

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Glaucia Maria Ferreira Pinto

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



UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA

Campinas
Fevereiro de 1999

9919607

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	P658d
V.	Ex.
TOMPO 80/	39429
PROD.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	02/11/99
N.º CPO	

CM-00136653-8

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

P658d Pinto, Glaucia Maria Ferreira
 Determinação de resíduos de herbicidas em águas
 utilizando extração em fase sólida seguida de separação
 por cromatografia líquida de alta eficiência / Glaucia Maria
 Ferreira Pinto. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999

Orientador: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Química

1. Pesticidas 2. Pré-concentração. 3. Validação de
 Método. I. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

***Ao meu marido Jefferson, companheiro e amigo
que esteve sempre carinhosamente ao meu lado,
sem o qual minha vida seria totalmente diferente,
e a minha família que me ensinou "os valores da vida",
dedico este trabalho.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus e a vida pela oportunidade de desenvolver este trabalho e principalmente me desenvolver como pessoa.

Agradeço especialmente à Profª Drª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pelo apoio, dedicação, atenção, auxílio e preocupação que carinhosamente demonstrou. Agradeço também por seu jeito doce e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

☺ Aos professores que auxiliaram na minha formação acadêmica, principalmente à Prof^a Dr^a Carol Collins e ao Prof. Kenneth E. Collins pelas correções e dicas importantes;

☺ Aos colegas de laboratório, antigos e novos, como Tânia, Pezzin, Zuin, Rose, Carla, Lúcio, Joseane, Dania e Ricardo pela convivência pacífica, pelo auxílio e amizade;

☺ Aos técnicos de laboratório Joãozinho e Priscila e ao Waltinho pela “mãozinha” e “apoio técnico”;

☺ Aos funcionários da UNICAMP e principalmente do Instituto de Química, como o pessoal da biblioteca e do xerox, que tiveram participação importante neste trabalho;

☺ Às firmas: Zeneca (Sérgio Paiva e Antônio Moreira), Basf (Jonny M. Krespsky), Novarte (Sandra Salgado), Rhodia, Agrevo/Hoechst e Du Pont (Paulo Flávio Maricodi) que gentilmente cederam os padrões de herbicidas;

☺ A Luiz Felipe Fontes Andes pelo roteiro de Validação de Análise de Resíduos de Herbicidas e pelos contatos importantes

☺ Aos órgãos que deram apoio econômico para esta pesquisa: UNICAMP, CNPq e FAEP;

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

O meu muito obrigada !!!

ÍNDICE GERAL

RESUMO	xii
---------------------	-----

ABSTRACT	xiii
-----------------------	------

CURRICULUM VITAE	xiv
-------------------------------	-----

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO	1
----------------------------	---

I.1. Importância da Pesquisa Realizada	2
---	---

I.2. Os Pesticidas Como Contaminantes	2
--	---

I.3. Análise de Pesticidas	6
---	---

I.3.1. Métodos Cromatográficos de Análise	6
--	---

I.3.2. Técnicas de Extração e Pré-Concentração	19
---	----

I.4. Os herbicidas Estudados	21
---	----

I.4.1. Bentazona	21
-------------------------------	----

I.4.2. 2,4-D	22
---------------------------	----

I.4.3. Cianazina	23
-------------------------------	----

I.4.4. Simazina	24
------------------------------	----

I.4.5. Atrazina	26
------------------------------	----

I.4.6. Ametrin	27
-----------------------------	----

I.4.7. Ácido Fluazifop	28
-------------------------------------	----

I.4.8. Diuron	29
----------------------------	----

I.4.9. Linuron	30
-----------------------------	----

I.5. Parâmetros Cromatográficos	31
--	----

I.6. Validação do Método.....	34
I.6.1. Curva Analítica.....	35
I.6.2. Linearidade.....	36
I.6.3. Recuperação.....	36
I.6.4. Exatidão e Precisão.....	36
I.6.5. Sensibilidade (Limite de Detecção e de Quantificação)	37
I.6.6. Robustez.....	39

CAPÍTULO II

II. OBJETIVO.....	40
--------------------------	-----------

CAPÍTULO III

III. PARTE EXPERIMENTAL.....	42
III.1. Materiais e Métodos.....	43
III.1.1. Reagentes e Solventes.....	43
III.1.2. Herbicidas Seleccionados.....	44
III.1.3. Gás Empregado.....	45
III.1.4. Coluna Cromatográfica.....	45
III.1.5. Cartuchos e Tubos de Extração em Fase Sólida.....	45
III.1.6. Equipamentos.....	45
III.2. Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Herbicidas.....	47
III.2.1. Estudo da Vazão Ótima da Coluna Cromatográfica.....	47
III.2.2. Estudo da Fase Móvel.....	47
III.3. Avaliação da Separação Cromatográfica.....	48

III.4. Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos Herbicidas.....	48
III.5. Medida de Absortividade Molar dos Herbicidas.....	49
III.6. Estudo da Extração em Fase Sólida dos Herbicidas.....	49
III.6.1. Utilização de Cartuchos Sep-Pak.....	49
III.6.1.1. Procedimento de Extração.....	49
III.6.1.2. Regeneração do Cartucho.....	50
III.6.2. Utilização de Tubos de Extração.....	50
III.7. Validação do Método de Determinação de Herbicidas em	
Amostras Aquosas.....	52
III.7.1. Preparo das Soluções.....	52
III.7.2. Curva Analítica.....	53
III.7.3. Linearidade.....	53
III.7.4. Recuperação.....	54
III.7.5. Exatidão e Precisão.....	54
III.7.6. Sensibilidade.....	55
III.7.7. Robustez.....	55
III.8. Aplicação do Método Desenvolvido.....	55

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
IV.1. Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos	
Herbicidas.....	58
IV.1.1. Estudo da Vazão Ótima da Coluna Cromatográfica.....	58
IV.1.2. Estudo da Fase Móvel.....	59
IV.2. Avaliação da Separação Cromatográfica.....	64
IV.3. Análise da Retenção e Comportamento Cromatográfico dos	
Herbicidas.....	65

IV.4. Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos Herbicidas.....	67
IV.5. Medida de Absortividade Molar dos Herbicidas.....	69
IV.6. Estudo da Extração em Fase Sólida dos Herbicidas.....	70
IV.7. Validação do Método de Determinação de Herbicidas em	
Amostras Aquosas.....	71
IV.7.1. Curva Analítica.....	71
IV.7.2. Linearidade.....	73
IV.7.3. Exatidão e Precisão.....	74
IV.7.4. Recuperação.....	75
IV.7.5. Sensibilidade.....	76
IV.7.6. Robustez.....	78
IV.8. Aplicação do Método Desenvolvido.....	79

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÕES.....	83
--------------------	----

CAPÍTULO VI

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
-------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da contaminação ambiental por pesticidas.....	5
Figura 2. Medidas de LOD e LOQ.....	38
Figura 3. Esquema do sistema utilizado na extração em fase sólida, em duplicata.....	51
Figura 4. Esquema das etapas de extração.....	51
Figura 5. Curva de van Deemter obtida para a coluna analítica Nova-Pak, Waters C-18, 4 μm , de 150 x 3,9 mm d.i.....	58
Figura 6. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de herbicidas. F= 0,8 mL/min; volume de injeção= 10 μL ; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). a) FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v; b) FM MeOH:H ₂ O 60:40, v/v e c) FM MeOH:H ₂ O 70:30, v/v, sem adição de ácido.....	60
Figura 7. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de herbicidas. F= 0,8 mL/min; volume de injeção= 10 μL ; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). a) FM MeOH:H ₂ O 50:50, v/v pH=4,6; b) FM MeOH:H ₂ O 60:40, v/v pH=4,6 e c) FM MeOH:H ₂ O 70:30, v/v, pH=3,6.....	61
Figura 8. Espectrogramas: a) ácido fosfórico 0,1%; b) ácido acético 1%.....	62
Figura 9. Cromatograma obtido para a separação da mistura de herbicidas. FM 50% MeOH : 50% HAc/NaAc, v/v pH=3,8, F= 0,8 mL/min, volume de injeção= 10 μL ; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS).....	64
Figura 10. Estrutura básica das triazinas: heterociclo de três membros com N localizados simetricamente. Quando R ₁ = Cl, tem-se Cl-triazinas; R ₁ = SCH ₃ , tem-se S-triazinas.....	66
Figura 11. a) Cromatograma obtido para a mistura de herbicidas mostrando b) os respectivos espectros de absorção UV. FM MeOH:H ₂ O 60:40, v/v	

pH=4,6 (H_3PO_4); F= 0,8 mL/min ; volume de injeção = 10 μL ;
 detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). Picos: 1= bentazona, 2= 2,4D,
 3= cianazina, 4= simazina, 5= ácido fluazifop, 6= atrazina, 7= diuron,
 8= linuron, 9= ametrin.....68

Figura 12. Curvas analíticas da bentazona, 2,4-D, cianazina, simazina, atrazina,
 diuron, linuron e ametrin.....72

Figura 13. Cromatograma obtido para amostra completa de herbicidas utilizando
 diferentes analista, instrumento, colunas e laboratório. Demais
 condições idem a figura 7b. [1] bentazona; [2] 2,4-D; [3] cianazina; [4]
 simazina; [5] ácido fluazifop; [6] atrazina; [7] diuron; [8] linuron; [9]
 ametrin.....78

Figura 14. Cromatograma obtido para análise de amostra real (água de filtro
 doméstico), após pré-concentração. Condições idênticas a da Figura
 11.....79

Figura 15. a)Cromatograma da amostra real (água de filtro doméstico).
 b)Espectros referentes aos picos cromatográficos detectados.
 Detector de arranjo de diodos, volume de injeção 25 μL , demais
 condições idênticas as da Figura 11.....80

Figura 16. Cromatograma obtido para análise de amostra real (água de lavoura),
 após pré-concentração. Condições idênticas a da Figura 11.....82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Herbicidas, fornecedores, grau de pureza e família.....	44
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos t_R , k , R_s e α obtidos para a separação de herbicidas nas melhores condições de separação (cromatograma da figura 7b).....	65
Tabela 3. Valores de ε obtidos para os herbicidas em estudo.....	69
Tabela 4. Equações de curvas analíticas obtidas para os herbicidas estudados. FM MeOH:H ₂ O 60:40, v/v pH=4,6; F= 0,8 mL/min; detecção UV, 230 nm; volume de injeção =10 μ L.....	72
Tabela 5. Valores de intervalo de linearidade para os herbicidas em estudo.....	74
Tabela 6. Valores de precisão e exatidão obtidos para os herbicidas.....	74
Tabela 7. Valores de recuperação e RSD para os herbicidas estudados.....	75
Tabela 8. Resultados cromatográficos de LOD e LOQ obtidos para os herbicidas estudados.....	76
Tabela 9. Valores de LOD e LOQ para os herbicidas incluindo a etapa de pré-concentração e os resultados de recuperação.....	77

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE HERBICIDAS EM ÁGUAS UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA SEGUIDA DE SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Autora: Glaucia Maria F. Pinto

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

O sucesso da produção agrícola depende da aplicação de substâncias químicas, os pesticidas, que controlam as pragas. Se por um lado a aplicação de pesticidas é indispensável, por outro lado, pode ser muito perigosa para o meio ambiente e à saúde humana. Os pesticidas podem ser transportados para fontes de água causando contaminações. No mundo, tem crescido a preocupação com a qualidade das águas e devido a isto, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para analisar estes contaminantes no meio ambiente.

No presente trabalho, foi desenvolvido um método rápido, simples e eficiente para separar, identificar e quantificar nove herbicidas presentes em amostras de água, são eles: bentazona; 2,4D; cianazina; simazina; ácido fluazifop; atrazina; diuron; linuron e ametrin. O método consiste de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) por fase reversa, utilizando fase estacionária Nova-Pak C-18, fase móvel MeOH:H₂O 60:40, v/v, pH=4,6 (ajustado com ácido fosfórico) e detecção UV em 230 nm. Para atender o rigoroso limite permitido, que é de 0,1 µg/L para pesticidas individuais, foi feita uma etapa de extração e pré-concentração dos herbicidas, empregando a extração em fase sólida (EFS) com tubos C-18.

Depois do desenvolvimento do método o mesmo foi validado utilizando os parâmetros: precisão (repetibilidade) e exatidão, calibração, linearidade, recuperação e sensibilidade (limites de quantificação e de detecção). As precisões e exatidões obtidas foram menores que 15%, a linearidade foi boa para todos os herbicidas ($r > 0,999$), as recuperações obtidas ficaram entre 63,1 e 97,8% e o limite de detecção médio foi aproximadamente 21,4 ng/L, exceto para o ácido fluazifop (12,0 µg/L), conseguindo desta forma atingir os baixos limites estabelecidos pelos órgãos internacionais.

ABSTRACT

DETERMINATION OF HERBICIDE RESIDUES IN WATER UTILIZING SOLID PHASE EXTRACTION FOLLOWED BY SEPARATION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Author: Glaucia Maria F. Pinto

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

The success of agricultural production depends on the application of chemical substances, pesticides, that control the pests. If on the one hand, the application of pesticides is indispensable, on the other hand, it can very be dangerous for the environment and to human health. The pesticides can be carried to sources of water, causing contamination. Worldwide, concern with the quality of water has grown and, thus, the development of methods to analyze these contaminants in the environment becomes necessary.

In the present work, a fast, simple and efficient method was developed to separate, identify and quantify nine herbicides present in water samples. They are: bentazon; 2,4D; cyanazine; simazine; fluazifop acid; atrazine, diuron, linuron and ametrin. The method consists of high performance liquid chromatography (HPLC) with reversed phase, using, as stationary phase Nova-Pak C-18, and as mobile phase, MeOH:H₂O 60:40, v/v, pH=4,6 (adjusted with phosphoric acid), with UV detention at 230 nm. To obtain the allowed limits, that is 0.1 µg/L of each pesticides, an extraction and pre-concentration step of these herbicides was made, using solid phase extraction (SPE) with C-18 tubes.

