To guarantee the highest agricultural output, pesticide use has intensified, which has increased the environmental contamination caused by these chemicals.

In the present work methods involving solid phase extraction and high performance liquid chromatography were developed and validated, being applied to the analysis of environmental samples of water and soil. The herbicides bentazon, cyanazine, simazine, atrazine; 2,4-D, diuron and linuron and the metabolics 3,4-dichloroaniline; 2,4-dichlorophenol and 2-hydroxyatrazine were determined. The use of C-18 tubes, disks and columns and polystyrene-divinylbenzene columns were studied for solid phase extraction. The chromatographic conditions, optimized for the analysis, used a 4 µm Nova-Pak C-18 column (Waters) of 150 x 3.9 mm i.d., a guard column of 30 x 3.9 mm i.d., mobile phase methanol:water (50:50, v/v, pH = 3.75, phosphoric acid), flow rate 0.8 mL/min and diode array detection.

The validation of the developed methods was based on calculation of the following parameters: precision, accuracy, linearity, detection and quantification limits, analytical curve and recovery. Such parameters proved that the methods developed are appropriate for the expected application, reaching low concentration levels, as required by international legislation.

*CURRICULUM VITAE***1. DADOS PESSOAIS:**

Glaucia Maria Ferreira Pinto (nome de casada)

Glaucia Maria Ferreira da Silva (nome de solteira)

Casada

Data de nascimento: 20/12/74

Naturalidade: Campinas, SP

1.1. Endereços**1.1.1. Residencial**

R. Francisco Bueno de Lacerda, 250, apto 82B

13030-210 – Pq. Itália- Campinas, SP

Fone: (019) 32737371

Cel.: (019) 97004903

1.1.2. Profissional

Rodovia SP 101, km 08

Hortolândia, SP

CEP 13186-481

Fone: (19) 3887-8905

Fax:(19) 3887-9869

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA:

Doutoranda em Química, IQ - UNICAMP, Concentração em Química Analítica.

Ingresso em agosto de 1998. Título do Projeto de Pesquisa: "Desenvolvimento de Metodologia para Determinação de Multirresíduos de Herbicidas e seus Metabólitos em Água e em Solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência".

Mestre em Química Analítica - IQ - UNICAMP, em 19/02/1999. Título da

Dissertação de Mestrado: "Determinação de Resíduos de Herbicidas em Águas Utilizando Extração em Fase Sólida Seguida por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência".

Bacharel em Química Tecnológica, IQ - UNICAMP, em 31/01/1997.

Técnica em Química - Curso de 2º Grau com Formação Plena em Técnica Química - E.T.E. "Conselheiro Antônio Prado" - Campinas, SP, de fevereiro de 1990 a dezembro de 1992.

3. APERFEIÇOAMENTO ACADÊMICO

3.1. Línguas estrangeiras

Inglês – avançado

Francês – noções básicas.

3.2. Informática

Usuária avançada de programas de ambiente Windows: MS Office, Origin, Netscape

3.3 Cursos

"Auditorias Internas e Externas em Conformidade com a RDC 134/2001", 6,5 horas-aula, 18 a 21 de julho de 2002, Faco 2002, 6º Encontro Racine, São Paulo, SP.

"Validação de Métodos e Processos na Indústria Farmacêutica", Shib Mookherjea, 29 e 30 de abril de 2002, Sindusfarma, São Paulo, SP.

"Validação de Métodos Analíticos", Prof. Dr. Flávio Leite, 18 de setembro de 2001, 11º Encontro Nacional de Química Analítica, Campinas, SP.

"Eletroforese Capilar", Profª Drª Marina Tavares, 31 de agosto a 03 de setembro de 1999, 10º Encontro Nacional de Química Analítica, Santa Maria, RS.

"HPLC Avançado", Carl William Berguist, 24 a 28/08/1998, 40 horas/aula. Waters Comercial, São Paulo.

"Solid Phase Microextraction Theory and Practice", Prof. Dr. Janusz Pawliszyn, 15 a 17/04/1997, 24 horas/aula. UNICAMP.

3.4. Seminários

"Purificação de Água para Laboratório", Millipore, 19 de julho de 2000, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP.

"Recentes Desenvolvimentos da Varian em Espectrometria de Massas GC/MS/MS Utilizando Tecnologia Íon Trap", 01 de dezembro de 1998, Varian, Instituto de Química, UNICAMP.

"Atualização Tecnológica em Cromatografia Líquida de Alta Performance na Área Química, Farmacêutica e Educacional", 06 de dezembro de 1996, Varian, Hotel Ermitage Boulevard Campinas.

4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

4.1. Experiência Acadêmica

4.1.1. De Ensino

Docência Plena - Disciplina de Química Experimental I, QG-102, do Instituto de Química da UNICAMP, de agosto a dezembro de 2001.

Auxiliar Didático - Disciplina de Química Geral Experimental, QG-109, do Instituto de Química da UNICAMP, de março a julho de 1998.

Participação, na qualidade de **corretora**, da correção da prova de Química na 2ª fase do Vestibular UNICAMP 2001 (total de 168 h)

Participação, na qualidade de **corretora**, da correção da prova de Química na 2ª fase do Vestibular UNICAMP 2000 (total de 120 h)

4.2. Experiência Industrial

Emprego atual - Pesquisadora/Supervisora de Projetos - Validação de Métodos Analíticos/ Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo EMS Sigma Pharma.

Estágio Profissionalizante - Centro de Pesquisa - Departamento de Estudos Analíticos do Centro de Pesquisas - Rhodia S.A., Paulínia. Técnicas: CLAE, Via Úmida, Polarografia, ICP e Colorimetria. Estágio de nível técnico (1993).

5. PRODUÇÃO TÉCNICO CIENTÍFICA

5.1. Publicações Científicas

5.1.1. Artigos em Revistas Indexadas

Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Use Of Solid Phase Extraction And High Performance Liquid Chromatography For Determination Of Herbicide Residue Recoveries In Environmental Samples", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 25(7), 1093-1101 (2002).

Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Development of C-18 Stationary Phases Sorbed on Zirconized Silica for Use in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 25(2), 205-216 (2002).

Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Use of Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography for Determination of Triazine Residues in Water: Validation of the Method", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 463-469.

Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Mobile Phase Optimization for the Separation of Some Herbicide Samples Using HPLC", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 23 (9) 1353-1363 (2000).

Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Method Validation for the Determination of Bentazon Residues in Water", *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 369-374.

5.1.2. Artigo em livro

G.M.F. da Silva, J.F. Pinto em Como Preparar Experimentos, Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, B. de Barros Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns (autores), Editora da UNICAMP, 2001, p. 291.

5.1.3. Apresentação em Congressos

G.M. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Method Validation For the Determination of Multirresidues of Herbicides in Water Using C-18 Discs and HPLC", 26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2-7 junho de 2002, Montreal.

G.M. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Determination of herbicide Multirresidue in Environmental Samples Using C-18 Discs and HPLC", 26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2-7 junho de 2002, Montreal.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Desenvolvimento e Validação de EFS-CLAE *on-line* para Análise de Multirresíduos de Herbicidas em Água", 25^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 20-23 de maio de 2002, Poços de Caldas.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Extração e Pré-concentração de Multirresíduos de Herbicidas em Água, Utilizando Tubos C-18 e Colunas de DVB", XI Encontro Nacional de Química Analítica, 16-18 de setembro de 2001.

G.M.F. Pinto, Jefferson F. Pinto, Rubens Maciel Filho, I.C.S.F. Jardim, "Uso de Técnicas Computacionais Para Determinação de Parâmetros de EFS para Extração de Herbicidas", XI Encontro Nacional de Química Analítica, 16-18 de setembro de 2001.

G.M.F. Pinto, C.R. Silva, C. Airoidi, I.C.S.F. Jardim, "Determinação de Multirresíduos de Herbicidas Utilizando uma Nova Fase Reversa do Tipo C₁₈ com Grupos Polares", XI Encontro Nacional de Química Analítica, 16-18 de setembro de 2001.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, I.C.S.F. Jardim "Use of Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography for Determination of Herbicide Residue Recovery in Environmental Samples", HPLC 2001 Symposium, Holanda, 17-22 de junho de 2001.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Estudo e otimização das Melhores Condições de Extração em Fase Sólida para Determinação de Herbicidas", 24^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 28-31 de maio de 2001.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "HPLC Determination of Herbicide Adsorption/Dessorption Values in Soils With Different Characteristics", (painel 048), 23rd International Symposium on Chromatography, Olympia, London, 1-5 de outubro de 2000.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Adsorption/Dessorption Isotherms for Herbicides in Soil Utilizing HPLC", 8th Latin-American Congress on Chromatography (COLACRO VIII), Buenos Aires, Argentina, 12-14 de abril de 2000.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Análise Fatorial para Otimização de Parâmetros de Adsorção de Herbicidas em Solos Determinada Utilizando CLAE", (painel AB-016), livro de resumos, vol. 3, 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 23-26 de maio de 2000.

R.S. Freire, N. Duran, A.L. de Jesus Filho, W.F. Jardim, M.I.M.S. Bueno, **G.M.F. Pinto**, I.C.S.F. Jardim, "Uso de EDXRF e ICP-OES na Determinação de Metais em Sedimento Lacustre", (painel AB-065), livro de resumos, vol. 3, 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 23-26 de maio de 2000.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Desenvolvimento de Método, por CLAE, Para Determinação dos Herbicidas Diuron e Linuron em Água", , (painel QA 090) livro de resumos, vol. 3, 22^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 25-28 de maio de 1999.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Método Baseado em CLAE Para Determinação Simultânea de Herbicidas em Águas", (painel QA-69) livro de resumos, 10^o

Encontro Nacional de Química Analítica, 31 de agosto a 03 de setembro de 1999, Santa Maria, RS.

G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Extração e Determinação Simultânea de Multirresíduos de Herbicidas em Solo", (painel QA-70) livro de resumos, 10º Encontro Nacional de Química Analítica, 31 de agosto a 03 de setembro de 1999, Santa Maria, RS.

Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F. "Method Validation For the Determination of Bentazon Residues in Water"; 22nd International Symposium on Chromatography, Roma, Itália, 13-18 de setembro de 1998 (Abstract P-506).

Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Validação de Método para Determinação dos Herbicidas Cianazina e Simazina em Água"; 21º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1998 (Resumo QA-009).

Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F.; "Seleção de Fase Móvel para Separação de Herbicidas, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em Amostras de Água"; Seventh Latin American Congress on Chromatography, Águas de São Pedro, SP, 25-27 de março de 1998 (Abstract p. 202).

Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; "Development of a C-18 Stationary Phase Using Zirconized Silica as Support"; Seventh Latin American Congress on Chromatography, Águas de São Pedro, SP, 25-27 de março de 1998 (Abstract p. 220).

Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; "Preparação de Fase Estacionária Reversa C-18 Utilizando Sílica Zirconizada como Suporte"; 20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1997 (Resumo QA-109).

Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; Silva, R.B.; Melo, L.F.C.; Gushikem, Y.; Collins, C.H.; "Modificação de Superfície de Sílica com Titânio e Zircônio para Uso em CLAE"; 20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1997 (Resumo QA-106).

Silva, G.M.F.; Collins,K.E.; Jardim, I.C.S.F.; "Método de Enchimento de Coluna Microbore"; 19º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 27-30 de maio de 1996 (Resumo QA-019).

Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; "Estudo da Suspensão de Fase Estacionária Empregada no Enchimento de Colunas Cromatográficas Microbore"; VIII Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, MG, 03-06 de setembro de 1995 (Resumo p. 339).

Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; "Estudo da Influência do Volume de Injeção na Eficiência de Colunas Microbore"; 18º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambu, MG, 30 de maio a 2 de junho de 1995 (Resumo QA-076).

5.2. Participação em Sociedades

Sócia da Sociedade Brasileira de Química.

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os Pesticidas

O contínuo crescimento da população mundial gera a necessidade de aumentar os suprimentos de alimentos. Como resultado, o uso de pesticidas no mundo tem aumentado rapidamente, particularmente em países mais desenvolvidos, onde há uma forte preocupação com o extermínio de pragas, porém dispensa-se uma atenção relativamente menor à saúde do usuário, do consumidor e ao meio ambiente [1].

Os pesticidas possuem o benefício de matar pragas prontamente e com eficiência, quando usados corretamente. Entretanto, existem outros métodos efetivos para o controle de pragas, como o uso de agentes biológicos, mas como o "tempo" é um dos parâmetros primordiais na avaliação da eficácia do controle, os pesticidas são geralmente preferidos, pois proporcionam um resultado efetivo e imediato. Assim, os pesticidas, apesar de proporcionarem um inegável benefício para a agricultura, sua natureza representa um perigo tanto para o homem quanto para o meio ambiente [1].

Pesticida é um termo geral para inseticidas (pesticidas que matam insetos), acaricidas (pesticidas que matam ácaros), rodenticidas (pesticidas que matam roedores), moluscosidas (pesticidas que matam moluscos), herbicidas (pesticidas que matam ervas), fungicidas (pesticidas que matam fungos) e produtos de ação similar [2,3]. Este termo geralmente indica algum composto químico, agente biológico ou suas misturas, usadas como ingredientes ativos de produtos que têm a função de controlar pragas e doenças de plantações, ectoparasitas de animais e pragas da saúde pública [4]. A proteção das plantações contra pragas e parasitas representa o principal fator que propiciou o aumento do uso de pesticidas. Outra

aplicação importante é a batalha contínua contra os vetores de doenças em países tropicais.

A listagem do Manual de Pesticidas de 1991 apresenta com mais de 600 ingredientes ativos. Considerando que há inúmeras formulações diferentes, calcula-se que há entre 60 e 70 mil compostos químicos em uso comum. Além disso, o número total dos pesticidas disponíveis, bem como a quantidade produzida e aplicada, está aumentando progressivamente [4]. Juntamente com o uso, o interesse pelos efeitos dos pesticidas no homem e no meio ambiente, também tem aumentado.

Os pesticidas de origem natural têm sido usados pelo homem há muitos séculos. Alguns compostos inorgânicos como enxofre e arsênio, são provavelmente os pesticidas mais antigos em uso na Europa e Ásia. Na Odisséia de Homero (700-600 A.C.), o herói grego usou enxofre queimado para purificar a casa e em Plínio, o Ancião da História Natural (23-79 A.C.), muitos outros exemplos são dados. No século 10, sulfeto de arsênio era usado como inseticida. Os compostos de cobre já eram empregados no século XIX como fungicidas. As propriedades tóxicas do ácido cianídrico eram conhecidas pelos egípcios e os romanos, que utilizavam este composto, bem como o dissulfeto de carbono, como fumigantes, a mais de 100 anos atrás. Tabaco e nicotina têm sido utilizados na Europa desde o século XVII como inseticidas. Também foram encontradas evidências arqueológicas do uso de métodos químicos para proteger plantações na Grécia e Roma antiga [4].

O início da história dos pesticidas modernos ocorreu nos anos 30, quando as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) foram descobertas por Paul Muller, ganhador do Prêmio Nobel. Antes do desenvolvimento dos pesticidas modernos eram utilizadas substâncias muito tóxicas, como: ácido sulfúrico, arsenitos (herbicidas), estriquinina (rodenticida) e dinitro-o-cresol (multi-uso) [4].

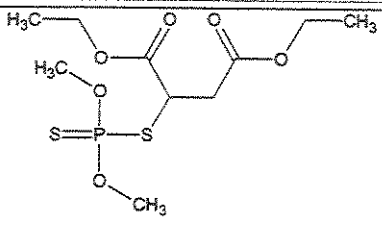
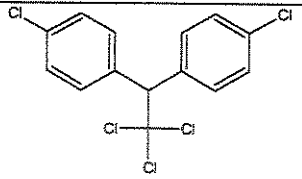
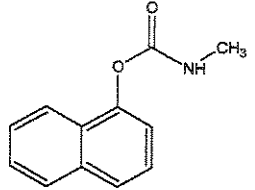
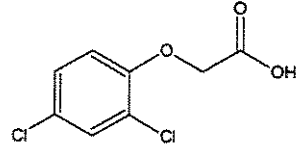
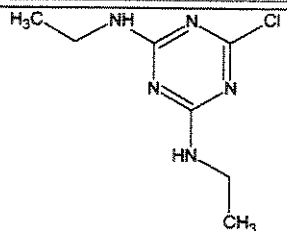
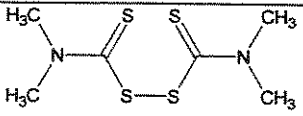
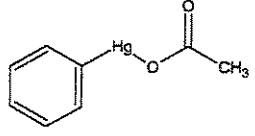
Um resumo ilustrando os passos importantes no desenvolvimento dos pesticidas modernos está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Desenvolvimento de alguns pesticidas modernos [4].

Ano	Composto
1939	DDT
1940-50	Outros hidrocarbonetos clorados
Anos 40	Inseticidas organofosforados
1944	paration
1941/42, 1944	2,4D; 2,4,5-T
Anos 50	carbamatos
1958	Paraquat e atrazina
Anos 70	Piretróides sintéticos
1954, anos 80	Inseticidas microbial

Os pesticidas, bem como muitos tipos de xenobióticos, podem ser classificados utilizando diferentes critérios tais como a finalidade de uso ou modo de ação, a classe química e/ou toxicidade. O critério mais comumente empregado é o uso ou ação, que divide os pesticidas em inseticidas, herbicidas, fungicidas e etc... Cada grupo inclui vários compostos químicos de diferentes classes estruturais. De acordo com a estrutura química, os pesticidas podem ser classificados em fosforados, clorados, carbamatos, piretróides, tiocarbamatos, derivados de uréia e etc... A Tabela 2 apresenta os principais tipos de pesticidas, um exemplo de cada classe com a estrutura correspondente e o tipo de ação típica [2,4].

Tabela 2. Classificação química de alguns pesticidas de acordo com o uso ou ação[2,4].

Tipo químico	Exemplo	Estrutura	Ação típica
Organofosforado	Malation		inseticida
Organoclorado	p-p'-DDT		inseticida
Carbamato	Carbaril		inseticida
Ácido clorofenóxi	2,4D		herbicida
Heterocíclico	Simazina		herbicida
Ditiocarbamato	Tiram		fungicida
Organometálico	Acetato de fenilmercúrio		fungicida

Diferentes pesticidas representam diferentes riscos para os usuários. Os pesticidas são classificados, pela World Health Authority, em relação a sua toxicidade para os mamíferos, em quatro classes de perigo:

classe 1A: extremamente tóxico

classe 1B: altamente tóxico

classe 2: moderadamente tóxico

classe 3: levemente tóxico.

Os pesticidas das classes 2 e 3 devem ser selecionados preferencialmente nos países tropicais, onde geralmente o uso de roupas de proteção mostram-se quase impraticáveis. As roupas, que são adequadas para evitar a penetração dos pesticidas, são geralmente desconfortáveis, principalmente em regiões de clima quente e úmido, e podem causar um efeito de stresse no usuário devido ao calor excessivo [1].

O perigo apresentado por um pesticida depende não somente da toxicidade inerente ao ingrediente ativo, mas também da duração da exposição: $\text{PERIGO} = \text{TOXICIDADE} \times \text{EXPOSIÇÃO}$. Os pesticidas, como o próprio nome indica (do latim *pestis* e *caedo*, significando "matador de praga") são amplamente usados, pois são capazes de introduzir efeitos tóxicos irreversíveis em sistemas biológicos indesejáveis. Infelizmente, como a sua toxicidade não é seletiva, se usados incorretamente, efeitos adversos podem ocorrer em humanos expostos ou em outras espécies que não são alvos. Assim, muitos cuidados são necessários na estocagem, manipulação, transporte e uso dos pesticidas para minimizar os riscos para os usuários e meio ambiente [1,4]. O ingrediente ativo, a formulação e o método de aplicação do pesticida irão influenciar no risco potencial causado aos usuários. Além disso, muitos fatores precedem a severidade dos efeitos que os pesticidas podem causar aos homens, como [4]:

- A quantidade da **dose absorvida** e a **toxicocinética** do composto, incluindo sua acumulação no tecido alvo (isto é, a duração da exposição)

- A **biotransformação**, a qual pode conduzir a ativação e/ou desativação do composto derivado
- A integridade dos **sistemas de defesa, mecanismos de reparo** e de **toxicodinâmica**, a nível molecular, celular e de tecido.

A avaliação toxicológica mais comum é dada pela dose letal 50, ou LD₅₀, que é definida como "a dose que previsivelmente causará uma resposta de 50% em uma população na qual se procura determinar o efeito letal", sendo sua unidade mg/kg. A LD₅₀ geralmente é estudada utilizando ratos albinos ou outros animais de laboratório. A toxidez, de acordo com a LD₅₀, mais importante é a dose oral aguda, que ocorre quando a exposição ao composto tóxico se dá através de uma dose única e pela boca. Quando a exposição ocorre pela pele tem-se a LD₅₀ dérmica e quando a exposição ocorre pelas vias respiratórias tem-se a LD₅₀ inalatória. Existe ainda a toxidade crônica que se caracteriza quando a exposição ao composto tóxico ocorre em doses sub-letais, mas repetidamente [5]. A classificação em classes de perigo, extremamente tóxica, moderadamente tóxica e etc., também é feita em relação aos valores de LD₅₀ oral aguda, e este tipo de classificação está apresentado na tabela 3 [5].

Tabela 3. Classificação de substâncias químicas baseada nos valores de LD₅₀ oral aguda em ratos [5].

Classificação	LD₅₀ (mg/kg)
Extremamente tóxica	até 5
Altamente tóxica	5 a 50
Moderadamente tóxica	50 a 500
Levemente tóxica	500 a 5000
Relativamente tóxica	> 5000

Observa-se, geralmente, que entre os pesticidas, os inseticidas são os mais tóxicos, o que pode ser comprovado pelos valores de LD₅₀ (oral aguda, por exemplo) que são mais baixos (1 a 500 mg/kg) que para os herbicidas ou fungicidas (geralmente acima de 5000 mg/kg). Isto pode ser entendido pelo simples fato de que os inseticidas, que têm como alvo insetos, afetam mais ao homem e aos animais superiores devido ao modo e local de ação, que é comumente o sistema nervoso. Por outro lado, os herbicidas e fungicidas, que têm como alvo ervas e microorganismos vegetais, respectivamente, possuem modo e local de ação consideravelmente diferentes, pois os organismos em questão são bem distintos [5].

Os pesticidas são, particularmente, poluentes importantes dentre os compostos orgânicos, devido ao seu uso comum e descontrolado. De acordo com Pimentel e Levitan [6], dos 455.106 kg de pesticidas que são aplicados nos Estados Unidos, os herbicidas representam 60%, os inseticidas 24% e os fungicidas 16%. De acordo com um relatório publicado nos Estados Unidos, pela *US Environmental Protection Agency* (EPA), mais de 500.000 toneladas de pesticidas foram usados em 1985. Na Europa, o uso de pesticidas é difícil de estimar, porém a Comunidade Européia reportou o uso de 14000 toneladas por ano durante o período de 1980-1983. Observando os dados sobre o uso de pesticidas específicos, como por exemplo a atrazina, verifica-se que ele foi de 90000 toneladas em 1980 [3]. O Brasil, desde a década de 70, destaca-se como um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, estando em terceiro lugar no mercado mundial, sendo antecedido somente pelos Estados Unidos e pelo Japão, que ocupa o primeiro lugar [7].

1.2 Os herbicidas

Dentre os pesticidas, os herbicidas representam um problema especial de resíduos no meio ambiente, pois são aplicados diretamente no solo em pré-emergência (seletivo) ou como esterilizante do solo (não-seletivo) [8]. Dessa forma, os herbicidas apresentam duas categorias básicas, podendo ser divididos em seletivos e não-seletivos, sendo que alguns só apresentam diferenças em relação à quantidade aplicada [8].

Os herbicidas também diferem amplamente entre si devido à toxicidade. Muitos são tóxicos para plantas e animais por diferentes mecanismos, enquanto muitos possuem um modo de ação comum para os dois alvos. A produção e o uso dos herbicidas têm aumentado mais rapidamente que para qualquer outro pesticida. Recentemente, quantidades de herbicidas, às vezes superiores a traços mas não necessariamente perigosas, têm sido detectadas em águas, o que certamente tem servido de alerta ao público [4].

1.2.1 Os herbicidas estudados

No presente trabalho foram estudados os herbicidas pertencentes às classes mais importantes em termos de toxicidade e de uso. São elas: triazinas, tiodiazinas, ácidos clorofenóxi acéticos e uréias substituídas.

1.2.1.1 As triazinas

As triazinas são uma classe de herbicidas seletivas que foram introduzidas por J.R. Geigy, nos anos 50 [4].

As triazinas e seus metabólitos são derivados amino primário de um sistema de anel azareno, sendo que estes tipos de compostos orgânicos são carcinogênicos para mamíferos [9].

A solubilidade das triazinas em água varia bastante, de 5-3500 µg/mL (ppm); elas são instáveis em alcalis e ácidos diluídos e são degradadas no solo por microorganismos [8].

Os herbicidas que pertencem a esta classe e que foram estudados neste trabalho foram: cianazina, simazina e atrazina.

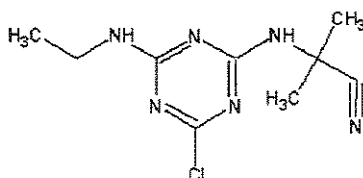
1.2.1.1.1 Cianazina

A cianazina é mais eficiente em pré que em pós-emergência, devido a maior facilidade de absorção por via radicular. No Brasil é registrada para culturas de algodão, café, cana-de-açúcar, milho e soja. Em outros países também é usada em ervilha, cevada, amendoim, batata, cebola e fruticultura. É mais eficaz no controle de ervas de folhas largas que de gramíneas [10-13].

A cianazina pertence à classe das triazinas e apresenta caráter fracamente básico. Este herbicida pode ser analisado diretamente por cromatografia gasosa (CG) ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

nome químico: 2-(4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazina-2-ilamino)-2-metilpropionitrila

fórmula estrutural:



fórmula molecular: C₉H₁₃ClN₆

massa molar: 240,7

classe toxicológica: classe 2, moderadamente tóxico

irritabilidade: pele - não irritante, olhos - não irritante

sintomas de envenenamento: letargia, respiração rápida, queda de pressão arterial e redução da tensão muscular

dissociação ácida (pka): 0,63 (T=25 °C)

solubilidade: água = 171 mg/L (T=20 °C); solventes orgânicos = benzeno, clorofórmio, etanol, hexano

estudos de degradação: decomposição em 10 semanas no topo de 20 cm de solo (T= 35 °C)

$t_{1/2}$: 3 semanas em solo não estéril (o grupo nitrila é hidrolizado a ácido carboxílico e o cloro é trocado por um grupo hidroxil)

dose letal: oral 182 mg/kg (em ratos)

nomes comerciais: Bladex 500 [14].

1.2.1.1.2 Simazina

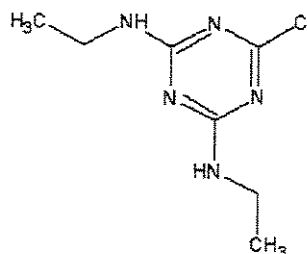
A simazina é utilizada exclusivamente em pré-emergência das ervas, devido a absorção foliar do produto ser extremamente reduzida. É registrada no Brasil para culturas de milho, plantações de abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, citrinos, macieira, videira, roseira e seringueira. Em outros países é utilizada também em feijões, milho, aspargo, morango e plantas ornamentais. Controla essencialmente gramíneas anuais e, também, uma ampla gama de ervas de folhas largas [10-13].

A simazina é uma das mais importantes triazinas, sendo um dos herbicidas mais usados na agricultura atual. Sua persistência no solo é bastante acentuada. Seu transporte no meio ambiente causa poluição do sistema aquático [8,15,16].

A simazina pode ser analisada diretamente tanto por CG quanto por CLAE [15,16].

-nome químico: 2-cloro-4,6-bis-etilamino-s-triazina

-fórmula estrutural:



- fórmula molecular:** $C_7H_{12}ClN_5$
- massa molar:** 201,66
- classe toxicológica:** classe 3, levemente tóxico
- irritabilidade:** pele - levemente irritante, olhos - moderadamente irritante
- sintomas de envenenamento:** ataxia, dispnéia e convulsões
- dissociação ácida (pka):** 1,62 (T=25 °C)
- solubilidade:** água = 5 mg/L (T=20 °C); solventes orgânicos = metanol, clorofórmio, éter etílico
- estudos de degradação:** 75-100% de degradação no solo em 12 meses.
- t_{1/2}:** 36-234 dias em "sandy loam"
- dose letal:** > 5000 mg/kg (em ratos)
- nomes comerciais:** Gesatop 800 PM, Herbazin 800 PM, Sipazina 800 PM, Simanax SC e etc...

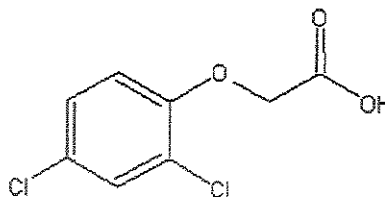
1.2.1.1.3 Atrazina

A atrazina é mais eficiente em pré que em pós-emergência, devido ser de absorção foliar moderada. É registrada no Brasil para as culturas de abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, mangueira, milho, pessegueiro, seringueira, pimenta do reino e roseira. Em outros países é utilizada em sisal e pastagem de alfafa. Controla, essencialmente, ervas de folhas largas anuais, mas também, algumas gramíneas [10-13].

A atrazina é a mais utilizada das triazinas. Sendo uma triazina também apresenta caráter fracamente básico, e juntamente com a simazina é a triazina mais persistente no meio ambiente [15].

-**nome químico:** 2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_8H_7Cl_2O_3$

-massa molar: 215,68

-classe toxicológica: classe 3, levemente tóxico

-irritabilidade: pele - irritação mínima, olhos - irritação mínima

-sintomas de envenenamento: fraqueza muscular, apatia, dispnéia e prostração.

-dissociação ácida (pka): 1,70

-solubilidade: água = 70 mg/L ($T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$); solventes orgânicos = acetona, dimetil sulfóxido, clorofórmio, etanol, acetato de etila, éter dietílico

- $t_{1/2}$: 6-10 semanas em solos (degradação microbiológica)

-dose letal: oral 1750 mg/kg (em camundongos)

-nomes comerciais: Atrazinax 500, Gesaprim 800 PM, Herbitrin 800, Siptran 800 PM, Stauzina 800 PM e etc...

1.2.1.2 As tiodiazinas

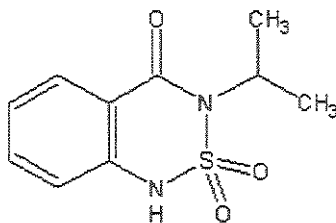
1.2.1.2.1 Bentazona

A bentazona é utilizada exclusivamente em pós-emergência, devido a reduzida absorção radicular. No Brasil ela é aplicada, principalmente, em culturas de amendoim, arroz, feijão, milho, soja e trigo. Em outros países é utilizada em diversas culturas de gramíneas, leguminosas, e outras dicotiledônias [10-13].

A bentazona é um composto de caráter polar e por isto só pode ser analisada por CG após uma etapa de derivatização com diazometano, gerando a N-metilbentazona [17,18]. Utilizando a CLAE este herbicida pode ser analisado diretamente.

-nome químico: 3-isopropil-2,1,3-benzotiodiazina-(4)-2,2-dióxido

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$

-massa molar: 240,3

-classe toxicológica: classe II, mediamente tóxico

-irritabilidade: pele - não irritante, olhos - moderada

-sintomas de envenenamento: apatia, prostração, tremores, irritação central, câibras tipo crônico, vômito e diarreia.

-dissociação ácida (pka): 3,2 ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

-solubilidade: água = 500 mg/L ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$); solventes orgânicos = acetona, etanol, acetato de etila, éter dietílico, clorofórmio, benzeno, cicloexano

- $t_{1/2}$: < 2-14 semanas em solos

-dose letal: oral 1100 mg/kg (em ratos)

-nomes comerciais: Banir e Basagran

1.2.1.3 Os ácidos clorofenóxidos acéticos

1.2.1.3.1 2,4-D

A estrutura química do 2,4-D é uma forma clorada de um hormônio de ocorrência natural da planta auxina [19].

O 2,4-D foi o primeiro herbicida seletivo a ser desenvolvido. Durante a guerra do Vietnã, o 2,4-D, junto com o 2,4,5-T e com o pentaclorofenol formaram o famoso "agente laranja", que foi utilizado pela força aérea americana como agente desfolhante. Após a guerra, em 1947, ele foi introduzido como herbicida

substituindo a capina mecânica e rapidamente tornou-se o herbicida mais amplamente usado no mundo. Depois de cinquenta e um anos de uso, o 2,4-D é ainda o terceiro herbicida mais usado nos Estados Unidos [20,21].

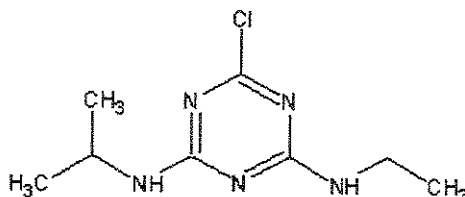
O 2,4-D é um herbicida utilizado, normalmente, em pós-emergência das ervas mas, uma vez que também é absorvido via radicular, pode ser usado em pré-emergência e em pré-plantio incorporado. No Brasil e em outros países é registrado para culturas de café, cana-de-açúcar, cereais, milho, trigo e controle de ervas aquáticas [10-13].

Há muitas controvérsias quanto a toxidez deste herbicida. Há estudos que dizem que o 2,4-D é carcinogênico, mutagênico e neurotóxico, porém outros estudos afirmam que este herbicida tem pouco potencial para apresentar estas características [20]. Porém, comprovadamente a síntese do 2,4-D gera dioxinas, que são compostos conhecidos como muito tóxicos [19].

O 2,4-D é um herbicida de caráter altamente polar e ácido, portanto, só pode ser analisado por CG após derivatização, principalmente por metilação [22]. Empregando a CLAE este herbicida pode ser analisado diretamente.

-nome químico: 2,4 diclorofenoxiacético

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_8H_6Cl_2O_3$

-massa molar: 221,04

-classe toxicológica: classe I, altamente tóxico (formulações amina)

-irritabilidade: pele - moderadamente irritante, olhos - irritante

-sintomas de envenenamento: mal-estar, vômito, enfraquecimento muscular, dificuldade respiratória, braquicardia, suor excessivo, oligúrgia; pessoas diabéticas são particularmente sensíveis ao 2,4-D.

-**dissociação ácida (pka):** 2,73 (T=25 °C)

-**solubilidade:** água = 620 mg/L (T=20 °C); solventes orgânicos = acetona, etanol, dioxano, heptano, tolueno, xileno, dimetil sulfóxido, éter dietílico

-**t_{1/2}:** < 7 dias em solos (biodegradável)

-**dose letal:** oral 375 mg/kg (em ratos)

-**nomes comerciais:** Aminol, DMA 806 BR, 2,4-D Isamina, Esteron 400 BR e etc..

1.2.1.4 As uréias substituídas

1.2.1.4.1 Diuron

O diuron é utilizado preferencialmente em pré-emergência por ser a via radicular a mais importante para absorção do produto. Este herbicida é registrado no Brasil, e em diversos países, para culturas anuais (alfafa, algodão e soja), plantações perenes (abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, citrinos, pimenta-do-reino, seringueira e videira), áreas não cultivadas e canais de irrigação e drenagem [10-13].

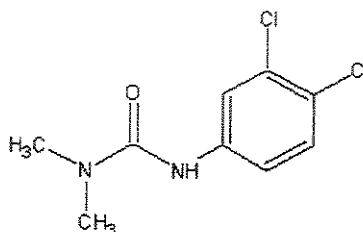
Este herbicida é considerado o terceiro mais perigoso pesticida para fontes de águas subterrâneas.

O diuron pertence a classe das uréias substituídas. As uréias substituídas são quimicamente persistentes e podem permanecer no solo por vários meses após a aplicação [15]. Além disso, as fenil uréias são solúveis em água, tendo grande capacidade de migração para a água e também podem entrar na cadeia alimentar, onde são degradadas e metabolizadas por mamíferos [23]. Considera-se que esta classe de compostos é dificilmente detectada através da análise direta por CG devido a decomposição térmica, resultando em isocianatos e aminas alifáticas. Esta ruptura térmica é atribuída à ligação hidrogênio-amida, pois a substituição nesta posição, com um grupo metila, proporciona compostos termoestáveis [15]. Dessa forma, o diuron, sendo pouco volátil, é analisado por CG

após derivatização por acilação ou metilação, hidrólise para sua anilina correspondente ou pirólise para isocianato de fenila [24]. Análises por CLAE podem ser realizadas diretamente.

-nome químico: 3-(3,4 diclorofenil)1,1-dimetil uréia

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_9H_{10}Cl_2N_2O$

-massa molar: 233,1

-classe toxicológica: classe 2, moderadamente tóxico

-irritabilidade: pele - não irritante, olhos - levemente irritante

-sintomas de envenenamento: não conhecidos

-solubilidade: água = 42 mg/L ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$); solventes orgânicos = acetona, benzeno, estearato de butila, óleo vegetal

-estudos de degradação: duração da atividade no solo de ~ 4-8 h, dependendo do tipo de solo e umidade. Degradação de 67-99 % ocorre em 10 semanas, sob condições aeróbicas.

-dose letal: oral 3400 mg/kg para formulação de 500 g/L (em ratos)

-nomes comerciais: Cention 800, Diuron 500 SC, Diuron Nortox, Diuromex, Herburon, Karmex 800, Staron SC e etc...

1.2.1.4.2 Linuron

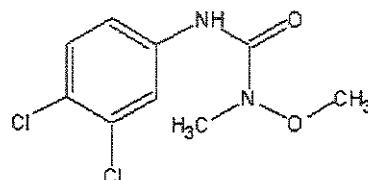
O linuron é utilizado em pré ou pós-emergência precose. É registrado no Brasil para as culturas hortícolas (aipo, alho, alho-porro, ervilha, e outras), culturas anuais (algodão, amendoim, mandioca, milho, soja, sorgo e trigo) e plantações de abacaxi, cacau, café, cana-de-açúcar, castanheiro, eucalipto, pereira e videira. Ele

é utilizado em outros países, também, para beterraba, feijão e áreas não cultivadas. Controla uma gama de ervas de folha larga [10-13].

O linuron pertence a classe das uréias substituídas, valendo as propriedades gerais descritas para o diuron.

-nome químico: 3-(3,4 diclorofenil)-1-metoxi-1-metil uréia

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$

-massa molar: 249,1

-classe toxicológica: classe 3, levemente tóxico

-irritabilidade: pele - moderadamente irritante, olhos - moderadamente irritante

-sintomas de envenenamento: não conhecidos

-solubilidade: água = 75 mg/L ($T=20\text{ }^{\circ}\text{C}$); solventes orgânicos = acetona, etanol, dietil éter, clorofórmio, benzeno, tolueno, xileno

- $t_{1/2}$: 2-5 meses em solos (degradação microbiológica)

-dose letal: oral 4000 mg/kg (em ratos)

-nomes comerciais: Afalon 500 SC, Linurex 50 PM, Lorox 500 e etc..

1.2.2 Os metabólitos estudados

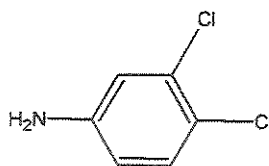
No presente trabalho foram estudados os seguintes metabólitos: o 3,4-dicloroanilina, originário da degradação da feniluréia diuron; o 2,4-diclorofenol, originário da degradação do fenoxialcanoato 2,4-D; e a 2-hidroxiatrazina, proveniente da degradação das triazinas atrazina e simazina.

1.2.2.1 3,4-DCA

É utilizado como intermediário industrial na produção de linuron, diuron e proponil, sendo que a maior emissão deste composto para o meio ambiente é justamente pela degradação destas feniluréias [25].

-nomes químicos: 3,4- dicloroanilina; 1-amino-3,4-diclorobenzeno e 3,4-diclorobenzenoamina

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_6H_5NCl_2$

-massa molar: 162,02

-classe toxicológica: 9

-irritabilidade: pele - irritante, olhos - severamente irritante.

-sintomas de envenenamento: irritação da pele, severa irritação dos olhos, aceleração da respiração devido à redução de oxigenação do sangue. Permeação através da pele pode levar a efeitos sistêmicos.

-dissociação ácida: $pK_a = 2,96$ (25 °C)

-solubilidade: solúvel em etanol, éter etílico e outros solventes orgânicos. Ligeiramente solúvel em água.

-dose letal: $LD_{50} = 740$ mg/kg

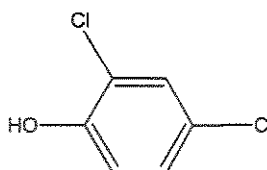
-nomes comerciais: 3,4-DCA.

1.2.2.2 2,4-DCP

Pode ser utilizado como inseticida, conservante de madeira, desinfetante de sementes, em síntese orgânica e na produção de 2,4-D [26].

-nome químico: 2,4-diclorofenol

-fórmula estrutural:



-fórmula molecular: $C_6H_4Cl_2O$

-massa molar: 163,00

-classe toxicológica: 6.1

-irritabilidade: pele - severa irritação, olhos - severa irritação, mucosas - severa irritação

-sintomas de envenenamento: irritação severa e queimaduras na pele, olhos, mucosas e parte superior do aparelho respiratório, tremores, convulsões, respiração acelerada, vômito, queda da pressão sanguínea, náusea, diarreia, suor excessivo.

-dissociação ácida: $pK_a = 7,69$ (25 °C)

-solubilidade: solúvel em dimetilsulfóxido, acetona e bastante solúvel em éter dietílico, clorofórmio e benzeno. Pouco solúvel em água.

-dose letal: $LD_{50} = 580$ mg/kg

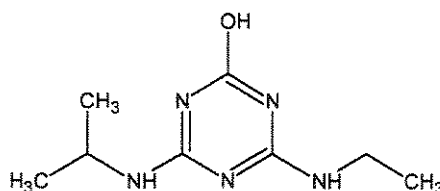
-nomes comerciais: DCP, 2,4-DCP, NCI-C55345

1.2.2.3 2-HA

A 2-hidroxiatrazina é formada principalmente pela degradação metabólica das triazinas atrazina, simazina e propazina. Não há registros de emprego deste composto em síntese orgânica [27].

-nome químico: 2-hidroxiatrazina; 4-etilamina-2-hidroxi-6-isopropilamina-1,3,5-triazina e hidroxidicloroatrazina

-fórmula estrutural:



- fórmula molecular: $C_8H_{15}N_5O$
- massa molar: 197,24
- classe toxicológica: não disponível
- irritabilidade: não disponível
- sintomas de envenenamento: não disponível
- dissociação ácida: não disponível
- solubilidade: não disponível
- dose letal: não disponível
- nome comercial: 2-HA

1.3 Os pesticidas e o meio ambiente

Os pesticidas que são aplicados na lavoura, eventualmente, são transportados para as águas superficiais, através de vários mecanismos e seus resíduos podem permanecer no meio ambiente, devido a sua persistência, causando riscos potenciais à saúde humana [28,29]. As principais vias de entrada de compostos orgânicos nos organismos humano e animal são a gastrointestinal, respiratória e dérmica. Uma vez no organismo, tanto de animais como de humanos, os pesticidas sofrem transformações e são excretados na urina, nas fezes e no leite. Os pesticidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação a concentração inicial de pesticidas, como o leite, os peixes de água doce ou salgada, os crustáceos e os vegetais. A cadeia alimentar aquática é um bom exemplo de como ocorre a acumulação. Se for considerada uma concentração arbitrária de 1 para concentrações baixas ("traços") de um inseticida na água, então a concentração em um plâncton será de 10, em um crustáceo será de 500, em um peixe pequeno será de 2500, em um peixe carnívoro será de 5000 e em um pássaro, que come peixes, será de 125000 [30].

Em 1979, um relatório do Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) resumiu o impacto ambiental causado pelo uso indiscriminado dos pesticidas utilizando as seguintes palavras: "Quando aplicados sem os devidos cuidados, os pesticidas químicos podem causar efeitos colaterais agudos e persistentes, incluindo enfermidades e mortes de pessoas, animais, peixes e pássaros, e destruição de colheitas. Mesmo quando usados apropriadamente, os pesticidas químicos apresentam efeitos colaterais inevitáveis. Sua persistência e natureza ambígua, combinada com a tendência de muitos compostos em concentrar em organismos que se movem na cadeia alimentar, podem aumentar sua toxicidade para peixes, pássaros e outras formas de vida incluindo o homem e causar outros efeitos prejudiciais para o homem, sua saúde e bem estar" [31].

A tabela 4 ilustra a complexidade do uso dos pesticidas [31].