After the development of the method, it was validated using the parameters: precision (repeatability) and accuracy, calibration, linearity, recovery and sensitivity (detection and quantification limits). Precision and accuracy were less than 15%, the linearity were good for all herbicidas ($r > 0.999$), the recoveries were between 63.1 and 97.8% and the average detection limits were approximately 21.4 ng/L, except for fluazifop acid (12.0 µg/L), thus reaching the low limits established by international organizations.

CURRICULUM VITAE

Glaucia Maria Ferreira Pinto

Data e local de nascimento: 20 de dezembro de 1974, Campinas - SP

1. Formação Acadêmica:

- ✓ Mestrado em Química Analítica - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), de março de 1997 a janeiro de 1999.
- ✓ Bacharelado em Química Tecnológica - UNICAMP, de março de 1993 a dezembro de 1996.
- ✓ 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.

2. Artigo publicado:

- ✓ Pinto, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F., "Method Validation for the Determination of Bentazon Residues in Water", *J. Chromatogr. A*, *in press*.

3. Cursos:

- ✓ "HPLC Avançado", Carl William Bergquist - Waters, São Paulo, 24-28/08/1998.
- ✓ "Solid Phase Microextraction Theory and Practice", Prof. Dr. Janusz Pawliszyn - UNICAMP, Campinas, 15-17/04/1997.

3. Experiências Didáticas:

- ✓ Auxiliar Didático de duas turmas do curso de Química Geral Experimental da UNICAMP, março a julho de 1998.

4. Trabalhos apresentados em congressos:

- ✓ "Method Validation For the Determination of Bentazon Residues in Water"; Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F.; 22nd International Symposium on

Chromatography, Roma, Itália, 13-18 de setembro de 1998 (Abstract P-506).

- ✓ "Validação de Método para Determinação dos Herbicidas Cianazina e Simazina em Água"; Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F.; 21º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1998 (Resumo QA-009).
- ✓ " Seleção de Fase Móvel para Separação de Herbicidas, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em Amostras de Água"; Silva, G.M.F. e Jardim, I.C.S.F.; Seventh Latin American Congress on Chromatography, Águas de São Pedro, SP, 25-27 de março de 1998 (Abstract p. 202).
- ✓ " Development of a C-18 Stationary Phase Using Zirconized Silica as Support"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; Seventh Latin American Congress on Chromatography, Águas de São Pedro, SP, 25-27 de março de 1998 (Abstract p. 220).
- ✓ " Preparação de Fase Estacionária Reversa C-18 Utilizando Sílica Zirconizada como Suporte"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; 20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1997 (Resumo QA-109).
- ✓ " Modificação de Superfície de Sílica com Titânio e Zircônio para Uso em CLAE"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; Silva, R.B.; Melo, L.F.C.; Gushikem, Y.; Collins, C.H.; 20º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 24-27 de maio de 1997 (Resumo QA-106).
- ✓ "Método de Enchimento de Coluna Microbore"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; 19º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 27-30 de maio de 1996 (Resumo QA-019).
- ✓ "Estudo da Suspensão de Fase Estacionária Empregada no Enchimento de Colunas Cromatográficas Microbore"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; VIII Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte, MG, 03-06 de setembro de 1995 (Resumo p. 339).
- ✓ "Estudo da Influência do Volume de Injeção na Eficiência de Colunas Microbore"; Silva, G.M.F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; 18º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambu, MG, 30 de maio a 2 de junho de 1995 (Resumo QA-076).

***“No final tudo dá certo, se ainda não
deu certo é porque não
chegou o final”.***

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da Pesquisa Realizada

O homem moderno tem usado recursos da natureza sem a preocupação de reposição ou de preservação. Devido a esta mentalidade várias regiões do globo terrestre estão ameaçadas por causa da poluição provocada pelo homem. A situação se complicou de tal forma que aos poucos vem crescendo a conscientização de que os recursos naturais não são infinitos, como convenientemente se acreditou, e que por isto, precisam de cuidados e controle.

Um dos recursos que a natureza fornece e que tem caráter essencial para o homem, é a água. Sem água um ser humano adulto pode sobreviver apenas por dois dias e mesmo assim as fontes de água, principalmente os rios, estão bastante comprometidas pela poluição provocada pelo homem.

Quais e que tipo de contaminantes estão presentes na água que se bebe, e em qual quantidade? Esta pergunta está se tornando muito freqüente e para respondê-la corretamente é necessário a análise destas águas.

Desta forma, pode-se compreender o importante papel desempenhado pela química analítica, que é a ciência que estuda o desenvolvimento de métodos capazes de estabelecer quais os constituintes de uma amostra (química analítica qualitativa) e qual a concentração destes constituintes (química analítica quantitativa).

1.2. Os Pesticidas Como Contaminantes

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas que controlam as pestes, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. Toda substância química que age no controle de pestes, no sentido de exterminá-las, é chamada de pesticida. Assim, têm-se as definições específicas para cada pesticida de acordo com o seu uso: herbicidas são pesticidas que matam ervas,

fungicidas são pesticidas que matam fungos, raticidas são pesticidas que matam roedores, moluscocidas são pesticidas que matam moluscos, entre outros [1]. A aplicação de pesticidas gera três grandes problemas: um é que os pesticidas são necessariamente tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos e mimetizadores de hormônios [2]; outro é que são aplicados em uma grande quantidade, em uma área bastante extensa, e possuem uma grande persistência no meio ambiente [1].

A produção anual global de compostos orgânicos é de 100-200 milhões de toneladas. Aproximadamente um terço de todos os compostos orgânicos produzidos tem como destino o meio ambiente, incluindo a água. Cerca de 700 compostos químicos, incluindo mais de 600 compostos orgânicos, muitos dos quais são biologicamente ativos, têm sido detectados em amostras de água [1].

Pesticidas são, particularmente, poluentes importantes dentre os compostos orgânicos, devido ao seu uso comum e descontrolado. De acordo com Pimentel e Levitan, dos 455.10^6 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 recentemente 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 o UK reportou o uso de 14000 toneladas por ano durante o período de 1980-1983. Observando os dados para 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 [4].

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 e

caráter apolar, causando riscos potenciais à saúde humana [5,6]. 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, fezes e leite. Os pesticidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígados, 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, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais. A cadeia alimentar aquática é um bom exemplo de como ocorre a acumulação. Se for considerada uma concentração arbitrária de 1 para traços de um inseticida na água, então a concentração em um plancton 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 [1].

A figura 1 apresenta um diagrama esquemático da contaminação ambiental por pesticidas [7].

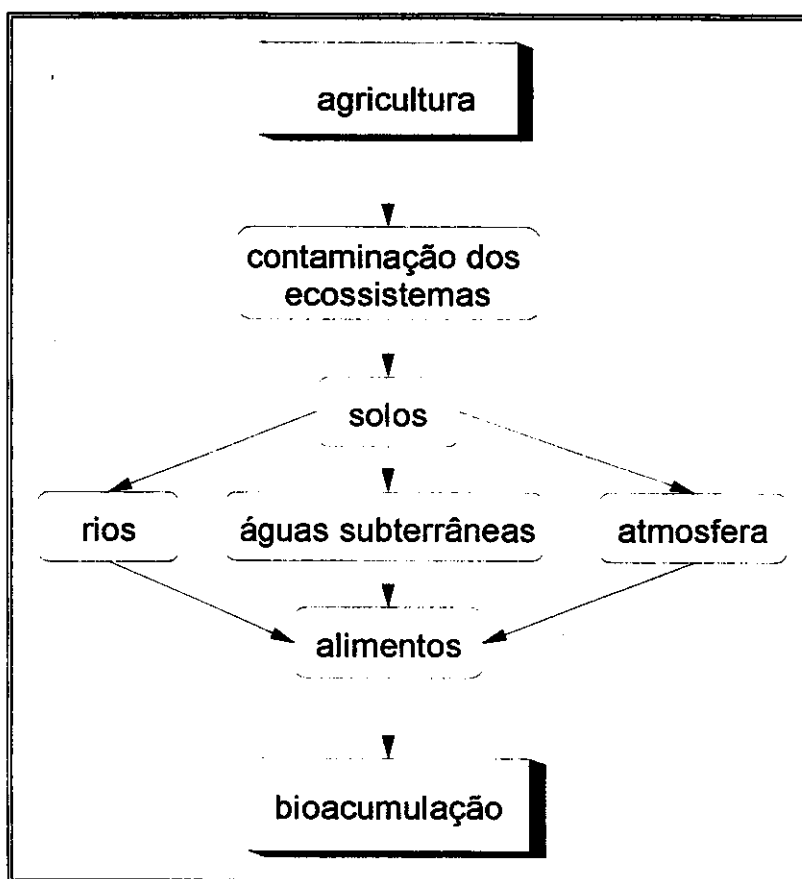


Figura 1. Diagrama esquemático da contaminação ambiental por pesticidas [7].

Dessa forma, como muitos contaminantes orgânicos são direta ou indiretamente introduzidos no ambiente aquático, a determinação de resíduos de pesticidas em água tornou-se de importância fundamental para solucionar problemas ambientais e biológicos.

Devido ao fato dos mananciais de água serem fontes de água potável, muitas agências ambientais têm imposto legislação rigorosa a respeito da qualidade dessas águas. Por exemplo, a União Européia estabeleceu a concentração máxima permitida de 0,1 $\mu\text{g/L}$ para pesticidas individuais em água potável [5,8,9,10], 0,5 $\mu\text{g/L}$ para soma de pesticidas, incluindo produtos de transformação tóxicos e 1-3 $\mu\text{g/L}$ em águas superficiais [5].

I.3. Análise de Pesticidas

I.3.1. Métodos Cromatográficos de Análise

O alto padrão de pureza da água potável, imposto pela União Européia, requer o desenvolvimento de métodos analíticos de sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de pesticidas compatíveis com os crescentes níveis de exigência [11,12]. A exatidão e precisão da análise dependem do método de preparação da amostra e da performance do equipamento utilizado. No passado, utilizaram-se várias técnicas para a determinação da qualidade das águas, como técnicas espectrofotométricas, método de halogênio total e métodos biológicos. A situação foi modificada com a introdução de métodos cromatográficos [13]. 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 cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em determinações de resíduos é de ocorrência 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 µg/L. Um ano mais tarde Krzeminski et al. usaram a CLAE para isolar ¹⁴C-difenamida. Nos anos seguintes Kirkland e Kirkland et al. empregaram CLAE para a determinação de resíduos de benomil [14].

Osselton e Snelling (1986) [15] mediram as propriedades cromatográficas de 51 pesticidas utilizando sete diferentes sistemas cromatográficos, entre eles cromatografia gás-líquido (CGL), CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD) e CCD com diferentes reagentes. Eles calcularam os coeficientes de correlação para a combinação dos três sistemas, concluindo-se que a melhor combinação para os sistemas estudados, para identificação de um pesticida desconhecido, é

CGL com OV-17, CLAE com ODS-Hypersil e CCD usando isooctano-acetato de etila.

Patumi *et al.* (1987) [16] descreveram um método, utilizando CG acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) ou CLAE para análise de fluazifop-butil e seu produto de degradação ácido fluazifop, que se forma devido a processos de hidrólise. O limite de detecção do método foi de 0,05 mg/kg para CLAE e 0,01mg/kg para CG-EM.

Pacáková *et al.* (1988) [17] estudaram a dependência do fator de retenção de acordo com o conteúdo de metanol, pH e força iônica, para separação de algumas triazinas e seus derivados. Eles utilizaram a fase estacionária Separon SIC 18 e fase móvel de diidrogenofosfato de sódio e metanol, e detecção UV. Eles verificaram que a fotólise das triazinas depende do pH e dos substituintes.

Hamann *et al.* (1989) [18] determinaram ácidos fenólicos (incluindo 2,4-D) usando CLAE. A eficiência da separação de algumas fases estacionárias, como sílica octadecil, sílica aminopropil e sílica nitril, foi estimada com diferentes fases móveis, concluindo-se que somente sílica octadecil e sílica aminopropil foram bem sucedidas. Estas fases estacionárias também foram utilizadas por Meier *et al.* (1989) [19] na análise de ácidos fenólicos em amostras de solo mostrando recuperações de 68 a 92%.

Schuetz *et al.* (1990) [8] apresentaram um método para isolamento de herbicidas (incluindo atrazina, simazina e cianazina), oriundos de amostras de água, utilizando extração em fase sólida (EFS), com C18, seguido por análise cromatográfica. As exatidões obtidas foram de $\pm 5\%$ para concentrações maiores que 0,20 $\mu\text{g/L}$.

Geerdink *et al.* (1991) [20] apresentaram um método para determinação de bentazona e oito ácidos fenólicos (incluindo 2,4-D) em amostras de água, utilizando EFS seguida por CLAE. O método mostrou recuperações maiores que 85%, com estimativa de desvio padrão relativo de 9%, para concentrações de

0,25 $\mu\text{g/L}$ e de 2% para concentrações de 1 $\mu\text{g/L}$, obtendo o limite de detecção de 0,05-0,1 $\mu\text{g/L}$.

Loconto (1991) [21] descreveu um método para determinação de ácidos clorofenólicos, em amostras de água, também utilizando EFS seguida por CLAE com DAD. O método proposto eliminou interferentes não-polares.

Orinák *et al.* (1991) [22] descreveram um método para eliminação de interferentes na determinação de bentazona em diferentes amostras, utilizando EFS e CLAE com detecção UV a 219 nm. Eles verificaram que Separol SI C18 e SI C1 eliminaram, com sucesso, interferentes de matrizes complexas como tecidos de órgãos.

Brauch e Schullerer (1991) [23] mostraram diferentes estratégias para o monitoramento de pesticidas (tais como atrazina, simazina e bentazona) em água potável. Eles empregaram CG e CLAE para os pesticidas mais polares, ambas precedidas de EFS. O limite de determinação ficou entre 0,05 e 0,1 mg/m^3 .

Barceló (1991) [3] apresentou uma revisão sobre a ocorrência, manipulação e determinação cromatográfica de pesticidas em ambientes aquáticos, no qual discute diferentes métodos de extração e sistemas cromatográficos, concluindo que a EFS tem gradualmente superado a ELL, e que a facilidade de automação de EFS com CL tem favorecido seu uso.

Bolygó e Atreya (1991) [9] descreveram um método para análise de multirresíduos de pesticidas em água utilizando EFS seguida de CLAE ou CG. O limite de determinação variou entre 0,003 e 0,1 $\mu\text{g/L}$ dependendo da sensibilidade instrumental, e as recuperações foram de 80-107% com coeficiente de variação de 9-15%.

Conaway (1991) [24] discutiu novas tecnologias analíticas e métodos (como EFS, extração com fluido supercrítico, eletroforese capilar) para análise de resíduos de pesticidas em água, e defende que a análise de pesticidas está

em desenvolvimento sendo necessário a formação de profissionais especializados.

Legler e Forschungsanstalten (1991) [25] apresentaram a análise de 10 herbicidas em água potável, utilizando CLAE com detecção UV, CG e CCD. No estudo com doze diferentes compostos as recuperações variaram entre 72-115% com estimativa de desvio padrão relativo de 21%.

Schulett (1991) [26] apresentou um método para análise de multirresíduos de pesticidas, por CLAE, após EFS, determinando concentrações abaixo de 0,05 µg/L. Ele concluiu que o uso de DAD fornece uma boa segurança na identificação de substâncias.

Durand *et al.* (1992) [27] compararam os métodos de CG e CLAE para determinação de traços de herbicidas (incluindo atrazina, simazina, linuron, bentazona e 2,4-D) em água. As recuperações variaram entre 60 e 100% com estimativa de desvio padrão relativo de 10%. Empregando CG eles conseguiram determinar herbicidas a nível de 5-10 ng/L, enquanto a CLAE permitiu a determinação a níveis de 0,1 a 0,5 µg/L. Apesar da LC ser menos sensível que CG ela permitiu a determinação dos herbicidas ácidos sem derivatização.

Zanco *et al.* (1992) [28] descreveram um novo método para determinação simultânea de fluazifop butil e ácido fluazifop utilizando CLAE com fase reversa, fase fenil, e reagente de par iônico. Os limites de determinação encontrados foram de 1 e 2 ng para fluazifop-butil e ácido fluazifop, respectivamente.

Balinova (1993) [12] desenvolveu um método de EFS seguida de CLAE para monitoramento de herbicidas (tais como 2,4-D, ácido fluazifop, bentazona, diuron, linuron, atrazina e simazina) em água potável, utilizando tampão acetato para a separação dos herbicidas. Ela encontrou limites de determinação que variaram entre 0,01 e 0,1 µg/L.

Font *et al.* (1993) [29] apresentaram uma revisão sobre EFS em análise de multirresíduos de pesticidas em água. Eles discutiram os mecanismos de EFS, adsorção e partição, e também os fatores que afetam a EFS: tipo de água,

volume de amostra, pH e o tratamento do sorvente (ativação, lavagem e dessorção).

Chiron *et al.* (1993) [30] compararam EFS e extração líquido-líquido (ELL) para monitoramento de pesticidas em águas ambientais. Os autores concluíram que a ELL oferece menor interferência na análise por CL-UV, comparada com a EFS, pois as substâncias húmicas não são extraídas da matriz, entretanto a ELL apresenta as desvantagens comumente conhecidas: formação de emulsões, uso de grande quantidade de solventes orgânicos, é trabalhosa, etc..

Sacchero *et al.* (1994) [31] fizeram um estudo comparativo entre Cl-triazinas (atrazina, simazina, cianazina, entre outras) e S-triazinas (ametrin e outras), utilizando CLAE com detecção UV. Eles investigaram os fatores de retenção em função de vários parâmetros da fase móvel: pH, força iônica e modificador orgânico e concluíram que as Cl-triazinas, geralmente, têm menor retenção que as S-triazinas.

Laganà *et al.* (1994) [32] desenvolveram um método para determinação de herbicidas feniluréias, incluindo diuron e linuron, utilizando EFS e CLAE com detecção UV. As recuperações variaram entre 65,1 e 97,9%.

Chiron *et al.* (1994) [33] descreveram o isolamento de herbicidas ácidos, como 2,4-D e bentazona, utilizando EFS e CLAE com DAD. As recuperações encontradas apresentaram valores de 40-76%, uma vez que eles observaram a presença de substâncias húmicas.

Pichon e Hennion (1994) [34] determinaram pesticidas (incluindo atrazina, linuron e simazina) em água ambientais por EFS seguida de CLAE com DAD. O limite de detecção encontrado foi de 0,1 µg/L, usando 150 mL de água de rio.

Chiron *et al.* (1995) [35] utilizaram CLAE acoplada a espectrometria de massas para a determinação de herbicidas ácidos, como bentazona e 2,4-D, em águas ambientais, após EFS. Para encontrarem uma boa separação por CLAE, a fase móvel foi acidificada (pH=2,9 ajustado com ácido fórmico). O limite de detecção variou entre 0,01 e 0,03 µg/L.

MacCarthy *et al.* (1995) [36] apresentaram uma revisão sobre a determinação de pesticidas, herbicidas e fungicidas, em água, utilizando EFS para extração e pré-concentração, e CG e CLAE com detecção espectrométrica e eletroquímica para separação.

Rouberty e Fournier (1995) [37] realizaram a otimização e propuseram um modelo para a separação cromatográfica de simazina e atrazina, usando a CG, na qual estudaram o volume de injeção, pressão de gás carregador e temperatura, e CLAE, na qual analisaram o volume de injeção, a vazão e a composição da fase móvel. Eles concluíram que o modelo para CG é de primeira ordem e para CLAE é de segunda ordem.

Butz e Stan (1995) [38] fizeram uma varredura de 265 pesticidas em águas por CCD. O limite de detecção foi superior a 100 ng.

Schüleín *et al.* (1995) [39] compararam diferentes materiais e técnicas de EFS, aplicados a métodos de determinação de multirresíduos em água, 33 pesticidas básicos e neutros, 10 pesticidas ácidos e 3 metabólitos, separados por CLAE com detecção UV, e concluíram que os cartuchos de extração C18 podem ser aplicados universalmente, entretanto eles não são apropriados para pesticidas muito polares ou bastante apolares.

Sherma (1995) [40] apresentou uma revisão contendo a literatura referente à análise de pesticidas, no período de 1992 a 1994.

Gennaro *et al.* (1995) [41] desenvolveram um método de CLAE com interação iônica para a separação de feniluréias (incluindo diuron e linuron), usando fase estacionária C18. O limite de detecção foi menor que 9 µg/L, sem o emprego de pré-concentração.

Hupe *et al.* (1995) [42] descreveram a metodologia e instrumentação usada em uma varredura cromatográfica de amostras de água. Eles demonstraram que é possível o uso de sistemas on-line, com pequenas colunas, para realizar tanto a extração quanto o enriquecimento e a separação.

Marcé *et al.* (1995) [43] determinaram um grupo de pesticidas utilizando CLAE com DAD, acoplado a EM, em amostras de águas do meio ambiente. Eles empregaram EFS *on-line*, que permitiu a determinação de pesticidas a níveis de 0,2 e 5 µg/L e limites de detecção na faixa de 0,05-0,5 µg/L com DAD, e 0,02-0,5 µg/L com EM.

Dean *et al.* (1996) [44] apresentaram uma revisão para extração e subsequente análise cromatográfica de triazinas em amostras ambientais. Foi dada ênfase a extração de herbicidas de amostras de água. Vantagens e desvantagens dos sistemas de extração e cromatográficos foram discutidos, bem como as características das metodologias envolvidas na determinação de triazinas.

Pacáková *et al.* (1996) [45] apresentaram uma revisão sobre a análise de triazinas e seus resíduos. Depois de uma breve introdução contendo as propriedades das triazinas e seus metabólitos, foram discutidas técnicas de pré-concentração, como EFS, ELL e extração em fluido supercrítico, e métodos cromatográficos, como CLAE, CG combinadas a diferentes detectores.

Vera-Avila *et al.* (1996) [46] descreveram uma técnica para a determinação de seis herbicidas ácidos clorofenóxidos. Após a extração e pré-concentração dos analitos, a pH $\approx$ 1, em coluna de EFS de estireno-divinilbenzeno, foi utilizada CL de troca iônica. As recuperações foram próximas a 100% com estimativa de desvio padrão relativo < 10%. O método mostrou-se linear em uma faixa de 1-80 µg/L.

Barceló e Alpendura (1996) [47] apresentaram uma revisão com 35 referências sobre a estabilidade e preservação de amostras de traços de pesticidas em água. Eles concluíram que a EFS é uma boa alternativa para a estocagem de pesticidas pré-concentrados de amostras de água mantidas a -20 °C.

Gökmen e Acar (1996) [48] estudaram um método para a determinação de 2,4-D em tomates. Quatro diferentes fases móveis e duas vazões foram

analisadas para definir as melhores condições cromatográficas. Os melhores resultados foram obtidos usando a mistura de acetonitrila:água 50:50, v/v, contendo 2% de ácido acético, com vazão de 1 mL/min para a separação de soluções padrões de 2,4-D.

Nakamura *et al.* (1996) [49] investigaram o uso de oito cartuchos de EFS de fase reversa, na determinação de vinte agroquímicos, sendo as recuperações correlacionadas com coeficientes de partição octanol-água. Eles observaram que os compostos com alto coeficiente foram facilmente sorvidos, mas dificilmente eluídos e que os parâmetros de EFS podem ser definidos de acordo com o coeficiente de partição octanol-água.

Wan e Wong (1996) [50] apresentaram uma revisão com várias possibilidades de redução do uso de solventes consumidos na análise de resíduos de pesticidas. Considerável redução do consumo de solventes pode ser obtida com a miniaturização da escala de extração da amostra e de limpeza. Dessa forma, a microextração em fase sólida e a extração com fluido supercrítico são uma boa opção.

Aguilar *et al.* (1996) [5] descreveram o uso de discos de EFS C18 e compararam com discos de estireno-divinilbenzeno. Eles verificaram que discos de estireno-divinilbenzeno apresentaram menores recuperações que os de C18. A repetibilidade e reprodutibilidade foram boas para ambos os tipos de discos e os limites de detecção foram de 0,02-0,1 µg/L para C18 e 0,03-0,2 µg/L para estireno-divinilbenzeno.

Liska e Slobodník (1996) [13] apresentaram uma revisão na qual descreveram as aplicações de CG e CL na análise de grupos de pesticidas, como feniluréias, triazinas e ácido fenólicos, em água. Eles empregaram CG e CLAE e usando procedimentos adequados de tratamento de amostra conseguiram atingir limites de detecção na faixa de 0,001-1 ng/L.

Jinno *et al.* (1996) [51] utilizaram extração em fase sólida seguida de CLAE para análise de pesticidas em água. Eles utilizaram duas colunas

cromatográficas C18, uma de 4,6 mm de diâmetro interno (d.i.) e outra de 1,5 mm d.i.. Os limites de detecção foram de 0,5 a 8 ng/L para as colunas convencionais e 0,1 a 5 ng/L para a microcoluna.

Junker-Buchheit e Witzemberger (1996) [52] compararam as eficiências de extração em fase sólida obtidas com sorvente polimérico e com C18, utilizados na extração de pesticidas. A separação foi realizada por CLAE com DAD. As recuperações obtidas para os pesticidas de alta polaridade foram um pouco superiores usando-se sorvente polimérico.

Balinova (1996) [11] estudou as melhores condições para determinação de pesticidas ácidos em amostras de água. Trietilamina foi adicionada na fase móvel, como reagente de par-iônico, para aumentar a retenção dos pesticidas ácidos em coluna C18, a pH neutro. O método mostrou-se reprodutível e suficientemente sensível.

Tolosa *et al.* (1996) [53] avaliaram a performance da extração em fase sólida utilizando diferentes sorventes, para extração de pesticidas em água. A eficiência de recuperação dos analitos em C18 e em estireno-divinilbenzeno variaram com a polaridade do composto e com a solubilidade em água.

Gennaro *et al.* (1996) [54] desenvolveram uma metodologia para determinação simultânea de feniluréias, triazinas e ácidos fenólicos, utilizando CLAE com detecção UV. Eles estudaram o melhor comprimento de onda para a análise e concluíram que os melhores resultados foram obtidos em 228 nm.

Sánchez-Martín *et al.* (1996) [55] desenvolveram um método analítico baseado em CLAE com DAD, para determinação de linuron em extratos aquosos de solo. O limite de detecção foi de 0,010 µg/mL e a estimativa de desvio padrão para a repetibilidade, baseada na área do pico, variou entre 0,7 e 3,1%.

Hogendoorn *et al.* (1996) [56] analisaram pesticidas polares utilizando CL-CL e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM), e compararam com CG-EM. Os resultados mostraram que CL-EM é uma técnica

útil para determinação de pesticidas polares à níveis inferiores a 0,1 µg/L (limite estabelecido pelos Estados Unidos para água potável).

Bizuik *et al.* (1996) [1] apresentaram uma revisão na qual descreveram a poluição ambiental causada pelos pesticidas e discutiram os dados da literatura em relação a concentração destes em águas. Várias técnicas de isolamento e pré-concentração dos pesticidas em água foram apresentadas, dando ênfase a EFS.

Balinova (1996) [57] apresentou uma revisão das técnicas modernas e do aprimoramento de métodos para a determinação de resíduos de pesticidas em água. A situação recente dos passos individuais (extração, limpeza, separação, identificação e quantificação) dos métodos cromatográficos, aplicados à análise de pesticidas, foi mostrada com ênfase no aumento da sensibilidade de detecção e confiabilidade da identificação e quantificação a baixos níveis de concentração, exigidos pela comunidade européia.