Devido a aplicação, os pesticidas podem ser localizados no solo, no ar (névoas), na água ou nas plantas. O transporte dos pesticidas presentes em diferentes compartimentos do meio ambiente pode ocorrer através de diversos mecanismos, como: vaporização (do solo para o ar, ou das plantas para o ar), precipitação (do ar para o solo, ou do ar para as plantas, ou do ar para a água), escoamento (das plantas para a água), transporte (do solo para água e vice-versa), absorção (da água para as plantas), e etc... Além disso, os resíduos dos pesticidas podem atingir os alimentos e assim os animais e o homem [31].

Tabela 4 – Visão da complexidade do uso dos pesticidas [31]

Controle de pragas utilizando pesticidas	
Na agricultura	Na saúde pública
Redução da perda de alimentos. O prejuízo, em dólares, causados pela perda de colheitas, devido ao ataque de insetos no USA foi reduzido em 13 %.	Decréscimo na extensão e intensidade de doenças causadas por vetores. Existem dados impressionantes na redução da mortalidade devido a malária.
Problemas	
Persistência no meio ambiente. Devastação ecológica. Acumulação nos tecidos. Efeitos na saúde de organismos que não são alvos. Surgimento de resistência das pragas. Elevação dos custos. Abuso de pesticidas.	
Soluções	
Controlar a exposição de organismos que não são alvos. Integração do gerenciamento de pragas. Monitorar os resíduos. Avaliar com segurança as misturas. Desenvolver antídotos (isto seria averiguado e providenciado pelos fabricantes).	

O deslocamento dos pesticidas no meio ambiente depende da maneira como eles são aplicados, da natureza química de seus compostos e de sua formulação. A técnica de aplicação mais popular é a pulverização, sob a forma de nuvem de pó, fumos, névoa ou vapores, utilizando dispositivos manuais ou mecânicos ou pequenos aviões, os quais facilitam a difusão dos compostos químicos em uma grande área e fazem com que se aumente a persistência dos efeitos potencialmente tóxicos dos pesticidas no ambiente [31].

Os pesticidas e seus metabólitos movem-se no meio ambiente através de plantas, solo, água e ar, primariamente de acordo com fatores climáticos como chuva, vento e sol. Um esquema ilustrando a interligação destes fatores e o modo

de transferência, transformação, volatilização e eventuais perdas dos pesticidas no ambiente é mostrado na Figura 1 [8].

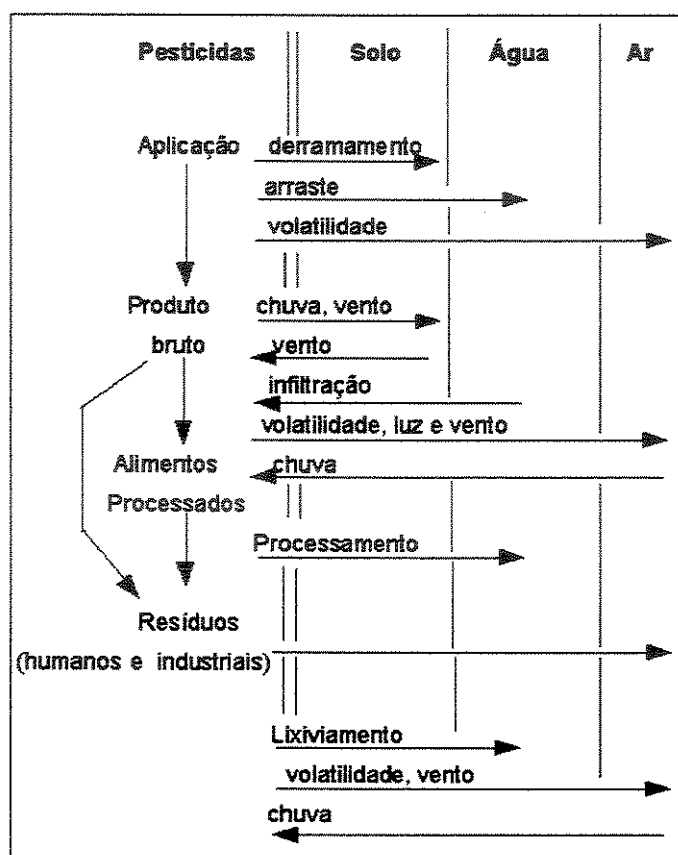


Figura 1. Rotas de movimentação e perda dos pesticidas no ambiente [8].

O risco ecológico inerente aos pesticidas decorre da vulnerabilidade das diversas comunidades bióticas à sua ação tóxica e à resposta diferencial dos organismos a seus efeitos não letais, mas de longa duração [31].

1.4 O solo

Ao produto final do intemperismo das rochas dá-se o nome de solo, desde que as condições físicas, químicas e biológicas permitam o desenvolvimento da vida vegetal, junto a atividade de microorganismos em associação íntima com a

vida de vegetais mais desenvolvidos [32]. O solo cobre a superfície da Terra e, juntamente com o ar e a água, é uma das fontes de recursos indispensável.

Em uma visão mais ampla, o solo é a combinação de minerais de matéria orgânica, água e ar, e faz parte do regolito (manto que cobre a Terra, também chamado de manto de intemperismo), que suporta o crescimento de plantas [33].

O solo pode ser classificado quanto a sua riqueza ou pobreza de nutrientes em: distrófico, eutrófico, álico, epitrófico, epiálico, endoálico, etc... A classificação científica (taxonômica) divide o solo em: latossolos (amarelo, bruno, vermelho-amarelo, vermelho escuro, roxo e húmico), solos com B textural (podzólicos, terras roxas estruturadas, brunos não cálcicos, planossolos, solonetz-solodizados), cambissolos, areias quartzosas, regossolos, solos litálicos, solos aluviais, solos hidromórficos, podzóis, vertissolos, solos salinos, solos concrecionários lateríticos e solos brunizens [34]. Na verdade, o nome atribuído aos diferentes solos é bastante variável.

De acordo com a classificação taxonômica do "Soil Survey Staff" (Departamento de Agricultura, Serviço de Conservação de Fontes Naturais dos EUA) [35], os solos podem ser classificados em: alfisol, andisol, aridisol, entisol, gelisol, histosol, inceptisol, molisol, oxisol, espodosol, ultisol e vertisol.

A ciência que estuda o solo é chamada pedologia e a ciência que estuda especificamente o solo arável é chamada de edafologia [32].

Um solo, após atingir sua maturidade apresenta, a partir da superfície, o perfil ilustrado na Figura 2. Observa-se que o perfil do solo é caracterizado por várias zonas designadas como horizontes O, A, E, B e C. As espessuras de cada horizonte são bastante variadas, apresentando desde centímetros até metros [32,33].

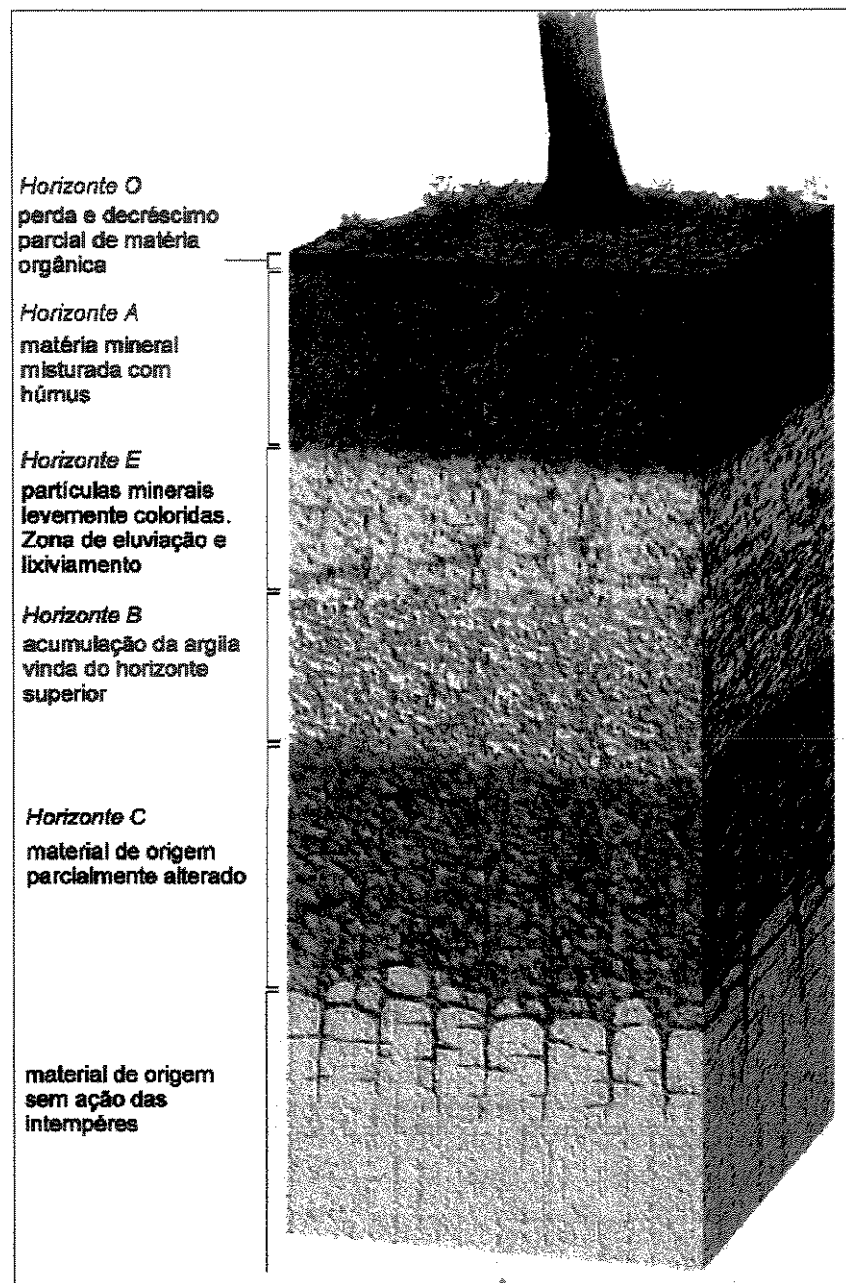


Figura 2. Perfil do solo mostrando os horizontes característicos [29].

Os solos contêm partículas de diferentes tamanhos e a proporção delas define a textura dos solos, que é uma das suas propriedades básicas. A textura influencia fortemente na habilidade do solo reter e eliminar água e ar. Assim, solos arenosos são drenados facilmente, enquanto solos com alto teor de argila secam mais lentamente. Como os solos dificilmente são constituídos por partículas de um

único tamanho, foram estabelecidas categorias de texturas, baseadas nas diferentes proporções de argila, silte e areia total. Após a análise granulométrica, transportam-se os resultados para um diagrama triangular, onde as diferentes texturas estão delimitadas. Existem vários modelos de triângulos para auxiliar a classificação das texturas dos solos [32,36]. A Figura 3 apresenta o triângulo proposto pelo Soil Survey Staff do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e modificado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, a qual introduziu mais uma classe textural denominada argila pesada, bem como a modificação da palavra barro por franco [36]. A textura dos solos, isto é, a proporção de diferentes partículas, tem grande influência na retenção de compostos contaminantes, como os pesticidas.

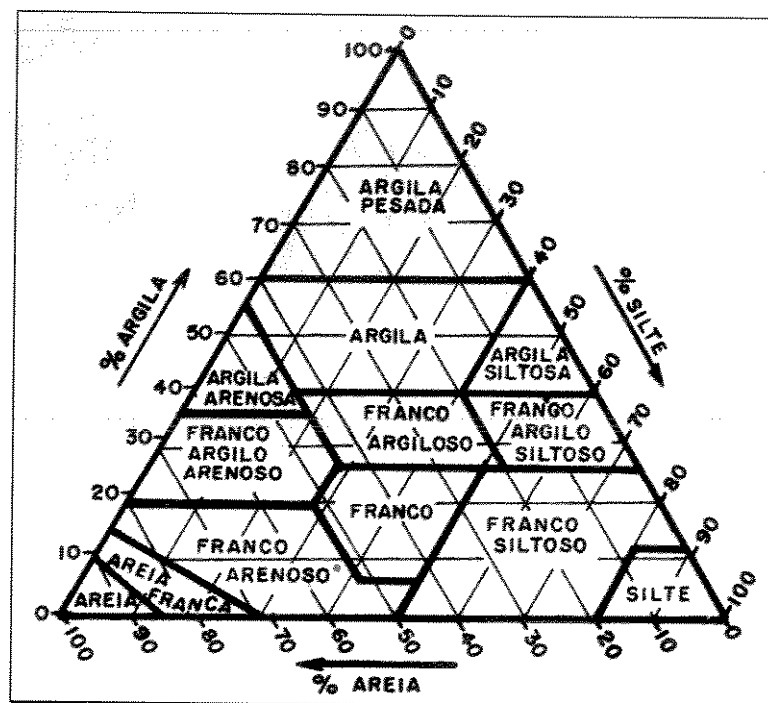


Figura 3. Diagrama de textura de solos [36].

Muitos levantamentos de reconhecimento de solos fazem referência às classes texturais indicando os termos em inglês. As traduções mais aceitas, dos termos em inglês para o português, seriam: clay - argila, silty clay - argila siltosa

(argila limosa), sandy clay - argila arenosa, silty clay loam - franco argilo siltoso (barro argilo limoso), clay loam - franco argiloso, sandy clay loam - franco argilo arenoso, silt - silte, silt loam - franco siltoso, loam - franco (barro), sandy loam - franco arenoso, loamy sand - areia franca (areia barrenta) e sand - areia [36].

1.5 Os pesticidas no solo

Durante muito tempo, acreditou-se e agiu-se como se o solo fosse um sistema fechado, isolado e inerte, no qual era possível fazer depósito de resíduos sem que houvessem implicações para os organismos vivos. Obviamente, isto não é verdade, uma vez que o solo é essencial para a vida na Terra, fazendo parte de um sistema global (Figura 4) [37].

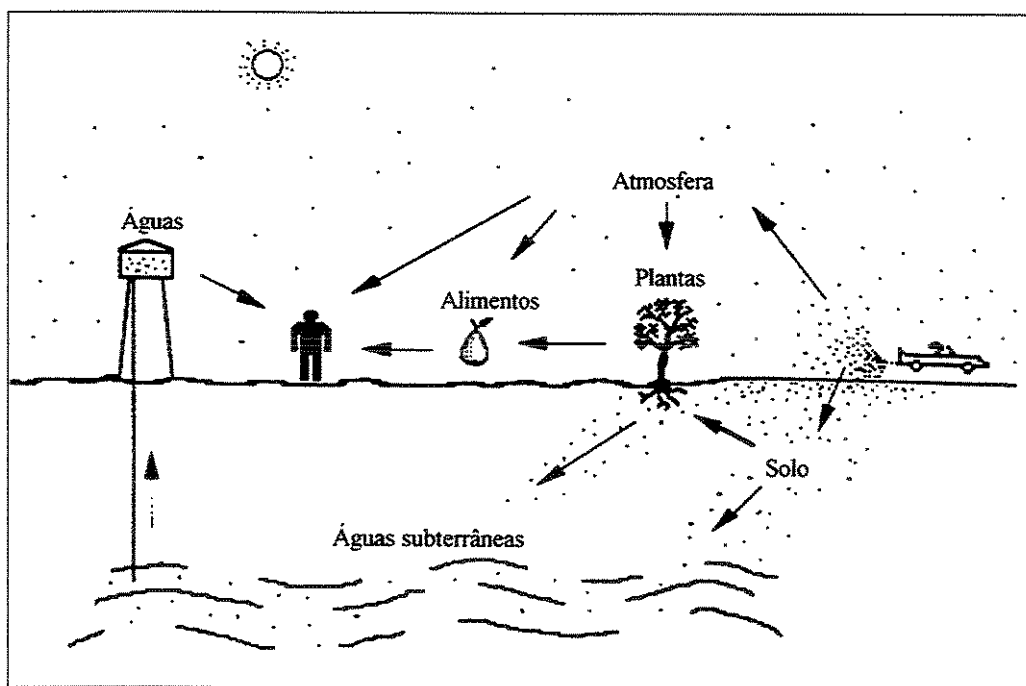


Figura 4. Principais caminhos de poluição ambiental [37].

Grandes quantidades de pesticidas entram em contato com o solo, sejam por aplicação direta ou trazidos pelo ar, pela chuva ou por animais e plantas, os

quais morrem e podem ser incorporados ao solo. Assim, o solo torna-se um reservatório de muitos resíduos, os quais se movem através da atmosfera, da água ou dos organismos vivos.

Com poucas exceções, outros compostos inorgânicos têm se mostrado tão persistentes quanto arsênio, cobre ou chumbo, que foram os principais inseticidas e fungicidas utilizados antes da Segunda Guerra Mundial, ou os inseticidas organoclorados. Sem dúvida, o DDT representa o composto químico encontrado em maior quantidade nos tipos de solos testados para resíduos de pesticidas, seguido pelo dieldrin, que geralmente é encontrado em quantidades menores, mas com maior frequência [38].

Quando um pesticida é aplicado no solo, ele é exposto a processos como degradação, lixiviamento, adsorção, volatilização e absorção por organismos. O que ocorre com cada composto depende de como ele se comporta frente a estes processos, isto é, depende de suas propriedades físico-químicas. Muitas destas propriedades têm importância significativa no processo de contaminação das águas subterrâneas. A contaminação das águas varia de acordo com o movimento do contaminante no fluxo de água, que depende da solubilidade do contaminante em água, da sua força de adsorção nas partículas do solo, da resistência à degradação biótica e abiótica e da volatilidade. A importância destes e de outros fatores têm sido demonstradas em estudos de campo e de laboratório, bem como em investigações de monitoramento [31]. A Figura 5 apresenta um diagrama esquemático dos processos característicos de herbicidas em solos [39].

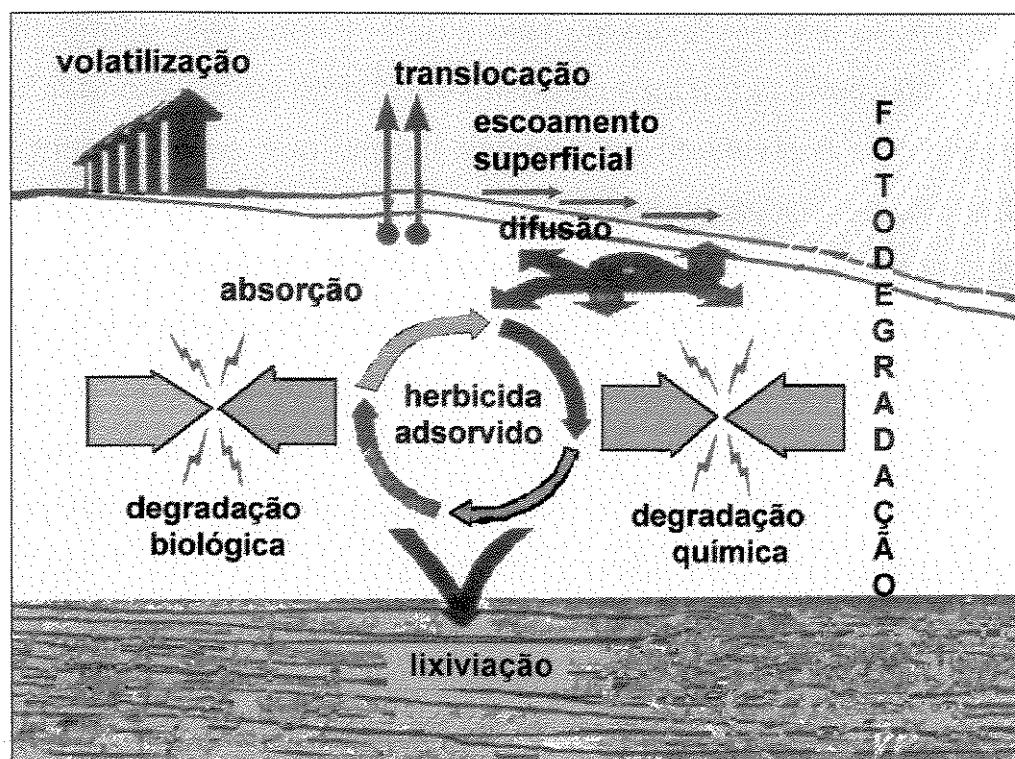


Figura 5. Processos característicos de herbicidas em solos [39].

1.5.1 A acumulação e persistência dos pesticidas no solo

Em muitos níveis, os pesticidas podem contaminar e acumular nos vários membros da cadeia alimentar, bem como no solo e na água do meio ambiente. Durante as décadas passadas, informações consideráveis sobre este assunto foram investigadas. Acredita-se que fatores como temperatura, luz, umidade, movimento do ar, volatilidade dos compostos e atividade de microorganismos, podem influenciar a dispersão dos pesticidas na superfície de plantas e do solo. Entretanto, para plantas e animais o fator mais importante para a quebra e transformação dos pesticidas é a ação enzimática. Quando um pesticida é aplicado em plantas, solos, animais, água e ar, muitos fatores podem afetar as mudanças químicas e as taxas dos mecanismos dependerão da natureza dos compostos e das condições ambientais [8].

A acumulação dos pesticidas no solo é determinada pela diferença entre a taxa de adição do pesticida e a taxa de desaparecimento do mesmo [40].

A persistência é resultado de diversos fatores que se interagem, mas as propriedades dos pesticidas podem ser dominantes. A volatilidade, solubilidade, estabilidade a radiação ultravioleta, a tendência em adsorver ou dissolver na superfície dos tecidos, a facilidade de sofrer hidrólise, a sensibilidade à umidade, o potencial para polimerizar, a possibilidade de isomerização ou outros rearranjos moleculares são propriedades químicas significativas para a persistência. Condições climáticas como ventos, chuvas, quantidade e intensidade de luz, temperatura e umidade também são importantes [8].

Os resíduos de pesticidas que permanecem na cadeia alimentar podem existir como depósitos na superfície, podem penetrar na cutícula ou serem transportados para várias seções da planta ou animal por ações sistêmicas. Uma vez depositado, o pesticida é geralmente metabolizado ou quebrado em produtos secundários, através de vários mecanismos [38].

1.5.2 Características do solo que afetam a persistência dos pesticidas [38]

A seguir estão apresentadas as principais características dos solos que afetam a persistência dos herbicidas nos mesmos:

Tipo de solo: influência não somente a persistência e a atividade dos pesticidas no solo, mas também a taxa com que são convertidos em outros compostos.

Conteúdo de matéria orgânica (%C): este é o fator mais importante na persistência dos pesticidas no solo. A porcentagem de carbono orgânico (%C) pode variar de menos de 1% até 50%. Todas as evidências indicam que quanto maior a %C maior será a persistência dos pesticidas no solo.

Conteúdo de argila: talvez o conteúdo de material coloidal seja tão importante quanto a %C. Os solos que apresentam um grande conteúdo de argila

possuem uma grande área superficial interna e portanto espera-se que eles retenham mais os pesticidas, pois têm maior área para adsorção.

Acidez do solo: a concentração de íons hidrogênio pode influenciar a quebra dos pesticidas no solo de muitas maneiras. Ela pode afetar a estabilidade do material argiloso, a capacidade de troca iônica, ou a taxa pela qual as decomposições químicas e bacterianas ocorrem. Entretanto, não há muitas evidências diretas de que a acidez influencie na persistência dos pesticidas no solo.

Conteúdo de minerais: a quantidade e variedade dos minerais no solo influenciam seu tipo e estrutura e também a persistência dos pesticidas. Por exemplo, a adsorção é provavelmente a primeira etapa no processo de decomposição catalítica, sendo que ela ocorre muito rapidamente em solos com alto teor de ferro.

Temperatura: os pesticidas desaparecem no solo principalmente devido a degradação química, decomposição bacteriana e volatilização, e todos estes processos são influenciados pela temperatura. À baixas temperaturas estes processos ocorrem muito lentamente e são pequenas as perdas de pesticidas.

Umidade do solo: A principal influência da umidade na persistência dos pesticidas no solo é devido aos efeitos da adsorção deles em várias frações do solo. A água pode competir com os pesticidas pelos sítios de adsorção, pois ela é uma molécula muito polar e fortemente adsorvida pelos colóides do solo.

Plantação: de acordo com a plantação o solo pode estar exposto a maiores quantidades de chuva, vento e sol, fatores estes que influenciam fortemente a persistência dos pesticidas no solo.

1.5.3 A degradação e perda dos pesticidas no solo

As principais rotas de perda e degradação dos pesticidas no solo são [38]:

Volatilização: Quanto menor a volatilidade, e portanto quanto menor pressão de vapor, menor será a evaporação dos pesticidas e menores as perdas. Evidências mostram que mesmo pesticidas considerados não-voláteis, quando expostos à atmosfera por longos períodos de tempo, podem volatilizar. Principalmente em solos cultivados, restringe-se a volatilização na superfície do solo e portanto ela irá depender dos transportes para a superfície do solo. O transporte ocorre por movimentos de capilaridade ou por difusão moleculares e ambos estes processos podem ser lentos.

Lixiviamento: O movimento dos pesticidas através do solo, causado pela água, pode ser dividido em dois componentes distintos: movimento lateral dos pesticidas na superfície do solo e movimento de penetração dos pesticidas com a água drenada. O grau de lixiviação de um pesticida no solo está correlacionado com a sua solubilidade em água, mas este relacionamento não é simples, pois ele é afetado pela capacidade do pesticida adsorver nas frações do solo.

Degradação microbiológica: Há muitas evidências de que os microorganismos são muito importantes na degradação de pesticidas persistentes, entretanto é bastante difícil diferenciar entre a degradação biológica e não-biológica. Os maiores grupos de microorganismos do solo são os actinomicetes, fungos e bactérias. Eles podem degradar os pesticidas através de β -oxidação, clivagem-éter, hidrólise ester e amida, oxidação de álcoois e aldeídos, dealquilação, hidroxilação, hidroalogenação, epoxidação, dealquilação redutiva, N-dealquilação, etc... A característica mais importante dos sistemas de degradação por microorganismos é serem redutivos [8].

Degradação pela luz do sol: A luz solar, particularmente a radiação ultravioleta (UV), parece ser o fator mais significativo em relação aos efeitos da natureza.

Um dos fatores mais importantes que afetam a degradação dos pesticidas pela luz solar é a presença de fotossensibilizadores. A primeira informação nesta área foi obtida quando se descobriu que a riboflavina sensibiliza a fotodecomposição do 2,4-D [41]. Quatro tipos básicos de reações fotoquímicas podem ocorrer quando pesticidas aromáticos são expostos a radiação ultravioleta. São elas: substituição no anel, hidrólise (em solução aquosa), oxidação e polimerização. A reação de substituição mais comum no anel para clorados aromáticos é a troca do cloro do anel por um grupo hidroxila.

Outras perdas: Podem ocorrer perdas de pesticidas devido a inativação causada pela matéria orgânica, em colóides do solo e em tecidos de plantas e animais [38].

A seguir será apresentado um resumo sobre a degradação das triazinas, dos fenoxialcanoatos e das feniluréias em solo.

1.5.3.1 Triazinas

Geralmente os herbicidas deste grupo têm uma persistência moderada no campo.

As triazinas são degradadas por processos químicos e biológicos. No solo a degradação das triazinas ocorre devido a hidrólise, radiação UV, oxidação e microorganismos. Seus principais produtos de decomposição no solo e na água são as respectivas hidroxitriazinas, as quais são formadas principalmente por reações hidrolíticas quimicamente induzidas [15,16]. Porém, estudos mostram que usando *Aspergillus fumigatus*, a N-dealquilação é o primeiro passo na rota de degradação, resultando em 2-cloro-4-amino-6-etilamino-s-triazina. A Figura 6 apresenta o caminho proposto para a degradação da simazina [41]. A Figura 7 apresenta o caminho de degradação proposto para a atrazina [42].

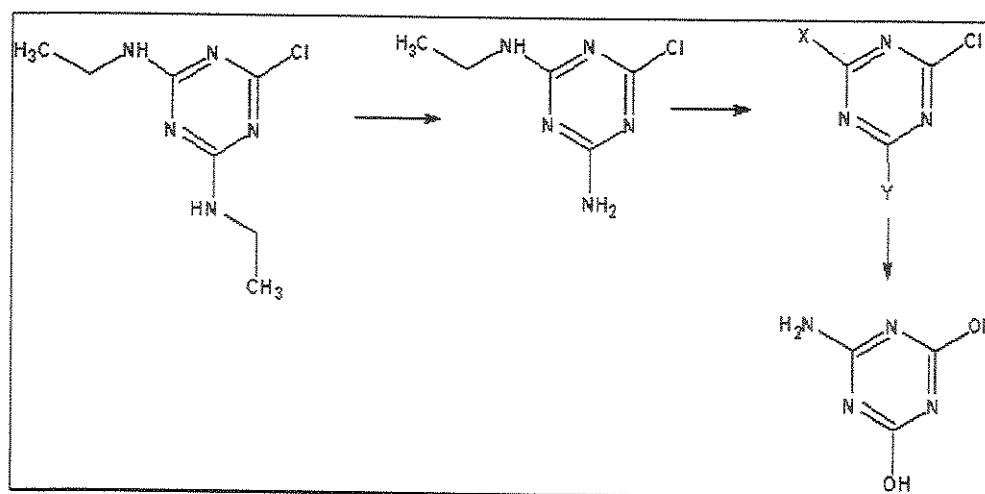


Figura 6. Caminho de degradação proposto para a simazina [41].

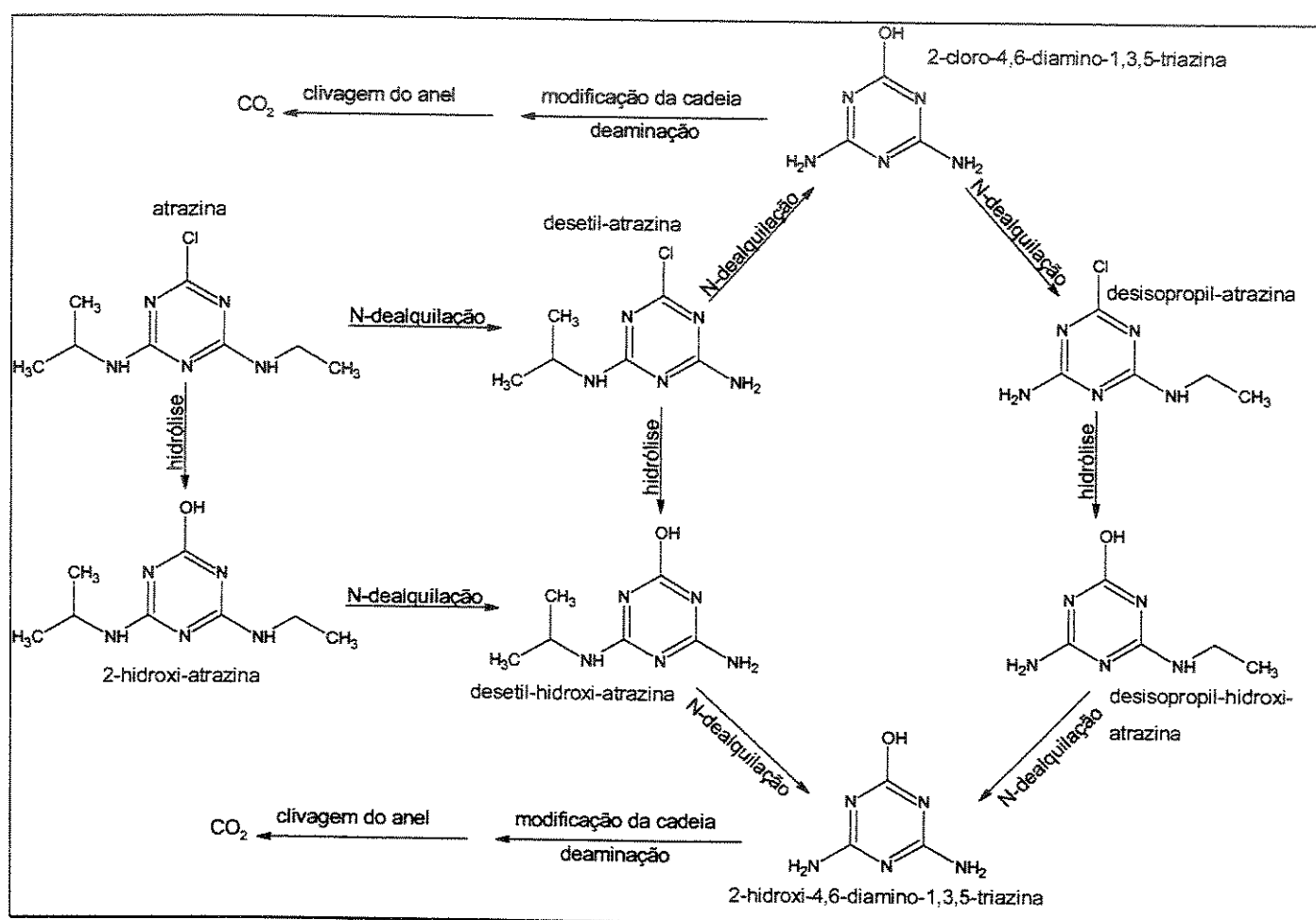


Figura 7. Degradação do herbicida atrazina [42].

1.5.3.2 Fenoxialcanoatos

Usualmente sua persistência é de um mês (2,4-D) à dois meses (MCP), até cinco meses (2,4,5-T).

Em geral este grupo de herbicidas é degradado por microorganismos. O ponto susceptível ao ataque microbiológico é a ligação éter entre o anel e o ácido graxo do ácido fenóxi-alcanóico (Figura 8). Este processo reduz a atividade do composto. Os microorganismos que degradam o 2,4-D através desta rota são *Flavobacterium* e *Arthrobacter*. A β -oxidação é um processo importante de ativação deste grupo de pesticidas, e ocorre naturalmente no solo. A hidroxilação do anel também é um processo enzimático comum [41].

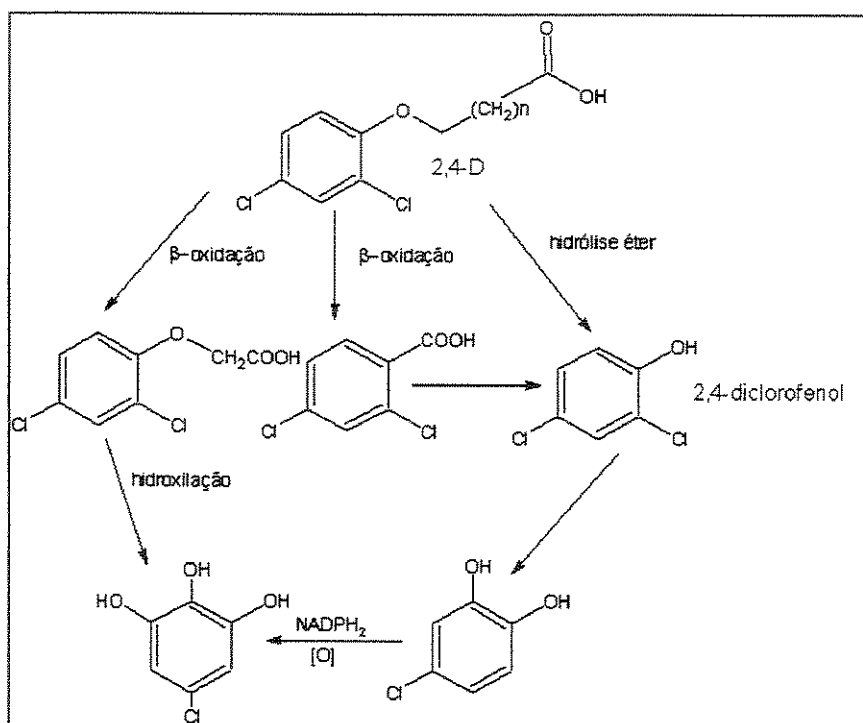


Figura 8. Esquema de degradação para o herbicida 2,4-D [41].

Herbicidas da classe do 2,4-D também podem ser degradados pela luz solar. Um exemplo está mostrado na Figura 9, para a degradação fotolítica do 2,4-

D em solução aquosa. O produto final desta reação é o 1,2,4-benzenotriol, indicando a clivagem do grupo éter e a troca do cloro do anel por hidroxila [41].

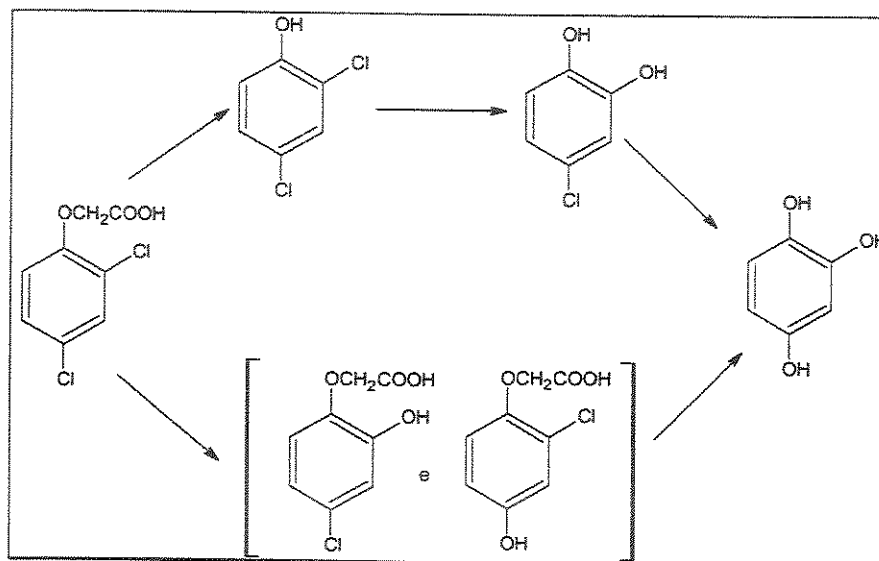


Figura 9. Decomposição fotoquímica do 2,4-D [41].

1.5.3.3 Feniluréias

As feniluréias (ex: diuron e linuron) podem ser degradadas por microorganismos do solo. A taxa de degradação parece ser favorecida em solos relativamente pobres, os quais não adsorvem muito os pesticidas. O diuron degrada por N-demetilação, sob condições aeróbicas, resultando em metabólitos que incluem o N'-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia, 3,4-diclorofeniluréia e 3,4-dicloroanilina. Sob condições anaeróbicas do solo ocorre a formação dos produtos decolorinados [24]. As evidências mais diretas da ação microbiológica em feniluréias foram mostradas por Hill (1956) que comprovou que muitas espécies de microorganismos degradam monuron. A rota geral de degradação das feniluréias é através de uma série de N-dealquilação hidrolítica, seguida pela remoção da metade carbonila, resultando na anilina análoga (Figura 10) [41].

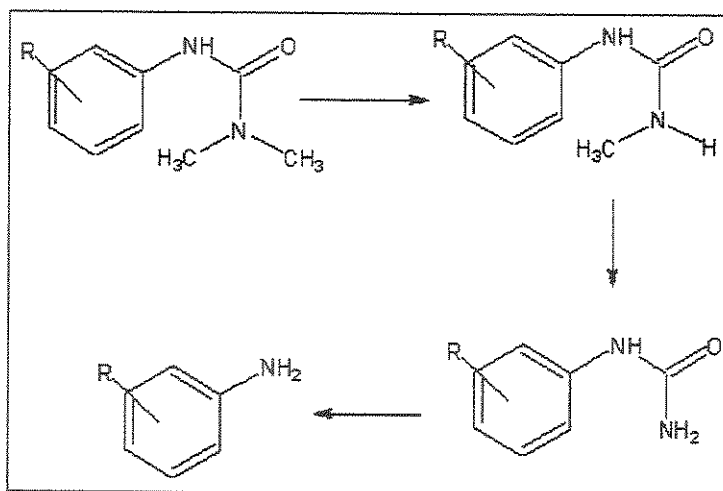


Figura 10. Rota de degradação no solo proposta para as feniluréias [41].

1.5.3.4 Tiodiazinas

Os principais produtos de degradação da bentazona são os 6- e 8- hidroxí derivados [43]. Um esquema da degradação da bentazona é apresentado na Figura 11 [44].

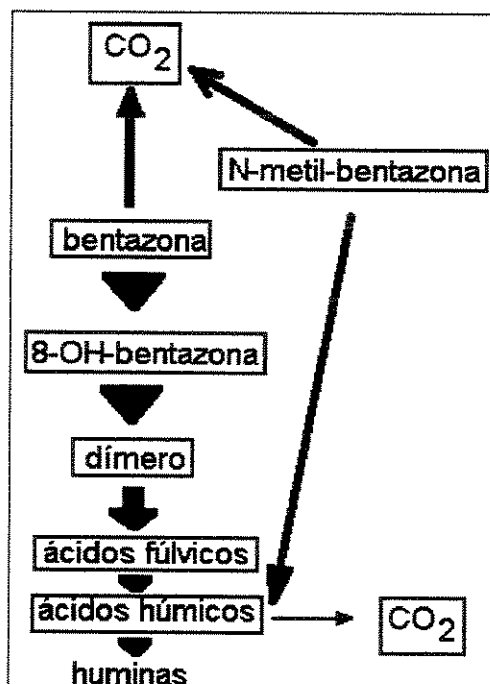


Figura 11. Esquema de degradação do herbicida bentazona [44].

1.6 Adsorção-dessorção e dessorção de pesticidas no solo

Os dados de adsorção-dessorção são necessários para avaliar a tendência de migração dos pesticidas no ar, na água e no solo ou nos sedimentos do meio ambiente. Eles são necessários para estimar, por exemplo, o lixiviamento através do solo, a volatilidade na água e no solo, a fotodegradação no estado adsorvido em superfícies de aerossóis e a concentração na água ou o escoamento pelo solo até as águas naturais. Os processos de adsorção/dessorção químicos (processos de sorção) têm efeito no processo de transporte e na sua biodisponibilidade. No ambiente natural, a adsorção reduz a concentração do composto químico em soluções aquosas [45].

A adsorção é considerada um dos principais processos que afetam a interação entre o pesticida e a fase sólida do solo. Os principais constituintes que representam a fase sólida do solo são: argila, minerais, matéria orgânica, óxidos e hidróxidos de alumínio, de ferro e de sílica. Assim, a natureza das interações depende da composição do solo [46].

Como os solos têm uma capacidade de troca iônica variável, bem como diferentes áreas superficiais, pH e potencial redox, a interação com as substâncias químicas em um sistema aquoso é um assunto complexo e não pode ser completamente definida utilizando testes simples [45].

A distribuição resultante entre o sorvente (solo) e a fase líquida (solução de pesticidas) depende de propriedades do sorvente, parâmetros químicos e ambientais, como temperatura, a relação entre solo/solução e a força iônica. O procedimento experimental envolvido nestas determinações mede o decréscimo na concentração de pesticida (após equilíbrio) quando a solução aquosa do composto entra em contato com os solos, à temperatura ambiente [45]. A equação que descreve a relação da distribuição de um composto entre um sólido e uma fase aquosa é chamada de isoterma de sorção [47].

Há vários modelos para descrever a isoterma de sorção. Historicamente, cada modelo baseia-se em uma equação empírica ou teórica. Os três modelos mais comuns são o de Freundlich, o de Langmuir e o de Brunauer, Emmett e Teller (BET). O modelo de Freundlich é o mais amplamente usado para descrever a sorção em sistemas aquosos e fornece boa linearidade para solos [45,46].

A forma básica da equação de Freundlich é a seguinte:

$$\frac{x}{m} = k_{(ads\ ou\ des)} \cdot C_{eq}^{1/n} \quad \text{eq. 1}$$

onde: C_{eq} = concentração do composto no equilíbrio

x = quantidade de composto sorvido

m = massa de sorvente

$k_{(ads\ ou\ des)}$ = coeficiente de sorção (adsorção ou dessorção)

$1/n$ = expoente onde n é uma constante

$k_{(ads\ ou\ des)}$ e $1/n$ são constantes de sorção e são únicas para cada isoterma.

Para facilitar a determinação gráfica de k e $1/n$, a equação de Freundlich é plotada em escala logarítmica para fornecer uma relação linear:

$$\log\left(\frac{x}{m}\right) = \log k + \frac{1}{n} \cdot \log(C_{eq}) \quad \text{eq. 2}$$

k é o intercepto quando $C_{eq} = 1$ e $1/n$ é a inclinação da reta obtida, que é denominada gráfico de isoterma.

Os parâmetros k e $1/n$ são conhecidos como fator de capacidade e intensidade de sorção, respectivamente. Como k é a quantidade de pesticida adsorvido (ou dessorvido) quando a concentração no equilíbrio é igual a unidade, k e $1/n$ indicam que a razão de adsorção aumenta conforme aumenta a concentração do soluto [46].

A isoterma de dessorção representa a relação entre a quantidade de pesticida que permanece no solo, após o processo de dessorção, e a quantidade

Quando as isotermas de adsorção e de dessorção não são iguais têm-se um "loop de histerese".