Hartrik e Tekel (1996) [58] reviram o contemporâneo estado da determinação cromatográfica de resíduos de pesticidas (herbicidas, inseticidas e fungicidas) e muitos de seus produtos de transformação. As vantagens e desvantagens de CLAE e CG foram discutidas, enfocando métodos multirresíduos com limite de quantificação inferiores a 0,1 µg/L. Vários aspectos de extração, pré-concentração e limpeza também foram discutidos.

Aguilar *et al.* (1996) [59] determinaram um grupo de pesticidas, tais como simazina, atrazina, ametrin e cianazina, usando EFS e CLAE com DAD. Eles obtiveram boa linearidade na determinação a níveis de 0,1 µg/L.

Ibáñez *et al.* (1996) [6] determinaram pesticidas, a nível de traços, em água, utilizando separação por CLAE com detecção UV. O limite de detecção ficou abaixo de 20 ng/L, depois de uma pré-concentração.

Aguilar *et al.* (1996) [60] determinaram um grupo de pesticidas por CLAE com DAD. Utilizando EFS eles determinaram os pesticidas em amostras reais a níveis de 0,2-5 µg/L, com limite de detecção entre 0,05 e 0,5 µg/L. Em amostras

reais os pesticidas foram identificados com um DAD e confirmados por espectrometria de massas.

Li *et al.* (1996) [61] determinaram, a níveis de 0,05 ng/L, sulfoniluréias extraídas do solo utilizando CL-EM. O tempo de retenção foi reprodutível, $\pm$ 2%.

Báez *et al.* (1997) [62] apresentaram um estudo crítico usando EFS com C18 e cromatografia para determinação de pesticidas em águas, incluindo triazinas. Os autores estudaram vários parâmetros da EFS concluindo que para os níveis de concentração dos testes (150-1000 ng/L) a recuperação foi linear, sendo que ocorreram perdas, durante a evaporação, de alguns pesticidas como o dimetoato (>50%) e o prometon (30%) e que a pré-filtração das amostras de água não causou variação significativa no processo de extração.

Hidalgo *et al.* (1997) [10] utilizaram CLAE com C18 e detecção UV para determinar pesticidas como simazina e atrazina em amostras de água ambiental. As recuperações variaram entre 86-104% com coeficiente de variação entre 1-6%. Limites de detecção entre 0,02-0,05 μ g/L foram obtidos após pré-concentração com EFS.

Kim *et al.* (1997) [63] fizeram um modelo de regressão para explicar a retenção de pesticidas triazinas, fenóxidos e acetanilidas em CLAE com fase reversa. A retenção de triazinas e fenóxidos foram explicadas por energia de solvatação e polarizabilidade. A retenção das acetanilidas dependem da acessibilidade à área superficial do solvente e da conformação do soluto.

Galera *et al.* (1997) [64] utilizaram a calibração multivariada e a regressão de componentes principais para determinação simultânea de cinco pesticidas, por CLAE com DAD. Os modelos de calibração foram avaliados usando o cromatograma e a primeira derivada do cromatograma para prever a concentração dos pesticidas em testes independentes. Após isto, o modelo foi aplicado, com sucesso, na determinação de pesticidas em amostras de solo e de água.

Field *et al.* (1997) [65] desenvolveram um método simples e rápido para determinação de diuron e três metabólitos em águas. O método utilizou EFS com C18 e CLAE com detecção UV. As recuperações obtidas foram de 98,8-77,8%, a precisão, indicada pela estimativa de desvio padrão relativo, foi de $\pm 5\%$. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,5 e 1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Jiménez *et al.* (1997) [66] desenvolveram um procedimento para a determinação de resíduos de pesticidas em água. Para este propósito, foi usada a EFS com C18, otimizando os parâmetros de eluição e a influência da concentração dos pesticidas. Os extratos foram analisados por CG e CLAE com DAD para garantir uma identificação e determinação confiáveis de vinte e três pesticidas de diferentes famílias químicas, incluindo triazinas e feniluréias. A otimização dos parâmetros de eluição foram importantes para aumentar as recuperações, que variaram de 70-101%.

Rodolico *et al.* (1997) [67] compararam as técnicas de CG, CLAE e detecção enzimática na determinação de pesticidas, tais como 2,4-D e atrazina, em água. O método de detecção enzimática pode ser considerado de menor custo, principalmente de investimento inicial, mas está sujeito a maiores interferências ao usar pesticidas de mesma classe química, quando comparado com CG ou CLAE.

Ruiz *et al.* (1997) [68] desenvolveram um método, baseado em EFS, otimizando os parâmetros que poderiam afetá-lo: porcentagem de solvente orgânico usado na extração, volume e força iônica da amostra aquosa que passa através do sorvente na extração. O método foi usado para a determinação da concentração de pesticidas em extratos de solo. As recuperações obtidas com e sem adição de 15% de cloreto de sódio, utilizando 100 mL de amostra e 2,5 mL de dimetilformamida, mostraram que a adição de cloreto de sódio pode diminuir a recuperação de pesticidas muito polares como o carbofuran.

Slobodník *et al.* (1997) [69] acompanharam a poluição do rio Nitra (na Eslováquia) durante 1993 e 1994, utilizando EFS, CLAE com DAD, CL-EM e CG-

EM. As estimativas de desvio padrão relativo, calculadas com os valores de área do pico, foram de 1-15% para EFS-CLAE-DAD, 10-16% para EFS-CG-EM e 17-31% para EFS-CL-EM.

Hernández *et al.* (1998) [70] compararam CL-CL e EFS-CL para a determinação de resíduos de triazinas e seus produtos de degradação em água. A identidade dos compostos foi confirmada pelos espectros de absorção no UV e por CG-EM. A EFS-CL mostrou um considerável aumento de sensibilidade com um decréscimo de seletividade, em relação a CL-CL.

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 sensibilidade frente a determinados detectores. Alguns destes problemas podem ser solucionados usando técnicas de derivatização, mas aumenta-se o tempo de análise, introduzem-se erros adicionais, o que torna este procedimento não atrativo para muitos químicos [14]. 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 também se deve 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, considerados mais facilmente degradáveis, em substituição aos pesticidas mais apolares, como os organoclorados, que possuem maior acumulação no meio ambiente e em tecidos lipídicos [55]. Este fato tem colaborado para o aumento do uso de 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 Espectrômetro de Massa (CG/EM), a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a Espectrômetro de Massas (CL/EM) tipo feixe de partículas ou termospray, a CLAE com detectores por arranjo de diodos e CLAE com colunas capilares [12].

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) [10,12] ou detecção eletroquímica ou por fluorescência [5]. 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 [44].

1.3.2 Técnicas de Extração e Pré-Concentração

Com a intensificação do uso de CLAE aumentou-se a necessidade do emprego de técnicas de extração e pré-concentração de pesticidas das matrizes. Isto se deve ao fato de que os detectores utilizados em CLAE possuem sensibilidades 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) e a extração em fase sólida (EFS).

A ELL, técnica mais usada em métodos padrões, sendo recomendada pela EPA [30] e conhecida pela sua simplicidade, baseia-se na partição de diferentes analitos entre a fase aquosa e o solvente orgânico [3]. 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 automação [3,29].

Uma alternativa a ELL é a EFS que está ganhando ampla aceitação como uma ferramenta poderosa na extração e enriquecimento de traços de pesticidas em soluções muito diluídas como a água, para gerar concentrações suficientes do analito para detecção [29]. A EFS utiliza uma coluna contendo um adsorvente apropriado para reter o analito. A eluição da amostra e a vazão da fase móvel através da coluna se dá 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 e de fácil automação [3].

A EFS está com popularidade crescente devido ao uso de uma variedade de adsorventes sólidos como resinas poliméricas, polímeros como C-8 e C-18, e grupos amino ou ciano ligados ao suporte de sílica ou ao carbono grafitizado ou alumina [3].

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) [52].

O adsorvente mais popular de EFS 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 [52].

Adsorventes 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 [52].

I.4. Os Herbicidas Estudados

No presente trabalho foram selecionados nove herbicidas: bentazona; 2,4D; cianazina; simazina; atrazina; ametrin; ácido fluazifop; diuron e linuron. Estes herbicidas foram escolhidos por serem os principais componentes ativos presentes nos agrotóxicos mais utilizados no Brasil. Além disso, por possuírem caráter ácido, básico ou neutro, a mistura destes herbicidas permite uma completa avaliação da potencialidade da CLAE.

As principais características e propriedades de cada um dos herbicidas estudados estão relacionadas a seguir.

I.4.1. Bentazona

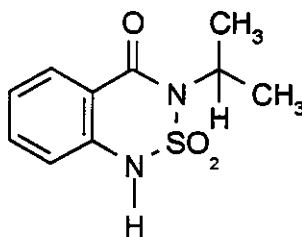
A bentazona é um herbicida utilizado exclusivamente em pós-emergência, devido a reduzida absorção radicular. No Brasil ele é aplicado, principalmente, em culturas de amendoim, arroz, feijão, milho, soja e trigo. Em outros países é utilizado em diversas culturas de gramíneas, leguminosas, e outras dicotiledôneas [71-74].

Os principais produtos de degradação da bentazona são os 6- e 8- hidroxí derivados [35].

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 [22,23]. Utilizando a CLAE este herbicida pode ser analisado diretamente.

- **grupo químico:** tiodiazinas
- **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, medicamente tóxico
- **irritabilidade:** pele - não irritante, olhos - moderada
- **sintomas de envenenamento:** apatia, prostração, tremores, irritação central, câimbras tipo clônico, vômito e diarreia.
- **dose letal:** oral 1100 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Banir e Basagran

1.4.2. 2,4-D

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 [7,75].

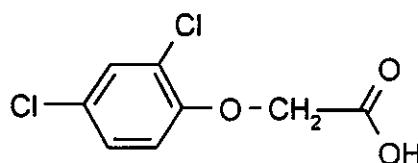
O 2,4-D é um herbicida utilizado, normalmente, em pós- emergência das ervas mas, uma vez que também é absorvido via radicular, pode ser usado em pré- emergência e em pré- plantio incorporado. No Brasil, e em outros países, é registrado para culturas de café, cana-de-açúcar, cereais, milho, trigo, controle de ervas aquáticas [71-74].

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 [75].

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 [48]. Empregando a CLAE este herbicida pode ser analisado diretamente.

- **grupo químico:** ácido fenóxiacético
- **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 especialmente sensíveis ao 2,4-D.
- **dissociação ácida (pK_a):** 2,73 ($T=25^\circ C$)
- **dose letal:** oral 375 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Aminol, DMA 806 BR, 2,4-D Isamina, Esteron 400 BR e etc..

I.4.3. Cianazina

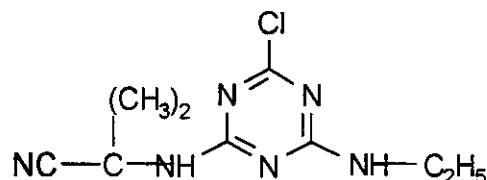
A cianazina é um herbicida mais eficiente em pré que em pós-emergência, devido a maior facilidade de ser absorvido por via radicular. No Brasil é registrada para culturas de algodão, café, cana-de-açúcar, milho e soja. Em outros países também é usada em ervilha, cevada, amendoim, batata, cebola e

fruticultura. É mais eficaz no controle de ervas de folhas largas que de gramíneas [71-74].

A cianazina pertence a classe das triazinas e apresenta caráter fracamente básico. Este herbicida pode ser analisado diretamente por CG ou por CLAE.

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

- **fórmula estrutural:**



- **fórmula molecular:** $C_9H_{13}ClN_6$
- **massa molar:** 240,7
- **classe toxicológica:** classe II, medicamente 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 (pK_a):** 0,63 ($T=25^\circ C$)
- **dose letal:** oral 182 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Bladex 500.

I.4.4. Simazina

A simazina é um herbicida utilizado 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

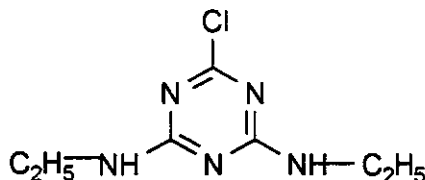
ornamentais. Controla essencialmente gramíneas anuais e, também, uma ampla gama de ervas de folhas largas [71-74].

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 [13,17].

As triazinas são degradadas por processos químicos e biológicos. No solo a degradação das triazinas ocorre devido a hidrólise, radiação UV, oxidação e microorganismos. Seu principal produto de decomposição no solo e na água são as respectivas hidroxi-triazinas, as quais são formadas principalmente por reações hidrolíticas quimicamente induzidas [13,17].

A simazina pode ser analisada diretamente tanto por CG quanto por CLAE [13,17].

- **grupo químico:** triazinas
- **nome químico:** 2-cloro-4,6-bis-etilamino-S-triazina
- **fórmula estrutural:**



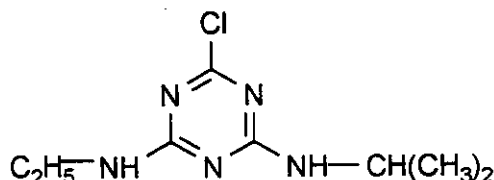
- **fórmula molecular:** $C_7H_{12}ClN_5$
- **massa molar:** 201,66
- **classe toxicológica:** classe III, pouco tóxico
- **irritabilidade:** pele - levemente irritante, olhos - moderadamente irritante
- **sintomas de envenenamento:** ataxia, dispnéia e convulsões.
- **dissociação ácida (pK_a):** 1,62 ($T=25^\circ C$)
- **dose letal:** > 5000 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Gesatop 800 PM, Herbazin 800 PM, Sipazina 800 PM, Simanax SC e etc.

I.4.5. Atrazina

A atrazina é um herbicida 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 [71-74].

A atrazina é a mais utilizada das triazinas. Sendo uma triazina também apresenta caráter fracamente básico, e juntamente com a simazina é a mais persistente no meio ambiente [13].

- grupo químico: triazina
- nome químico: 2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina
- fórmula estrutural:



- fórmula molecular: $C_8H_{14}ClN_5$
- massa molar: 215,68
- classe toxicológica: classe III, pouco tóxico
- irritabilidade: pele - irritação mínima, olhos - irritação mínima
- sintomas de envenenamento: fraqueza muscular, apatia, dispnéia e prostração.
- dissociação ácida (pK_a): 1,70
- 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..

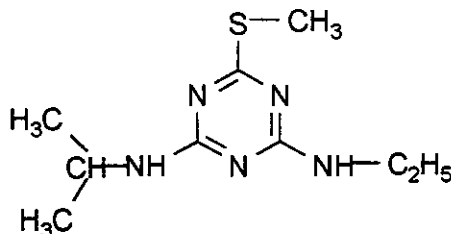
I.4.6. Ametrin

O ametrin é um herbicida que controla um vasto número de gramíneas e ervas de folhas largas anuais, quando utilizado em pré ou pós-emergência das ervas. É registrado no Brasil para as culturas de abacaxi, bananeira, café, cana-de-açúcar, citrinos, milho e videira. Em outros países também é utilizado em chá, sisal, ervilha, como dessecante de rama de batata e em controle total em áreas não cultivadas [71-74].

O ametrin pertence a classe das triazinas e, portanto, valem as propriedades gerais já descritas.

Este herbicida pode ser analisado diretamente tanto por CG quanto por CLAE [13].

- **grupo químico:** triazinas
- **nome químico:** 2 etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-s-triazina
- **fórmula estrutural:**



- **fórmula molecular:** $C_9H_{17}N_5S$
- **massa molar:** 227,33
- **classe toxicológica:** classe III, pouco tóxico
- **irritabilidade:** pele - não irritante, olhos - levemente irritante
- **sintomas de envenenamento:** ataxia, dispnéia, fraqueza muscular e perda de reflexos.
- **dissociação ácida (pK_a):** 4,1
- **dose letal:** oral 1100 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Gesapax 800 PM, Herbipak 800 BR, Metrimex e etc..

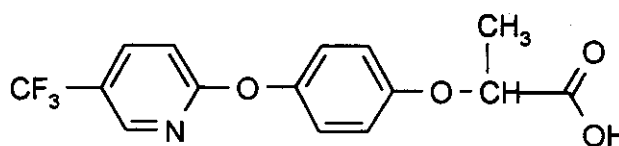
1.4.7. Ácido fluazifop

O ácido fluazifop é um herbicida, encontrado nas formulações na forma de ester (como fluazifop butil ou fluazifop p-butil), aplicado em pós-emergência, por ser essencialmente de absorção foliar, mas também é absorvido, em menor escala, por via radicular. Este herbicida está registrado no Brasil para as culturas de alface, algodão, cebola, cenoura, soja, tabaco e tomate e para as plantações de café, eucalipto, laranjeira, pinho e roseira. Este herbicida controla gramíneas anuais, no estágio de até quatro perfilhos e algumas perenes [71-74].

No solo o fluazifop butil hidrolisa, numa taxa que depende da temperatura, resultando no ácido livre fluazifop, e é a forma que realmente tem atividade herbicida [16,28].

O ácido fluazifop tem caráter ácido e polar e, portanto, não pode ser analisado diretamente por CG. A melhor opção para análise direta deste herbicida é por CLAE.

- **grupo químico:** aril oxi-fenóxi-propionato
- **nome químico:** ácido 2-(4-(5-trifluorometil-2-iloxipiridina)fenóxi) propiônico
- **fórmula estrutural:**



- **fórmula molecular:** C₁₅H₁₂F₃NO₄
- **massa molar:** 383,4
- **classe toxicológica:** classe II, mediantemente tóxico
- **irritabilidade:** pele - irritante, olhos - levemente irritante
- **sintomas de envenenamento:** mal estar, vômito, enfraquecimento muscular, dificuldade respiratória, suor excessivo, braquicardia, oligúria.
- **dose letal:** oral 4662 mg/kg para formulação 250 g/L de fluazifop butil (em ratos)
- **nomes comerciais:** Fusilade e Fusilade 125.

I.4.8. Diuron

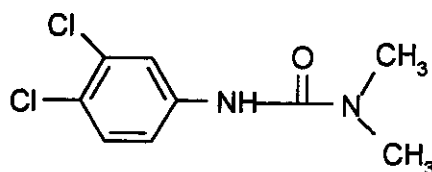
O diuron é um herbicida utilizado preferencialmente em pré-emergência por ser a via radicular a mais importante absorção do produto. Este herbicida é registrado no Brasil, e em diversos países, para culturas anuais (alfafa, algodão e soja), plantações perenes (abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, citrinos, pimenta-do-reino, seringueira e videira), áreas não cultivadas e canais de irrigação e drenagem [71-74].

Este herbicida é considerado o terceiro mais perigoso pesticida para fontes de águas subterrâneas. 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 de clorinados [65].

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 [13]. Além disso, as fenil uréias são solúveis em água, tendo grande capacidade de migração para o solo e de entrar na cadeia alimentar, onde são degradadas e metabolizadas por mamíferos [32]. Considera-se que esta classe de compostos é dificilmente detectado através da análise direta por CG devido a decomposição térmica, resultando em isocianatos e aminas alifáticas. Esta ruptura térmica é atribuída a átomos hidrogênio-amida, pois a substituição nesta posição, com um grupo metila, proporciona compostos termoestáveis [13]. 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 [65]. Análises por CLAE podem ser realizadas diretamente.

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

- **fórmula estrutural:**



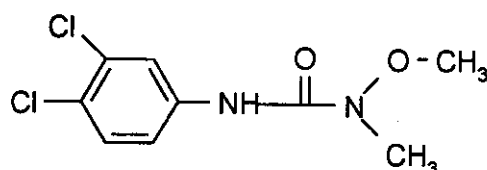
- **fórmula molecular:** $C_9H_{10}Cl_2N_2O$
- **massa molar:** 233,1
- **classe toxicológica:** classe II, mediamente tóxico
- **irritabilidade:** pele - não irritante, olhos - levemente irritante
- **sintomas de envenenamento:** não conhecidos
- **dose letal:** oral 3400 mg/kg para formulação de 500 g/L (em ratos)
- **nomes comerciais:** Cention 800, Diuron 500 SC, Diuron Nortox, Diuromex, Herburon, Karmex 800, Staron SC e etc.

I.4.9. Linuron

O linuron é um herbicida 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 [71-74].

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

- **grupo químico:** uréia substituída
- **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 III, pouco tóxico
- **irritabilidade:** pele - moderadamente irritante, olhos - moderadamente irritante
- **sintomas de envenenamento:** não conhecidos
- **dose letal:** oral 4000 mg/kg (em ratos)
- **nomes comerciais:** Afalon 500 SC, Linurex 50 PM, Lorox 500 e etc.

I.5. Parâmetros Cromatográficos

A seguir serão descritos os parâmetros cromatográficos que foram utilizados, no presente trabalho, para avaliar a separação dos herbicidas estudados.

O fator de retenção (k) diz respeito a retenção do soluto e é determinado pela razão entre os tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária e percorrendo a coluna na fase móvel, de acordo com a expressão (1) [76,77]:

$$k = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

onde:

t_R = tempo de retenção de um soluto, que é o tempo que um soluto gasta desde ao momento da injeção até a saída do máximo do pico;

t_M = tempo de retenção de um soluto não retido;

t'_R = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais de k devem variar entre 1 e 10 para dois componentes, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 [76,77].

A resolução (R_s) refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser obtida pela expressão (2) [76,77]:

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (2)$$

onde:

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

w_{b1} e w_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo;

w_{h1} e w_{h2} = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Considera-se que: $R_s = 1$ tem-se 98% de separação; $R_s = 1,25$ tem-se 99,5% de separação e $R_s = 1,5$ tem-se 100% de separação, para picos gaussianos [76,77].

Outro parâmetro cromatográfico relacionado com a separação de dois picos adjacentes é o fator de separação (α), que é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a equação (3) [76,77]:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação. Se $\alpha = 1$, não existem diferenças termodinâmicas entre os dois componentes de um dado sistema e eles não podem ser separados. Entretanto, quando $\alpha > 1$ não significa que os picos estão totalmente separados, porque eles podem ser largos

e estarem sobrepostos. Consequentemente, um valor elevado de α só implica em boa separação se os picos forem estreitos [76,77].

Na caracterização cromatográfica de uma coluna aconselha-se construir a curva de van Deemter para determinar a vazão que se deve trabalhar a fim de obter a eficiência (N) máxima da coluna. Uma interpretação desta curva é que existe uma vazão (F) ótima, que está relacionada com a velocidade linear ótima (μ), na qual a altura equivalente a um prato (H) terá um valor mínimo e portanto o valor de eficiência será máximo. As equações para cálculo de N, H e μ são apresentadas a seguir (equações 4,5 e 6, respectivamente) [76].

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{L}{t_m} \quad (6)$$

onde:

L= comprimento da coluna cromatográfica

A eficiência da coluna, expressa por H, também pode ser determinada pela equação de van Deemter (equação 7) [76]:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu \quad (7)$$

O termo A, difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto, e pode ser minimizado utilizando-se colunas de diâmetro interno reduzido. O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado utilizando-se altas velocidades lineares de fase

móvel. O termo C, transferência de massa, corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária, este pode ser minimizado diminuindo-se a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte [76].

I.6. Validação de Método

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 [78].

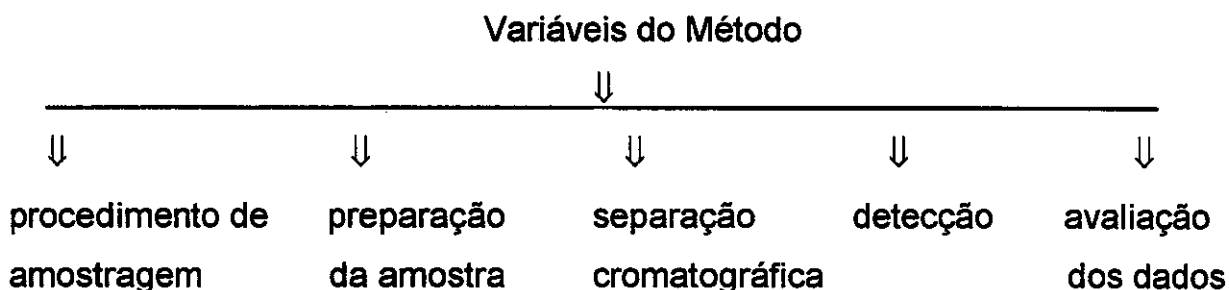
A validação também é parte integral de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da Comunidade Européia, Japão, EUA e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluidos biológicos e determinação de 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 [79-86]. Para amostras de pesticidas, os procedimentos são basicamente os mesmos, entretanto há poucas publicações.

Foi desenvolvido, pela Coordenação de Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura, um roteiro para validação de metodologia desenvolvida para análise de resíduos de pesticidas [87], 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) e sensibilidade (limite de detecção e limite de quantificação) [88].

1.6.1. Curva Analítica

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, precisão e exatidão não podem ser obtidas [88].

Para a maioria das técnicas analíticas 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 e b é a inclinação da reta. Idealmente, a não deve ser estatisticamente diferente de zero e b deve ser reprodutível. A regressão linear deve também ter alto coeficiente de correlação ($r > 0,99$) [88].

I.6.2. Linearidade

A linearidade de um método é a sua capacidade de produzir resultados que são diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do soluto na amostra, dentro de uma determinada faixa [88].

I.6.3. 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) foi calculada através da equação (8) [87]:

$$R = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \cdot 100 \quad (8)$$

I.6.4. 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 (9) [87,88]:

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

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 e utilizando o mesmo instrumento [86].

O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da equação (10) [86-88]:

$$RSD = \frac{s}{x_m} \cdot 100 \quad (10)$$

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto

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

x_i = valores individuais

x_m = média das medidas em replicatas

N = número de medidas

1.6.5. Sensibilidade (Limite de Detecção e de Quantificação)

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração de soluto detectada pelo método em estudo e é geralmente expresso em unidades de concentração [83].

O limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração de soluto que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis nas condições

experimentais e também é geralmente expresso em unidades de concentração [83].

Neste estudo os LOQ e LOD foram determinados baseando-se na definição de Francotte et al., e podem ser calculados empregando as equações (11) e (12) [83] :

$$\text{LOD} = (C_s \cdot 2h_n) / h_s \quad (11)$$

$$\text{LOQ} = (C_s \cdot 6h_n) / h_s \quad (12)$$

onde:

C_s = concentração do analito

h_s = altura do pico do analito (h_s deve ser 2 a 10 vezes maior que h_n)

h_n = maior desvio da linha base medido no t_R do analito numa faixa de 10 wh (largura do pico a meia-altura)

A figura 2 ilustra as medidas dos parâmetros utilizados nos cálculos de LOQ e LOD.