A isoterma de sorção é dependente das condições nas quais o experimento é realizado. A sorção é grandemente influenciada pelas mudanças de pH, temperatura e concentração do composto químico. Portanto, todos estes parâmetros devem ser mantidos constantes durante o experimento [47].

A partir dos resultados obtidos nas isotermas de sorção, torna-se possível calcular dois outros parâmetros muito importantes: k_D (coeficiente de distribuição) e k_{oc} (constante de partição normalizada para a quantidade de carbono do solo). k_D é calculado pela razão entre a quantidade de pesticida adsorvido no solo e a quantidade de pesticida que permanece em solução após o equilíbrio. O k_{oc} também é conhecido como coeficiente de distribuição, por unidade de carbono orgânico, usado para comparar adsorções relativas de pesticidas em solos diferentes (equações 3 e 4) [46]. Se k_D for substituído na equação 4 por k_{ads} , tem-se o coeficiente de adsorção normalizado para a quantidade de carbono [49].

eq. 3

eq. 4

A matéria orgânica (M.O.) existente nos solos, geralmente avaliada pela %C ($\%C = \%M.O./1,72$ [50]), é constituída de uma mistura de produtos, em vários estágios de decomposição, resultantes da degradação química e biológica de resíduos de plantas e animais e da atividade sintética dos microorganismos. A matéria orgânica é usualmente classificada como substâncias húmicas e não-húmicas [51].

As substâncias húmicas apresentam, geralmente, uma coloração mais escura, são ácidas, constituídas de estruturas aromáticas e alifáticas, hidrofílicas, quimicamente complexas e de massa molar que pode variar desde poucas centenas até vários milhares. Tais substâncias não apresentam características físicas e químicas definidas, e isto as diferencia das substâncias não-húmicas, que são de natureza definida (aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, por exemplo) [51].

Na verdade, as substâncias húmicas são constituídas de uma mistura heterogênea de compostos, formada por frações de ácido húmico, ácido fúlvico e humina. Elas devem ser consideradas como sendo uma série de moléculas de diferentes tamanhos, e, na maioria dos casos, de diferentes configurações estruturais e grupos reativos. As estruturas das substâncias húmicas parecem variar de solo para solo e são função do clima, tipo de vegetação, hidrologia, etc... A Figura 12 apresenta a estrutura do ácido húmico proposta por Schulten e Schinitzer, com base em análises espectroscópicas, degradação oxidativa e redutiva e resultados de microscopia [51].

A estrutura proposta apresenta grupos -OH fenólicos livres e ligados, estruturas quinonas e grupos -COOH em diferentes pontos dos anéis aromáticos [51].

O movimento dos pesticidas em solos, quando em solução, pode ocorrer por dois processos: difusão e fluxo de massa. Difusão é o processo pelo qual a matéria é transportada como resultado do movimento molecular ao acaso, causado por sua energia cinética. O fluxo de massa ocorre devido às forças externas agindo como carregadoras dos pesticidas. A soma destes dois processos determina a velocidade de movimento dos pesticidas no solo [39].

A Figura 13 apresenta um modelo proposto para a superfície do solo quanto a sua parte orgânica, mostrando a possibilidade de ocorrência tanto de interações físicas quanto químicas, entre o solo e os herbicidas, dependendo do estado dos sítos reativos [39].

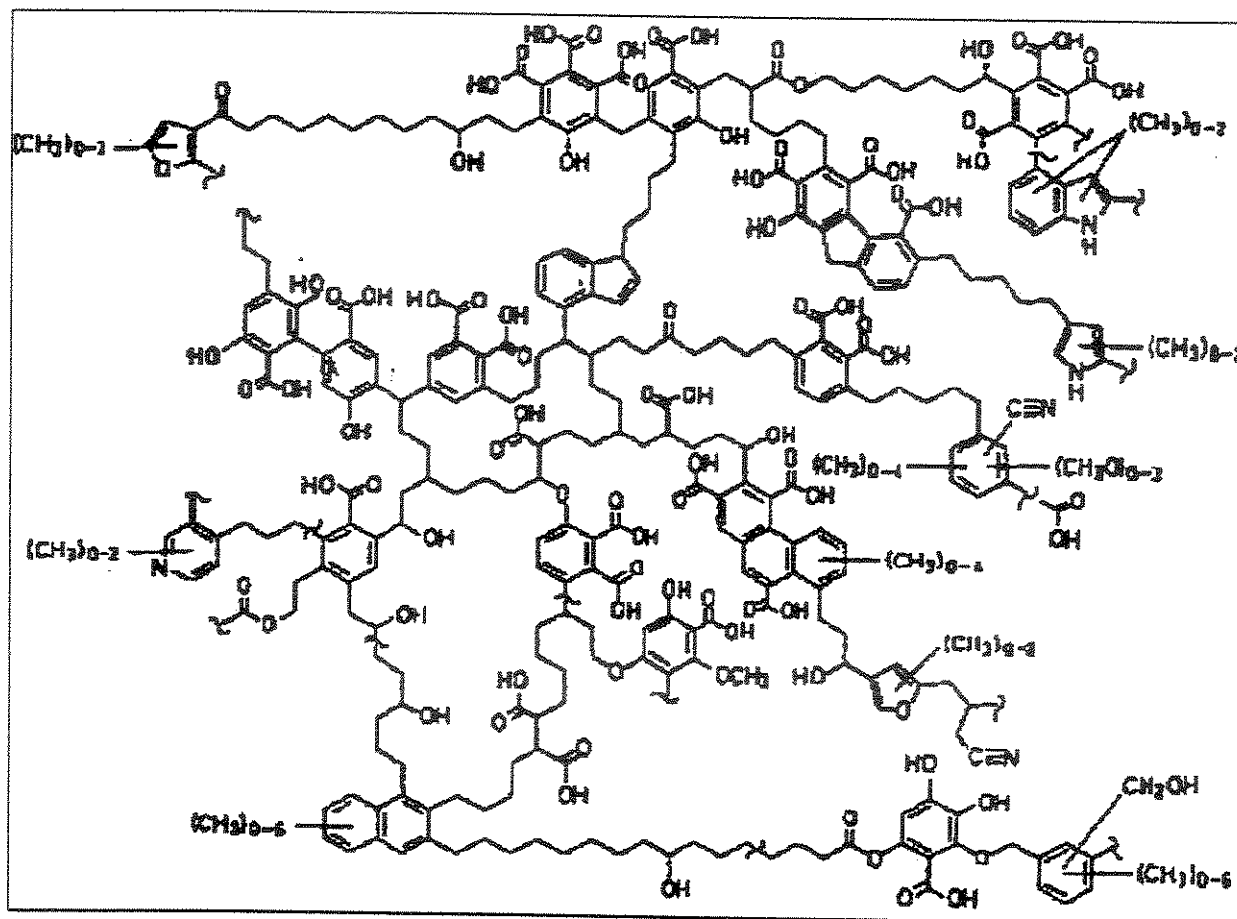


Figura 12. Esquema da estrutura do ácido húmico [51].

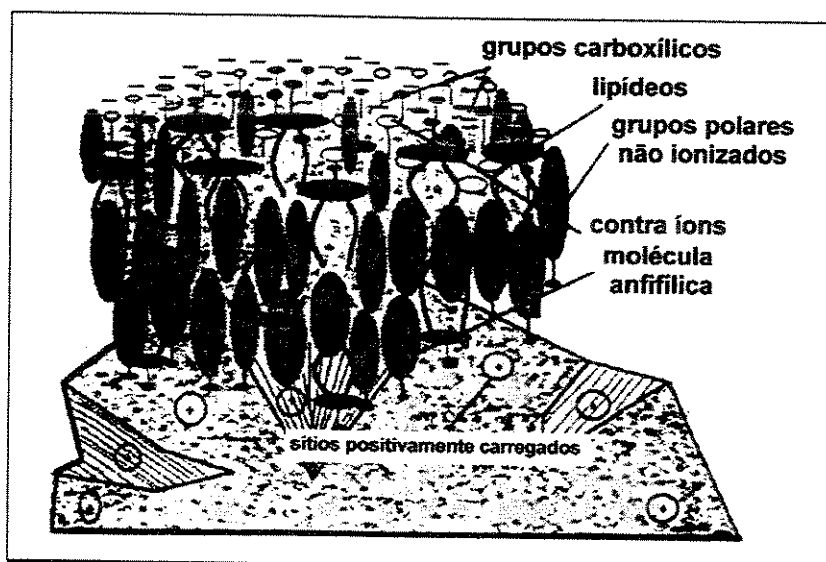


Figura 13. Superfície de um solo, mostrando grupos carboxílicos carregados na superfície [39].

A Tabela 5 sumariza alguns estudos realizados sobre a adsorção/dessorção de herbicidas em solo.

Tabela 5. Estudos realizados sobre a adsorção /dessorção de herbicidas em solo.

Objetivos	Resultados	Ref.
Atrazina, DEA, DIA, HA e metalaclor em dois solos da Virgínia.	A ordem de adsorção: HA > atrazina=metalaclor > DIA > DEA nos dois solos. K_{oc} de 140 a 234 para atrazina, 80 a 110 para DEA, 128 a 130 para DIA, 493 a 609 para HA e 162 a 190 para metalaclor. A % de dessorção variou de 60%, para DEA, até 17% da HA.	52
Estudar o efeito da irrigação e do cultivo no lixiviamento de atrazina e seus metabólitos, em solos.	A DEA foi a forma primária da atrazina a lixiviar. A prática de "no till" parece atenuar o lixiviamento, já que há um aumento no conteúdo de matéria orgânica, que tende a reter mais fortemente os herbicidas. A irrigação aumenta a quantidade de resíduos de atrazina lixiviada.	53
Verificar a complexação de atrazina em ácidos húmicos do solo.	Dados espectroscópicos mostraram que a transferência de prótons foi favorecida para os ácidos húmicos com alto conteúdo de grupos funcionais ácidos e para as s-triazinas de baixa basicidade.	54
Estudar a degradação e o lixiviamento "in situ" para os herbicidas atrazina, metribuzin, metalaclor, picloram, 2,4-D e alaclor, em subsolos.	Os herbicidas foram adicionados aos solos e estocados por 3 anos. Os resultados mostraram que 6 meses após a estocagem, 80 % das 36 possíveis combinações entre as condições de herbicida, profundidade do solo e localização, tinham sofrido degradação. Lixiviamento ocorreu em 30 a 50 % dos casos.	55
Apresentar uma revisão sobre os principais fatores que afetam o transporte de pesticidas e produtos de degradação no solo.	Os principais fatores revisados foram estrutura do solo, conteúdo inicial de água, tipo de irrigação, a formulação do pesticida, o tempo de aplicação, a chuva e o oco-transporte (movimento vertical no solo).	56
Estudar o efeito da profundidade e da temperatura do solo na degradação	Os dados mostraram que a taxa de degradação do 2,4-D decresce significativamente com o aumento da profundidade do solo, o que provavelmente está	57

microbiológica do 2,4-D	correlacionado com o conteúdo de bactérias, e que também está positivamente correlacionado com o conteúdo de carbono. A degradação do 2,4-D decresce com a diminuição da temperatura do solo (efeitos da temperatura são descritos pela equação de Arrhenius).	
Estudar a sorção e a retenção de herbicidas em solos	O aumento no conteúdo de carbono é o principal fator que influencia o aumento da sorção dos herbicidas de alto K_D (atrazina e metalaclor), e que este efeito é pouco verificado para herbicidas de baixo coeficiente de distribuição (primisulfuron e dicamba).	58
* "no-till": prática na qual os restos da plantação são depositados no solo após a colheita, isto é, não ocorre aragem e limpeza do solo entre um plantio e outro.		

1.7 Contaminação das águas por pesticidas

O homem depende do meio em que vive e dos recursos que a natureza fornece. Dentre estes recursos, o que mais se destaca é a água, devido ao seu caráter essencial.

Após vários anos de exploração desenfreada, o homem percebeu e vem conscientizando-se de que a água é um recurso finito e está se esgotando. Dentre os contaminantes freqüentemente encontrados em amostras de água deve-se destacar os pesticidas, devido à variedade e às altas concentrações.

Os pesticidas podem atingir as águas ambientais através de vários meios: eles podem ser aplicados diretamente, na forma de *sprays* ou grânulos, para controle de pestes; levados pelo ar, quando as lavouras são pulverizadas; podem ser arrastados devido ao escoamento superficial de água no solo ou podem ser carregados pela chuva; utensílios contaminados com pesticidas podem ser lavados em rios; resíduos podem ser carregados pela chuva; etc. [38].

O homem é exposto aos pesticidas através do ar que ele respira, da comida que ele consome e da água que ele bebe. Suspeita-se que os rios e os lagos

estejam contaminados por quantidades apreciáveis de inseticidas organoclorados, e aceleram-se as pesquisas para determinar outros pesticidas contaminantes que também possam estar presentes nas fontes de água potável. Em um dos primeiros estudos realizados neste sentido, nos Estados Unidos (1959), foram encontradas quantidades significativas de DDT em águas potáveis, sendo que endrin, clordane e dieldrin estavam em concentrações que excediam as quantidades máximas permitidas. Outros pesticidas encontrados foram 2,4-D, paration, toxafenodiazinon e etc. [8].

Basicamente, há dois tipos de situação envolvendo fontes de água e pesticidas como contaminantes: contaminação crônica, a qual usualmente apresenta níveis menores que 1 ng/mL, e contaminações de alto teor, mas por curto tempo. A contaminação crônica resulta de uma fonte mais ou menos continua de descarga do pesticida. O segundo tipo, pode envolver acidentes, escoamento maciço, como resultado de uma chuva forte após uma aplicação de pesticidas na lavoura, ou uma aplicação direta de pesticida na água [8].

Quantidades inferiores a 0,1% do total de pesticidas aplicados conseguem atingir suas pestes alvo, enquanto o restante, 99,9%, apresenta potencialidade de mover-se para outros compartimentos do meio ambiente, incluindo as águas [59].

Motivados pela consciência ambiental, aliado ao fato de que o uso de pesticidas está em contínuo crescimento no mundo, órgãos internacionais como a EPA (Environmental Protection Agency dos Estados Unidos) e a Comunidade Européia (EC) iniciaram um controle estabelecendo limites em relação às concentrações de pesticidas encontradas em águas. Além disso, estes órgãos também organizaram listas de periculosidade de tais compostos.

Em maio de 1986, a preocupação com a qualidade da água potável utilizada na Itália, ganhou força, tendo que atender os requerimentos da Diretriz da Comunidade Econômica Européia, a qual passou a monitorar as atividades que pudessem prejudicar a qualidade dos recursos de água potável e realizar

pesquisas para determinar a extensão da contaminação das águas pelo uso de pesticidas [60].

Os níveis permitidos pela EC são determinados pela *Drinking Water Directive* (80/778/EEC), que estabeleceu que a concentração máxima tolerável (*Maximum Admissible Concentration*, MAC) de um pesticida individual não deve exceder 0,1 µg/L e que a concentração total de pesticidas não deve exceder 0,5 µg/L, em água potável [61].

Dados oficiais mostraram que em 1988, 303 municípios da Comunidade Européia possuíam herbicidas em concentração acima de 0,1 µg/L. A atrazina apresentava a maior ocorrência, seguida pela bentazona e simazina [61].

Órgãos internacionais, como a World Health Organization e a EPA, consideram que os níveis permitidos de pesticidas não podem ser facilmente estabelecidos, pois cada pesticida representa um caso e assim estabeleceram limites (*health advisory levels*) baseados no índice ADI (*acceptable daily intake*), que determina a quantidade de pesticida tolerável para o homem, em mg/kg de massa corpórea por dia [62,63]. A tabela 6 apresenta alguns dados, estabelecidos pela EPA, para os níveis limites aceitáveis de pesticidas em água potável [64].

O Brasil apresenta uma legislação que também regulamenta os níveis máximos de pesticidas em água potável, baseados em sua periculosidade, similarmente a EPA. A tabela 7 apresenta os dados da Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000, que estabelece os padrões de potabilidade para substâncias químicas que representam riscos à saúde [65].

Tabela 6. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo a EPA [64].

Pesticida	Nível (µg/L)	Pesticida	Nível (µg/L)
Alaclor	2	Diquat	20
Aldicarb	10	Endotal	100
Aldicarb sulfóxido	10	Endrin	2
Aldicarb sulfone	10	Glifosato	700
Atrazina	3	Metomil	200
Bromacil	80	Metil paration	2
Carbofuran	40	Metolaclor	10
Clortalonil	2	Oxamil	200
Cianazina	9	Picloram	500
2,4-D	70	Simazina	4
Dalapon	200	Trifluralina	2
Dinoseb	7	---	---

Além disso, tanto a EC quanto a EPA desenvolveram listas de prioridades, também chamadas de listas vermelhas e/ou negras, nas quais os pesticidas de maiores periculosidades (avaliados de acordo com a toxicidade, persistência e uso) estão incluídos. A tabela 8 apresenta a lista negra desenvolvida pela Diretriz 76/464/EEC [66].

Tabela 7. Níveis permitidos, para alguns pesticidas selecionados, presentes em água potável, segundo o Brasil [65].

Pesticida	Nível (µg/L)	Pesticida	Nível (µg/L)
Alaclor	20	Hexaclorobenzeno	1
Aldrin e dieldrin	0,03	Lindano	2
Atrazina	2	Metacoloro	10
Bentazona	300	Metoxicloro	20
Clordano	0,2	Molinato	6
2,4-D	30	Pendimetalina	20
DDT	2	Pentaclorofenol	9
Endossulfan	20	Permetrina	20
Endrin	0,6	Propanil	20
Glifosato	500	Simazina	2
Heptacoloro e heptacoloro epóxido	0,03	Trifluralina	20

Tabela 8. Pesticidas incluídos na Diretriz 76/464/EEC (Lista Negra) [66].

aldrin	disulfoton	monolinuron
atrazina	endosulfan	ometoato
azinfos-etil	endrin	oxidemeton-metil
azinfos-metil	fenitroton	paration-etil
clordanne	fention	paration-metik
coumafos	heptaclor	foxim
2,4-D	hexaclorobenzeno	propanil
Ddt	linuron	pirazon
demeton	malation	simazina
diclorprop	mcpa	2,4,5-T
diclorvos	mecoprop	triazofos
dieldrin	metamidofos	triclorfon
dimetoato	mevinfos	trifluralin

1.7.1 Vulnerabilidade da água

Vulnerabilidade da água para a poluição pode ser definida pela medida da capacidade de substâncias contaminantes penetrarem no corpo de água, prejudicando a sua potabilidade. Os compostos químicos primeiramente percolam da superfície do solo em direção às águas subterrâneas (zona de vadosa) e então se propagam pelo aquífero (zona saturada), seguindo o fluxo da água [60].

O movimento dos compostos é resultante de muitos fenômenos e processos, os quais estão relacionados com as condições físicas e climáticas da área, com as propriedades hidrogeológicas da zona de vadosa e do aquífero, com detalhes da atividade poluidora e com propriedades físico-químicas das substâncias envolvidas [60].

Há dois principais aspectos de vulnerabilidade: o primeiro deriva de parâmetros da área afetada e o outro está relacionado com fatores de risco inerentes à substância. A combinação destes dois aspectos permite a avaliação do perigo de contaminação da água subterrânea, a qual pode ser expressa ordenadamente nas zonas de um território (mapeamento temático). Este tipo de observação é importante para determinar o risco hidrológico, bem como para planejar o uso da terra e dos recursos de água.

Quando se estuda o processo de penetração de substâncias até atingirem as águas subterrâneas, as seguintes observações são importantes [60]:

- propriedades texturais, mineralógicas, microbiológicas e físico-químicas do topo do solo, que é o foco da degradação biológica das substâncias aplicadas e representa a primeira barreira para a infiltração dos poluentes;
- propriedades hidráulicas (principalmente permeabilidade) das camadas do solo entre a superfície e a água que controla a percolação dos contaminantes;
- comprimento da superfície piezométrica, que é a espessura da zona insaturada;
- avaliabilidade da infiltração de água, que é a principal forma de transporte das substâncias poluentes em direção às águas subterrâneas.

Obviamente, a situação de maior vulnerabilidade está relacionada com uma alta permeação do solo, que permite uma alta taxa de infiltração.

Depois que o poluente alcança o aquífero (zona saturada), a posição de propagação e difusão está ligada a distribuição da superfície piezométrica.

Os aquíferos podem ser classificados em relação ao seu grau de vulnerabilidade, em muito pouco, pouco, médio, alto e muito alto [60].

Analisando dados ambientais de vários pesticidas, foi possível estabelecer características determinantes que identificam substâncias com ou sem potencial de contaminação de águas subterrâneas. Através destes resultados a EPA observou que geralmente um contaminante de águas subterrâneas apresenta [60,67]:

- Solubilidade (S) em água maior que 30 mg/L;
- K_D (coeficiente de distribuição em relação ao solo) < 5 e usualmente < 1 ;
- K_{oc} (coeficiente que mede a adsorção dos compostos na fase orgânica do solo e conseqüentemente a sua mobilidade) $< 300-500$;
- K_H (constante da Lei de Henry, mede a dispersão do composto no ar) $< 10^{-2}$ atm/m³ mol;
- $t_{1/2}$ no solo ou tempo de meia-vida de dissipação no campo (fator que mede a persistência do composto no solo) > 3 semanas;
- Especificação: carga negativa parcial ou total, em pH ambiente.

Fica evidente que a tendência de contaminar as águas subterrâneas depende de vários parâmetros, e ainda não está bem estabelecida, uma vez que estes parâmetros podem combinar entre si, entretanto a mobilidade e a persistência dos compostos químicos são consideradas de grande relevância.

Alguns modelos simples têm sido propostos para classificar a tendência dos pesticidas em atingir às águas subterrâneas, muitos incluem somente alguns parâmetros chaves que identificam muitas propriedades químicas e físico-químicas dos compostos. Dentre estes modelos deve-se destacar o do Índice de Lixiviamento (LI), proposto por Laskowski e o descrito por Gustafson [60].

A equação matemática que descreve o modelo de Gustafson é definida como *Groundwater Ubiquity Score* (GUS), equação 5:

$$GUS = \log(DT_{50})[4 - \log(K_{oc})] \quad \text{eq.5}$$

onde: DI_{s0} = persistência

A análise dos resultados fornecidos pela equação de Gustafson permite que um composto seja classificado como lixiviável ($GUS > 2,8$), não lixiviável ($GUS < 1,8$) e de transição ($1,8 < GUS < 2,8$) [60,67].

Existem ainda os modelos de Rao, através do qual se calcula o Attenuation Factor (AF), que é um índice para medir a perda de massa de pesticidas na zona de vadose, e de Jury, que permite o cálculo de M_r , que expressa a fração de massa residual em uma superfície na qual foram aplicados pesticidas [60].

1.8 Análise dos pesticidas

Os principais estágios que envolvem a análise de pesticidas em amostras ambientais são [8]:

1. Amostragem
2. Armazenamento
3. A extração do resíduo da matriz.
4. A remoção de substâncias interferentes que também são extraídas da matriz (clean-up).
5. Quantificação dos resíduos, juntamente com os metabólitos e os produtos de degradação. Os níveis destes resíduos geralmente são muito baixos ($< 10^{-12}$ g) e portanto, requerem alta detectabilidade e seletividade, ou seja o emprego de métodos de pré-concentração.
6. Confirmação da presença dos resíduos dos pesticidas.

Uma ampla diversidade de compostos é utilizada como pesticida e, correspondentemente, uma ampla variedade de métodos básicos, mais especificamente cinco, pode ser usada para análise de seus resíduos [2]:

1. Análise de grupos funcionais. Exemplo: ensaios colorimétricos de um grupo ou elemento particular no composto.

2. Métodos envolvendo testes biológicos. Este método, não específico, mostra a presença de resíduos tóxicos e pode ser aplicada sem limpeza prévia.
3. Métodos cromatográficos. Incluem cromatografia gasosa, líquida e em camada delgada.
4. Métodos espectroscópicos. Eles fornecem evidências sobre a identidade do pesticida.
5. Métodos radioquímicos. Incluem análise de derivados isotópicos.
6. Métodos enzimáticos (ELISA).

1.8.1 Emprego da CLAE na Análise de Pesticidas

No passado, utilizaram-se vários métodos para a determinação da qualidade das águas, como métodos espectrofotométricos, de halogênio total e biológicos. A situação foi modificada com a introdução de métodos cromatográficos [15]. As análises de traços de pesticidas em amostras biológicas e do meio ambiente, desde meados de 1950, basearam-se, primeiramente, na cromatografia gasosa (CG) e em outras técnicas como a cromatografia em camada delgada (CCD). O uso de CLAE em determinações de resíduos é de ocorrência relativamente recente. A primeira publicação neste sentido foi a de Henry *et al.* em 1971. Resíduos de inseticidas foram determinados em reservatórios de água, com limite de detecção de 0,05 mg/L. Um ano mais tarde Krzeminski *et al.* usaram a CLAE para isolar 14 C-difenamida. Nos anos seguintes Kirkland *et al.* empregaram CLAE para a determinação de resíduos de benomil [44].

A expansão do emprego da CLAE na separação e quantificação de pesticidas deve-se às vantagens reais que ela possui em relação a CG, na qual é difícil a análise de algumas classes de resíduos que possuem instabilidade térmica, não volatilidade, alta polaridade e baixa detectabilidade frente a determinados detectores. Alguns destes problemas podem ser solucionados

usando técnicas de derivatização, mas aumenta-se o tempo de análise e introduzem-se erros adicionais, o que torna este procedimento não atrativo para muitos químicos [44]. Para evitar a etapa de derivatização, a CLAE com fase reversa com detecção UV ou por arranjo de diodos tem sido usada freqüentemente.

O progresso da CLAE deve-se ao fato de ter ocorrido um desenvolvimento de materiais de recheio mais eficientes e pela introdução da fase reversa.

A ciência dos pesticidas é uma área bastante dinâmica e há uma tendência no desenvolvimento de produtos que atendam as normas que têm surgido. Por exemplo, há um aumento no desenvolvimento e uso de pesticidas de caráter mais polar, por serem mais facilmente degradáveis, em substituição aos pesticidas mais apolares, como os organoclorados, que possuem maior acumulação no meio ambiente e em tecidos lipídicos [68]. Este fato tem colaborado para o aumento do uso da CLAE.

Publicações recentes mostram que há uma tendência em utilizar, na determinação de resíduos de pesticidas em águas, técnicas sofisticadas como a Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrometria de Massas (CL/EM) com interface de feixe de partículas ou termospray, a CLAE com detectores por arranjo de diodos (DAD) e a CLAE com colunas capilares [69]. Entretanto, outros estudos mostram que o monitoramento, em águas, de pesticidas de alta polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica também é possível com o uso de métodos simples e rápidos empregando instrumentos menos sofisticados como a CLAE com fase reversa, usando detector ultravioleta (UV) [1,2] ou detecção eletroquímica ou por fluorescência [28]. O DAD pode ser usado para fazer uma varredura do espectro UV/Vis, identificando interferentes e picos sobrepostos, bem como confirmando a presença de pesticidas [70].

1.8.2 Emprego de Técnicas de Extração e Pré-Concentração na Análise de Pesticidas

Com o crescimento do uso da CLAE aumentou-se a necessidade do emprego de técnicas de extração e pré-concentração dos pesticidas das matrizes. Isto se deve ao fato de que os detectores utilizados em CLAE possuem detectabilidades menores que as obtidas com os detectores empregados em CG.

A determinação de concentrações baixas de pesticidas em amostras complexas requer o uso de sistemas de extração e pré-concentração, tais como a extração líquido-líquido (ELL) ou a extração em fase sólida (EFS).

A ELL, técnica mais usada em métodos padrões, sendo recomendada pela EPA [44] e conhecida pela sua simplicidade, baseia-se na partição das diferentes espécies ("analitos") entre a fase aquosa e o solvente orgânico. A ELL tem inúmeras desvantagens como o fato de poder formar emulsão, requerer grandes volumes de solventes, muitas vezes tóxicos e inflamáveis, demandar longo tempo de extração, ser cara, trabalhosa e de difícil mecanização [71].

Uma alternativa a ELL é a EFS que está ganhando ampla aceitação como uma ferramenta poderosa na extração e enriquecimento de quantidades baixas ("traços") de pesticidas em soluções muito diluídas como a água, para gerar concentrações suficientes da espécie de interesse para detecção [72]. A EFS utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para reter o analito. A eluição da amostra e a passagem da fase móvel através da coluna ocorrem por gravidade, pressão de uma seringa ou bomba de vácuo. A EFS tem as vantagens de possuir pequeno tempo de análise, consumo reduzido de solvente orgânico, ser menos trabalhosa que a ELL e de fácil mecanização [73].

1.8.2.1 Tipos de sorventes

A EFS está com popularidade crescente devido ao uso de uma variedade de sorventes sólidos como resinas poliméricas, hidrocarbonetos como C-8 e C-18, e

grupos amino ou ciano ligados ao suporte de sílica ou ao carbono grafitizado ou alumina [73].

A extração em resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio de forças de van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero estireno-divinilbenzeno, tais como Amberlite XAD-2, XAD-4 e polímeros acrilatos (Amberlite XAD-7 e XAD-8) [74].

O sorvente mais popular de EFS para extração de pesticidas em água é o grupo octadecil (C-18) ligado a sílica. Os dois principais mecanismos de retenção são a adsorção do analito sobre o suporte sólido e a partição devido as interações apolares entre as ligações C-H do grupo C-18 e C-H do analito [74].

Sorventes de sílica quimicamente ligada possuem muitas vantagens sobre as resinas poliméricas. Eles não requerem etapa de limpeza, há normalmente pouca interferência cromatográfica durante a análise e com o seu uso obtêm-se análises mais rápidas, com menor consumo de solventes [75].

1.8.2.2 Formatos dos dispositivos de EFS

As seringas (tubos) e os cartuchos, confeccionados em polietileno, são os formatos mais comumente utilizados em EFS para fins ambientais. Eles são recheados com partículas de 40-60 μm , contendo de 100 a 500 mg de sorvente, e podem ter reservatórios expandidos (caso das seringas) para se adequar ao uso de grandes volumes de amostra [75-77].

Recentemente, e com uso crescente, surgiram os discos de extração, que podem ser de fibra de vidro ou de politetrafluoretileno (PTFE) impregnados com pequenas partículas de sorvente, como C-18 e poliestireno divinilbenzeno (DVB). Geralmente, 90% da massa dessas membranas correspondem à massa de sorvente sólido e elas têm espessura de 0,5 mm [28,78,79].

Os discos apresentam vantagens sobre os tubos ou cartuchos, tais como permitir o uso de vazões de extração maiores, pois não apresentam o problema de

- **Condicionamento:** esta etapa tem o objetivo de preparar o leito do sorvente, previamente à extração, para permitir um contato efetivo da solução líquida da amostra, geralmente polar, com a superfície do sorvente, geralmente apolar. Comumente, esta etapa envolve a passagem de um pequeno volume de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) através do sorvente. Assim, a superfície do sorvente torna-se mais hidrofílica e portanto mais compatível com a amostra (aquosa). Esta etapa deve ser feita cuidadosamente, pois pode influenciar na qualidade da extração, prejudicando a recuperação dos analitos.
- **Adsorção:** nesta etapa a amostra é passada através do sorvente, que é responsável pela extração, com a ajuda de vácuo, no caso de seringas, cartuchos ou discos, ou com o uso de bomba de alta pressão, quando se usa pré-colunas (EFS "on-line"). As vazões utilizadas devem ser razoavelmente constantes e irão depender do tamanho das partículas envolvidas e do recheio do dispositivo de extração. A amostra pode, dependendo da sua interação com o sorvente, ser constituída de quatro tipos diferentes de substâncias: o primeiro tipo não tem nenhuma afinidade pelo sorvente e não interage com este; o segundo tem uma interação fraca e é arrastado na etapa de lavagem; o terceiro apresenta uma interação adequada com o sorvente e é eluído na etapa de eluição (analito de interesse), e o quarto apresenta uma afinidade muito grande pelo sorvente e permanece retido neste mesmo após a etapa de eluição.
- **Lavagem:** o propósito da lavagem é permitir que algumas impurezas fracamente retidas, adicionadas na etapa de adsorção, sejam eliminadas pela passagem de um solvente fraco (água geralmente é bastante adequada). É imprescindível que esta etapa de lavagem não arraste nenhuma espécie de interesse.
- **Eluição:** na etapa de eluição as espécies de interesse são removidas do sorvente e retornam para a fase líquida. Normalmente, emprega-se metanol

ou outro solvente orgânico, como acetonitrila. Algumas vezes, o extrato eluído é evaporado até a secura para uma posterior re-diluição. De qualquer modo, o solvente final do extrato deve ser compatível com a técnica analítica utilizada na quantificação das espécies de interesse.

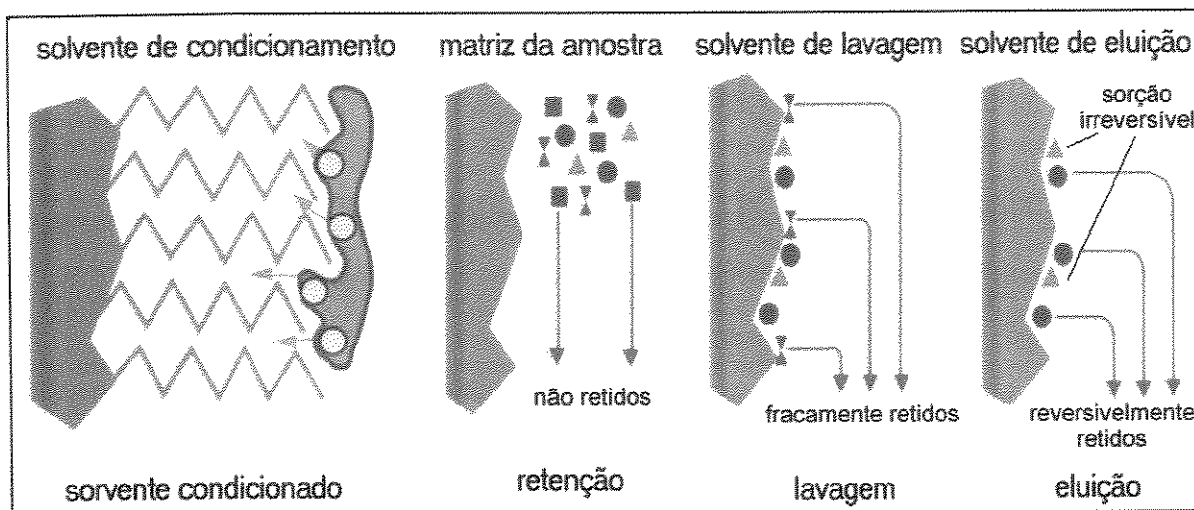


Figura 14. Representação das etapas envolvidas na EFS [91].

1.8.3 Propriedade dos sorventes

Um sorvente adequado para EFS deve apresentar certas características, tais como [89]:

- Ter alta área superficial: a retenção da espécie de interesse é afetada pelo equilíbrio estabelecido entre a solução da amostra e a partícula do sorvente. Um dos fatores que afeta este equilíbrio, além da natureza química do sólido e do analito, é a área superficial do sólido, pois quanto maior, mais fortemente deslocado estará o equilíbrio na direção do sorvente (situação desejável). Os materiais mais freqüentemente utilizados apresentam área superficial de 400 a 1000 m²/g.

- Apresentar adsorção reversível: na EFS deseja-se que a espécie de interesse seja fortemente retida pelo sorvente, mas também que ela possa ser completamente dessorvida e recuperada. A completa dessorção da espécie de interesse deve ser obtida na etapa de eluição.
- Ter baixo conteúdo de impurezas lixiviáveis: é importante que as partículas utilizadas em EFS sejam puras e livres de possíveis impurezas, que possam ser lixiviadas durante a extração. Este problema era mais pronunciado no passado, hoje as resinas de XAD utilizadas praticamente não apresentam este inconveniente, mas podem absorver impurezas do ar ou vindas dos materiais utilizados como filtros ou da própria manipulação.

1.8.3.1 Volume de *breakthrough*

Volume de *breakthrough* pode ser definido como o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas da espécie de interesse e portanto diminuição da sua recuperação, ou seja, é o volume que permite que uma recuperação teórica igual a 100% seja obtida [89,92]. O volume de *breakthrough* é dependente das interações entre o analito, o solvente da amostra e o sorvente, e para fase reversa ele é função da hidrofobicidade do analito e da massa de sorvente usada. Este é um parâmetro importante em EFS, pois indica qual o volume máximo de amostra que pode ser pré-concentrado, sendo que dois fatores podem ser responsáveis pelo volume de *breakthrough*: retenção insuficiente do analito pelo sorvente e sobrecarga do sorvente [87,90].

Para compreender completamente este parâmetro deve-se fazer a associação entre a EFS e a CL. Ocorre que na EFS, a fase móvel (FM) é o próprio solvente da amostra (geralmente água), durante a etapa de extração. Assim, há um determinado volume de amostra (chamado de volume de *breakthrough*) que faz com que as espécies de interesse que estão sendo retidas no sorvente comecem a ser eluídas, diminuindo a recuperação das mesmas. Idealmente, este

ponto não deve ser atingido, isto é, deve-se trabalhar sempre com um volume de amostra menor que o volume de *breakthrough*.

Este volume irá depender das características do sorvente e da espécie de interesse, dependendo também das características do dispositivo de EFS. Quanto maior a afinidade entre a espécie de interesse e o sorvente, maior será o volume de amostra que poderá ser empregado.

O volume de *breakthrough* pode ser calculado de maneira experimental, utilizando medidas de absorbância, e também através de métodos computacionais, recentemente em destaque devido ao grande trabalho experimental envolvido na medida deste parâmetro [76,90].

1.8.4 Revisão Sobre Análise de Pesticidas em Solo e Água Empregando CLAE e Técnicas de Extração

A tabela 9 contém uma revisão sobre a análise de herbicidas em solo, utilizando CLAE e EFS ou ELL.

Tabela 9 . Revisão bibliográfica sobre a análise de herbicidas em solo e água utilizando CLAE e técnicas de extração.

Objetivo	Observações	Resultados	Ref.
Avaliar a extractabilidade e degradação da atrazina em sedimentos gerados de solos sandy loam	Extração com CaCl_2 0,01 mol/L, misturas de metanol / água e metanol / água / ác. fórmico (pH=3,2)	30% (5 °C) e 60% (24 °C) do C-14 não foram extraídos. O metabólito HA foi detectado após 25 dias a 24 °C e 112 dias a 5 °C	93
Desenvolvimento de um método empregando eluição por gradiente para determinar o coeficiente de adsorção (K_{oc}) de s-triazinas	Uso do gradiente permitiu determinação de K_{oc} em uma faixa de 4,4 ordens de magnitude sem ajuste da composição do solvente de	A faixa de valores de log K_{oc} foi de 0,8 para ciromazina e 2,6 para anilazina	94

	elução		
Desenvolver um método de "screening" para 9 sulfoniluréias presentes em solos e água	A detecção foi UV, mas os autores precisariam de EM para confirmação definitiva. Os solos foram extraídos com carbonato de amônio/acetona (4:1), v/v	LOQ = 1 ug/L (ppb), para amostras de solo. As recuperações foram de 70-120% com RSD <20%	95
Empregar extração por microondas para "screening" de sulfoniluréias em solo	10 g de solo + 20 mL diclorometano:metanol (9:1), v/v foram aquecidos em forno de microondas	As recuperações foram de 78-97%, 95-102%, 94-101%, para fortificações de 20, 200 e 1000 mg/kg de solo. O LOD foi de ~ 5 mg/kg	96
Determinação da cinética de adsorção e das isotermas de adsorção/dessorção para atrazina e seus produtos de degradação DEA e HA	A análise feita por CLAE não mostrou degradação após 72 h. As isotermas foram descritas pela equação de Freundlich	Adsorção aumenta na ordem DEA<AT<<HA. Dessorção foi histerética e alguns resíduos não foram extraídos	97
Determinar 7 sulfoniluréias usando CL/EM	Também foram obtidos derivados de isocianatos, que foram analisados por CL/EM para comparação	A sensibilidade de detecção aumentou 7-8 vezes pela adição de 0,2 mL/min de propanol ou butanol, pós-coluna	98
Apresentar uma revisão sobre extração e concentração de compostos orgânicos em água e solo	A revisão incluiu os métodos de CG, CLAE com diferentes detectores, EM e eletroforese	A principal aplicação discutida foi a determinação de herbicidas por CLAE/EM, CLAE/EM/EM e CG/EM	99
Analisar multirresíduos de herbicidas em solos coletados na área de Halle	As substâncias húmicas foram previamente precipitadas. Aplicou-se EFS	A curva analítica mostrou-se linear na faixa de 1-500 ng/20mL, com LOD= 1,5 e 3 mg/kg de solo, para s-triazinas e fenoxialcanóicos substituídos,	100

		respectivamente	
Determinar rondicidas, diuron e isoproturon em amostras de solo por CLAE/DAD	10 g de solo foram submetidos a extração por Soxhlet com 200 mL de metanol, por 2 h	As recuperações, a um nível de 100 mg/L (ppb), foram de 56,2-65,2 %	101
Determinar herbicidas triazinas em solo com detecção amperométrica	A extração foi feita com acetonitrila, agitação, centrifugação e filtração	As recuperações, geralmente, foram >90%. Os LOD variaram de 5,6-1,4 ng e a curva analítica foi linear de 5-10 vezes estes valores	102
Determinar a mobilidade da bentazona em solos	Bentazona, marcada com C-14, foi aplicada em uma coluna de solo (30 cm) e o eluato foi analisado por CLAE	Não foram detectados metabólitos em solução. Os dados foram melhores descritos usando diferentes taxas de degradação: uma para região condutora e outra para não-condutora	103
Determinar o equilíbrio de adsorção/dessorção dos herbicidas feniluréias clortoluron, isoproturon, metobromuron, cloroxuron e difenoxuron em dois solos	Foi utilizada a equação de Freundlich para obtenção das isotermas	Os valores de K_{ads} indicaram que a quantidade de carbono é o principal fator que afeta a sorção dos herbicidas nos solos. Quanto maior a sorção, mais limitada é a mobilidade dos herbicidas	104
Determinar os herbicidas atrazina, alaclor e 10 de seus produtos de degradação em água e solo	Os herbicidas do solo foram extraídos usando metanol:água (80:20, v/v)	Amostras de água foram injetadas diretamente. Os LOQ foram de 20-110 ng/g para atrazina e 80-320 ng/g para alaclor e seus produtos de degradação	105
Separar simultaneamente os herbicidas feniluréia, triazinas	Foi utilizado um método de interação iônica. Os solos	As recuperações obtidas foram de aproximadamente	106

e ácidos fenólicos em amostras de solo	foram extraídos com 2x50 mL de NaOH 0,01mol/L	64%	
Determinar a sorção e degradação da bentazona em solos	Extração realizada com metanol:CaCl ₂ 0,01 mol/L (80:20), v/v	Degradação da bentazona foi explicada por cinética de primeira ordem. Os metabólitos têm alta sorção	107
Analisar os herbicidas sulfoniluréias em solos usando CL/EM	A extração do solo foi feita com carbonato de amônio 0,1 mol/L, a pH=7	A curva analítica foi obtida na faixa de 15-170 mg/L. Os LOD foram < 0,1 mg/kg e as recuperações foram de 80-100%	108
Estudar a biodegradação das feniluréias, clorotoluron, diuron e isoproturon por fungos do solo	Quantidades determinadas dos herbicidas foram adicionadas à meios de cultura de fungos, por 5 dias	Foram observadas diminuições de 50 e até 70% dos herbicidas. O diuron inibiu o crescimento do fungo Rhizoctonia solani	109
Determinar a adsorção/dessorção e a lixiviação de feniluréias em solos	Os herbicidas foram adicionados em lotes e também em colunas de solo. Eluições foram feitas com água	Os LOD foram de 0,2 mg	110
Desenvolver um método para análise dos herbicidas bromoxinil, ioxinil e diclorobenil, e seus metabólitos em solo	Os herbicidas foram metabolizados no solo por nitrilases que convertem nitrilas em ácidos	A curva analítica foi linear até concentrações acima de 100 mg/L, com LOD de 0,56-3,97 mg/L	111
Determinar os parâmetros hidrofóbicos (K, K _{ow} e K _{oc}) de 13 triazinas e 9 feniluréias	Isotermas de sorção foram determinadas para clorotoluron, cloroxuron, cianazina e metoxuron em quatro tipos de solos. Relações entre K _{ow} e o K foram avaliadas	Uma relação linear muito significativa foi encontrada entre log K _{ow} , log K _{oc} e log K	112