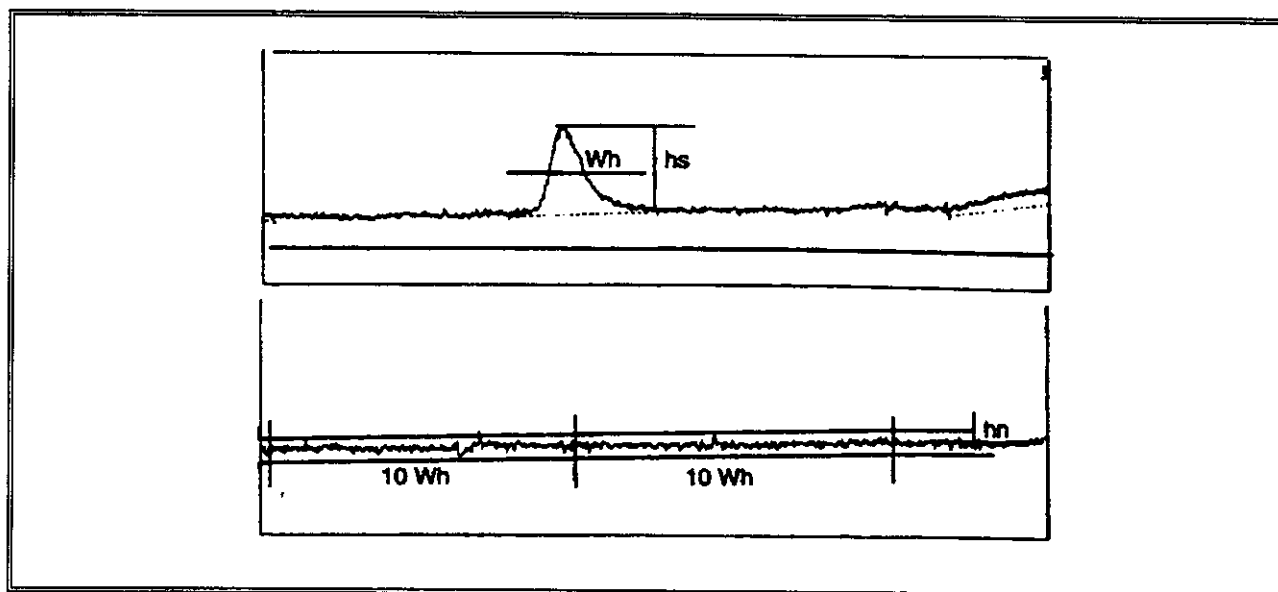


Figura 2. Medidas de LOD e LOQ [83].

I.6.6. Robustez

A robustez de um método analítico corresponde aos estudos que indicam o grau de confiabilidade do ensaio perante a 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 [78].

CAPÍTULO II

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo primordial o desenvolvimento de um método, por CLAE, simples, rápido e eficiente, para análise simultânea de multirresíduos dos herbicidas: bentazona; 2,4-D; cianazina; simazina; ácido fluazifop; atrazina; diuron; linuron e ametrin, presentes em matrizes de água.

Para atingir o objetivo proposto, este trabalho foi dividido em quatro etapas:

- a) selecionar as melhores condições cromatográficas de separação dos herbicidas, estudando pH, vazão e composição de fase móvel (FM);
- b) desenvolver o método de extração em fase sólida, utilizando tubos de extração recheados com C-18, para extrair e enriquecer traços dos herbicidas estudados;
- c) realizar a validação do método desenvolvido, abrangendo a etapa de extração e pré-concentração, realizadas utilizando EFS, e a separação, identificação e quantificação dos herbicidas, realizadas através de CLAE;
- d) aplicar o método desenvolvido para análise de água potável de diferentes fontes: filtro doméstico e água proveniente de uma lavoura da região de Campinas, após irrigação, a fim de verificar a sua eficiência.

CAPÍTULO III

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiais e Métodos

III.1.1. Reagentes e Solventes

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

- Metanol - grau cromatográfico, Mallinckrodt e Ominosolv (Merck).
- Ácido Fosfórico - PA, Synth.
- Cloreto de Sódio - PA, Mallinckrodt.
- Água Milli-Q, sistema Millipore.
- Ácido Acético Glacial - grau cromatográfico, Mallinckrodt.
- Acetato de Sódio - PA, Carlo Erba.
- Ácido Sulfúrico - PA, CPQ (Cromato Produtos Químicos).
- Amostra sintética: acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; todos PA.

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

III.1.2. Herbicidas Seleccionados

Os herbicidas seleccionados para este estudo estão listados na tabela 1, juntamente com os respectivos fornecedores, grau de pureza e a família química.

Tabela 1. Herbicidas, fornecedores, grau de pureza e família.

HERBICIDA	FORNECEDORES	GRAU DE PUREZA (%)	FAMÍLIA [71-73]
bentazona	Basf	99,9	tiodiazina
ác. fluazifop	Zeneca	97,4	aril-oxi-fenóxi- ácido
2,4-D	Dow	+ 99	fenoxiacético
cianazina	Cyanamid	98,0	triazina
simazina	Novartis	98,3	triazina
atrazina	Novartis	97,7	triazina
ametrin	Novartis	96,8	triazina
linuron	Hoescht	99,5	uréia substituída
diuron	Du Pont	99,27	uréia substituída

OBS: Todos os padrões dos herbicidas foram estocados em geladeira.

III.1.3. Gás Empregado

- Nitrogênio, 99,999% de pureza, super seco, Aga.

III.1.4. 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, 20 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.

III.1.5. Cartuchos e Tubos de Extração em Fase Sólida

- Cartuchos de EFS, 500 mg Sep-Pak C-18, Waters.
- Tubos de EFS, tipo coluna, Supelclean™ Envi C-18, de 500 mg, Supelco.

III.1.6. Equipamentos

- Cromatógrafo a Líquido marca Waters, composto por:
 - Bomba de alta pressão, recíproca, tipo pistão cabeça dupla, modelo 510
 - injetor Rheodyne, 7725i, com alça amostradora de 10 μL
 - detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis de comprimento de onda variável, caminho ótico de 10 mm, modelo 486-Tunable Absorbance Detector

- detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, caminho ótico de 10 mm, modelo 991.
- Computador IBM Pentium de 90 MHz, contendo placa DT 2804 e sistema Chrom Perfect instalados para aquisição e tratamento de dados cromatográficos.
- Cromatógrafo a Líquido HP Series II/M constituído por:
 - Bomba de alta pressão, recíproca, tipo pistão cabeça dupla, modelo DR5;
 - Injetor automático com volume de injeção variável de até 25 μL ;
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, cela de 8 μL de volume, modelo 1090;
 - sistema de aquisição de dados ChemStation, série Pascal.
- Espectrofotômetro por Arranjo de Diodos HP 8452A, acoplado ao sistema de aquisição de dados HP 89532A UV-Vis RevA.
- Bomba de vácuo - Primar, modelo 141.
- Bomba Dosadora Peristáltica - Millan.
- Banho Ultrassônico - Thornton, modelo T14.
- pHmetro, DM 21 - Digimed, utilizado com os seguintes eletrodos:
 - Eletrodo de vidro combinado, Digimed
 - Eletrodo Termocompensador, Digimed

III.2. Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Herbicidas

III.2.1. Estudo da Vazão Ótima da Coluna Cromatográfica

Foi feito um estudo da vazão ótima da coluna através da construção da Curva de van Deemter, obtida traçando-se $H \times \mu$, que foram calculados variando-se a vazão de fase móvel, no intervalo de 0,2 a 0,6 mL/min.

Juntamente com o valor de vazão ótima, obtido pela curva de van Deemter, também foram consideradas a pressão e o tempo de análise na escolha da melhor vazão.

Neste estudo de determinação da vazão ótima foi utilizada uma amostra sintética composta por acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. O comprimento de onda empregado foi de 254 nm, FM MeOH:H₂O 70:30, v/v e volume de injeção de 10 μ L.

III.2.2. Estudo da Fase Móvel

Para realizar a separação dos herbicidas selecionados foram estudadas as seguintes composições de FM MeOH/H₂O: 50/50, v/v; 60/40, v/v; e 70/30, v/v.

Estas FM tiveram o pH variado para verificar a influência desta variável na separação dos herbicidas. Assim, foram estudadas FM nos seguintes valores de pH: 6,0 - 7,0 (sem adição de ácido), 3,0 - 4,6 (com adição de ácido acético ou fosfórico). Os pH foram medidos com o auxílio de um pHmetro, calibrado com soluções tampão de pH 4,01 e 7,01 ($\pm 0,01$, a 25 °C - Hanna Instruments).

Também foi empregada uma FM 50% MeOH: 50% tampão HAc:NaAc (pH 3,8).

Durante todo estudo, a ordem de eluição e identificação dos picos dos herbicidas foi feita comparando-se os t_R , tempo de retenção, dos picos na

mistura com os t_R dos picos dos padrões, injetados isoladamente. No caso de dúvidas, foi feita a adição do padrão referente ao pico que se queria identificar na mistura completa, assim se o pico em questão aumentasse de tamanho sua identidade estava confirmada, ou seja, foi feita a co-cromatografia.

III.3. Avaliação da Separação Cromatográfica

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos herbicidas foram: fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α). Eles foram calculados a partir de valores extraídos dos cromatogramas, utilizando as equações definidas no capítulo I, item I.5.

III.4. Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos Herbicidas

Para obtenção dos espectros de absorção no UV injetou-se uma mistura dos herbicidas selecionados em um cromatógrafo a líquido HP acoplado com detector de arranjo de diodos. Deste modo foi possível obter os espectros de todos os solutos, exceto do ácido fluazifop, devido a problemas de aquisição de dados e de intensidade do pico.

Com este detector também realizou-se a confirmação da pureza dos picos dos padrões. Para isto, compararam-se os espectros UV obtidos em três diferentes pontos do pico cromatográfico: no início, no topo e no fim. Se os espectros destes três pontos fossem coincidentes o pico era considerado puro.

Também foram feitas aquisições de espectro de absorção UV utilizando o detector de arranjo de diodos Waters acoplado ao sistema Waters utilizado nos demais experimentos. Com este sistema, além dos espectros UV de todos os herbicidas em estudo, em duas e três dimensões, também obteve-se a pureza dos picos. Nestes experimentos a FM utilizada foi MeOH:H₂O 60:40, v/v (pH=4,6,

com ácido fosfórico), a vazão foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção foi de 25 μ L.

III.5. Medida de Absortividade Molar (ϵ) dos Herbicidas

Com o uso do espectrofotômetro por arranjo de diodos foi obtido o espectro de absorção no UV, na faixa de 190 a 450 nm, dos herbicidas em estudo. Para isto foram usados os padrões dos herbicidas preparados nas concentrações de 10 a 1000 μ g/L, exceto para o ácido fluazifop, cuja faixa de concentração variou de 1000 a 100000 μ g/L. A finalidade deste estudo foi determinar a absortividade molar dos herbicidas e assim ter mais uma informação sobre a sensibilidade do método, também determinada pela inclinação da curva analítica.

O caminho ótico, b, utilizado foi de 10 mm.

III.6. Estudo da Extração em Fase Sólida dos Herbicidas

III.6.1. Utilização de Cartuchos Sep-Pak

Alguns testes preliminares de recuperação foram realizados utilizando-se cartuchos Sep-Pak. Com estes cartuchos testaram-se a recuperação de amostras fortificadas com 0,067 μ g de 2,4-D e atrazina e também realizaram-se testes em branco apenas com água destilada, água Milli-Q e água Milli-Q + ácido sulfúrico + NaCl.

III.6.1.1. Procedimento de Extração

- a) Condiciona-se o cartucho de extração passando-se por ele 10 mL de metanol;
- b) Equilibra-se o cartucho pela passagem de 10 mL de água Milli-Q;

- c) Ajusta-se o pH<2 e a força iônica da amostra aquosa (500 mL) pela adição respectiva de ácido sulfúrico e 10 g de NaCl;
- d) Força-se a amostra a percolar através do cartucho, com o auxílio de uma bomba peristáltica, com vazão de 5 mL/min;
- e) Lava-se o cartucho com 5 mL de água Milli-Q;
- f) Descarta-se o eluato e seca-se o leito adsorvente pela passagem de ar;
- g) Elui-se o analito com metanol*;
- h) Evapora-se o eluato até secar, em capela;
- i) Dissolve-se o resíduo com um volume total de 0,5 mL**.

* Variou-se o volume de metanol em 1 mL, duas frações de 1 mL e 2 mL.

** Utilizaram-se 0,25 mL de metanol + 0,25 mL de FM; 0,5 mL de metanol e 0,5 mL de FM.

III.6.1.2. Regeneração do cartucho

Os cartuchos podem ser regenerados pela passagem de volumes e solventes iguais aos utilizados no condicionamento e equilíbrio dos cartuchos.

III.6.2. Utilização de Tubos de Extração

A figura 3 apresenta um esquema do sistema utilizado na EFS, realizada em duplicata. A figura 4 apresenta um esquema das quatro etapas de EFS.

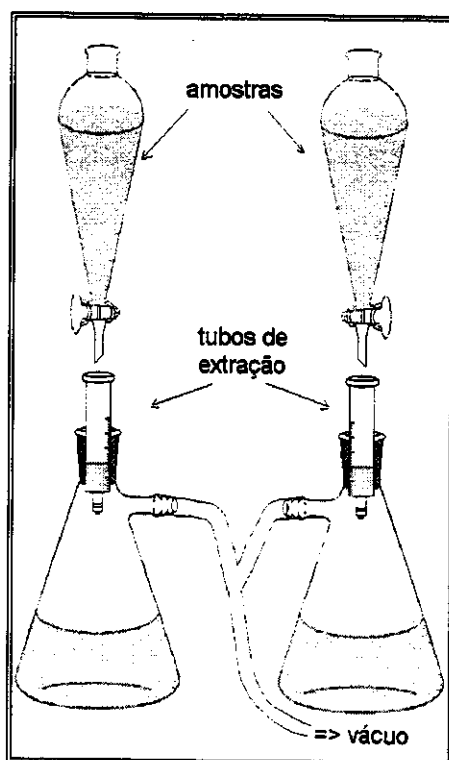


Figura 3. Esquema do sistema utilizado na extração em fase sólida, em duplicata.

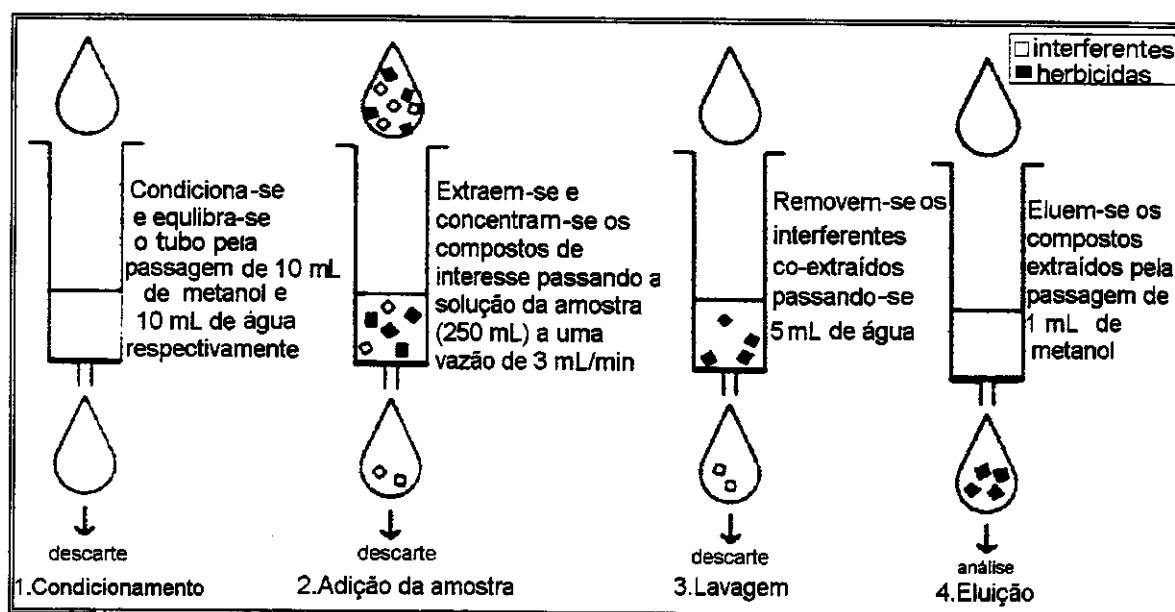


Figura 4. Esquema das etapas de extração.

Com os tubos de extração realizaram-se testes de recuperação com as amostras aquosas fortificadas com todos os herbicidas em estudo. Também fizeram-se testes em branco com água Milli-Q + ácido fosfórico + NaCl.

Seguiram-se os mesmos procedimentos descritos para o uso do cartucho Sep-Pak, com a modificação que para percolar a amostra foi adaptado um sistema de extração, que utiliza uma bomba de vácuo. Este sistema foi modificado para permitir a extração simultânea de duas amostras (figura 3).

Outras modificações realizadas foram a variação do nível de fortificação, 0,067 e 0,33 μg , a utilização de um volume de amostra de água de 500 mL e de 250 mL, e a substituição do ácido sulfúrico pelo fosfórico, devido às mudanças ocorridas na FM.

Evaporou-se o eluato em cuba fechada, com passagem suave de corrente de N_2 .

III.7. Validação do Método de Determinação de Herbicidas em Amostras Aquosas

Definida as melhores condições de separação dos herbicidas, a composição da FM MeOH:H₂O 60:40 v/v (pH= 4,6 - com adição de ácido fosfórico) e o comprimento de onda de 230 nm (0,001 AUFS) , o passo seguinte foi a validação do método para a análise da bentazona; 2,4-D; cianazina; simazina; ácido fluazifop; atrazina; diuron; linuron e ametrin, segundo os parâmetros que são descritos a seguir.

III.7.1. Preparo das Soluções

Prepararam-se 100,0 mL de solução estoque dos herbicidas, em metanol, com concentração da ordem de $1 \cdot 10^5 \mu\text{g/L}$. A partir desta, prepararam-se os padrões nas concentrações de aproximadamente 10; 50; 250; 500; 750 e 1000

$\mu\text{g/L}$, diluídas na FM para que o pico do metanol não interferisse. Apenas para o ácido fluazifop as concentrações dos padrões preparadas foram de 1000, 5000, 25000, 75000 e 100000 $\mu\text{g/L}$, por este apresentar uma menor sensibilidade. Estas soluções foram estocadas em geladeira a 4 °C.

III.7.2. Curva Analítica

Obteve-se a curva analítica dos herbicidas na faixa de 10 a 1000 $\mu\text{g/L}$. Injetaram-se 10 μL de cada padrão, pelo menos três vezes, e obtiveram-se as áreas e as alturas dos picos com o uso do software Chrom Perfect. Os dados foram adquiridos a uma taxa de 15 pontos /seg para que o pico fosse definido com um mínimo de 30 a 50 pontos e assim garantisse uma integração do pico com menor erro, sem comprometer demasiadamente os limites de detecção e quantificação, devido ao aumento do ruído.

Traçaram-se as curvas colocando os valores de concentração dos herbicidas no eixo das abcissas e as médias das áreas ou das alturas no eixo das ordenadas e calcularam-se as respectivas estimativas de desvio padrão absoluto e as estimativas de desvio padrão relativo.

As curvas analíticas foram traçadas com o auxílio do programa Origin 3.5, o qual forneceu os coeficientes de correlação das retas obtidas, os coeficientes lineares e angulares e as respectivas estimativas de desvio padrão, com as quais se pode julgar se os coeficientes eram estatisticamente significativos (teste t-Student) e se o modelo linear era válido.

III.7.3. Linearidade

Através da curva analítica obtida na faixa de três ordens de magnitude de concentração dos herbicidas (10 a 1000,0 $\mu\text{g/L}$), avaliou-se a linearidade do método. No caso de dúvida, se um ponto encontrava-se ou não dentro da região

linear da curva, foi feito o teste da razão entre o sinal (área) e a concentração, definida por $(S/Q_i) = (S_i - b) / Q_i$; onde a razão sinal/concentração para o i-ésimo ponto da curva analítica, $(S/Q)_i$, é calculada a partir do correspondente sinal medido S_i , da concentração Q_i correspondente e do intercepto da curva analítica a . A definição exata dos valores S e Q depende da técnica analítica; no caso de cromatografia a curva analítica é construída através dos parâmetros área do pico e concentração [89].

III.7.4. Recuperação

Este teste foi feito individualmente para amostras sintéticas de água Milli-Q (250 mL) fortificadas com cerca de 0,33 μg de solução estoque de cada herbicida em estudo.

Também foi realizado um teste de recuperação fortificando uma amostra de água Milli-Q com todos os herbicidas juntos, cada um em quantidade aproximada de 0,33 μg .

III.7.5. Exatidão e Precisão

No estudo da exatidão utilizaram-se amostras das soluções padrão dos herbicidas analisadas cromatograficamente. Os valores de massa obtidos após extração em tubos de extração foram chamados "valor obtido", e o "valor real" foi aquele adicionado na fortificação.

O estudo da repetibilidade foi feito para três ou cinco injeções de diferentes padrões dos herbicidas. Também foi avaliada a precisão do método de extração através da realização do mesmo em duplicatas.

III.7.6. Sensibilidade

A sensibilidade do método, em relação aos herbicidas, foi avaliada através da determinação do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) de cada um dos herbicidas estudados.

Na determinação destes parâmetros existem várias definições feitas por diferentes autores. No presente trabalho foi utilizado a definição de Francotte et al. (1996) [83].

III.7.7. Robustez

O teste de robustez foi realizado pela técnica Priscila Andrade da Silva, no laboratório de Cromatografia da Central Analítica (IQ/UNICAMP), utilizando o cromatógrafo a líquido Waters, constituído por:

- ✓ bomba de alta pressão, recíproca, tipo pistão de cabeça dupla, modelo 600 E;
- ✓ detector espectrofotométrico UV/Vis de comprimento de onda variável, com caminho ótico de 10 mm, modelo 484;
- ✓ injetor U6K, com volume de injeção de 10 μ L;
- ✓ integrador modelo 746.

As colunas analítica e de guarda utilizadas eram de marca e dimensões idênticas as do presente trabalho, porém pertencente ao laboratório de Cromatografia da Central Analítica. As demais condições cromatográficas (comprimento de onda, FM, vazão de FM e volume de injeção) foram idênticas as otimizadas no desenvolvimento do método.

III.8. Aplicação do Método Desenvolvido

Para verificar a aplicabilidade do método de extração, enriquecimento, separação e quantificação desenvolvido, utilizaram-se amostras reais de água.

Uma amostra foi recolhida de filtro doméstico, tipo talha com vela e suporte de barro. Foram recolhidos 500 mL desta amostra, que foi sujeita ao método desenvolvido, utilizando a EFS e CLAE com detector de arranjo de diodos e com detector UV.

Uma outra amostra foi recolhida de uma lavoura na região de Barão Geraldo, na qual é sabido que se utilizam herbicidas. Foi recolhida a água acumulada em uma valeta após a irrigação da lavoura com água proveniente de uma torneira. A amostra de água primeiramente filtrada em filtro analítico para eliminar resíduos de solo e impurezas sólidas nela contida, e depois em membrana de nylon Rainin (0,45 μm), sendo que mesmo após este tratamento a água permaneceu com cor castanha. Após este tratamento prévio, a amostra foi submetida a EFS. Os tubos de extração ficaram castanhos e o eluato ficou incolor. Os resíduos dos tubos de extração foram eluidos com metanol, seguindo o procedimento já descrito, resultando em um resíduo castanho, que foi injetado no cromatógrafo a líquido.

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Estudo das Condições Cromatográficas de Separação dos Herbicidas

IV.1.1. Estudo da Vazão Ótima da Coluna Cromatográfica

O fabricante da coluna cromatográfica sugere o uso da vazão de 1,0 mL/min, mas de acordo com a curva de van Deemter (Figura 5), obtida para a coluna analítica empregada, as melhores eficiências foram conseguidas com vazões mais baixas, sendo a vazão ótima de 0,2 mL/min.

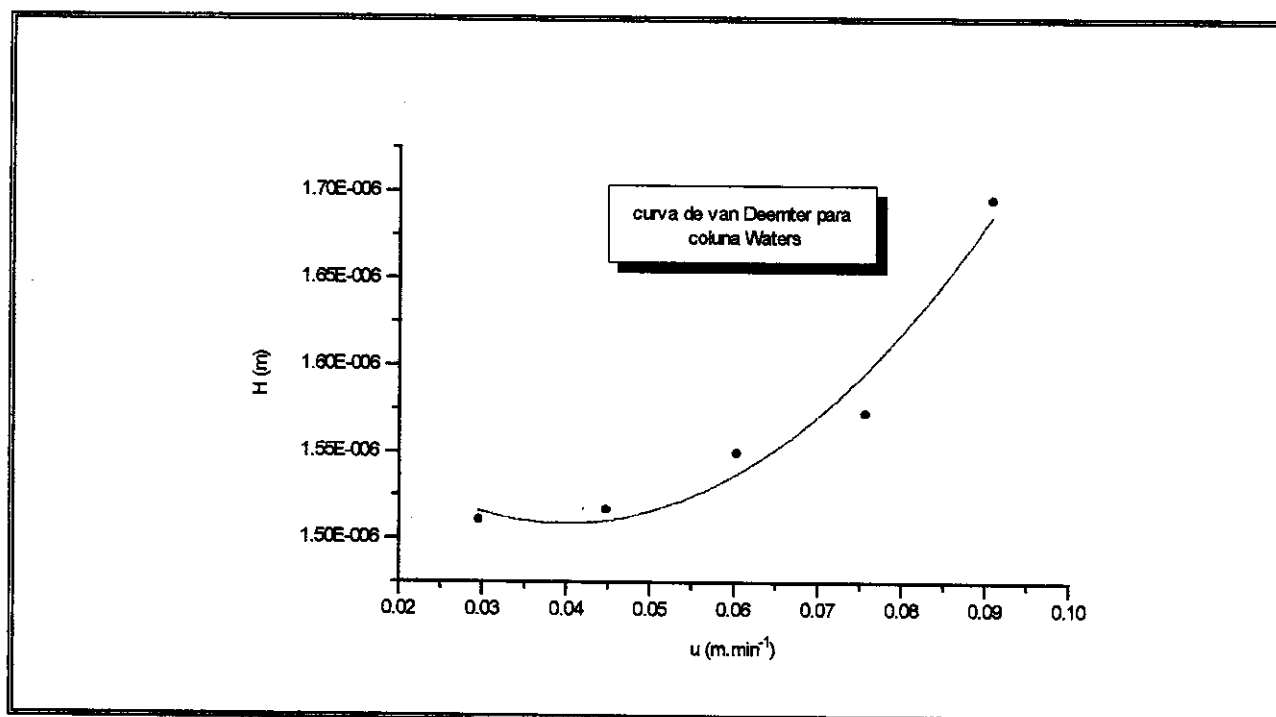


Figura 5. Curva de van Deemter obtida para a coluna analítica Nova-Pak, Waters C-18, 4 μ m, de 150 x 3,9 mm d.i..

Para selecionar a melhor vazão a ser empregada na separação cromatográfica dos herbicidas estudados analisaram-se também as pressões, obtidas a diferentes vazões, e os tempos de análise da mistura dos herbicidas.

Desta forma concluiu-se que a melhor vazão a ser utilizada é de 0,8 mL/min, pois permite separações com pressões de ~1500 psi (~ 10,3 MPa) e tempos de análise (~ 14 min) adequados, sem grande perda da eficiência da coluna.

IV.1.2 - Estudo da Fase Móvel

Primeiramente foi definida a melhor composição da FM MeOH:H₂O. Analisando os cromatogramas obtidos, figura 6, com as diferentes composições de FM MeOH:H₂O 50:50; 60:40 e 70:30, v/v, determinou-se que a melhor composição da FM é a MeOH:H₂O 60:40, v/v, pois com a 50:50 v/v a separação entre a maioria dos picos é excessiva e praticamente não se detectou o ametrin, o último composto a ser eluído. Com 70:30 v/v não se tem resolução suficiente entre alguns herbicidas.