Apresentar uma revisão sobre métodos analíticos para determinação de sulfoniluréias em solos	A sorção destes compostos em solos foi baixa e houve um lixiviamento potencial em solos alcalinos. A degradação ocorreu por mecanismos químicos e bioquímicos	Taxas de aplicação da ordem de 10 g/ha necessitaram de técnicas analíticas capazes de quantificar os resíduos no solo na ordem de sub mg/kg	113
Aperfeiçoar um método para análise de imazapir em solo	30g de solo foram extraídos com bicarbonato de amônio 0,1 mol/L (pH=5) e 90 mL de ácido sulfúrico	O LOD foi de 5 ng/g . As recuperações foram de 89-104%, para o nível de fortificação de 0,5 mg/g	114
Analisar os herbicidas 2,4-D; simazina; atrazina e alaclor em solo utilizando EFS e imunoensaios	3g de solo foram extraídos com CO ₂ contendo 15% de acetona/água/trietilamina (90:10:1,5), v/v/v e o extrato foi coletado em C18 (EFS)	As recuperações foram de 101, 79, 90 e 88 % para 2,4-D; simazina; atrazina e alaclor. As recuperações médias foram de 90% para EFS com C18 e 65 % para as coletas em acetona	115
Otimizar um procedimento para determinar triazinas em amostras ambientais	A pré-concentração e a limpeza das amostras de água foram feitas em linha, e das amostras de solo fora de linha. Para o solo as extrações foram feitas em ultrassom com acetona	7 triazinas foram determinadas na faixa de 5 mg/L, com os menores LOD, de 0,2-1,2 mg/L, para água potável	116
Detectar e quantificar os herbicidas sulfoniluréias em solo	Foi feita extração em tubos C18	A curva analítica foi linear de 0,6-10 mg/mL, com LOD de 0,63-0,5 mg/mL. As recuperações médias foram de 95,4±16,1%	117
Determinar sulfoniluréias em solo e água	As amostras de solo (50 ou 100g) foram extraídas com NaHCO ₃ 0,1 mol/L (pH	A curva analítica foi linear de 0,1-2 mg/mL, com R= 86,6% (5 mg/L), para água, e de	118

	7,8).As amostras de água (100mL) e o extrato do solo (pH 2,5) foram passados por tubos C18.	0,25-10 mg/mL, com R=71-108% (10-50 mg/L), para o solo	
Realizar a análise de resíduos de atrazina em solo 2 anos depois da aplicação	Foram comparados os métodos de CLAE e de Imuno-Ensaio. Extração com água e acetona forneceram resultados similares	Os resultados de 100 mg de atrazina por kg de solo foram considerados positivos. Os resultados de CLAE foram validados, e foi obtido $r = 0,96$. O método de Imuno-Ensaio foi considerado um método de "screening" poderoso	119
Determinar sulfoniluréias em solos e água por CLAE	Foram utilizadas duas colunas: C-6 e C-18, para separação. Foram testadas a ELL e EFS	A separação com C-6 mostrou-se mais rápida que com C-18. A EFS apresentou melhores recuperações que a ELL	120
Desenvolver um método para extrair e analisar atrazina e seus compostos de degradação e metalaclor, em amostras de água e sedimentos	Extração dos sedimentos foi feita com metanol:ácido clorídrico (50:50, v/v). Duas colunas de EFS C18 foram usadas para pré-concentrar e purificar os extratos	As recuperações foram da ordem de 75% e o LOD variou entre 0,05-0,15 mg/L, para água, e 0,5-1,5 mg/L, para sedimentos	121
Aplicar a extração com fluido supercrítico para extração de triazinas em matrizes sólidas	A extração com fluido supercrítico foi realizada com CO_2 e metanol como modificador orgânico	Extrações de solos fortificados (20 mg/mL) forneceram R= 88, 96, 41% para atrazina, HA e MET, respectivamente	122
Analisar clorotriazinas e seus produtos de degradação em amostras ambientais	Foi empregada a CL/EM. Foi feita a aplicação dos pesticidas para caracterização de fotólise e	O LOD obtido foi da ordem de 0,4-4 ng.	123

	produtos de transformação		
Determinar PAH e triazinas em solos, sedimentos e materiais suspensos por CLAE com detecção UV e DAD	O solo foi extraído com tolueno e depois do extrato ter sido evaporado e redissolvido em propanol foi diluído com água e submetido a EFS em aminopropil e C18 em série	Foram encontrados resíduos dos compostos nos sedimentos e nos solos, mas em distribuições diferentes. No sedimento a concentração foi da ordem de mg/kg (duas ordens de grandeza maior que no solo). A sorção no solo mostrou-se maior nas partículas menores e na matéria orgânica	124
Determinar resíduos de herbicidas em solo	Foram utilizados 5 diferentes procedimentos de CLAE, incluindo fase reversa e normal	Aproximadamente 30 substâncias foram determinadas com LOD de 0,01 µg/kg	125
Aplicar CL/EM para análise de resíduos de sulfoniluréias e seus produtos de degradação em solos	Os herbicidas foram extraídos do solo com solução de acetonitrila 80% e agitação vortex	O LOD foi de 0,02 µg/mL. A curva analítica foi linear até ~ 0,40 µg/mL. As recuperações foram maiores que 74%	126
Determinar simultaneamente os herbicidas isoproturon, diclorprop-p e bifenox em solos	Amostras de solo (20g) foram agitadas com CH ₂ Cl ₂ :etanol:acetona (6:2:1), v/v/v	Sem limpeza o LOD variou de 10-30 µg/L, com limpeza de 3-7 µg/L. As R foram da ordem de 70-99% (0,01-1 µg/mL) sem limpeza, e 73-99% com limpeza	127
Determinar herbicidas em solos e água	As extrações foram feitas com água e EFS ou com metanol e evaporação rotatória	O LOD foi de 0,05 µg/kg e as recuperações foram de 24 a 84% para extração com água e EFS e de 54-94%	128

		para extrações com metanol. O RSD foi 10-20%	
Determinar os herbicidas dinitroanilinas em solos e água	Amostras de solo seco (25g) foram extraídas com eter etílico. A água e o extrato do solo foram limpos em tubos C18	A curva analítica foi linear até 1,5 µg/mL. Os LOD foram de 0,02 µg/kg para solo e 0,5 µg/L para água. As R foram de 89-104%	129
Determinar resíduos de atrazina e hidroxiatrazina em solos	O solo foi extraído por agitação com acetonitrila:HCl 0,02 mol/L (9:1, v/v) por 1h. O extrato foi submetido a EFS	A curva analítica foi linear de 0,1 µg/mL (LOD) até 10 mg/mL	130
Determinar ácido e ester clorofenóxidos em solo e água	Foi utilizado ELL para amostras de água e extratos de solo	O LOD variou entre 24-149 ng. As R, para níveis de 0,1-33,3 mg/mL, foram de 78%, para os ácidos e 88% para os estéres	131
Determinar resíduos de triazinas em solo	5 g de solo foram agitados com 10 mL de água e 20 mL de acetona, e depois adicionou-se NaCl e CH ₂ Cl ₂	As R para triazinas variaram de 80-90%	132
Analisar simultaneamente tebutiuron e hexazinona em solo	As amostras de solo foram extraídas 2 vezes com metanol 80%	A curva analítica foi linear de 1,25-2000 ng. O LOD foi de 0,005 mg/g para o solo. As R foram maiores que 98%	133
Determinar clorotriazinas, seus produtos de degradação e organofosforados em solos	A limpeza dos extratos foi feita em coluna Florisil ou por GPC	As triazinas e seus produtos de degradação foram determinados a 0,5-100 ng/L. As R variam de 75-103%	134
Determinar ácidos fenóxidos em solo, com pré-concentração em linha	Amostras de solo foram extraídas com NaOH 10mmol/L. C= 0,5-5 µg/mL foram determinadas	O LOD foi de 2 mg/mL sem pré-concentração e 0,2 mg/L com. As R foram de 59,8-88,8%	135

	diretamente e concentrações menores foram pré-concentradas em linha com C18		
Determinar resíduos de triazinas em solo	Recheou-se uma coluna com 1g de solo seco e conectou-a em série com uma outra coluna similar recheada com fase de troca catiônica. Passou-se acetona que transferiu os herbicidas do solo para a fase trocadora	As R foram maiores que 90%. Os LOD foram de 0,8-3 ng/g	136
Determinar resíduos de atrazina em solo	Amostras de solo foram extraídas com água por 1h	O LOD foi de aproximadamente 3 mg/L	137
Comparar CG e CLAE na determinação de triazinas em solos	Amostras de solos foram extraídas com metanol em Soxhlet e o extrato foi limpo por CPG	Os LOD foram de 10 e 5 mg/L para CLAE e CG, respectivamente. CLAE proporcionou resolução mais alta e melhor capacidade de separação em relação a CG, para uma ampla variedade de triazinas	138
Determinar os herbicidas feniluréias em amostras de água superficial, solo e grãos utilizando CG e CLAE	As amostras foram submetidas a hidrólise catalítica	Os LOD foram de 0,01 a 0,1 mg/L em águas superficiais e 10 mg/L em solos e grãos. A repetibilidade foi satisfatória, mas para o solo a recuperação requer de otimizações futuras	139
Determinar metoxuron e seu metabólitos em água, solo e batata utilizando CCD e CLAE com detecção por fluorescência	Os herbicidas foram submetidos à hidrólise catalítica	Os LOD para o metoxuron e seu metabólito foram de 1 µg/L em água, 200 µg/L em solo e 20 µg/L em batata	140

Determinar resíduos de hexazinona em solos e água	O herbicida foi extraído do solo com 20% de acetona e depois com clorofórmio. Amostras de água foram extraídas diretamente com clorofórmio.	O LOD foi de 0,04 µg/mL em solo e µg/L em água	141
Determinar o lixiviamento de triazinas em solos barrentos por CLAE de fase reversa	A separação dos herbicidas ametrin, atrazina, simazina e cianazina foi feita com uma coluna C-18.	A R dos herbicidas do solo foram da ordem de 50 %. O LOD foi de 0,5-1,0 µg/mL.	142
Apresentar uma revisão sobre os desenvolvimentos recentes e futuros relacionados a CL na análise de pesticidas	Há informações sobre tipos de materiais para colunas, utilização de detecção por EM, métodos para águas e amostras sólidas.	O descaque foi dado para a detecção por EM e para os imunosorventes, que são muito seletivos e sensíveis	143
Analisar os resíduos de produtos de degradação de herbicidas em amostras ambientais	Utilizou-se a CLAE otimizada para análise de 5 herbicidas e seus principais metabólitos	As recuperações gerais de amostras de água foram de 58-82%, para um nível de resíduo de 25 µg/L	144
Palavras-chave: water, soil, herbicides, HPLC Fonte: Web of Science e WinSpirs 2.0			

1.9 Validação de Método

Validação de um método pode ser definida como o processo de estabelecimento das características de desempenho e limitações de um método, além da identificação das influências que podem alterar estas características e sua extensão [145,146].

Uma vez desenvolvido um método de análise cromatográfica, como em qualquer outra técnica analítica, torna-se importante fazer a validação do método

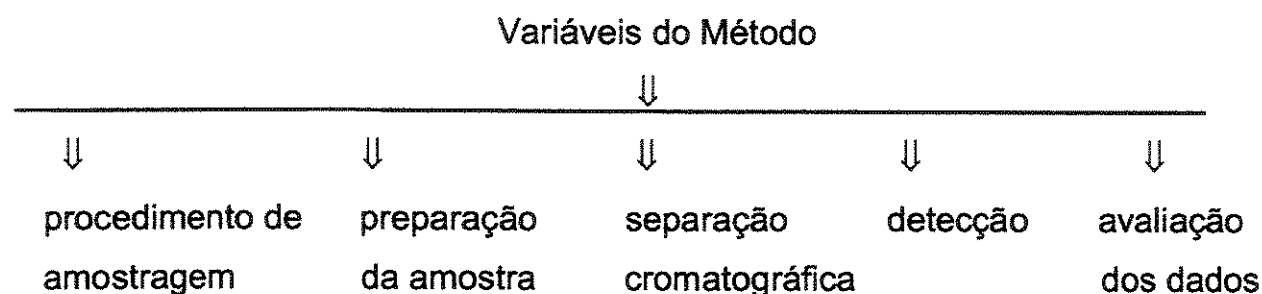
para avaliar se ele fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente [147].

A validação também é parte integral de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, EUA e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de resíduos de pesticidas em vários tipos de matrizes.

Na literatura existem várias referências sobre validação de métodos utilizando a CLAE, sendo que elas são mais facilmente encontrados para amostras biológicas ou biomédicas [148-155]. Para amostras de pesticidas, os procedimentos são basicamente os mesmos, entretanto há poucas publicações.

Foi publicado, pela Coordenação de Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura, um roteiro para validação de metodologia envolvendo a análise de resíduos de pesticidas [5], o qual apresenta normas específicas para os pesticidas.

A avaliação total de um método que emprega técnicas cromatográficas, como CLAE, pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas.



Os parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação de métodos analíticos são: curva analítica, linearidade, seletividade, recuperação,

exatidão, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), detectabilidade (limite de detecção e limite de quantificação) e robustez [156].

1.9.1 Curva Analítica

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, precisão e exatidão adequadas não podem ser obtidas [156].

Para a maioria das técnicas cromatográficas, uma relação linear (de primeira ordem) é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração (x) do composto em estudo, podendo ser descrita pela equação de regressão linear: $y = a + b x$, onde a é a intersecção da curva analítica (coeficiente linear) e b é a inclinação da reta (coeficiente angular). Idealmente, a não deve ser estatisticamente diferente de zero e b deve ser reprodutível. A regressão linear deve também ter alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$) [157].

1.9.2 Linearidade

A linearidade de um método é a sua capacidade de produzir resultados que são diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcional à concentração do soluto na amostra, dentro de uma determinada faixa [157].

Valores dentro da faixa linear devem respeitar os limites (teste dos resíduos) (equação 6):

$$0,05b < \frac{S-a}{C} < 1,05b \quad \text{eq. 6}$$

onde: b = coeficiente angular

a = coeficiente linear

C = concentração

S = sinal

Isto representa que $(S-a)/C$ não deve diferir de b com mais de 5% de tolerância, de acordo com a IUPAC [158].

1.9.3 Exatidão e Precisão

A exatidão e a precisão (repetibilidade) determinam respectivamente o erro e o desvio de uma análise e são os critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico.

A exatidão é expressa em porcentagem de erro sistemático, podendo ser calculada pela equação 7 [5,157]:

$$\text{exatidão} = \left(\frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \right) \cdot 100 \quad \text{eq. 7}$$

A precisão pode ser determinada em termos de repetibilidade e reprodutibilidade:

Repetibilidade é o grau de aproximação dos resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetitivamente a amostragens múltiplas de uma amostra homogênea ou a amostras artificialmente preparadas. A repetibilidade é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também denominado de coeficiente de variação (CV), ou pela estimativa do desvio padrão absoluto (s). Este teste é realizado pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, no mesmo dia e utilizando o mesmo instrumento [155].

O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da equação 8 [5,155,157]:

$$RSD = \frac{s}{x_m} \cdot 100 \quad \text{eq. 8}$$

onde: s = estimativa de desvio padrão absoluto

$$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$$

x_i = valores individuais

x_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas

1.9.4 Recuperação

Recuperação é a medida da eficiência do procedimento de extração do soluto, a partir da matriz. A recuperação geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para a amostra.

A recuperação (R) é calculada através da equação 9 [5]:

$$R = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \cdot 100 \quad \text{eq. 9}$$

Segundo a EPA, valores aceitáveis de recuperação encontram-se entre 70-130 %, com estimativa de desvio padrão relativo < 30% [16]. Os limites aceitáveis de recuperação, segundo o GARP [5], é de 50-120% para amostras ambientais, com estimativa de desvio padrão relativo < 15%.

1.9.5 Detectabilidade (Limite de Detecção e de Quantificação)

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito detectada pelo método em estudo e é geralmente expresso em unidades de concentração [152].

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais e também é geralmente expresso em unidades de concentração [152].

Existem várias controvérsias em relação ao cálculo de LOD e LOQ , porém para a maioria dos autores, estes dois parâmetros relacionam-se com o ruído do instrumento. As equações 16 e 17 foram utilizadas para os cálculos dos limites de detecção e de quantificação, respectivamente.

$$LOD = 3S / N \quad \text{eq. 16}$$

$$LOQ = 10S / N \quad \text{eq. 17}$$

onde: S/N = razão sinal ruído

Neste trabalho, LOD foi calculado como sendo 3 vezes o valor do ruído e LOQ 10 vezes o valor do ruído de linha de base [145,156].

1.9.6 Robustez

A robustez de um método analítico corresponde aos estudos que indicam o grau de confiabilidade do ensaio perante as mudanças de variáveis comuns. Estas mudanças podem ser ligeiras diferenças operacionais, de equipamento, analista, laboratórios, colunas, etc...

É evidente que um método deve ser robusto (reprodutível) frente a variações de analistas ou instrumentos, mas não necessariamente deve ser robusto frente a todas as variações que se estude [147].

Capítulo 2

2 Objetivos

O objetivo primordial deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia analítica rápida, simples e eficiente que emprega a extração em fase sólida "on-line" ou "off-line" para extrair e concentrar os herbicidas: bentazona; 2,4-D; atrazina; simazina; cianazina; diuron e linuron e seus produtos de degradação, 3,4-dicloroanilina, 2,4-diclorofenol e 2-hidroxiatrazina, presentes em matrizes de água e de solo, para posterior análise por CLAE, com fase reversa e detecção UV.

Neste trabalho utilizaram-se tubos, colunas e discos de extração em fase sólida de C-18, e colunas de estireno divinilbenzeno (DVB). Um dos objetivos relacionados ao presente projeto foi comparar os resultados obtidos com estes diferentes dispositivos de extração e também comparar a extração em fase sólida "on-line" e "off-line", tendo-se desenvolvido um sistema de extração acoplado ao cromatógrafo líquido, para atender este propósito.

Outro objetivo relacionado ao presente trabalho foi realizar a validação do método analítico desenvolvido, através da determinação das seguintes figuras de mérito: precisão (repetibilidade), exatidão, recuperação, curva analítica, linearidade, detectabilidade (limite de detecção e quantificação) e robustez.

Capítulo 3

3 Parte experimental:

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Reagentes e solventes

Foram empregados os seguintes reagentes e solventes, no desenvolvimento deste trabalho:

- Metanol - grau cromatográfico, Ominosolv (Merck).
- Ácido fosfórico - PA, Synth.
- Água Milli-Q, sistema Millipore.
- Cloreto de cálcio - PA, Nuclear.
- Cloreto de sódio - PA, Nuclear.

OBS: Os solventes usados no preparo da FM, como água e metanol, foram filtrados em filtro Millipore (GVWP 04700, 0,22 mm, 47 mm) e depois degaseificados em banho ultrassônico, por aproximadamente 15 min.

3.1.2 Solos utilizados

Solo A

- cor marrom avermelhado
- presença de pequenos resíduos de raízes
- coletado na Estação Experimental de Pindorama, perfil n° Pi 902, área de pasto
- profundidade de coleta de 0 a 20 cm (mesmo procedimento para análise de fertilidade)
- mais de 12 anos sem uso de pesticidas

- descrição dos perfis [159]

Solo B

- cor marrom escuro
- coletado em um orquidário na cidade de Campinas, SP
- profundidade de coleta de 0 a 20 cm
- não há registro do uso de pesticidas

Os solos foram homogenizados e peneirados, em peneiras de granulometria de 2 mm (USS/ASTM 10, Tyler/Mesh = 0,9), Bertel Industria Metalúrgica Ltda.

3.1.3 Herbicidas selecionados

Os herbicidas selecionados para este estudo estão listados na tabela 10, juntamente com os respectivos fornecedores, grau de pureza e família química.

Tabela 10. Herbicidas, fornecedores, grau de pureza e família química.

Herbicida	Fornecedores	Grau De Pureza (%)	Família Química [10-12]
bentazona	Basf	99,9	tiodiazina
2,4-D	Dow	> 99,0	fenoxiacético
cianazina	Cyanamid	98,0	triazina
simazina	Novartis	98,3	triazina
atrazina	Novartis	97,7	triazina
linuron	Hoescht	99,5	uréia substituída
diuron	Du Pont	99,3	uréia substituída

OBS: Todos os padrões dos herbicidas foram estocados em geladeira, a 4 °C.

3.1.4 Metabólitos

A tabela 11 apresenta os metabólitos, os fornecedores, o grau de pureza e os respectivos herbicidas pais, isto é, herbicidas que degradam gerando o metabólito em questão.

Tabela 11. Metabólitos, fornecedores, grau de pureza e herbicidas pai.

Metabólito	Fornecedores	Grau De Pureza (%)	Herbicidas Pai
3,4-dicloroanilina (3,4-DCA)	Aldrich	98	diuron ou linuron
2,4-diclorofenol (2,4 DCP)	Supelco	98,8	2,4-D
2-hidroxiatrazina (2-HA)	Chem Service	98	atrazina

3.1.5 Coluna cromatográfica

- Coluna Cromatográfica Analítica Nova Pak - Waters, 150 mm x 3,9 mm d.i., recheada com C-18 quimicamente ligado à sílica, tamanho de partícula de 4 μm e 6 nm de diâmetro de poro.
- Coluna de Guarda Nova Pak - Waters, 30 mm x 3,9 mm x d.i., recheada com C-18 quimicamente ligado à sílica, tamanho de partícula de 4 μm e diâmetro de poro de 6 nm.

3.1.6 Dispositivos de extração em fase sólida

- Tubos de extração, tipo seringa, Supelclean™ Envi C-18, de 500 mg, Supelco.
- Tubos de extração, tipo pré-coluna, Resource, DVB, de 1 mL, Biotech Pharmacia
- Discos de extração, de 47 mm, C-18, Supelco
- Colunas de extração, 3,8 x 3,9 mm d.i., recheadas artesanalmente com sílica C-18 R-Sil de 10 µm, Alltech.

3.1.7 Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido marca Waters, composto por:
 - Bomba de alta pressão, recíproca, tipo pistão cabeça dupla, modelo 515
 - Injetor Rheodyne, 7725i, com alça amostradora de 10 µL
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, caminho ótico de 10 mm, modelo 996
 - Forno e controlador de temperatura Waters, modelo TCM
- Computador Digital Pentium II de 300 MHz, contendo software Millenium instalado para aquisição e tratamento de dados cromatográficos.
- Bomba de vácuo - Primar, modelo 141
- Banho Ultrassônico - Thornton, modelo T14
- pHmetro, DM 21 - Digimed, utilizado com os seguintes eletrodos:
 - Eletrodo de vidro combinado, Digimed
 - Eletrodo Termocompensador, Digimed
- Centrífuga Tomy, modelo IC-15SN
- Centrífuga Fanem, Excelsa II, modelo 206 MP

3.2 Análises dos solos [160]

Foram realizadas, no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), as análises básicas dos dois solos utilizados.

pH (acidez ativa):

O solo é tipicamente um ácido fraco, pois apenas uma pequena parte da sua acidez encontra-se dissociada na fase líquida, a qual é denominada acidez ativa e representa a atividade dos íons H^+ na solução do solo. Esta acidez é medida pelo pH.

O pH foi determinado em uma suspensão de solo em $CaCl_2$ 0,01 mol/L, utilizando um eletrodo de vidro combinado.

Acidez potencial (H+Al):

A maior parte da acidez do solo encontra-se ligada na fase sólida, na forma não dissociada, e recebe a denominação de acidez potencial, representada por H+Al. Os íons Al^{+3} e H^+ são os responsáveis por esta acidez. Os íons Al^{+3} encontram-se predominantemente ligados às partículas coloidais do solo através de ligações eletrostáticas e, portanto, podem ser deslocados dos sítios de adsorção por troca iônica. Assim, estes íons são considerados como trocáveis e a acidez gerada por eles é denominada acidez trocável. Por outro lado, os íons H^+ estão ligados ao solo através de ligações covalentes, que são mais fortes que as ligações eletrostáticas. Portanto, em solos normais, a presença de hidrogênio trocável é desprezível e a presença de íons H^+ na forma trocável representa a presença de ácidos livres em solução.

A acidez potencial foi determinada utilizando-se uma solução de acetato de cálcio 1 mol/L, a pH 7, para extrair H+Al dos solos. Foi usada a mesma suspensão da medida de pH adicionando-se 5 mL de tampão SMP ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, K_2CrO_4 , $Ca(Ac)_2$ e trietanolamina). A solução foi agitada por 15 min a 220 rpm, deixada em

repouso por 1 h e, então, foi realizada a medida. A equação 10 foi usada para os cálculos:

$$\ln(H^+ + Al^{3+}) = 7,76 - 1,053pH(SMP) \quad \text{eq. 10}$$

Extração de cálcio, fósforo, magnésio e potássio:

Os solos possuem cargas eletricamente negativas, funcionando assim, como trocadores de cátions. As cargas negativas do solo têm origem na estrutura dos minerais de argila e na dissociação de hidroxilas de grupos funcionais de minerais, como por exemplo $Al(OH)_3$, ou matéria orgânica, como $R-COOH$.

O fósforo é um elemento que forma diversos compostos de baixa solubilidade com elementos como ferro, alumínio e cálcio, que são muito abundantes em solos. O princípio da extração de cálcio, magnésio e potássio de solos, difere fundamentalmente da extração de fósforo. Os primeiros são cátions trocáveis e facilmente extraídos com soluções salinas ou de ácidos diluídos, já a extração de fósforo é mais complexa.

Para extração foram usados $2,5 \text{ cm}^3$ de solo e acrescentados 25 mL de água destilada e uma bolinha de vidro para agitar e desagregar o solo (15 minutos). A bolinha foi retirada e foram adicionados $2,5 \text{ cm}^3$ de resina trocadora de íons (pode ser resina aniônica, tipo base forte, Amberlite IRA-400, ou uma mistura desta com resina catiônica, tipo ácido forte, Amberlite IR-120). O frasco foi fechado e agitado durante 16 h (agitador de movimento circular), a 220 rpm. Após este período, a suspensão de solo e resina foi transferida para uma peneira de 0,4 mm, a resina foi lavada e o material da peneira foi transferido para um frasco com capacidade de 100 mL, com auxílio de 50 mL de NH_4Cl 0,8 mol/L + HCl 0,2 mol/L. Esta mistura permaneceu em contato por cerca de 30 min, para permitir a eliminação do gás carbônico. Em seguida, o frasco foi fechado e agitado por 1 h a 220 rpm. O extrato foi levado para determinação de cálcio, magnésio, fósforo e potássio. O fósforo foi determinado diluindo-se 4 mL do extrato com 16 mL de solução diluída de molibdato, que, após 15 min., foi lido em espectrofotômetro à

660 nm. Cálcio, magnésio e potássio foram analisados acrescentando-se a 1 mL de extrato, 10 mL da solução de lantânio 0,1%. Cálcio e magnésio foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e potássio foi determinado por fotometria de chama. Previamente às medidas, foram obtidas curvas analíticas com padrões dos elementos.

Cálculo de soma de bases (SB), da capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação em bases (V):

A capacidade de troca de cátions dos solos indica quanto o solo é capaz de reter cátions a pH 7,0. Ela representa a quantidade de cargas negativas existentes na fração coloidal do solo, que poderão estar disponíveis para a retenção de cátions neste pH.

A saturação em bases é um parâmetro que indica quanto da capacidade de troca de cátions é ocupada, em termos percentuais, por cátions básicos como cálcio, magnésio e potássio.

A partir dos resultados de alguns dos parâmetros já descritos é possível calcular SB (mmol-carga/dm³), CTC (mmol-carga/dm³) e V (%) utilizando as equações 11, 12 e 13, respectivamente:

$$SB = [Ca^{2+}] + [Mg^{2+}] + [K^+] \quad \text{eq. 11}$$

$$CTC = SB + [H^+ + Al^{3+}] \quad \text{eq. 12}$$

$$V = 100 SB / CTC \quad \text{eq. 13}$$

Determinação da matéria orgânica:

O teor de matéria orgânica, que um determinado solo apresenta, decorre do equilíbrio de perdas e ganhos. Com o cultivo do solo, a matéria orgânica tende a diminuir até atingir um novo equilíbrio.

Para determinação deste parâmetro foi utilizado o método colorimétrico, que é uma adaptação do método de Walkley-Black. Transfere-se 1 cm³ de solo para

um frasco de 100 mL e adicionam-se 10 mL de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 4 mol/L em H_2SO_4 10 mol/L. Agita-se por 10 min a 180 rpm (agitação com movimento circular horizontal). Após repouso de 60 min, adicionam-se 50 mL de água, misturam-se as soluções e depois decanta-se durante uma noite. Após este período o sobrenadante é lido em um colorímetro com filtro de transmitância máxima de 650 nm. Neste caso também é necessária a obtenção de uma curva analítica.

Também foi determinada a %C orgânico, no IQ/UNICAMP, utilizando o método de combustão completa.

3.3 Separação cromatográfica dos herbicidas

3.3.1 Preparo de soluções padrão para análise dos herbicidas em solo e em água

Primeiramente foram preparadas soluções estoque individuais, dos herbicidas bentazona, 2,4-D, cianazina, simazina, atrazina, diuron e linuron, em uma concentração de 0,1 g/L, em metanol. A partir das soluções estoque foram preparadas soluções de calibração em concentrações de aproximadamente 30, 100, 250, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/L}$, em solução de CaCl_2 0,01 mol/L para análise de solo e soluções de calibração de 50, 100, 250, 1000 e 2000 $\mu\text{g/L}$ para análise de água. Cada nível de calibrador continha todos os herbicidas.

Também foram feitas algumas soluções calibradoras, de mesmos níveis de concentração, porém contendo, individualmente, cada um dos herbicidas.

3.3.2 Escolha da melhor fase móvel

Foi determinada a melhor fase móvel (FM) para realizar a separação cromatográfica dos herbicidas. Para isso, foram preparadas fases móveis de

composição MeOH:H₂O 50:50, 60:40 e 70:30, v/v, de pH variando de 3-7, ajustado com H₃PO₄. Os principais parâmetros avaliados na determinação da melhor FM foram fator de retenção (k) e resolução (R_s). As equações 14 e 15 foram utilizadas para o cálculo destes parâmetros [3].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{eq. 14}$$

$$R_s = 1,177 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} - w_{h1}} \quad \text{eq. 15}$$

onde: t_R = tempo de retenção

t_M = tempo de retenção de um composto não retido (medido para o metanol)

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de compostos adjacentes

w_{h1} e w_{h2} = largura a meia altura de picos adjacentes

3.3.3 Curvas analíticas

Foram obtidas curvas analíticas, de área vs concentração, com os calibradores preparados. As condições cromatográficas para determinação das curvas foram:

- fase móvel MeOH:H₂O 50:50, v/v, pH= 3,75 (ajustado com ácido fosfórico)
- vazão de fase móvel de 0,8 mL/min
- volume de injeção de 10 µL
- temperatura de 25 °C
- Max Plot (comprimento de onda de absorção máximo para cada herbicida)

As curvas analíticas foram refeitas todos os dias antes de se fazer a análise.

3.4 Isotermas de adsorção/dessorção

Para verificar qual o comportamento em relação a adsorção e dessorção dos herbicidas bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron e linuron, nos solos 1 e 2, foram obtidas isotermas utilizando o procedimento EPA adaptado [45]. Previamente a obtenção das isotermas foi feito um "screening" para verificar qual a % de adsorção. A EPA recomenda que as isotermas só sejam obtidas nos casos onde a adsorção seja maior que 25%. Apesar disto, em certos casos, esta recomendação não foi seguida.

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente, utilizando tubos de centrífuga com tampa.

O procedimento usado foi:

1. ~ 1g de solo seco ao ar, foi equilibrado durante 24h com água Milli-Q, sob agitação rotatória (Figura 15) suficiente para permitir a formação de uma suspensão;
2. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 min, a 3000 rpm;
3. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 5 mL da solução de CaCl_2 0,01 mol/L ao solo. A mistura resultante foi submetida à agitação rotatória durante 24 h;
4. A suspensão foi centrifugada e, mais uma vez, o sobrenadante foi descartado;
5. Ao solo foram adicionados 5 mL de solução, em CaCl_2 0,01 mol/L, contendo a mistura dos padrões dos herbicidas de interesse, em concentrações de ~ 30, 100, 250, 500, 1000 e 2000 mg/L. A mistura foi submetida à agitação rotatória por 24h e após este período a suspensão foi centrifugada;
6. O sobrenadante obtido teve seu volume determinado e foi levado para análise cromatográfica para verificar a porcentagem de herbicidas adsorvidos ao solo;
7. O solo foi submetido ao teste de dessorção adicionando a este 5 mL de solução de CaCl_2 0,01 mol/L e agitando, rotatoriamente, a mistura durante 16 h.

Também foi testada a dessorção com o uso de ultrassom durante 20 min, em substituição à agitação rotatória;

8. Novamente, após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi levado para análise cromatográfica para se verificar qual a % de dessorção. Dependendo dos valores de adsorção, o procedimento de dessorção foi realizado duas vezes.

Observações:

1. O procedimento de "screening" foi idêntico ao descrito, porém empregou apenas uma concentração de herbicidas, geralmente de valor intermediário.
2. A solução de CaCl_2 0,01 mol/L foi preparada em água Milli-Q.
3. Todos os tubos foram preparados em duplicatas.
4. Juntamente com cada experimento, foram obtidos brancos contendo solo e solução de CaCl_2 0,01 mol/L, sem herbicidas.
5. Foi feito um teste de controle, simultaneamente com os testes de adsorção, para verificar se não haviam perdas dos herbicidas (degradação, adsorção nas paredes do tubos e etc.). Para isso, tubos contendo somente as soluções de herbicidas em CaCl_2 0,01 mol/L (sem solo) foram submetidos ao mesmo procedimento descrito, juntamente com as demais amostras.
6. Os volumes de solução, os tempos de adsorção e o tempo de equilíbrio com CaCl_2 0,01 mol/L citados, foram otimizados de acordo com os resultados da análise fatorial.
7. Com a centrífuga Tommy o tempo de centrifugação foi de 20 min.

Os resultados de adsorção e dessorção foram utilizados para a obtenção de isotermas de adsorção e dessorção, respectivamente. Foi empregada a equação de Freundlich e os coeficientes de adsorção, dessorção, distribuição e de adsorção em relação a %C foram determinados.

Como o fatorial em questão envolve 3 fatores com dois níveis cada, ele é do tipo 2^3 e requer 8 experimentos.

A tabela 13 contém o esquema dos experimentos realizados e também os coeficientes de contraste para o fatorial (efeitos).

Tabela 13. Esquema de experimentos e efeitos para o fatorial 2^3

Ensaio	1	2	3	12	13	23	123	média
1	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	-	-	-	-	+	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+	+
4	+	+	-	+	-	-	-	+
5	-	-	+	+	-	-	+	+
6	+	-	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	+	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

Os sinais - ou + indicam os níveis dos fatores 1, 2 e 3 empregados em determinado ensaio. 12, 13, 23 e 123 indicam os efeitos de interação entre os fatores 1 e 2 (12), 1 e 3 (13), e assim sucessivamente. Os resultados empregados para avaliar este fatorial foram as adsorções obtidas para cada herbicida em cada situação, empregando uma solução com concentração da ordem de 2000 mg/L. O procedimento de adsorção seguido encontra-se descrito no item 3.4 deste capítulo.

3.5 Pré-concentração utilizando extração em fase sólida

3.5.1 Procedimento de extração com tubos tipo seringa

- a) Condiciona-se o tubo de extração passando-se por ele 10 mL de metanol;
- b) Equilibra-se o tubo pela passagem de 10 mL de água Milli-Q;
- c) Ajusta-se para $\text{pH} < 2$, com ácido fosfórico, o extrato de solo obtido após a dessorção (5 mL);
- d) Força-se a amostra a percolar através do tubo, com o auxílio de uma bomba de vácuo, com vazão de aproximadamente 3 mL/min;
- e) Lava-se o tubo com 5 mL de água Milli-Q;
- f) Descarta-se o eluato e seca-se o leito sorvente pela passagem de ar;
- g) Elui-se o analito com 1 mL de metanol;
- h) Evapora-se o eluato até secar, em capela*;
- i) Dissolve-se o resíduo com fase móvel.

* testou-se a realização de experimentos sem a etapa de evaporação. A vantagem é a diminuição do tempo e das possíveis perdas do analito por evaporação, a desvantagem é a diminuição da precisão e exatidão.

A Figura 16 apresenta um esquema com as principais etapas de extração.

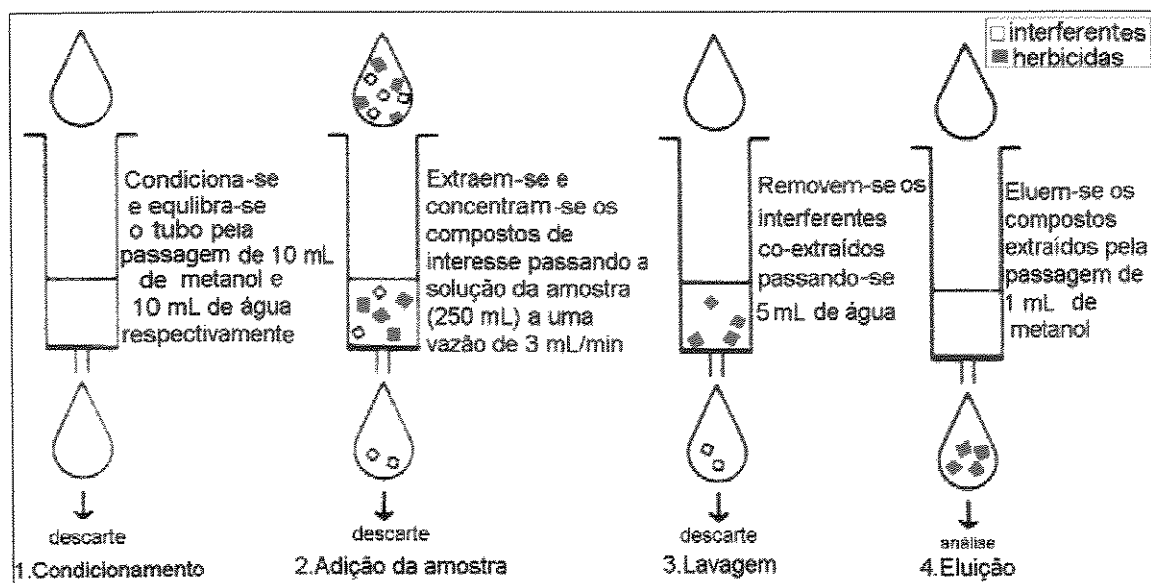


Figura 16. Esquema com as principais etapas de extração em fase sólida.

Os experimentos foram realizados com o auxílio do dispositivo de extração Supelco, que permite fazer a extração simultânea de 12 amostras. A Figura 17 apresenta o sistema utilizado.

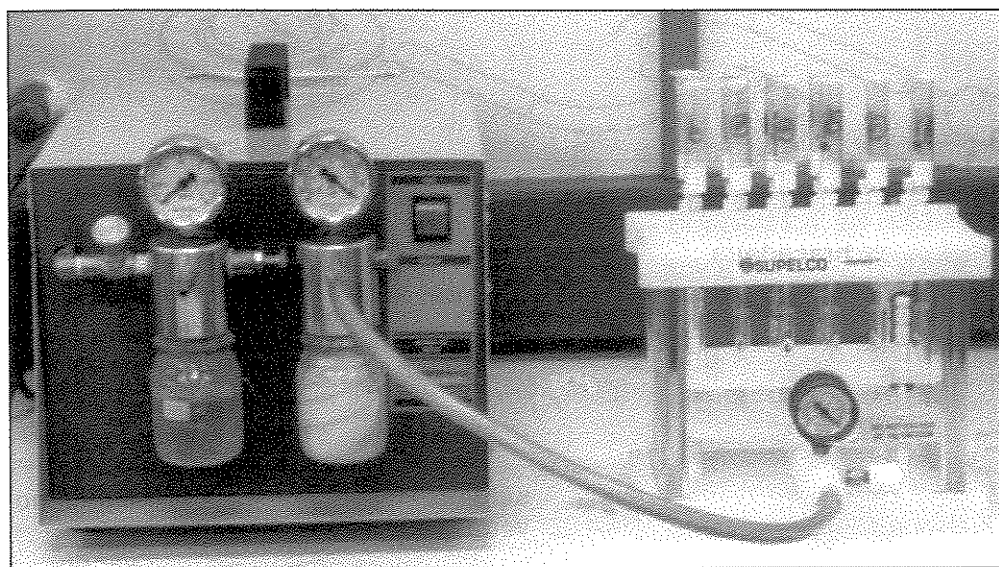


Figura 17. Dispositivo Supelco para 12 extrações simultâneas, e bomba de vácuo.

Para o solo 1, foram usadas fortificações da ordem de 0,5; 5 e 10 mg de herbicida por grama de solo (na etapa de adsorção), sendo os experimentos realizados em triplicata. Para o solo 2 foram usadas fortificações da ordem de 0,5; 2,5; 5 e 10 mg de herbicida por grama de solo (na etapa de adsorção), sendo os experimentos realizados em duplicata.

3.5.2 Procedimentos de extração com discos

O procedimento de extração foi o mesmo empregado para os tubos C-18, porém a vazão de passagem da amostra foi de 50 mL/min. O suporte utilizado com este dispositivo de extração foi o Solvac Filter Holder, da Gelman (Figura 18). Extração utilizando o sistema de filtração de fase móvel, da Millipore também foi testado com sucesso.

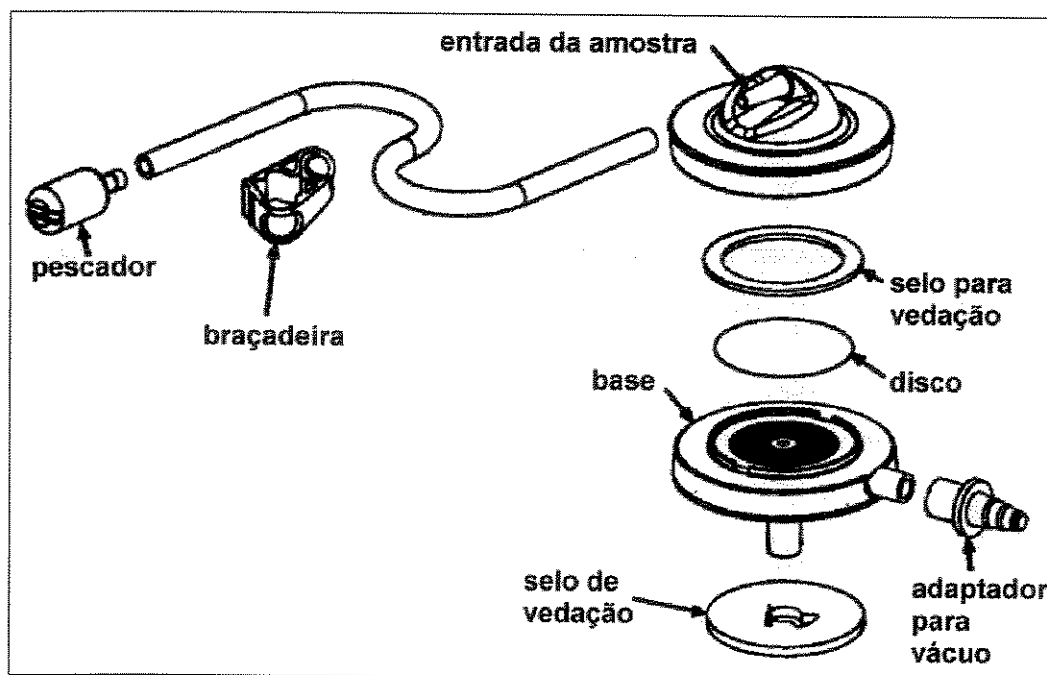


Figura 18. Suporte para extração utilizando discos.

3.5.3 Procedimentos de extração "on-line"

Para a realização das extrações "on-line" foi adaptada ao cromatógrafo uma segunda bomba de alta pressão, marca Waters modelo 510, utilizando-se o injetor Rheodyne como válvula de 6 vias, modelo 7725i.

O procedimento de extração foi o mesmo empregado para os tubos C-18, descrito no item 3.5.1, porém foram utilizadas vazões de 4 mL/min e as etapas *f*, *g*, *h* e *i* foram eliminadas. A Figura 19 apresenta o esquema utilizado nestas extrações.

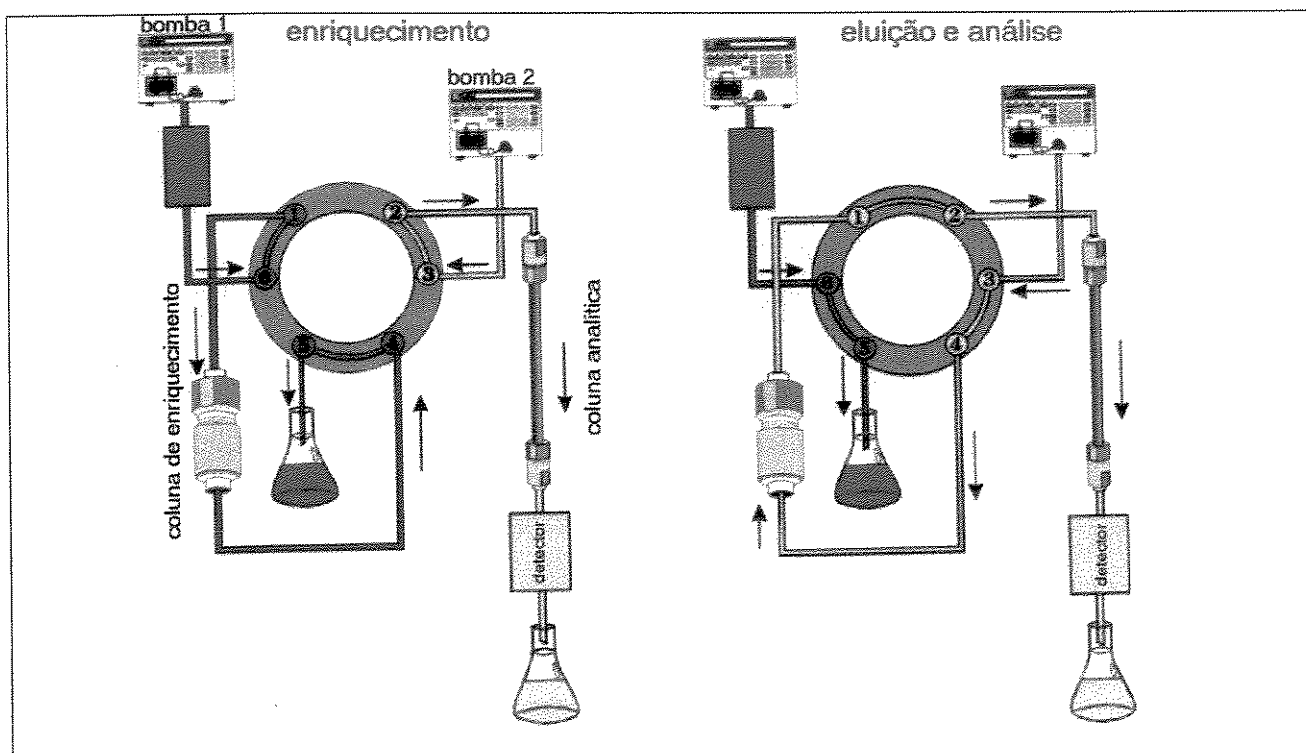


Figura 19. Esquema utilizado para extração "on-line" [161].

Após a extração o injetor foi colocado na posição *inject*, fazendo com que a FM de análise arrastasse os herbicidas retidos, levando-os até a coluna cromatográfica onde ocorreu a separação, e até o detector para uma posterior quantificação.

A EFS utilizando coluna de DVB também foi realizada em sistema utilizando bombas cromatográficas de alta pressão, porém a eluição dos analitos foi feita "off-line", para posterior injeção no sistema cromatográfico, pois como o sorvente utilizado (DVB) era diferente do recheio da coluna cromatográfica (C-18), a união em linha da coluna de extração e de análise causou alargamento do pico cromatográfico.

3.5.4 Regeneração dos tubos de extração

As condições empregadas no estudo de regeneração dos tubos de extração foram:

- Amostra: 200 mL de água Milli-Q
2 % de cloreto de sódio (4g)
adição de ácido fosfórico, até pH 2
- Fortificação: adição de 100 μ L da solução dos herbicidas em concentração da ordem de 2000 μ g/L
- Procedimento de extração: item 3.5.1
- Procedimento de regeneração: após a extração, os tubos são regenerados pela passagem de 10 mL de metanol e 10 mL de água Milli-Q

Um mesmo tubo de extração foi utilizado 6 vezes consecutivas, sendo regenerado após cada nova extração, e os resultados de recuperação obtidos foram calculados e comparados entre si.

3.5.5 Determinação do melhor volume de extração

As condições empregadas na determinação do melhor volume de extração foram:

- Amostra: volume de água Milli-Q = : 20, 60, 100, 200, 300 e 500 mL
2 % de cloreto de sódio (4g)
adição de ácido fosfórico, até pH 2
- Fortificação: ~ 0,2 µg de cada herbicida
- Procedimento de extração: item 3.5.1

Para determinação do melhor volume de extração, soluções aquosas dos herbicidas, com diferentes volumes e concentração mas mesma massa dos herbicidas, foram submetidas ao procedimento de extração (tabela 14). Com os resultados de recuperação obtidos, foi traçado um gráfico para se determinar qual o volume ideal de amostra que permite melhor recuperação.

Tabela 14. Volumes e respectivas concentrações das soluções de herbicidas empregadas na determinação do melhor volume de extração.

Tubos C-18		Coluna DVB		Disco		Coluna C-18 "on-line"	
V (mL)	C (µg/L)	V (mL)	C (µg/L)	V (mL)	C (µg/L)	V (mL)	C (µg/L)
20	10	100	5,0	20	25,0	20	25,0
60	3,3	200	2,5	100	5,0	50	10,0
100	2,0	500	1,0	200	2,5	100	5,0
200	1,0	1000	0,50	500	1,0	150	3,3
300	0,67	---	---	1000	0,50	200	2,5
500	0,40	---	---	---	---	---	---

Também foi realizada uma extração em branco com 200 mL de amostra de água Milli-Q.

3.5.6 Influência da adição de cloreto de sódio

As condições utilizadas no estudo sobre a influência da adição de cloreto de sódio, para ajuste da força iônica das amostras, foram:

- Amostra: 200 mL de água Milli-Q
adição de ácido fosfórico, até pH 2
- Fortificação: adição de 5 μL da solução estoque dos herbicidas com concentração da ordem de $1 \times 10^5 \mu\text{g/L}$
- Procedimento de extração: item 3.5.1

Foram submetidas ao experimento três pares de soluções idênticas exceto pelo fato de que em cada par uma das soluções continha 4g de NaCl e a outra não. Também foram utilizadas duas soluções de branco, que não sofreram fortificações com os herbicidas, uma contendo o NaCl e a outra não. Este teste foi realizado utilizando tubos e discos C-18.

As recuperações obtidas foram comparadas entre si.

3.5.7 Recuperação

As condições utilizadas nas determinações das recuperações foram:

- Amostra: 200 mL de água Milli-Q
2 % de cloreto de sódio (4g)
adição de ácido fosfórico, até pH 2
- Fortificação: 0,5; 1; 5 e 10 μg das soluções estoque dos herbicidas
- Procedimento de extração: item 3.5.1

As amostras de água foram submetidas ao procedimento de extração e os valores de recuperação foram utilizados para traçar um gráfico de massa recuperada x massa adicionada.

Cada experimento foi realizado de 3 a 7 vezes e durante os experimentos foram feitos ensaios com brancos, para verificar possíveis contaminações, e também foram injetadas amostras de controle, para verificar o nível de exatidão fornecido pela curva analítica.

3.6 Metabólitos

Os metabólitos 3,4-DCA, 2,4-DCP e 2-HA foram determinados de acordo com os métodos já mencionados e empregados na determinação dos herbicidas.

3.7 Biblioteca de espectros de absorção no UV

Foi montada uma biblioteca de espectros de absorção no UV contendo vários herbicidas e alguns metabólitos. As condições cromatográficas para obtenção destes espectros foram: FM MeOH:H₂O 50:50, v/v, vazão de 0,8 mL/min, pH= 3,75 (ácido fosfórico).

3.8 Amostras reais

Foram analisadas amostras reais de água e de solo, utilizando EFS com colunas C-18, acopladas a um cromatógrafo a líquido (sistema "on-line").

As seguintes amostras foram analisadas:

- **Água de torneira** do LABCROM (pia 1), fortificada com 0,01; 0,05 e 0,1 µg de herbicida, representando concentrações de 0,07, 0,3 e 0,7 µg/L.

- **Água de filtro**, tipo coluna, localizado próximo a zeladoria do IQ/UNICAMP, fortificada com 0,05 μg de herbicida.
- **Água de córrego**, coletada junto à Fazenda Monte Alegre, Monte Belo, MG, onde há plantações de cana-de-açúcar e faz uso dos pesticidas *Combine* (ingrediente ativo tebutiuron) e *Gramocil* (ingrediente ativo diuron).
- **Água de córrego**, coletada junto à Fazenda Monte Alegre, Monte Belo, MG, onde há plantações de café e faz uso do pesticida *Zaap* (ingrediente ativo sulfosato) e *Gramocil*.
- **Água de açude**, coletada junto ao sítio Grota Funda, São João da Boa Vista, SP, com plantações diversas a montante (Figura 20).
- **Solo**, coletado junto ao sítio Grota Funda, São João da Boa Vista, SP, atualmente com plantação diversas (Figura 21).

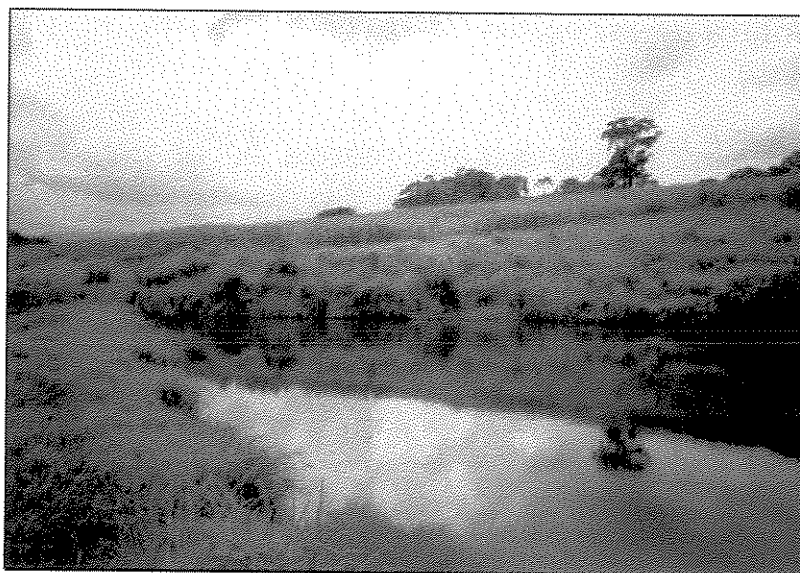


Figura 20 - Açude no sítio Grota Funda, São João da Boa Vista - SP.



Figura 21 - Amostragem do solo do sítio Grota Funda, São João da Boa Vista - SP

No caso das amostras de água de torneira e de bebedouro, foram realizadas fortificações com os herbicidas, após verificar que estas estavam isentas dos contaminantes estudados, para comprovar que seria possível realizar a determinação dos herbicidas, caso eles estivessem presentes nestas matrizes.

As amostras reais de água foram previamente filtradas (filtro Millipore 0,45 μm).

Capítulo 4

4 Resultados e discussão:

4.1 Análise de solos

A tabela 15 apresenta os resultados das análises de pH, acidez potencial (H+Al), concentração de cálcio, fósforo, magnésio e potássio, soma de bases (SB), capacidade de troca catiônica (CTC), saturação de bases (V), matéria orgânica (M.O.) e % de carbono (%C) para os solos 1 e 2.

Tabela 15. Resultados de pH, H+Al, concentração cálcio, magnésio, potássio e fósforo, SB, CTC, V, M.O. e %C, para os solos 1 e 2.

Parâmetros	Solo 1	Solo 2
pH (em CaCl ₂ 0,01 mol/L)	4,6	5,7
H+Al (mmolc/dm ³)	23	34
Ca (mmolc/dm ³)	11	96
Mg (mmolc/dm ³)	5,0	17
P (mmolc/dm ³)	5,0	61
K (mmolc/dm ³)	2,0	2,4
SB (mmolc/dm ³)	18,3	115,4
CTC (mmolc/dm ³)	41,2	149,4
V (%)	43	77
M.O. (g/dm ³)	10	39
%C	0,65	4,1

Mmolc = milimol-carga

10 g/dm³ = %

O pH foi determinado em uma solução de CaCl_2 0,01 mol/L, ao invés de ser determinado em água, pois nesta solução o efeito de pequenas concentrações de sais existentes no solo, que variam de acordo com a época de amostragem ou com o manuseio da amostra, são minimizados. Além disso, os resultados de pH em CaCl_2 0,01 mol/L apresentam uma correlação mais estreita com a saturação em bases do que o pH em água.

O valor de H+Al é constituído de duas partes distintas da acidez dos solos: a acidez trocável, representada por Al, e a acidez não trocável, representada principalmente por H. Os problemas do método de determinação, utilizando uma solução de acetato de cálcio são a qualidade variável do reagente, o ponto de viragem indefinido e a grande susceptibilidade da solução de acetato de cálcio a fungos. Para contornar estes problemas usa-se uma solução tampão de SMP e baseia-se na correlação entre o valor de pH da solução tampão de SMP em contato com o solo e os valores de H+Al. A solução tampão SMP foi desenvolvida inicialmente para ser utilizada em métodos rápidos de determinação de calagem (adição de cal ao solo). Ela consiste de um mistura de sais neutros com vários tampões, com o objetivo de se obter um decréscimo linear do pH, quando titulada potencialmente com ácido forte.

A tabela 16 apresenta os limites de interpretação de classes para a acidez e a saturação por bases.

O solo 1 apresenta uma acidez alta, já o solo 2 apresenta uma acidez baixa, de acordo com os pH encontrados (pH=4,6 para o solo 1 e pH=5,7 para o solo 2). Em relação a saturação por bases, o solo 1 apresenta baixa saturação por bases ($V=43\%$), enquanto o solo 2 apresenta alta saturação por bases ($V=77\%$).

Como era esperado, o solo 2, mais escuro, apresenta valores bastante diferentes do solo 1. O solo 2 apresentou maiores valores para todos os parâmetros analisados. Os maiores valores de M.O., %C e CTC, principalmente, mostram que o solo 2 deve apresentar maior adsorção dos herbicidas que o solo 1.

Tabela 16. Limites para interpretação de classes de acordo com acidez e a saturação por bases [162].

Acidez	pH em CaCl₂	Saturação por bases	V (%)
muito alta	Até 4,3	muito baixa	0-25
alta	4,4-5,0	baixa	26-50
média	5,1-5,5	média	51-70
baixa	5,6-6,0	alta	71-90
muito baixa	> 6,0	muito alta	> 90

Utilizando a relação entre M.O. (em %) e %C ($\%C = M.O./ 1,72$) para determinar a %C a partir da M.O., obtêm-se, solo 1 - %C = 0,6, solo 2 - %C = 2,3. Comparando-se estes valores com os da tabela 14, determinados experimentalmente, verifica-se que não há concordância para o solo 2, ao contrário do que ocorre para o solo 1.

4.2 Separação cromatográfica dos herbicidas

A escolha da melhor fase móvel a ser utilizada para a separação dos herbicidas bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron e linuron, baseou-se em dois aspectos: a fase móvel deveria permitir uma resolução (R_s) eficiente de todos os picos cromatográficos e deveria fornecer um fator de retenção (k) para o primeiro pico maior que 1.

Os pH das fases móveis foram ajustados com ácido fosfórico, pois este apresenta baixa absorção no UV e por ser um ácido forte, necessita-se de baixas concentrações para atingir o pH desejado.

Com uma fase móvel de composição MeOH:H₂O 70:30, v/v, não houve separações eficientes de todos os compostos, em nenhum pH estudado.

Com uma fase móvel de composição MeOH:H₂O 60:40, v/v, em alguns pH, houve resolução dos compostos, mas o k do primeiro pico a ser eluído (bentazona) apresentou um valor muito próximo a um. Diminuindo-se o pH foi possível aumentar o valor de k , mas neste caso a R_s piorou, fazendo com que houvessem muitas co-eluições. Mesmo com valores de pH próximos ao limite (pH=2), que garante a integridade do leito cromatográfico tendo como suporte sílica, não foram obtidos os resultados desejados. A Figura 22 apresenta um cromatograma obtido com uma FM MeOH:H₂O 60:40, v/v de pH = 3,0 (a 25 °C).

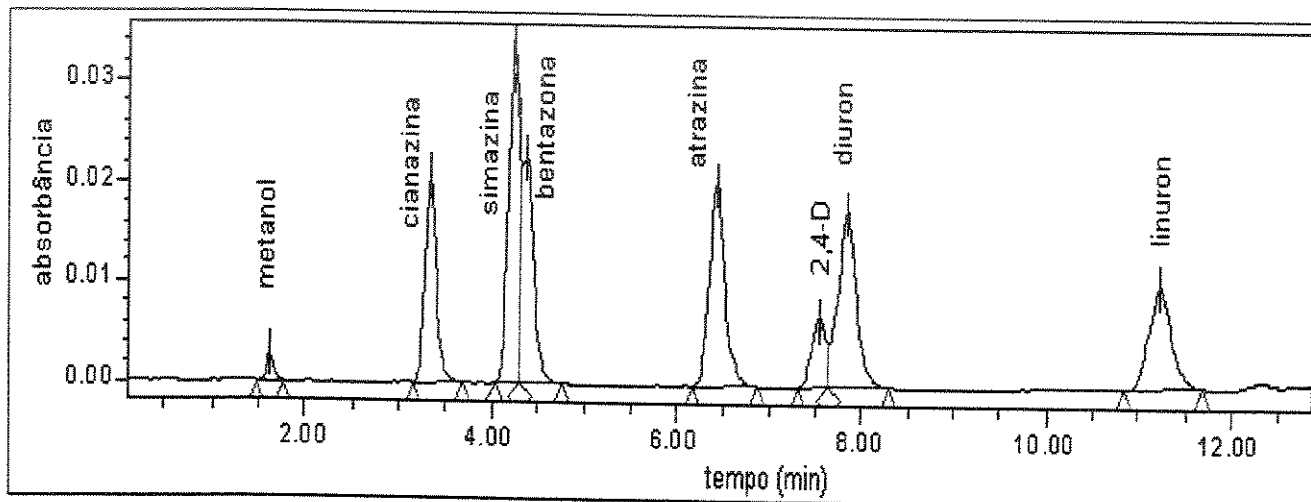


Figura 22. Cromatograma obtido com FM MeOH:H₂O 60:40, v/v de pH = 3,0 (a 25 °C), para separação simultânea de herbicidas.

Com uma FM MeOH:H₂O 50:50, v/v as resoluções obtidas para a separação da mistura dos herbicidas foram melhores. Variando-se o pH desta FM em uma faixa de 3-7, verificou-se que somente no valor de pH = 3,73 - 3,80 obtiveram-se bons resultados. Deve-se ressaltar ainda que pequenas mudanças de pH, da ordem de 0,02, são suficientes para mudar os parâmetros cromatográficos da separação da mistura dos herbicidas, como R_s , chegando até a ocasionar

mudanças na ordem da eluição. As Figuras 23 e 24 apresentam, respectivamente, cromatogramas obtidos para a separação da mistura de herbicidas utilizando FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,50 (a 25 °C) e FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75 (a 25 °C).

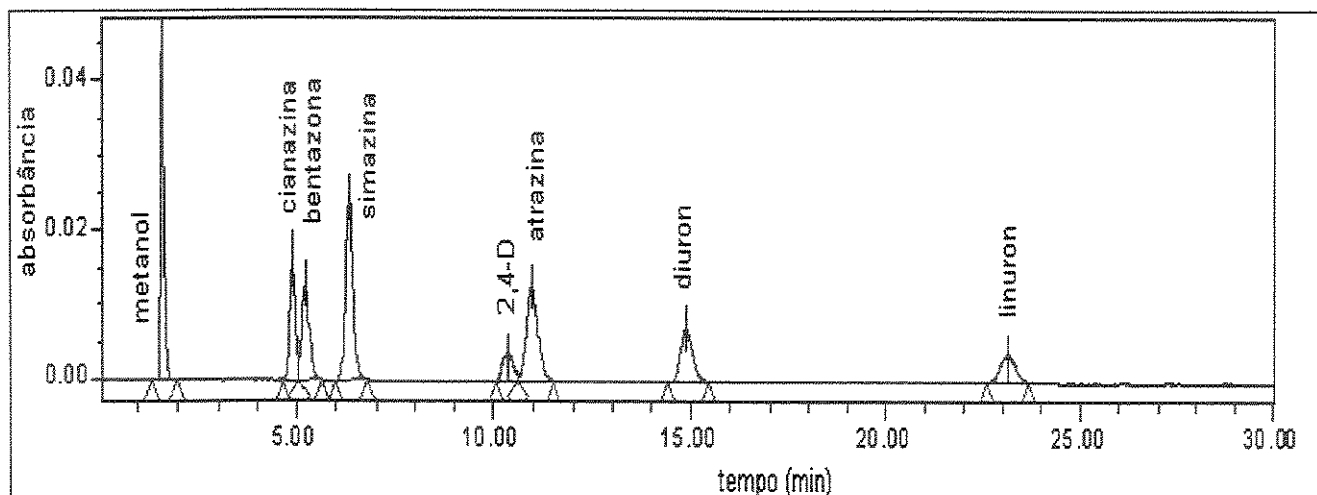


Figura 23. Cromatograma obtido com FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,50 (a 25 °C), para separação da mistura de herbicidas.

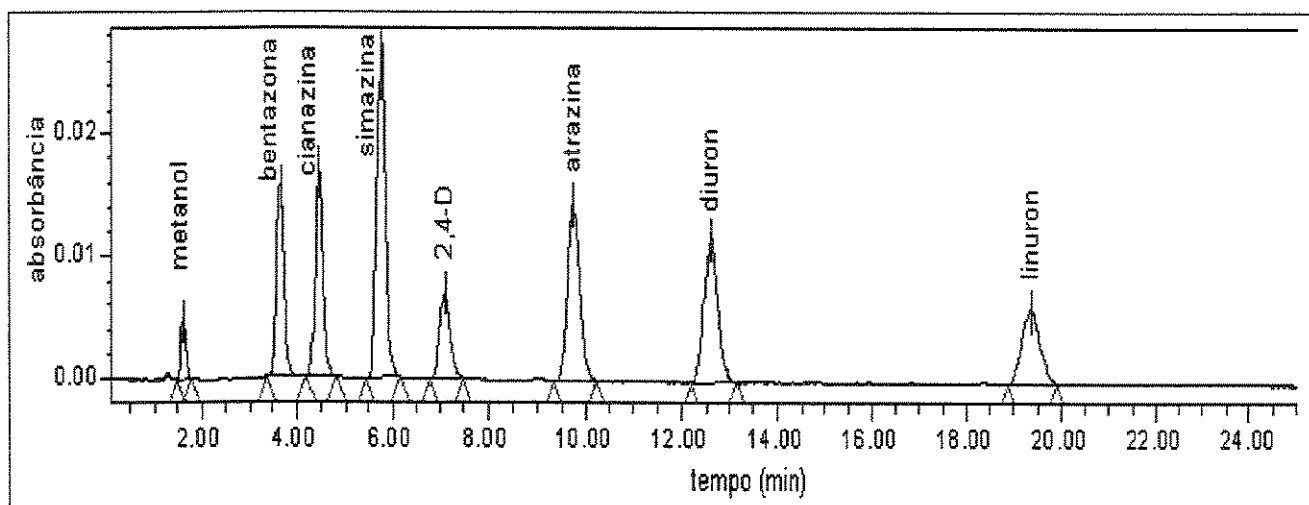


Figura 24. Cromatograma obtido com FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ajustado com ácido fosfórico), temperatura de 25 °C, vazão de 0,8 mL/min, coluna (3,9 x 150 mm) e coluna de guarda (3,9 x 20 mm) Nova Pak C18, 4 µm, para separação da mistura de herbicidas.

Após os testes, verificou-se que a FM que permitiu o melhor compromisso entre a resolução e o fator de retenção foi a FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ácido fosfórico), à 25 °C, para separação da mistura de herbicidas. A tabela 17 mostra os valores de k e R_s para todos os picos do cromatograma obtido com FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ácido fosfórico) à 25 °C.

Tabela 17. Valores de k e R_s para a separação da mistura de herbicidas utilizando FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75 (ácido fosfórico) à 25 °C.

Herbicidas	k	R_s
bentazona	1,3	
cianazina	1,8	3,1
simazina	2,6	4,6
2,4-D	3,4	3,8
atrazina	5,1	5,3
diuron	6,8	4,9
linuron	11,0	9,2

$t_M = 1,6$ min, obtido para o metanol

Os valores de k obtidos são adequados, pois para uma separação de vários compostos são aceitos valores de k entre 0,5 e 20 [163]. A R_s também apresentou bons resultados já que todos os valores obtidos foram maiores que 1,5.

Os dois primeiros picos a eluirm (bentazona e cianazina) são os que apresentam menor resolução e portanto, a situação mais delicada em termos de otimização da separação. Devido a isto, na tabela 18, são apresentados os valores de fatores de retenção da bentazona e cianazina e a resolução entre elas em vários valores de pH, para avaliar a influência deste parâmetro.

Tabela 18. Comparação de valores de R_s entre os picos de bentazona e cianazina utilizando diferentes pH de FM MeOH:H₂O 50:50, v/v.

pH	k bentazona	k cianazina	R_s^*
3,65	1,8	2,0	1,3
3,73	1,5	1,8	1,5
3,75	1,3	1,8	3,1
3,80	1,1	1,7	3,7

* entre bentazona e cianazina

Observando os valores de R_s , obtidos para os dois primeiros picos utilizando diferentes pH de FM MeOH:H₂O 50:50, v/v, comprova-se que pequenas mudanças no pH causam grandes variações na separação dos herbicidas em estudo.

Analisando a tabela 18, nota-se que a R_s dobra ao se elevar o pH de 3,73 para 3,75, comprovando que uma pequena diferença de pH apresenta grande influência na separação. As diferenças na retenção dos herbicidas frente a diferentes pH estão relacionadas com os valores de pKa dos compostos. Quanto mais próximo do valor de pKa estiver o pH da FM, menos dissociados estarão os herbicidas ionizáveis como: bentazona, cianazina, simazina, atrazina e 2,4-D, e portanto maior será a retenção destes compostos na coluna cromatográfica de fase reversa.

Assim, a FM MeOH:H₂O 50:50, v/v de pH = 3,75, ajustado com ácido fosfórico, a 25 °C, foi utilizada para separação da mistura de herbicidas, em todos os experimentos realizados.

4.3 Análise fatorial para a adsorção dos herbicidas

A tabela 19 apresenta os resultados de adsorção dos herbicidas no solo para os diferentes experimentos realizados segundo fatorial 2^3 , esquematizado na tabela 13.

Tabela 19. Valores de adsorção (%) dos herbicidas estudados, de acordo com os experimentos do fatorial 2^3 .

	1	2	3	4	5	6	7	8
bentazona	7,1	6,1	4,6	6,2	0,60	1,5	2,0	4,7
cianazina	5,8	4,5	11,7	4,6	1,8	0,60	1,3	1,2
simazina	11	11	6,6	9,6	3,1	4,0	6,6	4,9
2,4-D	33	32	29	33	28	28	28	27
atrazina	9,9	9,4	8,4	9,2	4,8	3,7	5,7	4,5
diuron	20	19	22	20	15	11	15	14
linuron	31	32	38	34	28	21	28	26

A tabela 20 apresenta os valores dos efeitos 1 (tempo de equilíbrio do solo em solução CaCl_2 0,01 mol/L), 2 (tempo de adsorção dos herbicidas) e 3 (volume de solução utilizada), e também as interações dos efeitos 12, 13, 23 e 123. Nesta tabela também são apresentados os valores médios de adsorção para cada herbicida estudado.

Tabela 20. Efeitos (Ef) referentes ao fatorial 2^3 calculados para cada herbicida.

Herbicidas	Ef (1)	Ef (2)	Ef (3)	Ef (12)	Ef (13)	Ef (23)	Ef (123)	Ads _{média} (%)
bentazona	1,1	0,60	-3,8	1,1	0,80	1,8	-0,20	4,1
cianazina	-2,4	1,5	-5,4	-1,2	1,8	-1,5	1,7	3,9
simazina	0,40	-0,20	-4,8	0,20	-0,90	2,4	-1,5	7,0
2,4-D	0,50	-0,80	-4,3	1,3	-0,90	0,50	-1,3	30
atrazina	-0,50	0	-4,6	0,30	-0,70	0,90	-0,40	7,0
diuron	-2,4	1,6	-6,6	0,50	-0,40	-0,20	1,0	17
linuron	-2,7	3,2	-8,0	0	-1,2	-0,90	2,9	30

Os efeitos dos fatores estudados e de suas interações são considerados significativos (estatisticamente diferentes de zero) quando apresentam valores maiores que o erro. Isto é estabelecido realizando-se o teste-t ($0 + t_{n-1}.s/N^{1/2}$). Assim, a maioria dos efeitos obtidos não são significativos ou são muito pouco significativos, para a maioria dos herbicidas, com exceção do efeito 3, volume de solução. Pela tabela 20 pode-se notar que o volume de solução utilizado é significativo para todos os herbicidas e o sinal negativo indica que um aumento no volume resulta em um valor de adsorção menor.

Desta forma, estabeleceu-se que as melhores condições para a adsorção dos herbicidas no solo são: volume de solução de 5 mL, tempo de equilíbrio de 24h e tempo de adsorção de 24h, sendo estes dois últimos fatores escolhidos devido a economia de tempo, já que com 48h os resultados não foram significativamente melhores.

4.4 Isotermas de adsorção/dessorção

4.4.1 Solo 1

Para obtenção das isotermas de adsorção/dessorção dos herbicidas no solo 1, foram utilizadas massas de herbicidas de aproximadamente 0,15; 0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 μg .

As Figuras 25 e 26 apresentam, respectivamente, cromatogramas para o branco de adsorção e após o equilíbrio do solo com solução contendo aproximadamente 10 μg de cada herbicida.

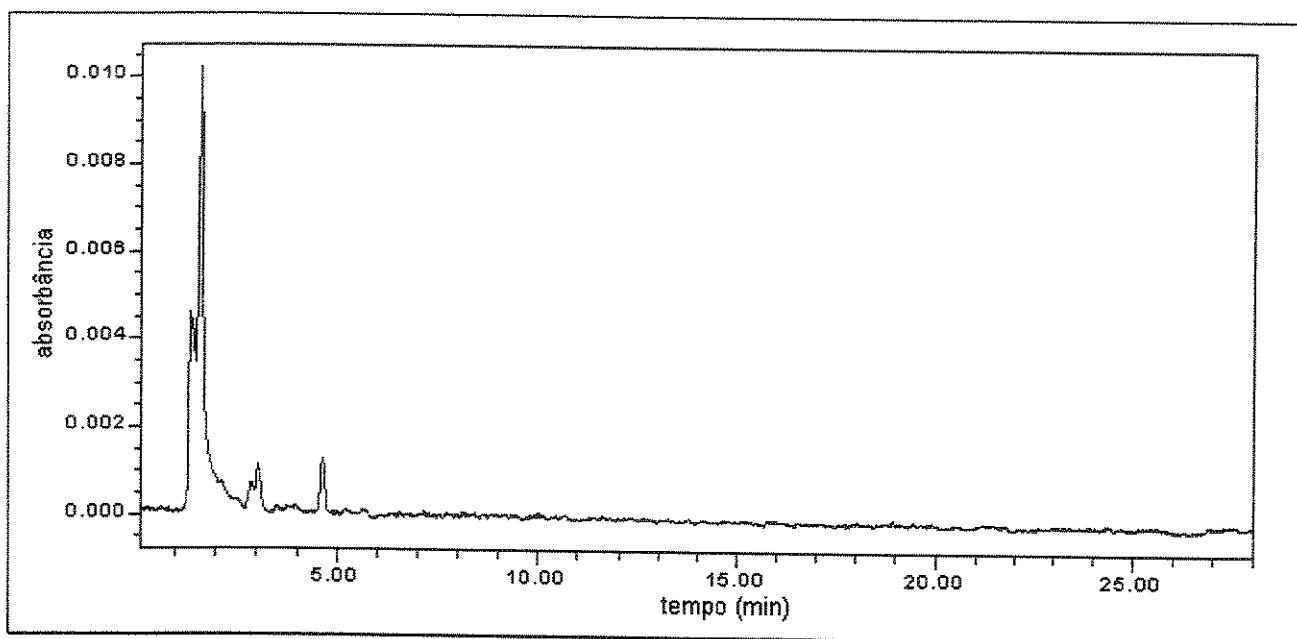


Figura 25. Cromatograma do branco obtido após o teste de adsorção no solo 1.

Condições idem às da Figura 24.

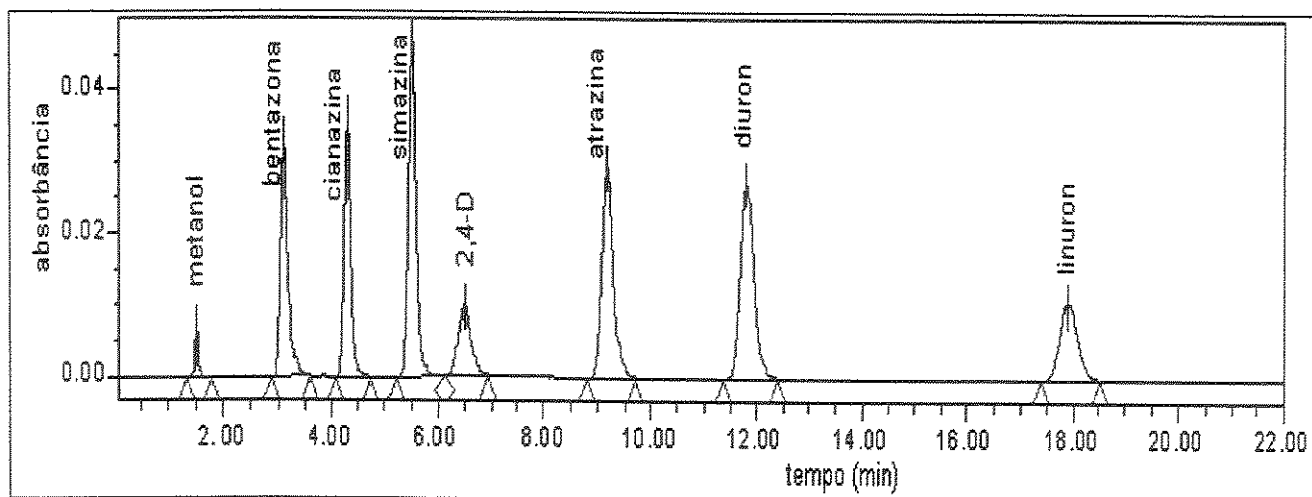


Figura 26. Cromatograma obtido após o teste de adsorção dos herbicidas no solo 1. Condição idem às da Figura 24.

Observando-se a Figura 25 nota-se a presença de alguns picos no início do cromatograma do branco, que não representam interferência, e um pico de pequena intensidade com tempo de retenção de aproximadamente 4,5 min. Este pico aparece em todos os cromatogramas obtidos e é uma interferência para o herbicida cianazina, que elui com tempo de retenção semelhante. Várias tentativas foram feitas para eliminá-lo, mas como não foi possível, ao realizar os cálculos para a cianazina descontou-se a área correspondente a este pico interferente, que se mostrou praticamente constante.

Pela intensidade dos picos do cromatograma obtido após adsorção dos herbicidas (Figura 26), verifica-se que a adsorção dos herbicidas no solo foi muito pequena.

A tabela 21 apresenta os resultados de adsorção dos herbicidas no solo 1 e também os valores calculados para obtenção da isoterma de adsorção.

Tabela 21. Resultados de adsorção e parâmetros calculados para obtenção da isoterma de adsorção do solo 1.

bentazona													
Cin (µg/L)	min(µg)	%ads1	%ads2	x1(µg)	x2(µg)	m1(g)	m2(g)	x1/m1	x2/m2	x/m(µg/g)	Ce(mg/L)	logCe	log(x/m)
38,4	0,19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
320,0	1,6	10,0	10,8	0,16	0,17	1,0263	1,0049	0,16	0,17	0,16	0,2868	-0,5424	2,5
640,0	3,2	12,9	13,5	0,41	0,43	1,0501	1,0369	0,39	0,42	0,40	0,555	-0,2554	2,7
1280	6,4	15,1	10,8	0,97	0,69	1,0185	1,0284	0,95	0,67	0,81	1,110	0,0453	3,0
2560	12,8	8,0	8,5	1,0	1,1	1,0444	1,0222	0,98	1,06	1,02	2,350	0,3711	3,4
cianazina													
32,4	0,16	24,7	6,5	0,040	0,011	1,0515	1,0534	0,038	0,010	0,02403	0,0244	-1,613	1,4
108,0	0,54	21,6	34,1	0,12	0,18	1,0096	1,0144	0,12	0,18	0,15	0,0780	-1,108	1,9
270,0	1,4	21,3	20,4	0,29	0,28	1,0263	1,0049	0,28	0,27	0,28	0,2138	-0,6700	2,3
540,0	2,7	16,4	15,6	0,44	0,42	1,0501	1,0369	0,42	0,41	0,41	0,4537	-0,3432	2,7
1080	5,4	13,4	18,4	0,72	0,99	1,0185	1,0284	0,71	0,97	0,84	0,908	-0,0419	3,0
2160	10,8	12,0	21,9	1,3	2,4	1,0444	1,0222	1,2	2,3	1,8	1,790	0,2529	3,3
simazina													
34,8	0,17	23,0	23,0	0,040	0,040	1,0515	0,0534	0,040	0,040	0,04	0,0268	-1,572	1,4
116,0	0,58	21,6	44,9	0,13	0,26	1,0096	1,0144	0,12	0,26	0,19	0,0775	-1,111	1,9
290,0	1,4	21,8	17,9	0,32	0,26	1,0263	1,0490	0,31	0,25	0,28	0,232	-0,6345	2,4
580,0	2,9	17,0	16,3	0,49	0,47	1,0501	1,0369	0,47	0,46	0,46	0,4836	-0,3155	2,7
1160	5,8	14,7	3,6	0,85	0,21	1,0185	1,0284	0,84	0,20	0,52	1,050	0,0212	3,0
2320	11,6	9,2	12,1	1,1	1,4	1,0444	1,0222	1,0	1,4	1,2	2,070	0,3160	3,3
2,4-D													
39,9	0,20	—	—	—	—	1,0515	1,0534	—	—	—	—	—	—
133,0	0,67	—	—	—	—	1,0096	1,0144	—	—	—	—	—	—
332,5	1,7	11,2	12,5	0,19	0,21	1,0263	1,0490	0,18	0,20	0,19	0,293	-0,5331	2,5
665,0	3,3	16,9	16,8	0,56	0,56	1,0501	1,0369	0,54	0,54	0,54	0,553	-0,2574	2,7
1330	6,7	18,6	14,3	1,2	1,0	1,0185	1,0284	1,2	0,92	1,1	1,1108	0,04564	3,0
2660	13,3	14,8	18,1	2,0	2,4	1,0444	1,0222	1,9	2,4	2,1	2,2236	0,3471	3,3
atrazina													
33,3	0,17	11,7	32,1	0,019	0,053	1,0515	1,0534	0,019	0,050	0,035	0,0	-1,585	1,4
111,0	0,56	26,0	44,0	0,14	0,24	1,0096	1,0144	0,14	0,24	0,19	0,1436	-0,8429	2,2
277,5	1,4	22,2	25,4	0,31	0,35	1,0263	1,0490	0,30	0,34	0,32	0,2109	-0,6759	2,3
555,0	2,8	17,0	19,8	0,47	0,55	1,0501	1,0369	0,45	0,53	0,49	0,4528	-0,3441	2,7
1110	5,6	18,6	12,5	1,0	0,69	1,0185	1,0284	1,0	0,67	0,84	0,937	-0,02826	3,0
2220	11,1	25,3	12,4	2,8	1,4	1,0444	1,0222	2,7	1,3	2,0	1,9660	0,2936	3,3
diuron													
51,6	0,26	21,9	21,9	0,057	0,057	1,0515	1,0534	0,050	0,050	0,05	0,0403	-1,394	1,6
172,0	0,86	17,3	17,7	0,15	0,15	1,0096	1,0144	0,15	0,15	0,15	0,142	-0,8477	2,2
430,0	2,15	23,3	24,0	0,50	0,52	1,0263	1,0490	0,49	0,49	0,49	0,328	-0,4841	2,5
860,0	4,3	25,0	33,2	1,1	1,4	1,0501	1,0369	1,0	1,4	1,2	0,610	-0,2147	2,8
1720	8,6	26,0	18,6	2,2	1,6	1,0185	1,0284	2,2	1,6	1,9	1,3360	0,1258	3,1
3440	17,2	20,2	21,7	3,5	3,7	1,0444	1,0222	3,3	3,7	3,5	2,7190	0,4344	3,4
linuron													
31,2	0,16	—	—	—	—	1,0515	1,0534	—	—	—	—	—	—
104,0	0,52	22,6	15,4	0,12	0,08	1,0096	1,0144	0,12	0,079	0,10	0,0843	-1,074	1,9
260,0	1,3	21,7	28,0	0,28	0,36	1,0263	1,0490	0,27	0,35	0,31	0,1950	-0,7100	2,3
1040	5,2	26,6	22,9	1,4	1,2	1,0185	1,0284	1,4	1,2	1,3	0,7828	-0,1063	2,4
2080	10,4	25,2	27,9	2,6	2,9	1,0444	1,0222	2,5	2,8	2,7	1,5300	0,1847	3,2

Onde: Cin = concentração inicial dos herbicidas (µg/L)
 min = massa inicial de herbicida (mg)
 %ads1 e %ads2 = porcentagens de adsorção para as duplicatas
 x1 e x2 = quantidade de herbicida adsorvida em mg
 m1 e m2 = massa de solo
 x/m = média da concentração adsorvida em mg/g
 Ce = concentração de equilíbrio no sobrenadante após adsorção(µg/L)

Os resultados de porcentagem de adsorção foram muito pequenos. Este fato deve ser atribuído, principalmente a baixa quantidade de matéria orgânica no solo 1 (1,0%).

A Figura 27 apresenta as isotermas de adsorção no solo 1, dos herbicidas estudados, à temperatura ambiente.

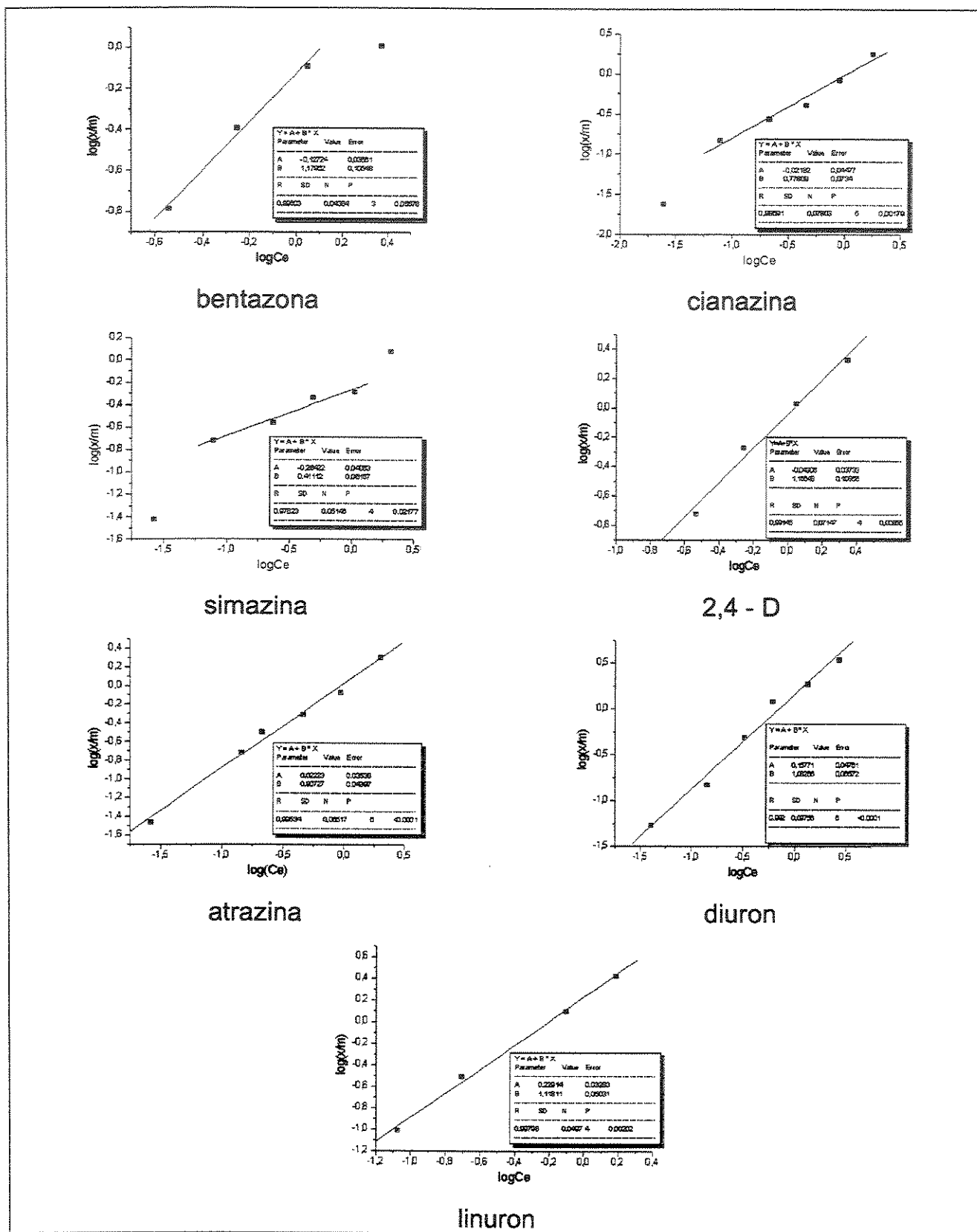


Figura 27. Isotermas de adsorção dos herbicidas estudados no solo 1.

Os baixos valores de massa de herbicida adsorvido dificultaram os experimentos de dessorção, pois as massas envolvidas eram muito pequenas.

A tabela 22 apresenta os resultados de dessorção dos herbicidas no solo 1 e também os valores calculados para obtenção da isoterma de dessorção.

Tabela 22. Resultados de dessorção e parâmetros calculados para obtenção da isoterma de dessorção no solo 1.

cianazina															
Cin ($\mu\text{g/L}$)	Csol ($\mu\text{g/L}$)	Cad($\mu\text{g/L}$)	mads(μg)	%des1	%des2	x1(μg)	x2(μg)	m1(g)	m2(g)	x1/m1	x2/m2	x/m	log(x/m)	Ce(mg/L)	log Ce
108,0	79,0	29,0	0,15	64,9	41,1	0,094	0,060	1,0741	1,0582	0,088	0,056	0,072	-1,1	0,01560	-1,081
270,0	218,7	51,3	0,26	35,6	29,3	0,091	0,075	1,0038	1,0211	0,091	0,074	0,082	-1,1	0,01670	-1,777
540,0	455,6	84,4	0,42	61,7	49,3	0,26	0,21	1,0095	1,0183	0,26	0,20	0,23	-0,64	0,04700	-1,328
1080	834,9	245,1	1,2	34,0	38,8	0,42	0,48	1,0085	1,0356	0,41	0,46	0,44	-0,36	0,08920	-1,050
simazina															
116,0	83,4	32,6	0,16	69,2	28,4	0,11	0,046	1,0741	1,0582	0,11	0,044	0,074	-1,1	0,01660	-1,780
290,0	238,3	51,7	0,26	31,7	38,2	0,080	0,10	1,0038	1,0211	0,080	0,10	0,090	-1,0	0,01790	-1,747
580,0	488,2	91,8	0,46	76,7	44,7	0,35	0,21	1,0095	1,0183	0,35	0,20	0,28	-0,56	0,05440	-1,264
1160	1095,3	64,7	0,32	-	-	-	-	1,0065	1,0356	-	-	-	-	0,1087	-0,9640
atrazina															
111,0	-	-	-	-	-	-	-	1,0741	1,0582	-	-	-	-	0,02330	-1,633
277,5	202,6	74,9	0,37	29,3	33,7	0,11	0,13	1,0038	1,0211	0,11	0,12	0,12	-0,93	0,02330	-1,633
555,0	450,7	104,3	0,52	56,0	39,1	0,29	0,20	1,0095	1,0183	0,29	0,20	0,24	-0,61	0,04830	-1,316
1110	969,5	140,5	0,70	69,6	73,8	0,49	0,52	1,0065	1,0356	0,49	0,50	0,49	-0,31	0,1011	-0,9950
diuron															
172,0	119,1	52,9	0,26	85,3	72,0	0,23	0,19	1,0741	1,0582	0,21	0,18	0,20	-0,71	0,03890	-1,410
430,0	269,9	160,1	0,80	39,3	51,4	0,31	0,41	1,0038	1,0211	0,31	0,40	0,36	-0,45	0,07100	-1,149
860,0	621,5	238,5	1,2	50,1	38,0	0,60	0,45	1,0095	1,0183	0,59	0,45	0,52	-0,29	0,1054	-0,9770
1720	1403,0	317,0	1,6	52,8	66,2	0,84	1,0	1,0065	1,0356	0,83	1,0	0,92	-0,035	0,1870	-0,7280
linuron															
104,0	59,5	44,5	0,22	-	100,0	-	0,22	1,0741	1,0582	-	0,21	-	-	0,04860	-1,313
260,0	118,6	141,4	0,71	31,3	39,1	0,22	0,28	1,0038	1,0211	0,22	0,27	0,25	-0,61	0,04930	-1,307
520,0	335,7	184,3	0,90	47,5	28,4	0,44	0,26	1,0095	1,0183	0,43	0,26	0,35	-0,46	0,06890	-1,162
1040	762,1	277,9	1,4	31,6	33,1	0,44	0,46	1,0065	1,0356	0,44	0,44	0,44	-0,36	0,08990	-1,046

onde: Csol = concentração de herbicida em solução após adsorção
 Cad = concentração de herbicida adsorvida pelo solo
 mads = massa de herbicida adsorvida
 %des1 e %des2 = porcentagem de herbicida dessorvido para as duplicatas

A Figura 28 apresenta as isotermas de dessorção no solo 1, à temperatura ambiente, dos herbicidas estudados.

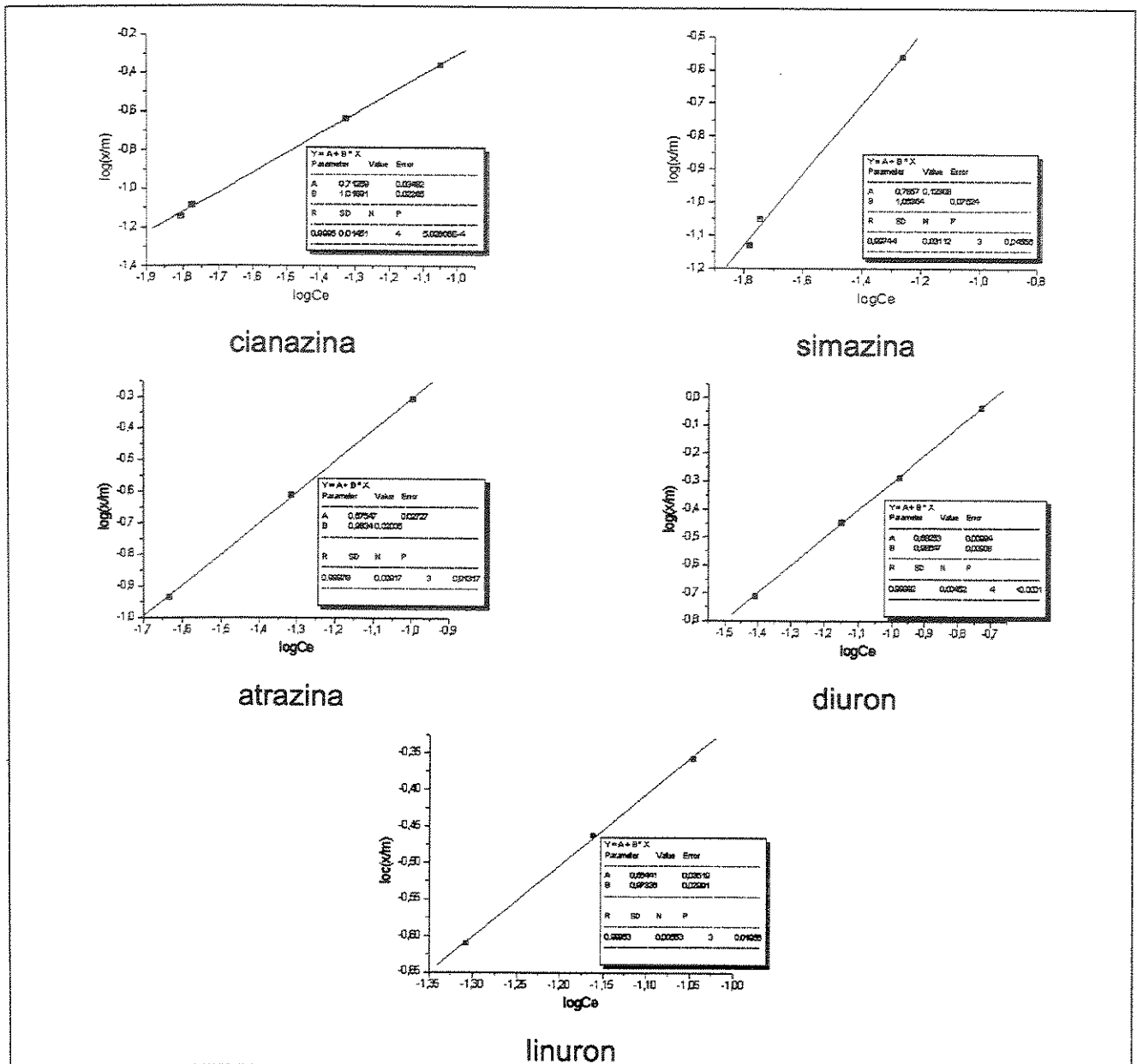


Figura 28. Isotermas de dessorção dos herbicidas estudados no solo 1.

Alguns pontos das curvas foram desconsiderados, utilizando o método dos resíduos, para obtenção de melhores coeficientes de correlação. De acordo com a equação de Freundlich, $\log(x/m) = \log K + 1/n \cdot \log Ce$, o coeficiente angular das retas é igual a $1/n$ (para a adsorção ou para a dessorção) e o coeficiente linear é igual a $\log K_{ads}$ ou $\log K_{des}$. A tabela 23 apresenta os resultados de K_{ads} , K_D , K_{oc} , K_{des} e $1/n$ calculados a partir das isotermas.

Tabela 23. Valores de K_{ads} , K_D , K_{oc} , K_{des} e $1/n$ calculados a partir das isotermas de adsorção e de dessorção para o solo 1.

	bentazona	cianazina	simazina	2,4-D	atrazina	diuron	linuron
K_{ads}	0,75	0,95	0,54	0,91	1,1	1,4	1,7
$1/n$ (ads)	1,2	0,80	0,40	1,2	0,90	1,0	1,1
K_D (dm ³ /g)	0,39	0,96	0,48	0,98	0,99	1,3	1,8
K_{oc} (dm ³ /g)	70,0	160,0	80,0	163,0	165,0	217,0	300,0
K_{des}	--	5,2	6,1	--	4,7	4,8	4,6
$1/n$ (des)	--	1,0	1,1	--	0,90	1,0	1,0

Não foi possível obterem-se as isotermas de dessorção para a bentazona e o 2,4-D, pois os resultados para estes dois herbicidas não apresentaram linearidade suficiente.

O parâmetro $1/n$ indica o quanto a isoterma de adsorção ou de dessorção é linear, pois quanto mais próximo a um este parâmetro estiver, mais a isoterma será função da concentração.

Pelos coeficientes de adsorção e dessorção obtidos, nota-se que a afinidade dos herbicidas estudados com o solo 1 é pequena, pois a adsorção é baixa e a dessorção é relativamente fácil (coeficientes de dessorção maiores que de adsorção), o que pode ser explicado devido à baixa quantidade de matéria orgânica do solo 1.

Observa-se que a ordem de adsorção dos herbicidas no solo é similar a ordem de eluição cromatográfica dos mesmos, indicando que o principal mecanismo envolvido é de sorção em sítios apolares do solo.

4.4.2 Solo 2

Para obtenção das isotermas de adsorção/dessorção dos herbicidas no solo 2, foram utilizadas massas de herbicidas de cerca de 0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0 mg.

A tabela 24 apresenta os resultados de adsorção dos herbicidas no solo 2 e também os valores calculados para obtenção da isoterma de adsorção.

Tabela 24. Resultados de adsorção e parâmetros calculados para obtenção da isoterma de adsorção dos herbicidas estudados no solo 2.

bentazona														
Cin (µg/L)	min(µg)	%ads1	%ads2	x1(µg)	x2(µg)	m1(g)	m2(g)	x1/m1	x2/m2	x/m(µg/g)	Ce(mg/L)	logCe	log(x/m)	
—	—	—	—	—	—	1,0312	1,0061	—	—	—	—	—	—	
320,0	1,6	17,0	18,0	0,27	0,29	1,0101	1,0322	0,27	0,28	0,27	0,2640	0,5784	2,4	
640,0	3,2	10,7	10,1	0,34	0,32	1,0369	1,0076	0,33	0,32	0,33	0,5768	-0,2390	2,8	
1280	6,4	10,7	10,0	0,68	0,64	1,0522	1,0290	0,65	0,62	0,64	1,1590	0,06410	3,1	
2560	12,8	7,8	6,7	1,0	0,86	1,0567	1,0652	0,94	0,81	0,87	2,3750	0,3757	3,4	
cianazina														
108,0	0,54	41,8	51,0	0,23	0,28	1,0312	1,0061	0,22	0,27	0,25	0,0579	-1,2373	1,8	
270,0	1,4	50,7	46,6	0,68	0,63	1,0101	1,0322	0,68	0,61	0,64	0,1387	-0,8579	2,1	
540,0	2,7	33,3	30,0	0,90	0,81	1,0369	1,0076	0,87	0,80	0,84	0,3703	-0,4314	2,6	
1080	5,4	44,4	32,7	2,4	1,8	1,0522	1,0290	2,3	1,7	2,0	0,6635	-0,1882	2,8	
2160	10,8	26,9	22,2	2,9	2,4	1,0567	1,0652	2,7	2,3	2,5	1,6300	0,2122	3,2	
simazina														
116,0	0,58	60,9	61,1	0,35	0,35	1,0312	1,0061	0,34	0,35	0,35	0,0452	-1,3449	1,7	
290,0	1,5	52,6	55,6	0,76	0,81	1,0101	1,0322	0,76	0,79	0,77	0,1328	-0,8768	2,1	
580,0	2,9	42,8	40,5	1,2	1,2	1,0369	1,0076	1,2	1,2	1,2	0,3387	-0,4702	2,5	
1160	5,8	29,5	29,5	1,7	1,7	1,0522	1,0290	1,6	1,7	1,6	0,8182	-0,0871	2,9	
2320	11,6	26,6	27,2	3,1	3,2	1,0567	1,0652	2,9	3,0	2,9	1,6947	0,2291	3,2	
2,4-D														
133,0	0,67	43,9	40,0	0,29	0,27	1,0312	1,0061	0,28	0,26	0,27	0,0772	-1,1124	1,9	
332,5	1,7	40,2	40,0	0,67	0,67	1,0101	1,0322	0,66	0,64	0,65	0,1995	-0,7001	2,3	
665,0	3,3	25,2	31,6	0,84	1,1	1,0369	1,0076	0,81	1,0	0,93	0,4760	-0,3224	2,7	
1330	6,7	23,0	23,0	1,5	1,5	1,0522	1,0290	1,5	1,5	1,5	1,0250	0,0107	3,0	
2660	13,3	26,1	26,1	3,5	3,5	1,0567	1,0652	3,3	3,3	3,3	1,9660	0,2936	3,3	
atrazina														
222,0	1,1	42,8	30,5	0,48	0,34	1,0312	1,0061	0,46	0,34	0,40	0,1408	-0,8514	2,1	
277,5	1,4	33,0	36,9	0,46	0,51	1,0101	1,0322	0,45	0,50	0,47	0,1806	-0,7433	2,3	
555,0	2,8	34,6	28,7	0,96	0,80	1,0369	1,0076	0,93	0,79	0,86	0,3793	-0,4210	2,6	
1110	5,6	26,0	26,0	1,4	1,4	1,0522	1,0290	1,4	1,4	1,4	0,8212	-0,0856	2,9	
2220	11,1	22,2	23,1	2,5	2,6	1,0567	1,0652	2,3	2,4	2,4	1,7182	0,2351	3,2	
diuron														
172,0	0,86	100,0	84,9	0,86	0,73	1,0312	1,0061	0,83	0,73	0,78	0,0130	-1,8861	1,1	
430,0	2,2	82,6	82,8	1,8	1,8	1,0101	1,0322	1,8	1,7	1,7	0,0745	-1,1278	1,9	
860,0	4,3	80,1	78,1	3,4	3,4	1,0369	1,0076	3,3	3,3	3,3	0,1766	-0,7530	2,2	
1720	8,6	74,0	68,7	6,4	5,9	1,0522	1,0290	6,0	5,7	5,9	0,4928	-0,3073	2,7	
3440	17,2	62,0	63,6	10,7	10,9	1,0567	1,0652	10,1	10,3	10,2	1,2800	1,1072	3,1	
linuron														
104,0	0,52	100,0	100,0	0,52	0,52	1,0312	1,0061	0,50	0,52	0,51	0	—	—	
260,0	1,3	70,0	70,0	0,91	0,91	1,0101	1,0322	0,90	0,88	0,89	0,0780	-1,1079	1,9	
520,0	2,6	74,4	72,0	1,9	1,9	1,0369	1,0076	1,9	1,9	1,9	0,1395	-0,8554	2,1	
1040	5,2	74,6	68,9	3,9	3,6	1,0522	1,0290	3,7	3,5	3,6	0,2937	-0,5321	2,5	
2080	10,4	61,4	62,5	6,4	6,5	1,0567	1,0652	6,0	6,1	6,1	0,7918	-0,1014	2,9	

A Figura 29 apresenta as isotermas de adsorção no solo 2, à temperatura ambiente, dos herbicidas estudados.

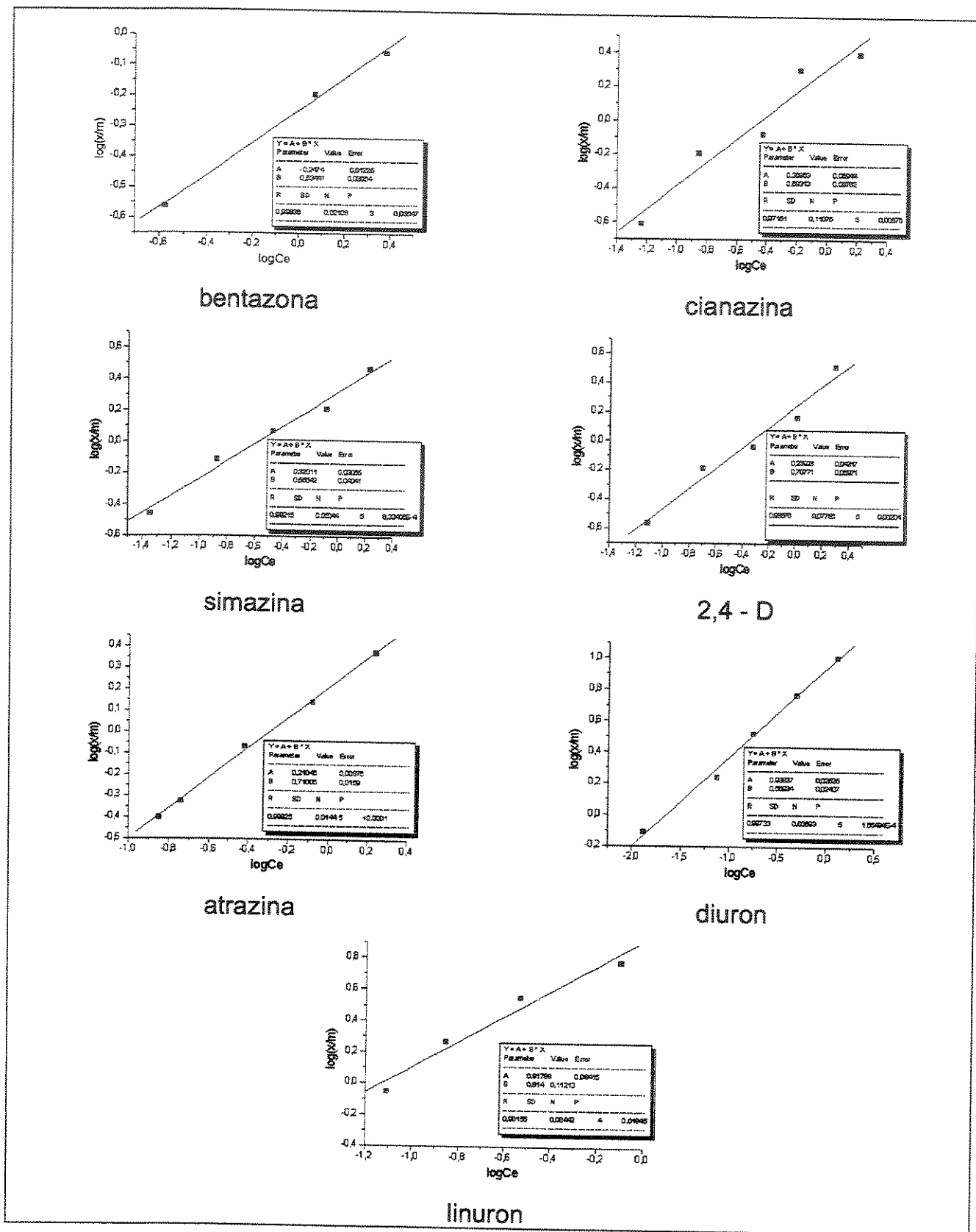


Figura 29. Isoterma de adsorção dos herbicidas estudados no solo 2.

A tabela 25 apresenta os resultados de dessorção dos herbicidas no solo 2 e também os valores calculados para obtenção da isoterma de dessorção.

Tabela 25. Resultados de dessorção e parâmetros calculados para obtenção da isoterma de dessorção no solo 2.

bentazona																
Cin ($\mu\text{g/L}$)	Csol($\mu\text{g/L}$)	Cad($\mu\text{g/L}$)	mads(μg)	%des1	%des2	x1(μg)	x2(μg)	m1(g)	m2(g)	x1/m1	x2/m2	x/m	log(x/m)	Ce(mg/L)	log Ce	
—	—	—	—	—	—	—	—	1,0312	1,0061	—	—	—	—	—	—	
320,0	264,0	56,0	0,28	109,0	95,0	0,31	0,27	1,0101	1,0322	0,30	0,26	0,28	-0,55	0,0570	-1,244	
640,0	577,0	63,0	0,32	127,0	144,0	0,40	0,46	1,0369	1,0076	0,39	0,45	0,42	-0,38	0,0870	-1,060	
1280	1159	121,0	0,61	42,0	120,0	0,25	0,73	1,0522	1,0290	0,24	0,71	0,47	-0,33	0,1520	-0,818	
2560	2375	185,0	0,91	144,0	167,0	1,3	1,5	1,0567	1,0652	1,3	1,5	1,4	0,13	0,2880	-0,541	
cianazina																
108,0	58,0	50,0	0,25	47,0	41,8	0,12	0,10	1,0312	1,0061	0,11	0,10	0,11	-0,96	0,0220	-1,658	
270,0	139,0	131,0	0,66	33,0	36,5	0,22	0,24	1,0101	1,0322	0,21	0,23	0,22	-0,65	0,0453	-1,344	
540,0	370,0	170,0	0,85	37,0	53,2	0,31	0,45	1,0369	1,0076	0,30	0,45	0,37	-0,43	0,0757	-1,121	
1080	664,0	417,0	2,1	41,0	42,8	0,86	0,89	1,0522	1,0290	0,82	0,87	0,84	-0,08	0,1747	-0,758	
2160	1630	530,0	2,7	58,0	67,0	1,5	1,8	1,0567	1,0652	1,4	1,7	1,6	0,19	0,3299	-0,482	
simazina																
116,0	45,2	70,8	0,35	18,3	21,1	0,065	0,075	1,0312	1,0061	0,063	0,074	0,069	-1,2	0,0142	-1,848	
290,0	132,8	157,2	0,79	26,1	26,5	0,21	0,21	1,0101	1,0322	0,20	0,20	0,20	-0,69	0,0415	-1,382	
580,0	338,7	241,3	1,2	29,3	38,0	0,35	0,46	1,0369	1,0076	0,34	0,46	0,40	-0,40	0,0800	-1,097	
1160	818,2	341,8	1,7	41,3	57,0	0,71	0,97	1,0522	1,0290	0,67	0,95	0,81	-0,092	0,2060	-0,686	
2320	1694	625,3	3,1	57,0	52,7	1,8	1,6	1,0567	1,0652	1,7	1,5	1,6	0,21	0,3430	-0,465	
2,4-D																
133,0	77,2	55,8	0,28	95,7	95,0	0,27	0,27	1,0312	1,0061	0,26	0,26	0,26	-0,58	0,0533	-1,273	
332,5	199,5	133,0	0,67	66,7	66,4	0,44	0,44	1,0101	1,0322	0,44	0,43	0,43	-0,36	0,0886	-1,053	
665,0	476,0	189,0	0,95	80,9	55,0	0,76	0,525	1,0369	1,0076	0,74	0,52	0,63	-0,20	0,1262	-0,899	
1330	1025	305,0	1,5	64,0	75,6	0,98	1,2	1,0522	1,0290	0,93	1,1	1,0	0,010	0,2850	-0,545	
2660	1966	694,0	3,5	81,0	74,0	2,8	2,6	1,0567	1,0652	2,7	2,4	2,5	0,40	0,5363	-0,271	
atrazina																
222,0	140,8	81,2	0,41	82,7	114,0	0,34	0,46	1,0312	1,0061	0,33	0,46	0,39	-0,41	0,0786	-1,105	
277,5	180,6	96,9	0,48	98,0	83,9	0,47	0,41	1,0101	1,0322	0,47	0,39	0,43	-0,36	0,0882	-1,055	
555,0	379,3	175,7	0,88	81,9	89,3	0,72	0,78	1,0369	1,0076	0,69	0,78	0,74	-0,13	0,1506	-0,822	
1110	821,2	288,8	1,4	57,4	73,0	0,83	1,1	1,0522	1,0290	0,79	1,0	0,91	-0,043	0,2366	-0,629	
2220	1718	501,8	2,5	83,9	67,5	2,1	1,7	1,0567	1,0652	2,0	1,6	1,8	0,25	0,3790	-0,421	
diuron																
172,0	13,0	159,0	0,80	10,5	15,8	0,083	0,13	1,0312	1,0061	0,08	0,12	0,10	-0,99	0,0210	-1,678	
430,0	74,5	355,5	1,8	14,5	14,3	0,26	0,25	1,0101	1,0322	0,26	0,25	0,25	-0,60	0,0514	-1,289	
860,0	176,6	683,4	3,4	20,4	11,7	0,51	0,40	1,0369	1,0076	0,49	0,40	0,44	-0,35	0,1104	-0,957	
1720	492,8	1227	6,1	17,5	14,8	0,96	0,91	1,0522	1,0290	0,92	0,88	0,90	-0,046	0,1987	-0,702	
3440	1280	2160	10,8	21,8	17,4	2,4	1,9	1,0567	1,0652	2,2	1,8	2,0	0,30	0,4231	-0,374	
linuron																
104,0	0,0	104,0	0,52	70,0	67,0	0,36	0,35	1,0312	1,0061	0,35	0,35	0,35	-0,46	0,0715	-1,146	
260,0	78,0	182,0	0,91	46,0	46,0	0,42	0,42	1,0101	1,0322	0,41	0,41	0,41	-0,39	0,0850	-1,071	
520,0	139,5	380,5	1,9	27,4	26,4	0,52	0,50	1,0369	1,0076	0,50	0,50	0,50	-0,30	0,1025	-0,989	
1040	293,7	746,3	3,7	31,7	27,8	1,2	1,0	1,0522	1,0290	1,1	1,0	1,1	0,028	0,1555	-0,808	
2080	791,8	1288	6,4	25,0	20,1	1,6	1,3	1,0567	1,0652	1,5	1,2	1,4	0,14	0,2900	-0,538	

A Figura 30 apresenta as isotermas de dessorção no solo 2, à temperatura ambiente, dos herbicidas estudados.

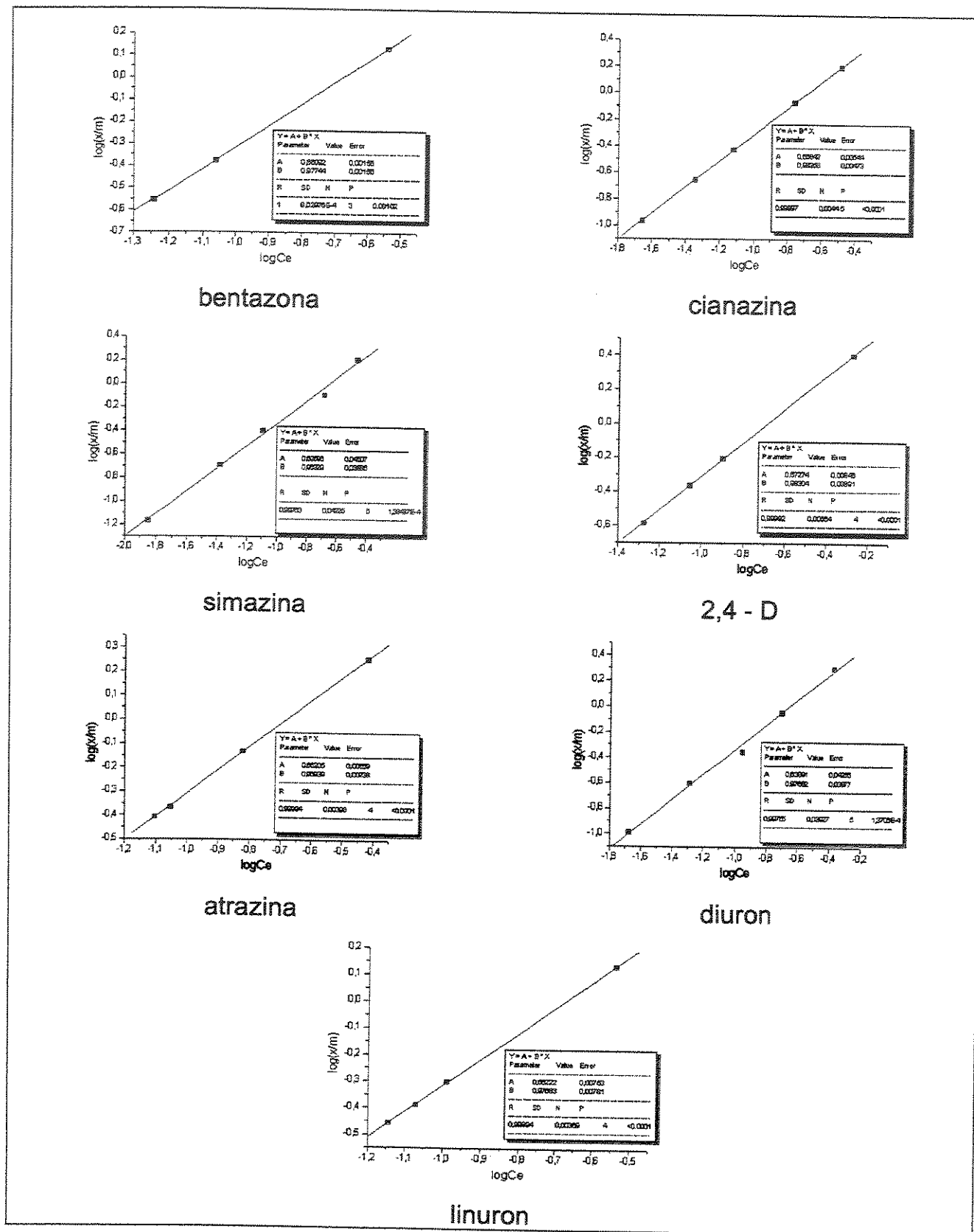


Figura 30. Isotherma de dessorção dos herbicidas estudados no solo 2.

Novamente alguns pontos das curvas foram desconsiderados para obtenção de melhores coeficientes de correlação. A tabela 26 apresenta os resultados de K_{ads} , K_D , K_{oc} , K_{des} e $1/n$ calculados a partir das isotermas.

Tabela 26. Valores de K_{ads} , K_D , K_{oc} , K_{des} e $1/n$ calculados a partir das isotermas de adsorção e de dessorção para o solo 2.

	bentazona	cianazina	simazina	2,4-D	atrazina	diuron	linuron
K_{ads}	0,57	2,0	2,1	1,7	1,6	8,7	8,3
$1/n$ (ads)	0,50	0,70	0,60	0,70	0,70	0,60	0,80
K_D (dm ³ /g)	0,28	1,4	1,4	1,5	1,2	10	7,1
K_{oc} (dm ³ /g)	7,0	35,0	35,0	38,0	30,0	250,0	180,0
K_{des}	4,6	4,7	4,2	4,7	4,6	4,4	4,6
$1/n$ (des)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Os coeficientes de adsorção, referentes ao solo 2 de um modo geral, foram maiores em relação aos do solo 1 porém, a linearidade da isoterma de adsorção foi pior ($1/n$ diferente de 1), sendo que, o herbicida que apresentou maior adsorção foi o diuron.

Os coeficientes de dessorção obtidos foram muito parecidos para todos os herbicidas e bem similares aos obtidos no solo 1. Talvez isto indique que se tem um máximo de dessorção, utilizando o procedimento seguido, e que este foi atingido. A linearidade da isoterma de dessorção foi muito boa, apresentando $1/n$ iguais a 1.

Os coeficientes de distribuição mostram que há uma tendência muito maior dos herbicidas estarem em solução que adsorvidos no solo.

As amostras de controle não mostraram nenhuma decomposição dos herbicidas estudados, durante o período dos experimentos de adsorção e dessorção.

Foram feitos experimentos de adsorção com os herbicidas fortificados individualmente nos solos, para verificar se individualmente as adsorções seriam maiores que com os herbicidas colocados juntos. Os resultados não mostraram diferenças significativas nas adsorções e portanto, não justificaria a realização das isotermas individualmente.

As precisões entre as duplicatas dos experimentos de adsorção/dessorção variaram entre 0,1 a 15%.

4.5 Pré-concentração utilizando extração em fase sólida

A Figura 31 apresenta um cromatograma obtido após a etapa de pré-concentração, utilizando EFS, do extrato do solo depois da dessorção.

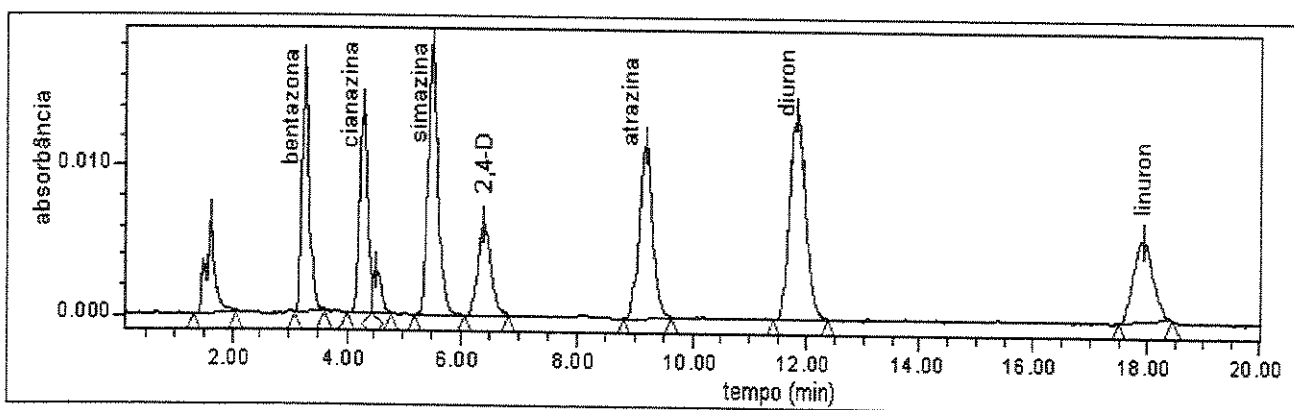


Figura 31. Cromatograma do extrato do solo após pré-concentração utilizando EFS. Condições idem às da Figura 24.

O pico que aparece na cauda do pico da cianazina é do interferente já mencionado e que apareceu inclusive nos brancos realizados. Sua interferência foi

solucionada descontando-se a área deste pico, que é constante nas condições dos experimentos realizados.

A tabela 27 apresenta os resultados de recuperação, obtidos após a EFS dos extratos dos solos 1 e 2, para os herbicidas estudados, em diferentes níveis de fortificação.

Tabela 27. Recuperações para os herbicidas estudados, em diferentes níveis de fortificação, obtidas após a EFS dos extratos dos solos 1 e 2.

Herbicidas	Solo 1			Solo 2			
	R(%)	R(%)	R(%)	R(%)	R(%)	R(%)	R(%)
	0,5 µg	5 µg	10 µg	0,5 µg	2,5 µg	5 µg	10 µg
bentazona	nd	100	100	--	71	65	76
cianazina	nd	64	48	96	127	90	95
simazina	nd	100	92	126	131	90	77
2,4-D	nd	100	72	46	89	67	96
atrazina	nd	100	94	55	78	103	102
diuron	nd	78	55	68	63	94	70
linuron	nd	50	48	--	70	46	89

R = recuperação

nd = não detectado

Os valores de recuperação mais aceitos estão entre 70-120% porém, dependendo da complexidade analítica da matriz e da natureza do resíduo, são aceitas recuperações de 50 a 120% [5]. Observando os resultados da tabela 27 nota-se que a maioria dos resultados estão compreendidos dentro da faixa aceita na literatura.

Com o solo 1, que apresentou menor adsorção dos herbicidas, não foi possível obterem as recuperações no nível mais baixo de fortificação, pois as massas envolvidas foram muito pequenas.

Deve-se lembrar também, que ocorre uma propagação de erros, isto é, há uma interação de erros das várias etapas envolvidas: fortificação, adsorção, dessorção e extração em fase sólida e quantificação cromatográfica.

4.5.1 Regeneração dos tubos de extração

A regeneração dos tubos de extração é um parâmetro interessante a ser estudado, pois o tubo de extração representa o principal custo da EFS.

A Figura 32 mostra um gráfico para melhor visualização dos resultados do teste de regeneração. Neste, foram traçados os valores de recuperação (R) para cada herbicida, após utilizar o tubo de extração de 1 até 6 vezes e os discos de 1-19 vezes (somente as 6 últimas utilizações são mostradas).

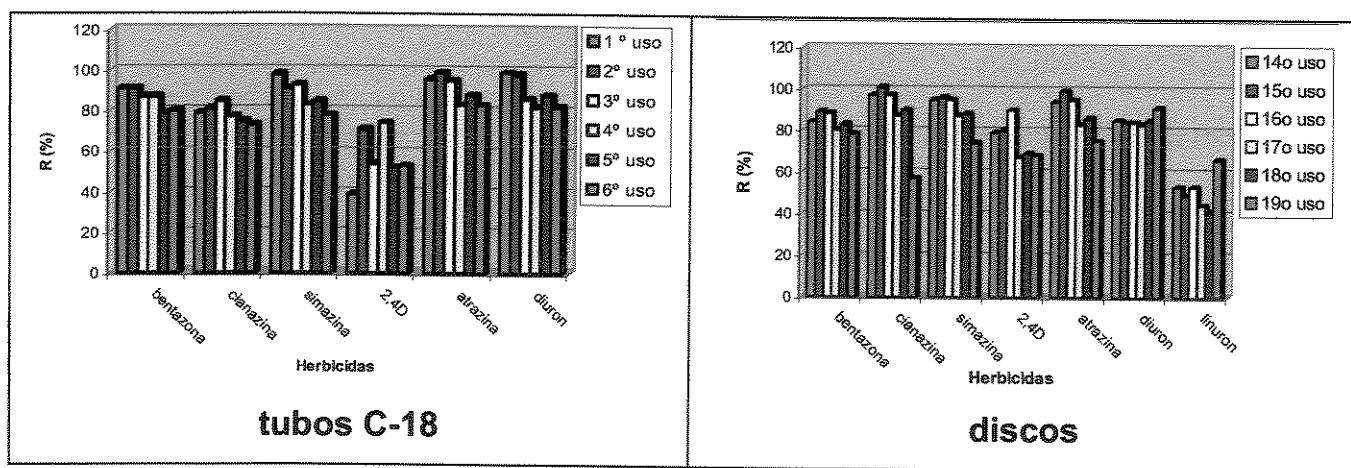


Figura 32. Gráfico de colunas mostrando a recuperação obtida após EFS dos herbicidas utilizando o mesmo tubo de extração C-18, de 1 a 6 vezes e o mesmo disco de extração C-18, de 1 a 19 vezes.

Os resultados mostraram que, para os tubos de extração, após seis vezes de uso, observa-se uma ligeira queda nos valores de recuperação.

Para os discos, considerou-se que o 19º uso apresenta uma queda nos valores de recuperações, principalmente para os herbicidas cianazina e simazina.

Estes resultados de regeneração dependem muito da complexidade da amostra, sendo que amostras com maior grau de impurezas e materiais particulados dificultam a reutilização dos dispositivos de extração. Algumas colunas do gráfico obtido contrariam um pouco esta afirmação, mas percebe-se que a tendência é mantida.

Devido à variação dos valores que se observa após a segunda utilização do tubo regenerado, optou-se por realizar a regeneração do tubo de extração C-18 uma vez, portanto utilizou-se cada tubo duas vezes, o que representou uma grande economia no custo do método, sem que se comprometesse os resultados.

A Figura 33 apresenta um cromatograma e os espectros de absorção no UV obtidos após a extração dos herbicidas utilizando o tubo de extração regenerado.

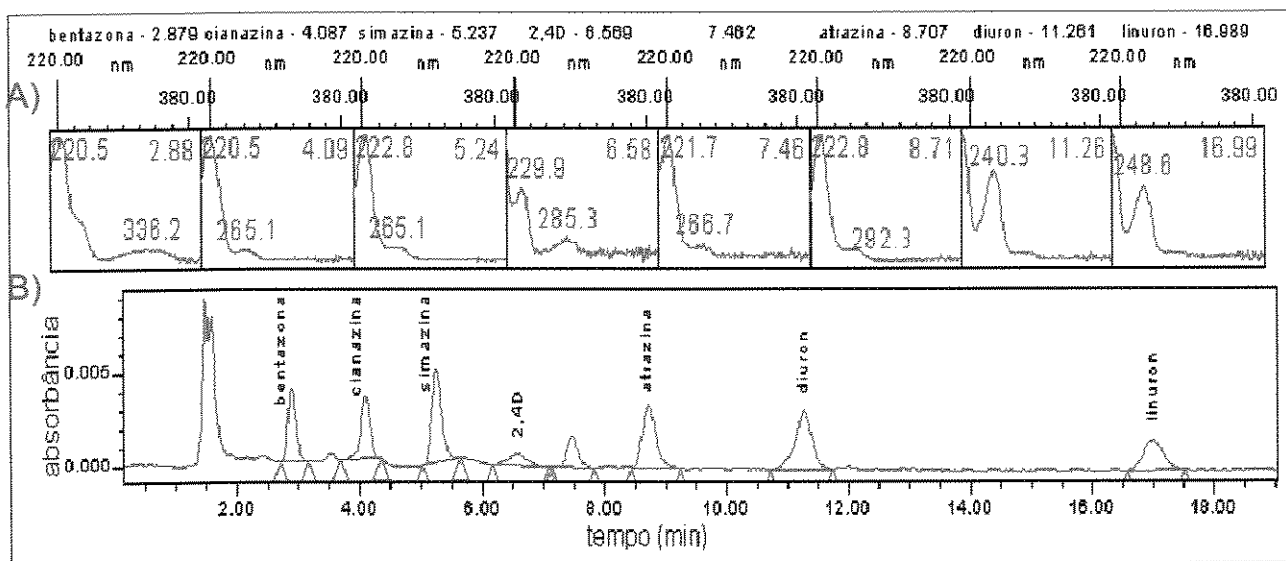


Figura 33. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após extração dos herbicidas utilizando tubo de extração regenerado. Condições idem às da Figura 24.

4.5.2 Determinação do melhor volume de extração

A Figura 34 apresenta um gráfico com os resultados de recuperação obtidos para cada herbicida, utilizando diferentes volumes de amostra e empregando os diferentes sistemas e dispositivos de EFS.

Analizando a Figura 34 nota-se que, para a maioria dos pesticidas estudados, empregando sorventes C-18 (tubos ou discos) o volume que permite obter recuperação máxima encontra-se próximo a 200 mL.

No caso das EFS realizadas com DVB, nota-se que as recuperações dos herbicidas em estudo são máximas em uma faixa mais ampla de volumes de amostra, estendendo-se até 1000 mL, com exceção do linuron. Este fato está relacionado com o tipo de interação dos analitos com o sorvente, pois o DVB, sendo altamente entrecruzado, possui uma alta porosidade que aumenta bastante a sua área superficial, aumentando as interações π - π [164,165].

Deve-se lembrar que o melhor volume de extração é sempre menor que o volume de *breakthrough*. Assim, o volume de *breakthrough* para o DVB deve ser bem maior que para o C-18, para os herbicidas estudados. Portanto, como as análises dos herbicidas são realizadas simultaneamente, determinou-se que os melhores volumes de amostra a serem utilizados nos experimentos seriam: 200 mL, para os tubos e discos C-18 e 150 mL, para as colunas C-18, no modo "on-line". Utilizando-se as colunas de DVB, os volumes de amostra a serem usados podem ser de até 1000 mL, mas neste caso também há um compromisso em relação ao tempo gasto para a EFS. Devido a isto e como as análises dos herbicidas são realizadas simultaneamente, determinou-se que 200 mL de amostra seria o melhor volume a ser utilizado nos experimentos envolvendo EFS.

Os valores obtidos para a recuperação da cianazina e do linuron, utilizando um volume de amostra de 500 mL e tubos C-18, não foram incluídos nos resultados pois apresentaram problemas na quantificação cromatográfica.

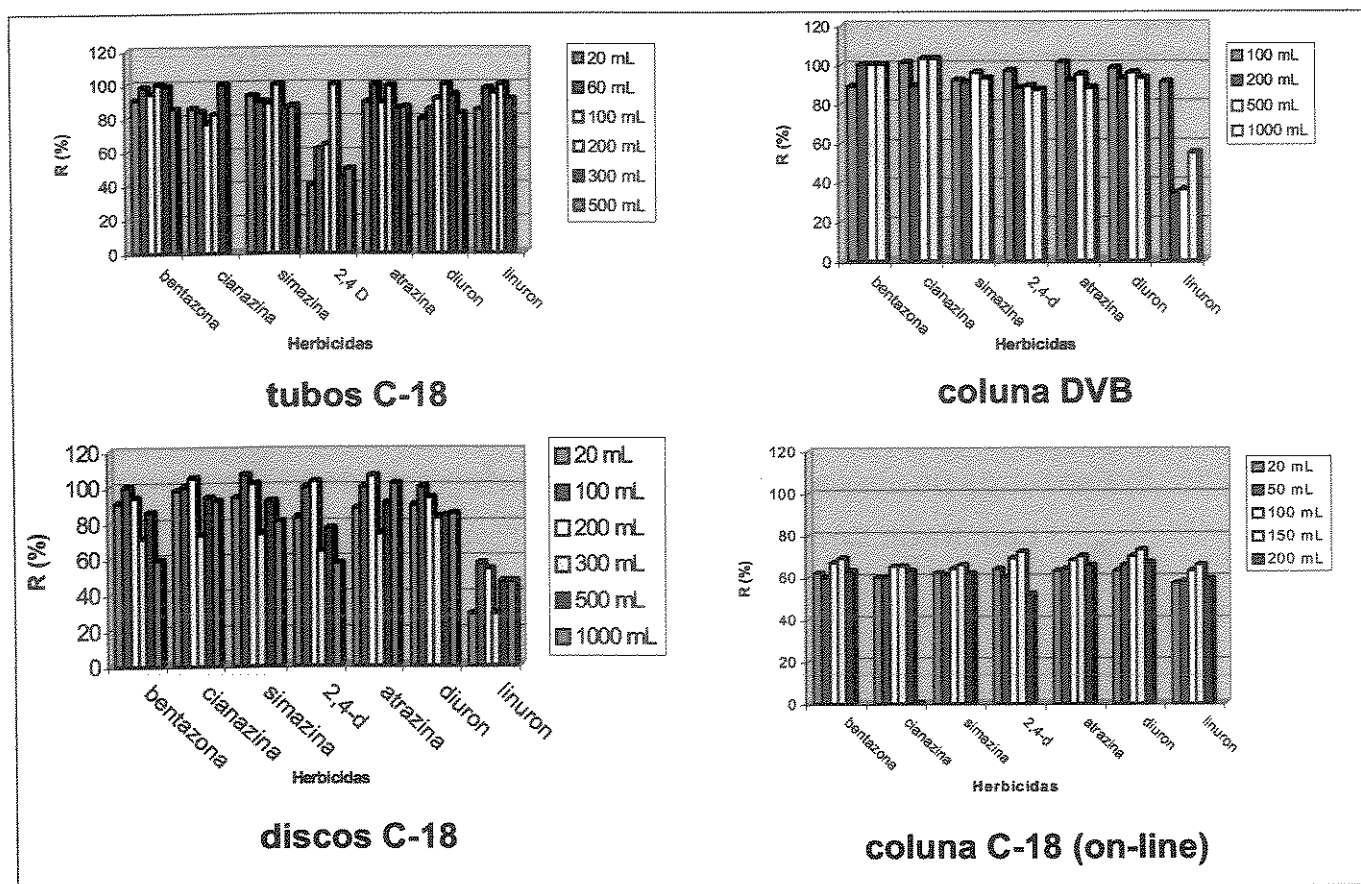


Figura 34. Recuperações obtidas na determinação do melhor volume de extração.

4.5.3 Influência da adição de cloreto de sódio

As Figuras 35 à 38 apresentam os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV obtidos para os brancos e para as extrações realizadas com e sem adição de NaCl.

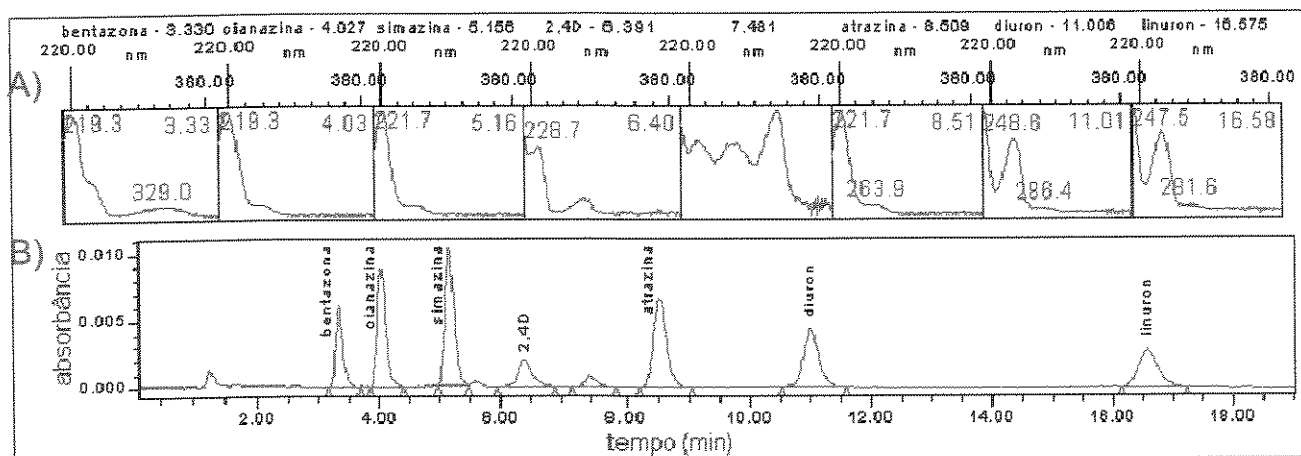


Figura 37. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma da EFS dos herbicidas realizada sem adição de NaCl. Condições idem às da Figura 24.

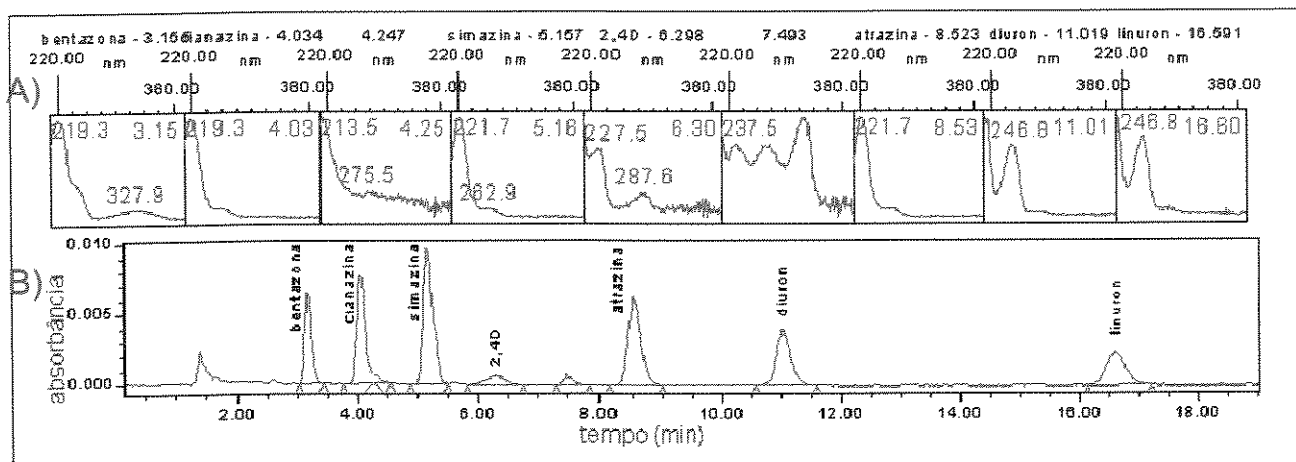


Figura 38. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma da EFS dos herbicidas realizada com a adição de NaCl. Condições idem às da Figura 24.

Há um pico cromatográfico de $t_R \approx 7,6$ min, que apareceu em todos os cromatogramas após a EFS, inclusive nos brancos realizados.

Os espectros de absorção no UV dos picos cromatográficos foram utilizados para uma possível confirmação da identidade dos compostos. Através desta ferramenta e do tempo de retenção dos compostos, determinou-se que os picos

cromatográficos presentes no branco e que também estão presentes no cromatograma obtido para a extração dos herbicidas, não são conhecidos.

A tabela 28 apresenta os resultados de recuperação obtidos após EFS com e sem adição de NaCl e a Figura 39 apresenta um gráfico, com os resultados, para melhor visualização.

Tabela 28. Recuperações obtidas para EFS com (C) e sem (S) adição de NaCl.

Herbicidas	Recuperação (%)							
	S1	C1	S2	C2	S3	C3	S _{média}	C _{média}
bentazona	70	69	100	88	73	72	81	76
clanazina	98	79	116	112	100	89	105	93
simazina	83	71	93	90	89	90	88	84
2,4-D	58	54	86	57	67	34	70	48
atrazina	83	76	100	89	94	87	92	84
diuron	88	75	99	99	98	90	95	88
linuron	61	57	71	69	89	79	74	68

S_{média} e C_{média} = valores médios obtidos sem e com adição de NaCl

Os resultados da tabela 28 mostram que a adição de NaCl é prejudicial, diminuindo os valores de recuperação para todos os herbicidas estudados.

Na literatura, a adição de NaCl para aumento da força iônica, é um assunto de bastante controvérsia. Pode-se dizer que cada caso é um caso e assim, deve-se realizar o teste para verificar se o aumento da força iônica melhora ou não a recuperação dos herbicidas em análise [28,166,167].

O aumento da força iônica tem o objetivo de diminuir as interações do soluto com a água (solvente) e assim facilitar a retenção no sorvente e portanto aumentar

a recuperação dos herbicidas. Assim, a adição de NaCl deve ter maior influência para herbicidas polares.

Os gráficos de colunas apresentado na Figura 39 permitem visualizar claramente que para todos os herbicidas estudados o aumento da força iônica não favoreceu a retenção dos mesmos no sorvente C18, utilizando discos ou tubos de extração em fase sólida, com conseqüente diminuição das recuperações. Estes resultados concordam com os obtidos por Ruiz *et al.* [168].

Portanto, as EFS foram realizadas sem a adição de NaCl.

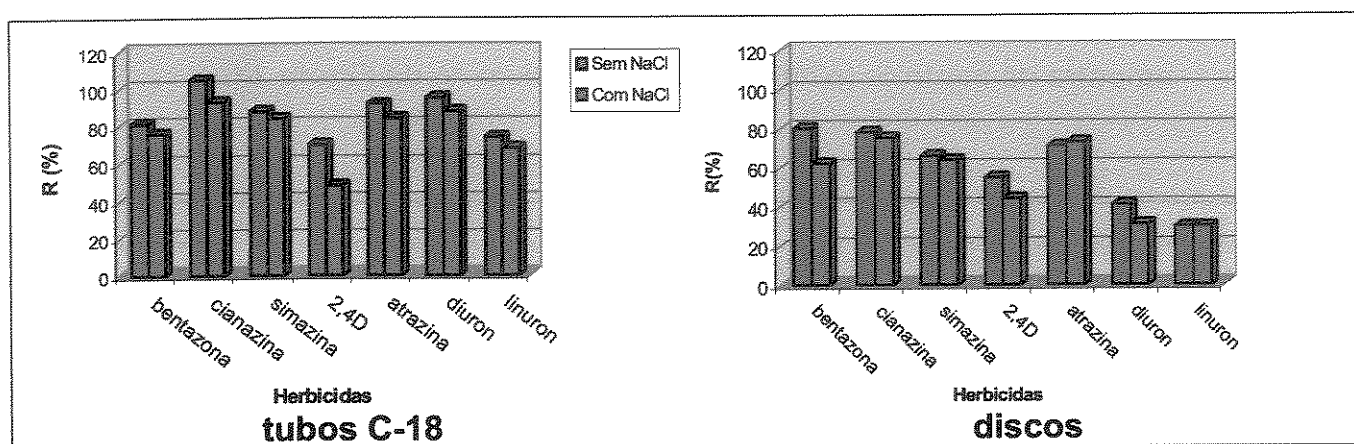


Figura 39. Gráfico mostrando as recuperações médias, obtidas para os herbicidas estudados, sem e com adição de NaCl na etapa de extração.

4.5.4 Recuperação

As Figuras 40 à 42 apresentam os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV obtidos após EFS para uma solução de controle, para uma solução fortificada com herbicidas na ordem de 0,5 ug e para o branco, respectivamente.

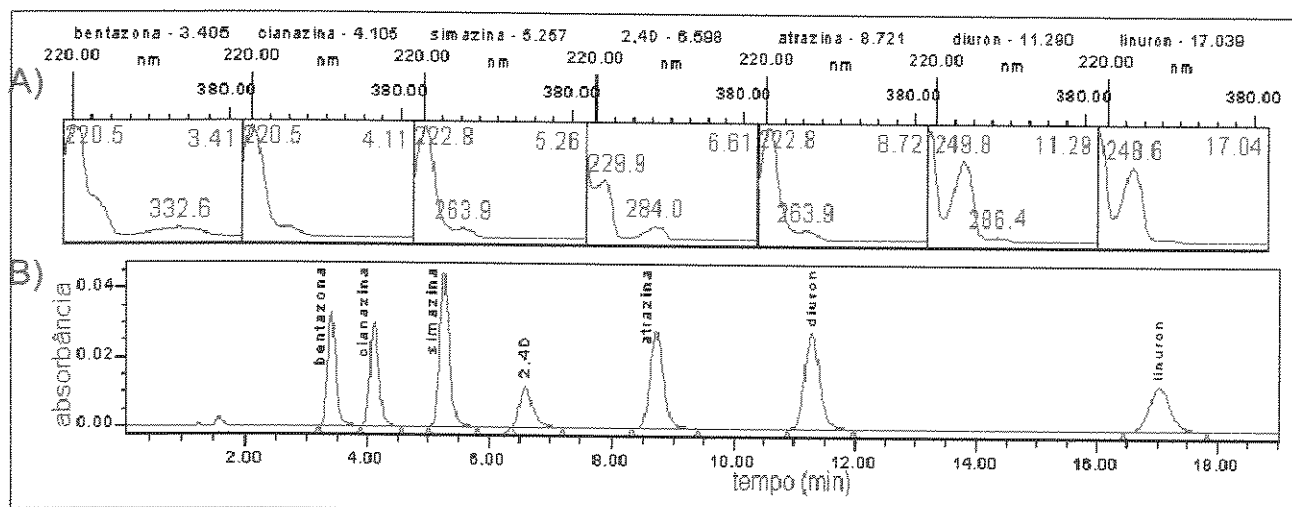


Figura 40. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido para uma amostra de controle (p2000). Condições idem às da Figura 24.

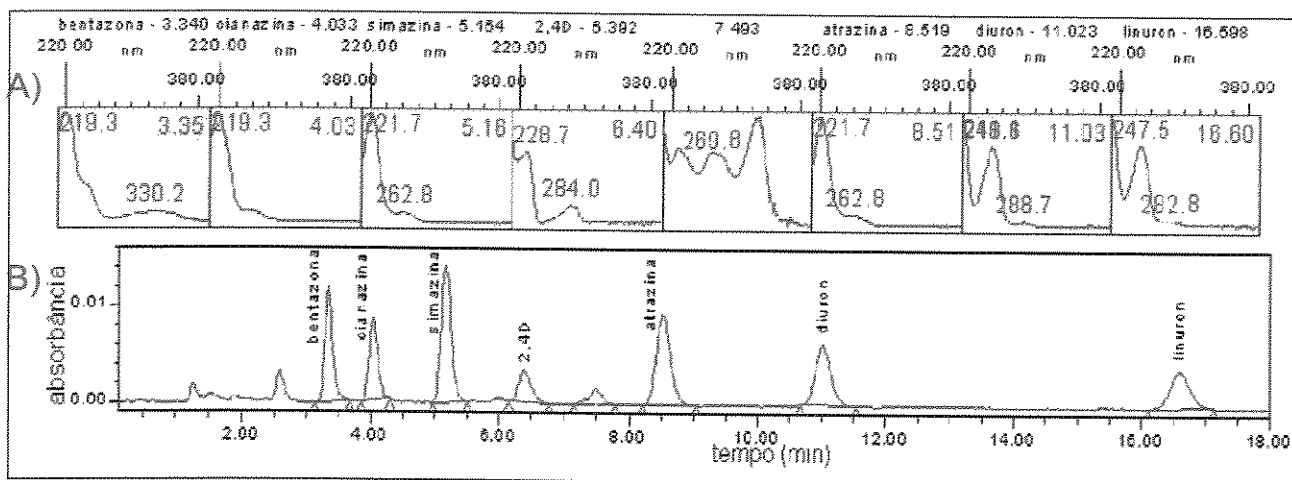


Figura 41. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após EFS com uma amostra fortificada com herbicidas na ordem de 0,5 μ g. Condições idem às da Figura 24.

Comparando os cromatogramas da amostra de controle e do extrato obtido após EFS, Figuras 40 e 41 respectivamente, nota-se que o processo de extração não introduz problemas na quantificação dos herbicidas. A única diferença

considerável que apareceu no cromatograma do extrato da EFS, é o pico de tempo de retenção de aproximadamente 7,5 min, o qual já foi mencionado.

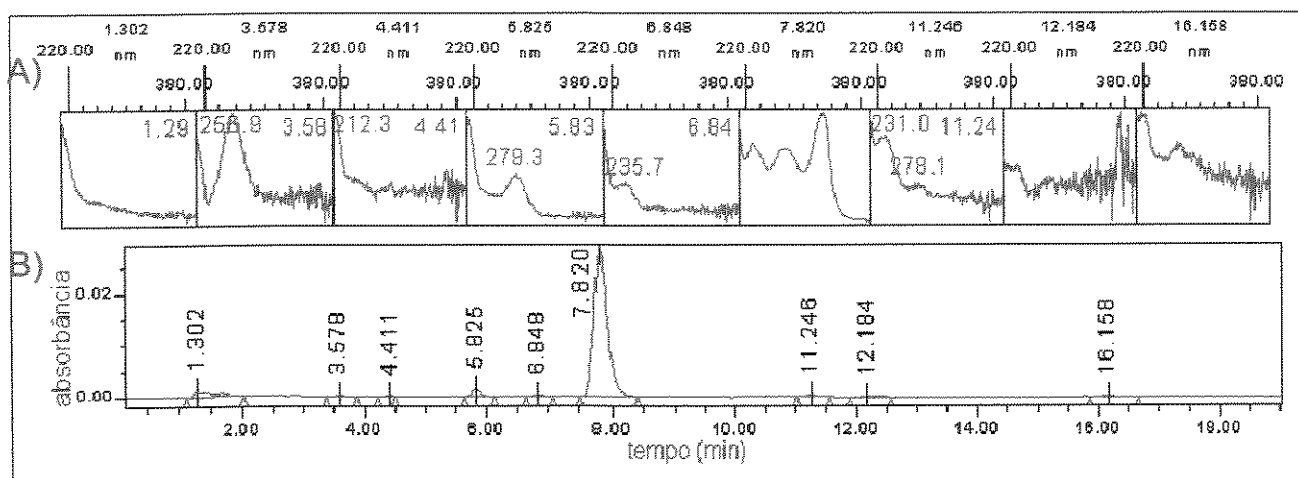


Figura 42. A) Espectros de absorção no UV. B) Cromatograma obtido após EFS para o branco. Condições idem às da Figura 24.

As figuras apresentadas mostram que há picos cromatográficos, referentes ao branco, com tempos de retenção nas proximidades dos picos dos herbicidas. Estes picos não foram identificados, mas não parecem ser dos herbicidas estudados, pois os espectros de absorção no UV não coincidem. Os picos de origem desconhecida não interferem na quantificação dos herbicidas, pois suas intensidades são muito pequenas.

As tabelas 29 à 32 apresentam um resumo dos resultados de recuperação e precisão obtidos para os herbicidas estudados, submetidos à EFS utilizando tubos C-18, discos C-18, colunas de DVB e colunas de C-18 no modo "on-line", respectivamente.

Em determinações utilizando EFS-CLAE, no modo "off-line", as recuperações podem ser conhecidas desde que sejam feitas análises quantitativas com curvas analíticas construídas independentemente com valores obtidos por injeção direta. Com sistemas "on-line", não é aconselhável realizar análises quantitativas por comparação com injeções diretas, pois se introduz o erro

associado à alça amostradora e há o problema da ocorrência de dispersão do pico cromatográfico [38]. Portanto, as recuperações da tabela 31 devem ser analisadas com cautela. Além disso, em EFS "on-line" os valores individuais de recuperação não são considerados importantes. No caso da extração "on-line" foi feita uma curva analítica também "on-line".

Tabela 29. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando tubos C-18, vazão de extração de 3 mL/min e modo "off-line".

Herbicidas	0,05 µg			0,1 µg			0,5 µg			1,0 µg		
	R (%)	CV (%)	N	R (%)	CV (%)	N	R (%)	CV (%)	N	R (%)	CV (%)	N
bentazona	111	7	3	103	5	6	77	9	6	77	3	3
cianazina	89	5	3	84	13	5	89	11	5	91	1	3
simazina	80	6	3	91	8	6	83	15	6	70	4	3
2,4-D	93	7	3	90	11	7	61	15	5	59	3	3
atrazina	98	10	3	87	8	6	80	15	5	65	8	3
diuron	98	8	3	99	14	5	70	12	6	63	8	3
linuron	118	8	3	104	14	7	77	14	5	58	10	3

R = recuperação

CV= coeficiente de variação

N= número de replicatas

Tabela 30. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando discos C-18, vazão de extração de 50 mL/min e modo "off-line".

Herbicidas	0,1 µg			0,5 µg			1 µg		
	R (%)	CV (%)	N	R (%)	CV (%)	N	R (%)	CV (%)	N
bentazona	102	4	4	94	0	4	75	10	4
cianazina	91	6	4	105	4	4	75	13	4
simazina	101	2	4	102	2	4	75	6	4
2,4-D	80	4	4	103	3	4	52	15	4
atrazina	100	4	4	106	3	4	82	8	4
diuron	91	9	4	94	4	4	77	4	4
linuron	---	---	-	54	13	4	48	9	4

Tabela 31. Recuperação e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com 0,5 µg dos herbicidas e submetidas à EFS, utilizando coluna de DVB, vazão de extração de 4 mL/min e modo "off-line."

Herbicidas	0,5 µg		
	R (%)	CV (%)	N
bentazona	89	0	4
cianazina	101	10	4
simazina	92	4	4
2,4-D	97	1	4
atrazina	101	2	4
diuron	98	2	4
linuron	91	4	4

Tabela 32. Recuperações e precisões (CV) de amostras de água fortificadas com herbicidas em diferentes níveis após EFS, utilizando colunas C-18, vazão de extração de 4 mL/min (N= 3)

Herbicidas	0,01 µg		0,05 µg		0,1 µg		0,25 µg		0,5 µg	
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)
bentazona	31	3	67	2	70	0,9	75	1	69	2
cianazina	80	3	69	3	71	1	76	1	65	2
simazina	73	2	60	2	67	4	72	3	66	1
2,4-D	60	2	57	3	40	2	64	4	72	1
atrazina	81	3	75	3	64	3	72	2	70	2
diuron	110	5	81	4	57	1	73	4	73	4
linuron	35	1	60	1	37	2	60	1	66	0

As recuperações determinadas foram adequadas, pois estão compreendidas dentro dos limites considerados aceitáveis (50-120%) [5], havendo algumas exceções. Os menores valores de recuperação foram encontrados para o 2,4-D, que apresenta baixa afinidade pelo sorvente C-18 e, portanto menor retenção no tubo de extração e para o linuron, que apresenta grande afinidade pelo sorvente C-18 e não deve ter sido totalmente eluído da coluna de extração. Entretanto, na coluna de DVB, que é mais indicada para pesticidas polares, as recuperações foram muito boas, atingindo aproximadamente 100%, mesmo para o 2,4-D e linuron.

Através dos resultados apresentados nas tabelas 30 e 31 observa-se que para o nível de fortificação de 1,0 µg, obtiveram-se os valores de recuperação mais baixos, para a maioria dos herbicidas estudados, com exceção da bentazona

e cianazina. Isto pode estar relacionado com uma possível saturação dos sítios de adsorção do sorvente.

A Figura 43 apresenta gráficos com os resultados de massa recuperada versus massa adicionada, para cada herbicida, nos 4 níveis de fortificação.

Os gráficos de massa recuperada versus massa adicionada mostraram comportamento linear, com bons coeficientes de correlação ($r > 0,99$) e boa linearidade na faixa estudada.

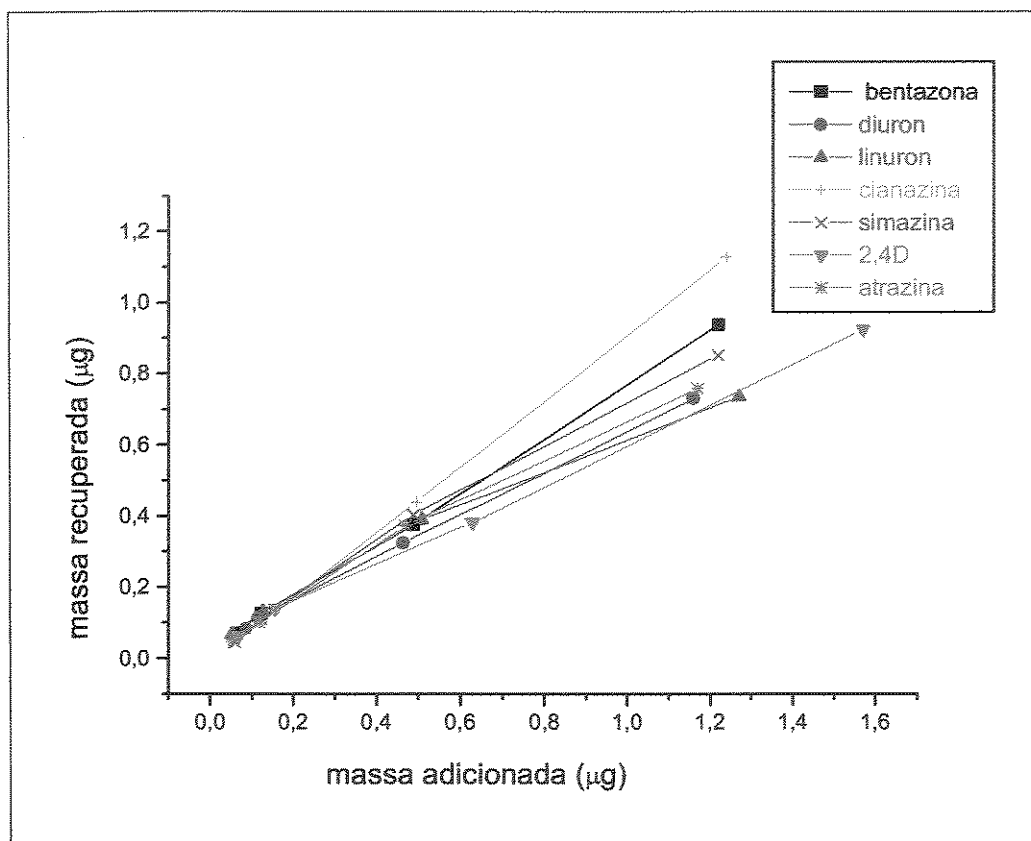


Figura 43. Gráficos massa adicionada x massa recuperada nos níveis da ordem de 0,05 a 1,0 µg de herbicidas.

A tabela 33 apresenta os parâmetros de cada curva.

Tabela 33. Parâmetros das curvas analíticas de recuperação dos herbicidas estudados.

Herbicidas	a	b	r
bentazona	0,02	0,75	0,9997
cianazina	-0,007	0,92	0,99995
simazina	0,03	0,69	0,9971
2,4-D	0,04	0,57	0,99949
atrazina	0,04	0,63	0,9963
diuron	0,04	0,60	0,99972
linuron	0,07	0,54	0,9937

4.6 Metabólitos

A Figura 44 apresenta um cromatograma mostrando a análise de uma amostra contendo os herbicidas em estudo e os metabólitos 3,4-DCA, 2,4-DCP e 2-HA.

Observa-se que as condições cromatográficas que constam na Figura 24, propiciaram uma boa separação dos herbicidas e metabólitos estudados.

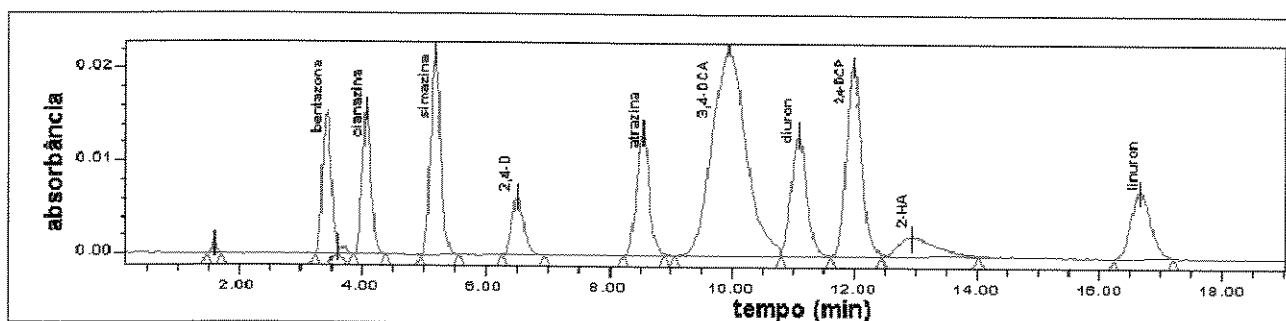


Figura 44. Cromatograma obtido para a separação de uma amostra contendo os herbicidas em estudo e os metabólitos 3,4-DCA; 2,4-DCP e 2-HA. Condições idem às da Figura 24.

4.7 Biblioteca de espectros de absorção no UV

As Figuras 45 e 46 apresentam respectivamente os espectros de absorção no UV dos metabólitos e dos herbicidas estudados, assim como os comprimentos de onda de absorções máximas destes compostos.

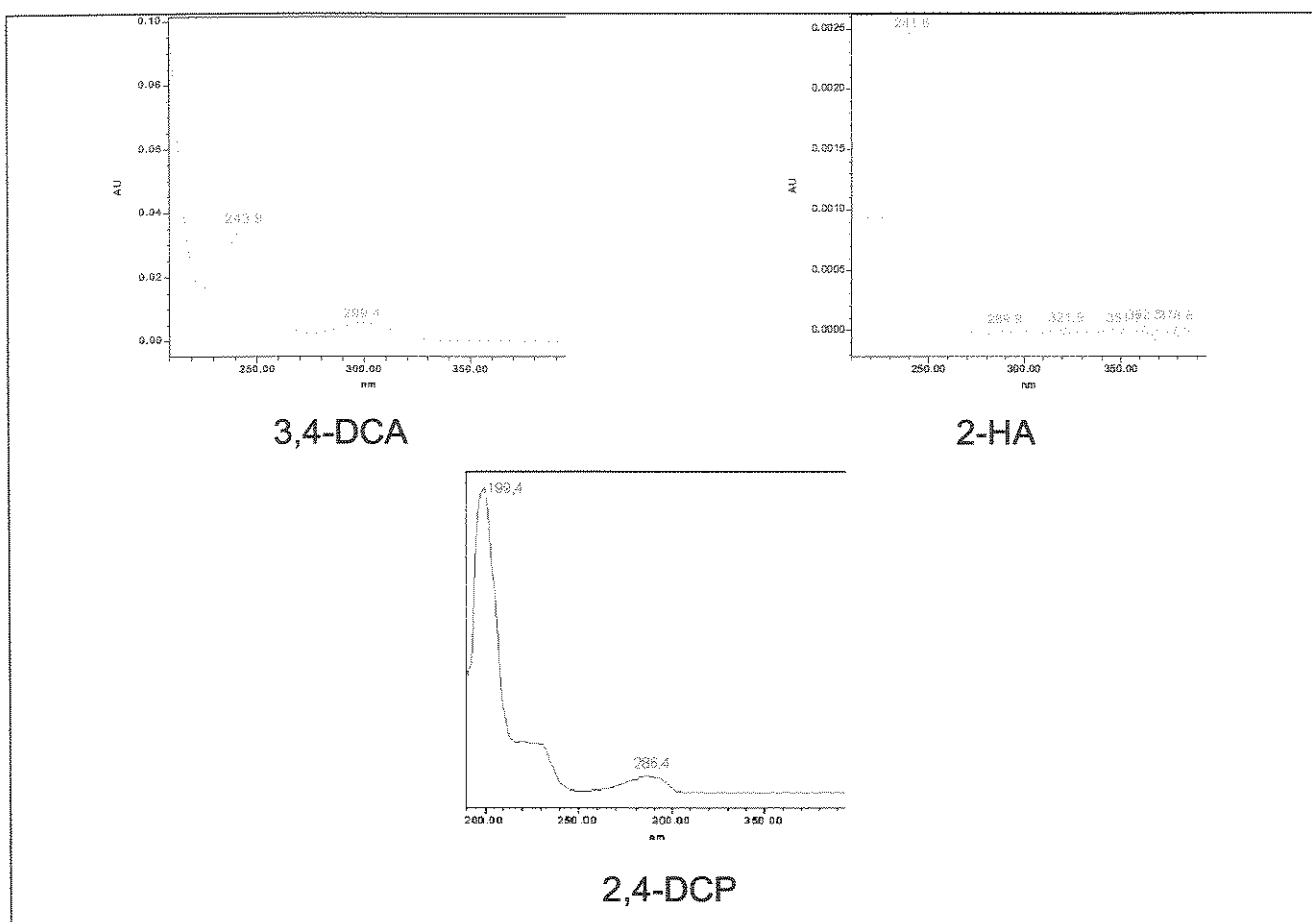


Figura 45. Espectros de absorção no UV dos metabólitos 2-HA; 3,4-DCA e 2,4 DCP.

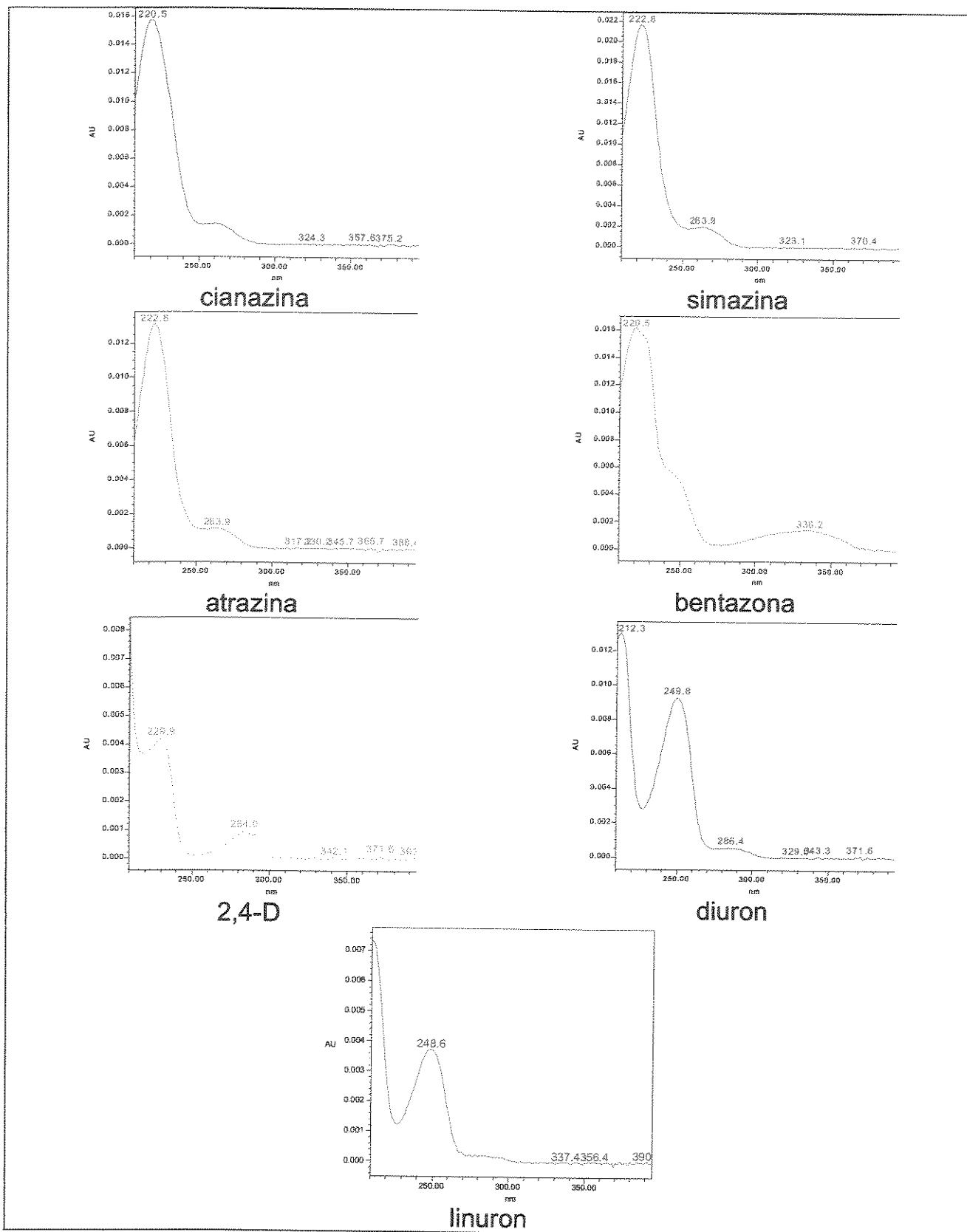


Figura 46. Espectros de absorção no UV dos herbicidas estudados.

A tabela 34 apresenta o comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) para bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron, linuron; 3,4-DCA; 2-HA e 2,4-DCP.

Tabela 34. Valores de comprimento de onda de absorção máxima para os herbicidas e metabólitos estudados.

Herbicidas	λ máx (nm)
bentazona	220,5
cianazina	220,5
simazina	222,8
2,4-D	209,9
atrazina	222,8
diuron	212,3
linuron	209,9
3,4-DCA	209,9
2-HA	241,6
2,4-DCP	209,0

O detector de arranjo de diodos também forneceu os espectros de absorção no UV de cada herbicida, sendo estes utilizados para a confirmação da identidade dos picos cromatográficos. A Figura 47 apresenta os espectros em três dimensões (3D) de absorção no UV dos herbicidas.

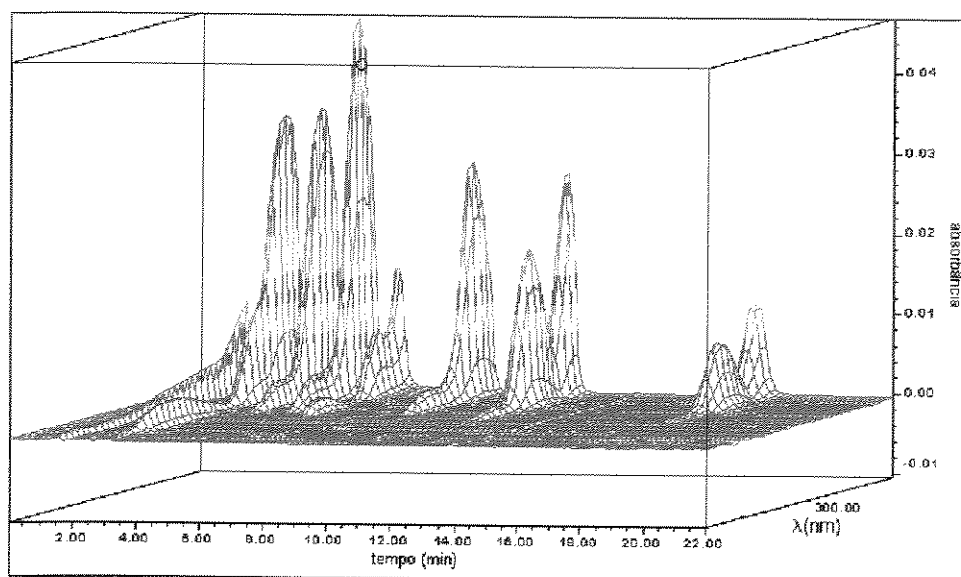


Figura 47. Espectros 3D de absorção no UV dos herbicidas. Ordem dos espectros: metanol, bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron e linuron.

4.8 Validação dos métodos desenvolvidos

As tabelas 35 à 39 apresentam os resultados de validação dos métodos desenvolvidos para análise de solo e água, utilizando EFS com tubos e discos de extração no modo "off-line" e colunas C-18 no modo "on-line". Os LOD e LOQ apresentados nas tabelas representam limites de detecção e de quantificação obtidos para o método. As recuperações apresentadas referem-se ao nível de fortificação indicado nas tabelas.

Tabela 35. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de solo 1, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).

Herbicidas	Curva analítica (área x conc.)			R (%) 5 µg/g	Precisão CV (%)	LOD* (µg/g)	LOQ* (µg/g)	Linear. (µg/g)
	a	b	r					
bentazona	-6043	131,8	0,9997	100	6,9	0,48	1,6	1,6-12,8
cianazina	-844	154,0	0,9996	64	4,0	0,16	0,53	0,53-10,8
simazina	-806	217,6	0,9992	100	2,8	0,051	0,17	0,17-11,6
2,4-D	-5187	63,0	0,9981	100	13,4	0,51	1,7	1,7-13,3
atrazina	-1521	203,4	0,9983	100	5,0	0,051	0,17	0,17-11,1
diuron	-5007	144,2	0,9989	78	9,3	0,078	0,26	0,26-17,2
linuron	-5886	126,5	0,9991	50	5,5	0,16	0,53	0,53-10,4

* valores obtidos para o método

Tabela 36. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise do solo 2, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).

Herbicidas	Curva analítica (área x conc.)			R (%) 5 µg/g	Precisão CV (%)	LOD* (µg/g)	LOQ* (µg/g)	Linear. (µg/g)
	a	b	r					
bentazona	-6540	131,6	0,9999	65	6,3	0,48	1,6	1,6-12,8
cianazina	-3645	155,3	0,9999	90	2,2	0,16	0,53	0,53-10,8
simazina	-7790	222,2	0,9997	90	5,3	0,17	0,57	0,57-11,6
2,4-D	-1206	74,1	0,9993	67	0,4	0,20	0,67	0,67-13,3
atrazina	-5113	206,5	0,9994	103	2,9	0,33	1,1	1,1-11,1
diuron	-8600	150,5	0,9994	94	0,3	0,26	0,87	0,87-17,2
linuron	-9587	131,8	0,9983	46	0,08	0,16	0,53	0,53-10,4

* valores obtidos para o método

Tabela 37. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com tubos C-18, seguido de CLAE (N=3).

Herbicidas	Curva analítica (área x conc.)			R (%) 0,25 µg/L	Precisão CV (%)	LOD* (µg/L)	LOQ* (µg/L)	Linear. (µg/L)
	a	b	r					
bentazona	-2300	117,3	0,9999	111	7	0,044	0,13	0,13-12,8
cianazina	-1540	143,8	0,9999	89	5	0,040	0,12	0,12-10,8
simazina	-6600	214,7	0,9998	80	6	0,036	0,12	0,12-11,6
2,4-D	-4800	66,2	0,9987	93	7	0,32	1,1	1,1-13,3
atrazina	-7486	194,8	0,9991	98	10	0,035	0,12	0,12-11,1
diuron	-8250	146,0	0,9996	98	8	0,035	0,12	0,12-17,2
linuron	-1550	136,9	0,9916	118	8	0,038	0,13	0,13-10,4

* valores obtidos para o método

Tabela 38. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com discos C-18, seguido de CLAE (N=3).

Herbicidas	Curva analítica (área x conc.)			R (%) 2,5 µg/L	Precisão CV (%)	LOD* (µg/L)	LOQ* (µg/L)	Linear. (µg/L)
	a	b	r					
bentazona	-1517	118,4	0,9998	94	0	0,044	0,13	0,13-12,8
cianazina	790	141,2	0,9996	105	4	0,040	0,12	0,12-10,8
simazina	-4421	213,7	0,9999	102	2	0,036	0,12	0,12-11,6
2,4-D	-2945	68,9	0,9997	103	3	0,32	1,1	1,1-13,3
atrazina	-5387	193,2	0,9998	106	3	0,035	0,12	0,12-11,1
diuron	-3677	144,1	0,9994	94	4	0,035	0,12	0,12-17,2
linuron	19519	145,8	0,9991	54	13	0,038	0,13	0,13-10,4

* valores obtidos para o método

Tabela 39. Parâmetros de validação obtidos para o método desenvolvido para análise de água, EFS com coluna C-18 "on-line" (N=3).

Herbicidas	Curva analítica (área x massa)			R (%) [#] 0,5 µg/L	Precisão CV (%)	LOD* (µg/L)	LOQ* (µg/L)	Linear. (µg/L)
	a	b	r					
bentazona	3111	8,52x10 ⁵	0,9995	92	2	0,025	0,08	0,08-12,8
cianazina	93684	9,40x10 ⁵	0,9973	90	2	0,025	0,08	0,08-10,8
simazina	56171	1,44x10 ⁷	0,9989	93	1	0,025	0,08	0,08-11,6
2,4-D	-167000	5,28x10 ⁵	0,9957	110	1	0,028	0,09	0,09-13,3
atrazina	29600	1,34x10 ⁷	0,9995	90	2	0,023	0,08	0,08-11,1
diuron	-40600	1,05x10 ⁷	0,9984	93	4	0,023	0,08	0,08-17,2
linuron	-170000	9,84x10 ⁵	0,9955	98	0,3	0,025	0,08	0,08-10,4
3,4-DCA	-59999	1,67x10 ⁵	0,9965	100	2	0,025	0,08	0,08-9,5
2- HA	-6830	7,77x10 ⁵	0,9774	50	5	0,25	0,8.	0,8-12,5
2,4-DCP	-1230	4,86x10 ⁵	0,9955	97	1	0,025	0,08	0,08-10,8

n.d.= não determinado

y= a+bx, a= coeficiente linear, b= coeficiente angular, r= coeficiente de correlação

* valores obtidos para o método

recuperações obtidas através de quantificações com curva analítica incluindo a etapa de EFS "on-line"

Observando os resultados das tabelas 35 à 39, nota-se que todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com quase todos os coeficientes de correlação maiores que 0,99 (exceção da 2-HA). Analisando os valores de coeficiente angular das curvas, conclui-se que a ordem crescente de sensibilidade é: 2-HA< 2,4-D< bentazona< cianazina< linuron< diuron< atrazina< simazina< 3,4-DCA.

As recuperações obtidas foram satisfatórias para a maioria dos pesticidas, estando compreendidas no intervalo aceito na literatura, de 50-120% [5].

As precisões (repetitividade) obtidas, avaliadas por CV, foram satisfatórias apresentando-se dentro dos limites aceitos na literatura [5], que é de até 20%.

Os LOD e LOQ dos métodos desenvolvidos foram baixos, permitindo que amostras de interesse ambiental, com concentrações da ordem de traços, sejam analisadas. As extrações *on-line* foram as que forneceram os menores LOD e LOQ, apresentando precisões adequadas.

As precisões e exatidões, sem incluir as etapas de extração, apresentaram valores dentro de faixa de $\pm 5\%$.

Os métodos desenvolvidos foram considerados robustos, pois se mantiveram sem grandes alterações mesmo quando foram introduzidas pequenas variações, como mudanças de lote ou marca de solventes ou mudanças de temperatura. Os métodos também foram considerados seletivos, pois não houve nenhum interferente que afetasse a determinação dos herbicidas estudados.

4.9 Amostras reais

As amostras reais de água foram analisadas, utilizando a extração "on-line", com colunas recheadas com C-18.

As Figuras 48 e 49 apresentam, respectivamente, uma análise de água de torneira e de água de filtro fortificadas com os herbicidas estudados. Os cromatogramas apresentados nas Figuras 48 e 49 mostram que as águas de torneira e de filtro podem ser analisadas com o método desenvolvido, permitindo detectar baixas concentrações dos herbicidas.

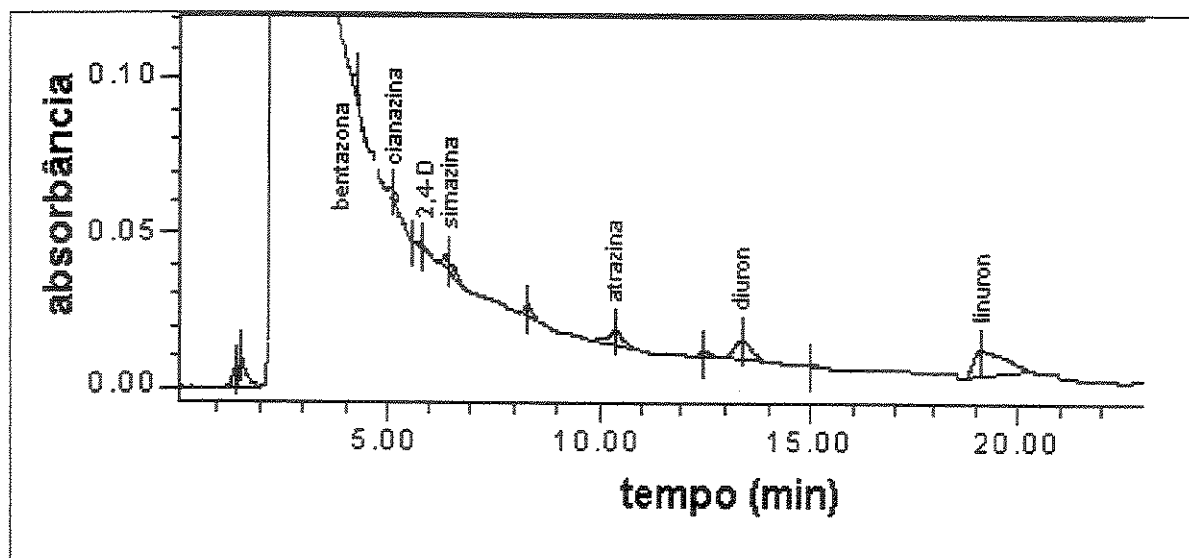


Figura 48. Cromatograma obtido após análise de água de torneira fortificada com herbicidas na ordem de $0,067 \mu\text{g/L}$. Condições idem às da Figura 24.

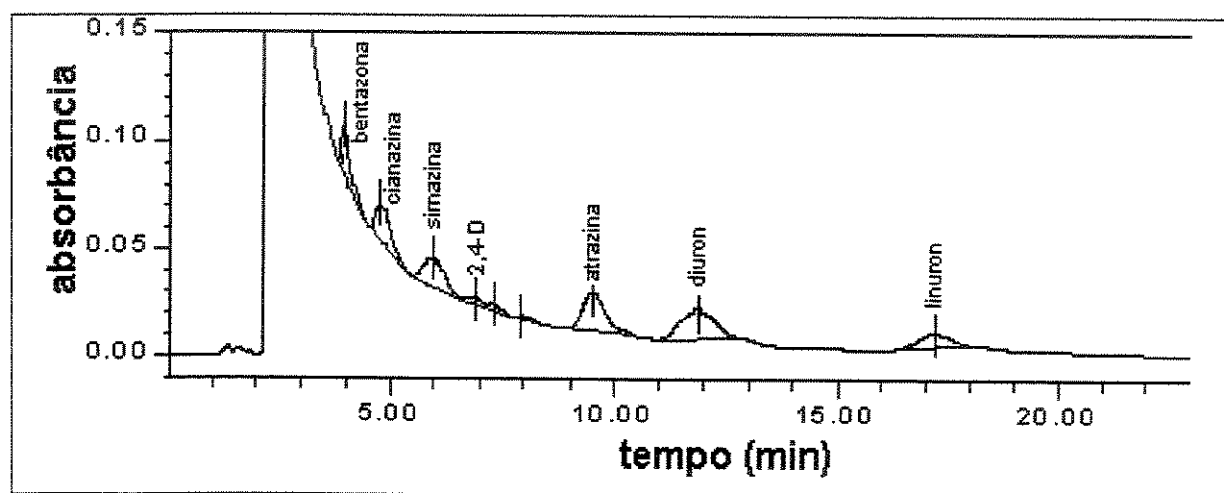


Figura 49. Cromatograma obtido após análise de água de filtro fortificada com herbicidas na ordem de $0,33 \mu\text{g/L}$. Condições idem às da Figura 24.

As Figuras 50 e 51 apresentam as análises de amostras reais de água coletadas em um córrego de água corrente, nas proximidades de uma lavoura de café e de cana-de-açúcar, respectivamente.

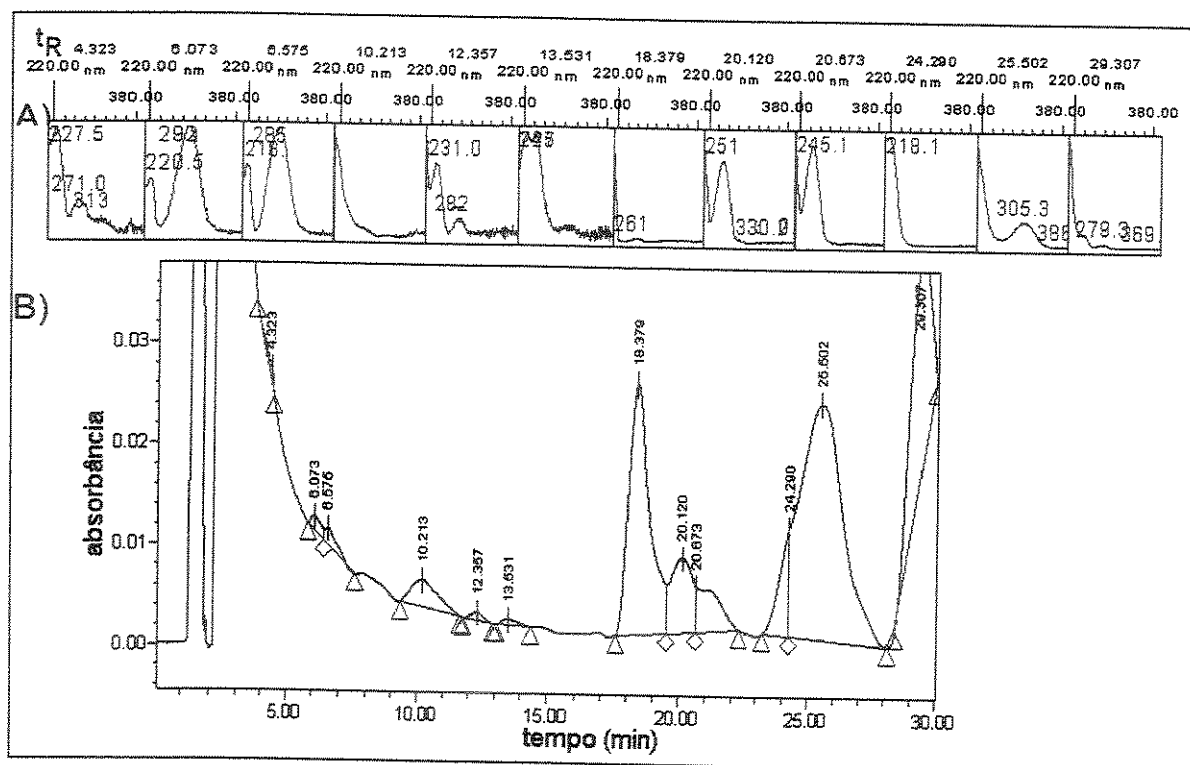


Figura 50. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de água de córrego em região de lavoura de café. Condições idem às da Figura 24.

Pela Figura 50 observa-se que a água coletada próxima à lavoura de café apresentou alguns picos com espectros de absorção UV com grande semelhança com os espectros dos herbicidas estudados. Os com maiores graus de concordância foram os espectros dos picos com tempo de retenção (t_R) de 12,4 min (possibilidade de ser o 2,4-DCP) e os com t_R de ~20 min (possibilidade de ser o diuron). As concentrações destes compostos seriam de 0,20 e 0,30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

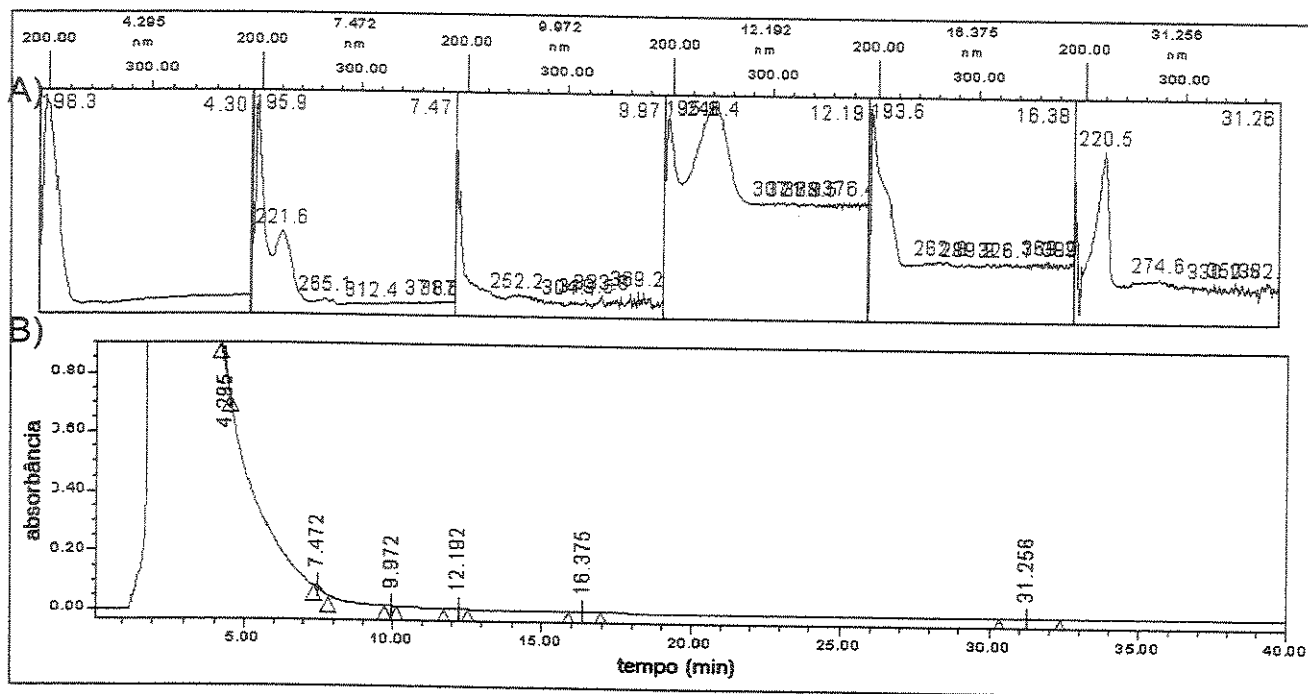


Figura 52. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de água de açude de sítio de plantação de culturas diversas. Condições idem às da Figura 24.

Na amostra de água coletada no sítio, não se pode identificar nenhum dos herbicidas ou metabólitos estudados, como pôde ser visto na Figura 52. Um dos pontos a destacar é que havia chovido bastante nas vésperas da coleta e portanto o açude devia estar “aparentemente mais limpo” devido ao efeito de diluição causada pela água das chuvas. Nota-se também que havia nesta água muito material orgânico, com substâncias húmicas e fúlvicas, observável pelo largo e intenso pico obtido logo no início do cromatograma presente na Figura 52. Este fato também é consequência das chuvas e também pode ter prejudicado a detecção dos herbicidas.

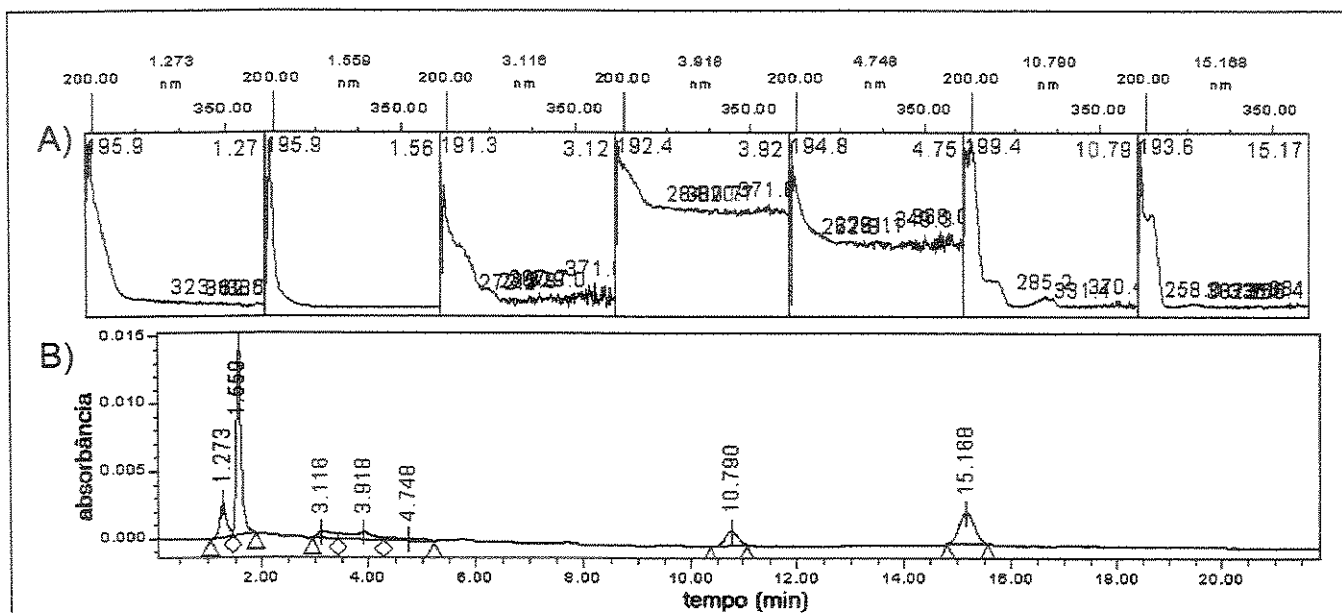


Figura 53. A) Espectros de absorção no UV e B) Cromatograma obtido após análise de solo, coletado em sítio de plantação de culturas diversas. Condições idem à Figura 24.

A Figura 53 mostra que no solo analisado tem-se a provável presença do metabólito 2,4-DCP (produto de degradação do 2,4-D). Esta conclusão foi tirada pela observação do espectro de absorção UV do pico de tempo de retenção de 10,7 min, já que este pico apresenta tempo de retenção e espectro muito coincidente ao do composto 2,4-DCP. Neste caso, a concentração em questão seria da ordem de 0,35 $\mu\text{g/g}$ de solo.

Capitula 5

5 CONCLUSÕES:

A separação dos herbicidas bentazona, cianazina, simazina, 2,4-D, atrazina, diuron, linuron e dos metabólitos 3,4-DCA; 2-HA e 2,4-DCP pode ser realizada com o emprego de eluição isocrática, empregando a fase móvel MeOH:H₂O 50:50, v/v, pH= 3,75, ajustado com ácido fosfórico. A eluição isocrática torna a análise mais simples, fácil e conveniente. As resoluções e os fatores de retenção obtidos foram satisfatórios para todos os picos cromatográficos. O emprego da supressão iônica usando o ácido fosfórico ao invés de um tampão resguarda a coluna cromatográfica fazendo com que se tenha tempos de vida maiores, além de facilitar a análise pois permite obter menores tempo de condicionamento, antes do uso, e de lavagem, após o uso da coluna.

Com o uso do detector de arranjo de diodos foi possível obter o espectro de absorção UV e os comprimentos de onda de absorção máxima dos herbicidas e dos metabólitos estudados, o que auxiliou na confirmação da identidade dos picos.

As isotermas de adsorção/dessorção, obtidas para os dois tipos de solo avaliados, mostraram boa linearidade. Os parâmetros determinados a partir das isotermas, coeficiente de adsorção e dessorção, $1/n$, coeficiente de distribuição e coeficiente de adsorção normalizado para a quantidade de carbono, mostraram que a adsorção dos herbicidas no solo 2 foi maior que no solo 1, provavelmente devido ao maior conteúdo de matéria orgânica no solo 2. Isto indica que os herbicidas aplicados no solo 2 apresentaram maior tendência de migração solo-água e portanto maior probabilidade de contaminação de águas ambientais. As precisões entre as duplicatas dos experimentos de adsorção/dessorção variaram entre 0,1 a 15%, sendo consideradas muito satisfatórias.

Os resultados mostraram que foi possível utilizar a extração em fase sólida para pré-concentrar os extratos dos solos e que não houve interferências que

prejudicassem a identificação dos herbicidas estudados. Os valores de recuperação obtidos apresentaram-se, em geral, dentro do limite aceito, 50-120%.

Utilizando como matriz a água, foi possível desenvolver e validar métodos para a extração e pré-concentração dos herbicidas utilizando EFS com tubos, discos e colunas "on-line" C-18, tendo também sido feitos alguns experimentos com colunas de DVB. As vantagens e desvantagens de cada um dos dispositivos são mostradas na tabela 40.

Tabela 40. Comparação entre os diferentes dispositivos de EFS utilizados.

	Tubos C-18	Discos C-18	Colunas DVB	Colunas C-18 (on-line)
vantagens	-disponível -prático	-altas vazões -regenerável -não forma canais	-maior volume de amostra -pH 1-14 -maior capacidade -melhores recup. para compostos polares	-mais repetitiva -menos laboriosa -mais reprodutível -menor manuseio -evita perdas -menor contaminação -melhor detectabilidade
desvantagens	-laborioso -perdas	-frágil -mais caro	-menor disponibilidade -mais caro	-1 injeção por extração -massa de sorvente reduzida

Como um dos parâmetros preponderantes na escolha de uma técnica de análise é o custo, a Figura 54 apresenta um comparativo sobre os custos de cada uma das técnicas e modos de extração empregados.

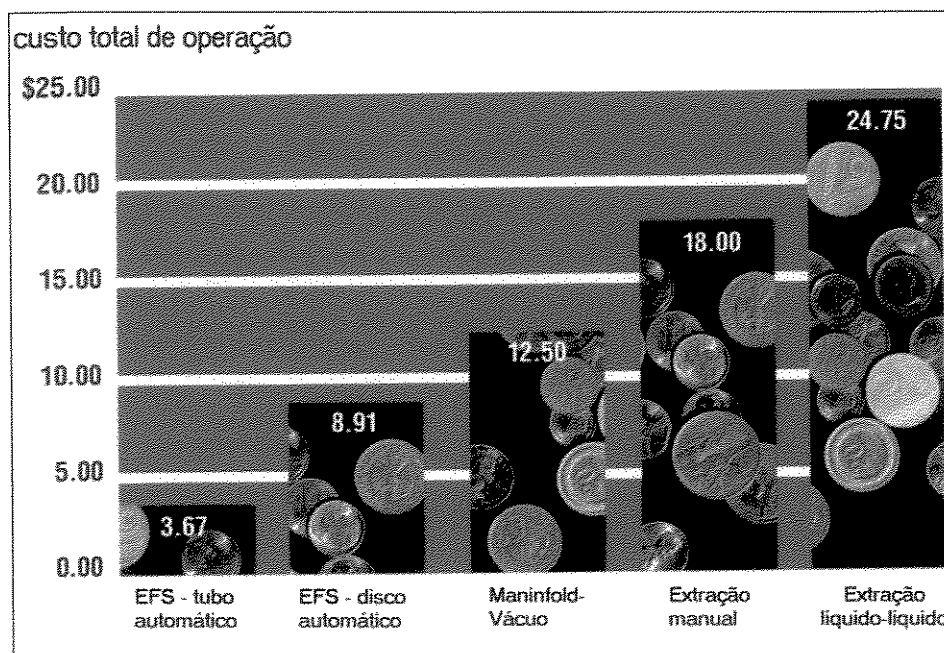


Figura 54. Gráfico comparativo sobre custos de técnicas e modos de extração.

Analisando a Figura 54 verifica-se que a técnica mais atrativa financeiramente, em relação ao seu custo de operação, é o tubo automatizado. Como a coluna de extração tem uma durabilidade maior do que o tubo de extração, pode-se dizer que a extração em fase sólida, utilizando este último dispositivo, é ainda mais vantajosa em termos de custos totais.

O melhor volume de amostra de água a ser utilizado com cada dispositivo, foi determinado, tendo sempre em vista a análise multirresíduos. Estabeleceu-se que 200 mL é o volume que permite maiores recuperações quando se utiliza discos e tubos C-18 e 150 mL quando se utiliza a coluna C-18, no modo "on-line". Com a coluna de DVB observou-se que o volume de amostra de água tem menor influência nas recuperações, permitindo o uso de até 1000 mL.

O ajuste da força iônica, com adição de NaCl, mostrou ser um fator negativo, diminuindo os valores de recuperação. Este resultado já era esperado, pois a adição de NaCl torna o meio mais iônico (polar) o que não é favorável quando se pretende analisar compostos com caráter pouco polar.

Os tubos e discos C-18 podem ser regenerados pela passagem dos solventes de condicionamento e equilíbrio, principalmente quando se utilizam amostras "limpas".

A validação dos métodos desenvolvidos mostrou que em todos os casos bons resultados de recuperação (entre 50-120%), precisão ($< 15\%$), linearidade, coeficiente de correlação ($> 0,99$), LOD e LOQ foram obtidos. O método desenvolvido, devido a pré-concentração realizada com o emprego da EFS, permite que os baixos limites de concentração máxima de herbicidas em água, estabelecidos pela Comunidade Européia e US EPA, sejam atingidos. Os resultados de validação também mostraram que a extração "on-line" foi a que forneceu menores valores de LOD, LOQ e CV. Além disso, outro fator de destaque desta técnica é a rapidez e a facilidade de operação.

Foram realizadas, com sucesso, algumas análises de amostras reais, utilizando a extração *on-line* seguida de CLAE, restando apenas dúvidas em relação à confirmação da identidade dos picos detectados. Na água de lavoura de café tem-se picos de 2,4-DCP e diuron, sendo que as concentrações destes compostos seriam de 0,20 e 0,30 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Na análise da água coletada próxima à lavoura de cana-de-açúcar também observou-se a possível presença do 2,4-DCP, pois houve semelhança dos espectros. Neste caso a concentração deste composto seria da ordem de 0,44 $\mu\text{g/L}$.

Na análise de uma amostra real de solo de sítio de lavoura de culturas diversas foi verificado a presença do metabólito 2,4-DCP, identificado através da semelhança de tempo de retenção e de espectro de absorção no UV. A ordem de concentração deste é de 0,35 $\mu\text{g/g}$ de solo.

As análises de amostras reais comprovam que o método desenvolvido é viável para a aplicação para a qual foi proposto, isto é, apresenta bons resultados na determinação de herbicidas e seus metabólitos em água potável e em solo de

diferentes fontes e mostram que o mesmo apresenta potencialidade para ser empregado em análise de águas provenientes de lavoura.

Capítulo 6

6 Referências Bibliográficas

- [1] D. Barceló, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 117.
- [2] A. Balinova, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 125.
- [3] D. W. Watts, E. R. Bogus, J. K. Hall, O. Mumma, *J. Environ. Qual.*, 23 (1994) 383.
- [4] M. Mano, "Toxicology and Risk Assessment of Pesticides", in *Chemistry, Agriculture and the Environment*, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pp. 466-490.
- [5] "Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos", Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; GARP; 1999.
- [6] D. Pimentel e L. Levitan, *BioScience*, 36 (1986) 86.
- [7] H.S. Dórea, M.A. Barbirato, F.M. Lanças, *Pest. R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 7 (1997) 109.
- [8] C.H. van Middelem, "Fate and Persistence of Organic Pesticides in the Environment", in *Organic Pesticides in the Environment*, A.A. Rosen, H.F. Kraybill, eds., American Chemistry Society, Washington, D.C., 1966, pp 229-249.
- [9] K. Jayachandran, T.R. Steinheimer, L. Somasundaram, T.B. Noorman, R.S. Kanwar, J.R. Coats, *J. Environ. Qual.*, 23 (1994) 311.
- [10] WSSA Herbicide Handbook Committee, "Herbicide Handbook", Weed Science Society of America, 3rd ed, 1974.
- [11] F.S. Almeida, B.N. Rodrigues, "Guias de Herbicidas", Livroceres, 2^o edição, Londrina, 1988.
- [12] P.C. Kearney, D.D. Kaufman, "Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action", Marcel Dekker Inc., 2^o edição, New York, 1969.
- [13] Catalog Handbook of Fine Chemical, Aldrich, 1986-1987.

- [14] M.L. Richardson, eds., *The Dictionary of Substances and their Effects*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996.
- [15] I. Liska, J. Slobodník, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 235.
- [16] V. Pacáková, K. Stulik, M. Prikoda, *J. Chromatogr.*, 442 (1988) 147.
- [17] A. Orinák, K. Holovská, V. Budínská, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 436.
- [18] H.J. Brauch, S. Schullerer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 420.
- [19] PCS International Programme on Chemical Safety, "Environmental Health Criteria 84: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) - Environmental Aspects", World Health Organization, Geneva, 1989, 92p.
- [20] A.G.S. Prado, E.M. Vieira, M.O.O. Rezende, *An. Assoc. Bras. Quim.*, 43 (1998) 239.
- [21] [wysiwyng://1L/http://www.24d.org](http://www.24d.org) (03/fev/2002).
- [22] V. Gökmen, J. Acar, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 1917.
- [23] A. Laganà, G. Fago, A. Marino, B.P. Martinez, *Chromatographia*, 38 (1994) 88.
- [24] J.A. Field, R.L. Reed, T.E. Sawyer, M. Martinez, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 3897.
- [25] http://ntp-db.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_Hs_Index.html (10/jun/2002).
- [26] http://157.98.10.135/NTP_Reports/NTP_Chem_HS_HTML/NTP_Chem1/Radiation120-83-2.html (10/jun/2002).
- [27] <http://umbbd.ahc.umn.edu:8015/umbbd/servlet/pageservlet?ptype=c&compID=c0161> (10/jun/2002).
- [28] C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, *LC-GC*, 14 (1996) 1048.
- [29] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mānes, *J. Chromatogr. A*, 728 (1996) 325.
- [30] M. Biziuk, A. Przyjazny, J. Czerwinski, M. Wiergowski, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 103.
- [31] C.R.K. Murti, D. Nag, "Human Health Impact of Pesticides in the Environment", in *Chemistry, Agriculture and the Environment*, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pp. 491-510.

- [45] Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.1220, Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm, United States Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) EPA, janeiro de 1998.
- [46] E.M. Vieira, A.G.S. do Prado, M.D. Landgraf, M.O.O. Rezende, *Quim. Nova*, 22 (3) (1999) 305.
- [47] Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS 835.1110, Activated Sludge Sorption Isotherm, United States Environmental Protection Agency Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) EPA, abril de 1996.
- [48] L.A. Gaston, M.A. Locke, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 1350.
- [49] L.A. Gaston, M.A. Locke, R.M. Zablotowicz, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 120.
- [50] <http://www.arsusda.gov> (05/jan/2002).
- [51] M.C.H. Tavares, M.D. Landgraf, E.M. Vieira, M.O.O. Rezende, *Quim. Nova*, 19 (1996) 605-608.
- [52] C.A. Seybold, W. Mersie, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 1179.
- [53] K.J. Fermanich, W.L. Bland, B. Lowery, K. McSweeney, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 1291.
- [54] G. Sposito, L. Martin-Neto, A. Yang, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 1203.
- [55] T.L. Lavy, J.D. Mattice, J.H. Massey, B.W. Skulman, S.A. Senseman, E.E. Gbur Jr., M.R. Barret, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 1268.
- [56] M. Flury, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 25.
- [57] R.H. Veeh, W.P. Inskeep, A.K. Camper, *J. Environ. Qual.*, 25 (1996) 5.
- [58] R.C. Stehouwer, W.A. Dick e S.J. Traina, *J. Environ. Qual.*, 23 (1994) 286.
- [59] H. Sabik; R. Jeannot; B. Rondeau; *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 217.
- [60] E. Funari, P. Bottoni, G. Giuliano, "Groundwater Contamination by Herbicides - Processes and Evaluation Criteria" in Chemistry, Agriculture and the Environment, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pp. 235-251.

- [61] EEC Drinking Water Guideline 80/779/EEC, EEC No. L229 (1980) 11-29.
- [62] T.R. Roberts, "Pesticides in Water - Human Health, Agricultural and Environmental Aspects" in Chemistry, Agriculture and the Environment, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pp. 429-443.
- [63] M.L. Richardson, "Epilogue" in Chemistry, Agriculture and the Environment, M.L. Richardson, ed., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, pp. 511-526.
- [64] Environmental Law Institute Research Report Opportunities for Advancing Environmental Justice: An Analysis of US-EPA Statutory Authorities, novembro de 2001.
- [65] Portaria 1469 do Ministério da Saúde da República Federativa do Brasil, 29 de dezembro de 2000.
- [66] D. Barceló, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 117-143.
- [67] S. Hartrik, J. Tekel, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 217.
- [68] M.J. Sánchez-Martín, R. Delgado-Pascual, E. Iglesias-Jimenez, M. Sánchez-Camazano, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 295.
- [69] A. Balinova, *J. Chromatogr. A*, 643 (1993) 203.
- [70] J.R. Dean, G. Wade, I.J. Barnabas, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 295.
- [71] R.G. Webb, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 5 (1978) 239.
- [72] G. Font, J. Mañes, J.C. Molto, Y. Pico, *J. Chromatogr.*, 642 (1993) 135.
- [73] D. Barceló, *Analyst*, 116 (1991) 681.
- [74] A. Junker-Buchheit, M. Witzemberger, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 67.
- [75] M. L. Mayer, S. K. Poole, C. F. Poole, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995), 89.
- [76] C. F. Poole, S. K. Poole, D. S. Seibert, C. M. Chapman, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997), 245.
- [77] Extração em Fase Sólida (SPE) (monografia), F. M. Lanças, 1997.
- [78] M.J. Ruiz, M.J. Redondo, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 776 (1997) 348.
- [79] W. C. Koskinen, B. L. Barber, *J. Environ. Qual.*, 26 (1997) 558.

- [80] E. Viana, M. J. Redondo, G. Font, J. C. Moltó, *J. Chromatogr. A*, 723 (1996), 267.
- [81] J. Slododnik, A. J. H. Louter, J. J. Vreuls, I. Liska, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 768 (1997), 239.
- [82] R.M. Marcé, H. Prosen, C Crespo, M. Calull, F. Borrull, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 696 (1995), 63.
- [83] S. Chiron, S. Papilloud, W. Haerdi, D. Barceló, *Anal. Chem.*, 67 (1995), 1637.
- [84] C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 77.
- [85] L. Vera-Avila, P. C. Padilla, M. G. Hernandez, J. L. L. Meraz, *J. Chromatogr. A*, 731 (1996), 115.
- [86] S. Chiron, E. Martinez, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 665 (1994), 283.
- [87] F. Hernández, C. Hidalgo, J. V. Sancho, F. J. Lopes, *Anal. Chem.*, 70 (1998), 3322.
- [88] J. S. Fritz, M. Macka, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000), 137.
- [89] M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999), 3.
- [90] G. Font, J. Mañes, J.C. Moltó, Y. Picó, *J. Chromatogr.*, 642 (1993), 135.
- [91] Catálogo Supelco 2001.
- [92] V. Pichon, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 665 (1994), 269.
- [93] W. Mersie, J.B. Liu, C. Seybold, D. Tierney, *Weed Science* 46 (1998) 7.
- [94] A. Kaune, R. Bruggemann, M. Sharma, A. Kettrup, *J. Agric. and Food Chem.*, 46 (1998) 9.
- [95] C.R. Powley, P.A. De Bernard, *J. Agric. and Food Chem.*, 46 (1998) 6.
- [96] N. Font, F. Hernandez, E.A. Hogendoorn, R.A. Baumann, P. van-Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 798 (1998) 179.
- [97] C. Moreau, C. Mouvet, *J. Environ. Quality*, 26 (1997) 9.
- [98] J. White, R.H. Brown, M.R. Clench, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 618.
- [99] R. Jeannot, *Spectra Anal.*, 26 (1997) 17.

- [100] J.U. Holthuis, R. Baumbach, S. Friebe, G.J. Kraus, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 66 (1997) 269.
- [101] A. Medvedovici, F. David, P. Sandra, *Talanta*, 44 (1997) 1633.
- [102] N. Ruiz de Erenchum, M.A. Goicolea, Z. Gomez de Balugera, M.J. Portela, R.J. Barrio, *J. Chromatogr. A*, 763 (1997) 227.
- [103] L.A. Gaston, M.A. Locke, *J. Environ. Quality*, 25 (1996) 7.
- [104] C.M. Fouque- Broaund, J.M. Fournier, *Talanta*, 43 (1996) 10.
- [105] B.R. Schroyer, P.D. Capel, *Herbic. Metab. In Surface Water and Groundw.*, 630 (1996).
- [106] M.C. Genaro, D. Giacosa, C. Baglietto, M. Gennari, M. Negre, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 14.
- [107] L.A. Gaston, M.A. Locke, R.M. Zablotowicz, *J. Environ. Quality*, 25 (1996) 7.
- [108] L.J. Marek, W.C. Koskinen, *J. Agric. Food Chem.*, 44 9 (1996) 3878.
- [109] T. Vroumsia, R. Steiman, F. SeigleMurandi, J.L. BenoitGuyod, J.L.Khadrani, *Chemosphere*, 33 (1996) 12.
- [110] C.M. Fouque-Brouard, J.M. Fournier, *Talanta*, 43 (1996) 1793.
- [111] J. Gabriel, J. Vekova, V. Vosahlo, *J. Chromatogr. B*, 681 (1996) 191.
- [112] J.B. Liu, C.F. Qian, *Chemosphere*, 31 (1995) 9.
- [113] A.E. Smith, *Intern. J. Of Environ. Anal. Chem.*, 59 (1995) 10.
- [114] C.S. Helling, M.A. Doherty, *Pest. Sci.*, 45 (1995) 21.
- [115] G.K. Stearman, M.J.M. Wells, S.M. Adkisson, T.E. Ridgill, *Analist*, 120 (1995) 2617.
- [116] H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, J. Marsel, *J. Chromatogr. A*, 704 (1995) 121.
- [117] G. Dinelli, A. Vicari, V. Brandolini, *J. Chromatogr. A*, 700 (1995) 201.
- [118] G.C. Galletti, A. Bonetti, G. Dinelli, *J. Chromatogr.A*, 692 (1995) 27.
- [119] A. Dankward, S. Pullen, S. Rauchalles, K. Kramer, F. Just, B. Hock, R. Hofmann, R. Schewes, F.X. Maidl, *Anal. Letters*, 28 (1995) 14.
- [120] G.C. Galletti, A. Bonetti, G. Dinelli, *J. Chromatogr. A*, 692 (1995) 27.
- [121] H. Sabik, S. Lafrance, J. Fournier, *Talanta*, 42 (1995) 8.

- [122] S. Papilloud, W. Haerdi, *Chromatographia*, 38 (1994) 514.
- [123] J. Abian, G. Durand, D. Barceló, *J. Agric. Food Chem.*, 41 (1993) 1264.
- [124] E. Rose, D. Martens, J. Lintelmann, H.G. Kicinski, W.J. Guenther, A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 347 (1993) 44.
- [125] K. Michels, *GIT Fachz Lab.*, 37 (1993) 28.
- [126] L.M. Shalaby, F.Q. Bramble, P.W. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 513.
- [127] H. Kloeppel, J. Haider, C. Hoffmann, B. Luettecke, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 344 (1992) 42.
- [128] K. Michels, B. Laschgari, R. Siegfried, M. Mokry, *Agribiol. Res.*, 44 (1991) 37.
- [129] P. Cabras, M. Melis, L. Spanedda, C. Tuberioso, *J. Chromatogr.*, 585 (1991) 164.
- [130] Q. Wenheng, N.A. Schultz, J.D. Stuart, J.C. Hogan, A.S. Mason, *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 1367.
- [131] I.S. Kim, F.I. Sasinos, R.D. Stephens, J. Wang, M.A. Brown, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 819.
- [132] H. Steinwandter, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 30.
- [133] J. Lydon, B.F. Engelke, C.S. Helling, *J. Chromatogr.*, 536 (1991) 223.
- [134] G. Durand, R. Forteza, D. Barceló, *Chromatographia*, 28 (1989) 597.
- [135] M. Meier, R. Hamann, A. Kettrup, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 334 (1989) 235.
- [136] M. Battista, A. Di-Córcia, M. Marchetti, *J. Chromatogr.*, 11 (1988) 233.
- [137] I.G. Ferris, B.M. Haigh, *J. Chromatogr. Sci.*, 25 (1987) 170.
- [138] G. Chiavari, C. Bergamini, *J. Chromatogr.*, 346 (1985) 375.
- [139] A. de Kok, M. van Opstal, T. de Jong, B. Hoogcarspel, R.B. Geerdink, R.W. Frei, U.A.T. Brinkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 18 (1984) 101.
- [140] J. Lantos, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, 292 (1984) 117.
- [141] D.C. Bouchard, T.L. Lavy, *J. Chromatogr.*, 270 (1983) 396.
- [142] I. Ali, H.Y. Aboul-Enein, *Int. J. Environ. Anal. Chemistry*, 81 (2001) 315-322.
- [143] E. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 435-453.
- [144] R.K. Juhler, S.R. Sorensen, L. Larsen, *Water Res.*, 8 (2001) 1371-1378.

- [145] Eurachem Group, "The Fitness for Purpose of Analytical Methods", <http://www.vtt.fi/ket/eurachem/valid.htm> (05/jul/2002).
- [146] Harmonised Guidelines for the In-House Validation of Methods of Analysis (Technical Report), IUPAC/In-House/Budapest (julho/2000).
- [147] O.A. Quattrochi, S.I.A. de Andrizzi, R.F. Laba, "Introducción a la HPLC- Aplicación y Práctica", Artes Gráficas Farro SA, Buenos Aires, 1992, p 301-328.
- [148] F. Bressolle, M. Bromet-Petit, M. Audran, *J. Chromatogr. B*, 686 (1996) 3.
- [149] A.A.M. Chasin, M. Chasin, M.C. Salvador, *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, 30 (1994) 49.
- [150] G.W. Peng, W.L. Chiou, *J. Chromatogr. B*, 531 (1990) 3.
- [151] G. Szepesi, M. Gazdag, K. Mihályfi, *J. Chromatogr.*, 464 (1989) 265.
- [152] E. Francotte, A. Davatz, R. Richert, *J. Chromatogr. B*, 686 (1996) 77.
- [153] V. Shah, K.K. Midtha, S. Arche, I.J. Macgilveray, J.P. Skelly, A. Yacobi, T. Layloff, C.T. Viswanathan, C.E. Cook, R.D. Macdowall, K.A. Pittmann, S. Spector, *Farmac. Research*, 9 (1992) 588.
- [154] J.R. Laug, S. Bolton, *J. Pharm. and Biom. Anal.*, 9 (1991) 357.
- [155] R. Causon, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 175.
- [156] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology, CPMP/ICH/281/95.
- [157] V.A.P. Jabor, "Análise Enantiosseletiva do Praziquantel em Plasma Empregando Fases Estacionárias Quirais", Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Ribeirão Preto, SP, 1997, p 53-56, 87-97.
- [158] <http://gdamcq.iqm.unicamp.br/~dandrade/assuntge/curcallib/parametr.htm> (Chemkeys) (15/jun/2002).
- [159] I.F. Lepsch, J.M.A.S. Valadares, *Bragantia*, 35 (2) (1976) 13-39.
- [160] B. van Raij, J.A. Quaggio, H. Cantarella, M.E. Ferreira, A.S. Lopes, O.C. Bataglia, *Análise Química do Solo para Fins de Fertilidade*, Fundação Cargil, Campinas, julho de 1987, pp. 69-124.

- [161] Catálogo Varian (2000)
- [162] Tabela de Interpretação de Resultados de Análise de Solo do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), julho de 1999.
- [163] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, INC., 2º ed., New York, 1997, pp.33.
- [164] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000), 217.
- [165] I. Liska, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000), 3.
- [166] C. E. Green, M. H. Abraham, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 41.
- [167] A. Junker-Buchheit, M. Wittenbacher, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996). 67.
- [168] M.J. Ruiz, M.J. Redondo, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 776 (1997) 348.