As diferentes composições de FM foram testadas alterando o pH de 6,0 a 7,0 (FM sem adição de ácido) para pH de 3,0 a 4,6. As figuras 7a, 7b e 7c apresentam os cromatogramas obtidos utilizando-se as FM MeOH:H₂O 50:50, v/v pH=4,6; MeOH:H₂O 60:40, v/v pH=4,6 e MeOH:H₂O 70:30, v/v pH= 3,6. Nota-se que a ordem de eluição altera bastante com pequenas mudanças de pH. Isto acontece pois os compostos mais ácidos como a bentazona, o 2,4-D e o ácido fluazifop passam a ter diferentes interações com a FM e a FE, uma vez que ocorre supressão iônica das respectivas dissociações. Quando o pH da FM torna-se menor, os compostos ácidos passam a ter maiores interações com a fase estacionária e tendem a ficar mais tempo retidos na FE. Uma diminuição do pH da FM é indispensável para a análise, pois com FM neutras ou quase neutras os compostos ácidos praticamente não têm retenção na coluna, saindo muito próximos ao tempo de retenção de um composto não retido (t_M), medido para o pico do metanol. Neste trabalho, t_M foi calculado através do volume da coluna: $V_M = V_{col} / 2 = L \cdot \pi \cdot r^2 / 2$, onde L = comprimento da coluna = 15 cm, r = raio da coluna = 0,195 cm $\Rightarrow t_M = V_M / F = 1,12$ min [90].

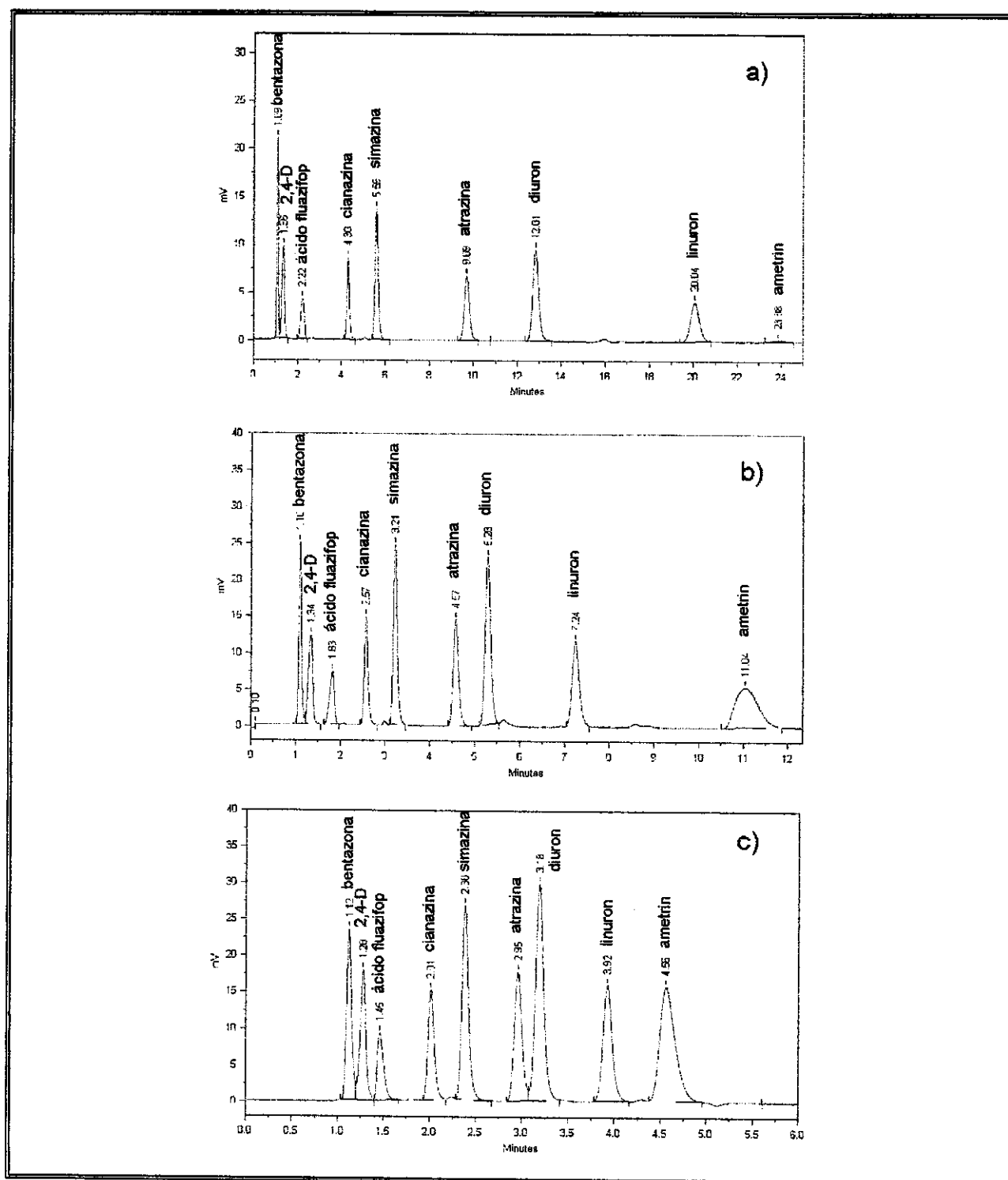


Figura 6. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de herbicidas. F= 0,8 mL/min; volume de injeção= 10 μ L; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). a) FM MeOH:H₂O 50:50, v/v; b) FM MeOH:H₂O 60:40, v/v e c) FM MeOH:H₂O 70:30, v/v, sem adição de ácido.

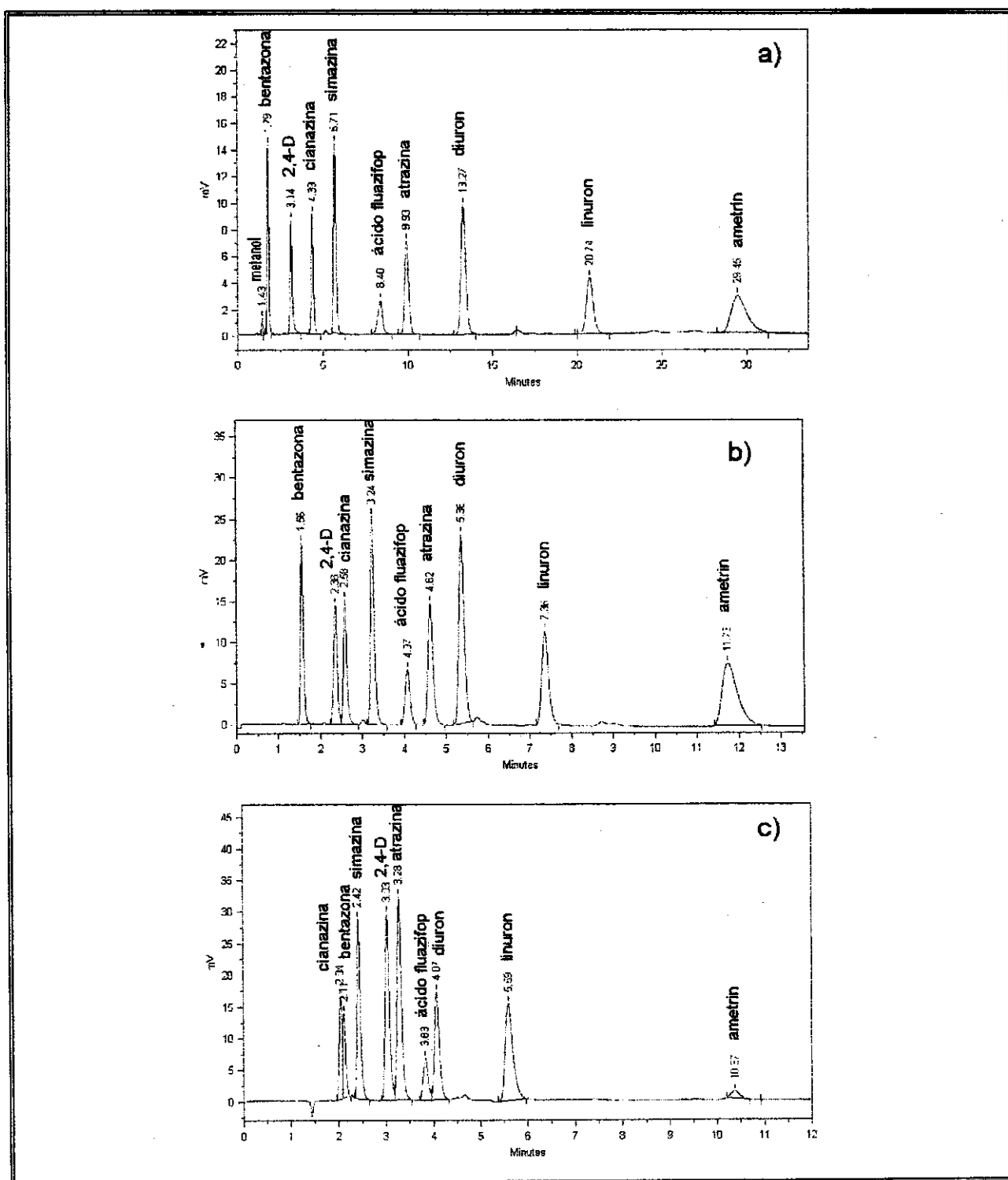


Figura 7. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de herbicidas. $F = 0,8$ mL/min; volume de injeção = $10 \mu\text{L}$; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). a) FM MeOH:H₂O 50:50, v/v pH=4,6; b) FM MeOH:H₂O 60:40, v/v pH=4,6 e c) FM MeOH:H₂O 70:30, v/v, pH=3,6.

Determinou-se que a composição mais adequada de FM foi MeOH:H₂O 60:40, v/v e o pH que forneceu uma eluição com melhor performance cromatográfica dos nove herbicidas foi pH=4,6, ajustado com ácido fosfórico. Caso não haja preocupação de tempo de análise (~30 min.), a FM MeOH:H₂O 50:50, v/v pH=4,6 também forneceu ótimos resultados. Para a FM MeOH:H₂O 70:30, v/v pH=3,6 os resultados obtidos foram os piores, mostrando que esta composição de FM não é adequada e que um valor baixo de pH não forneceu bons parâmetros cromatográficos, pois reduziu a resolução.

Para o ajuste das FM ácidas optou-se pelo ácido fosfórico ao invés do acético, pois, pelo espectrograma dos ácidos (figura 8), observa-se que o ácido fosfórico apresenta uma absorção muito menor que a do ácido acético e, além disto, como o ácido fosfórico é mais forte, 0,1% deste é capaz de acidificar uma amostra, enquanto se precisa de 1% do ácido acético para obter-se o mesmo pH.

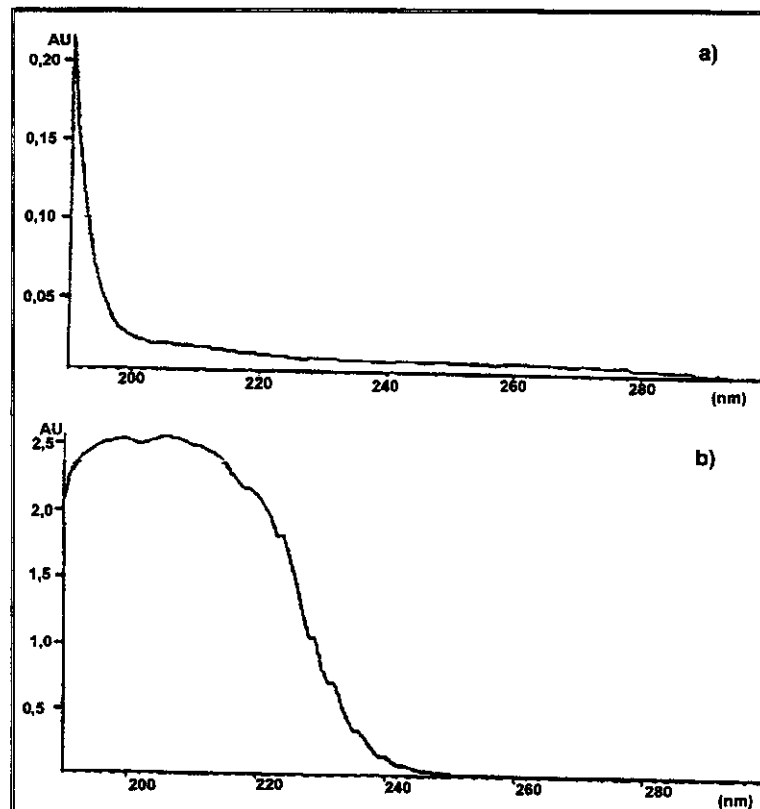


Figura 8. Espectrogramas: a) ácido fosfórico 0,1%; b) ácido acético 1% [90].

Verificou-se se a medida de pH de uma solução contendo grande quantidade de solvente orgânico, como o da FM empregada, forneceria valores confiáveis. Para isto mediu-se o pH de amostras contendo somente água, água e metanol e somente metanol, com iguais concentrações de ácido fosfórico. Observou-se que, no caso de amostras contendo somente metanol, o valor de pH medido é ligeiramente superior ao valor obtido para a mesma concentração de ácido em uma amostra contendo somente água. Para amostras contendo 50, 60 ou 70% de metanol não há diferença significativa no valor de pH quando comparada com uma amostra de água pura. Assim, decidiu-se ajustar o pH após preparar a mistura de metanol/ água.

O uso da FM 50% MeOH: 50% tampão HAc / NaAc pH 3,8 (figura 9) resultou em uma separação muito boa, fornecendo boa resolução para todos os picos porém, o uso desta FM não é conveniente para amostras muito diluídas, como é o presente caso, já que com o tampão a sensibilidade é menor. Isto ocorre, pois a FM contendo tampão tem uma absorbância muito grande e além disto, com o tampão a linha base apresenta-se com maior ruído. Outra desvantagem que o uso de FM contendo tampão apresenta é que a presença do sal (NaAc) é indesejável, pois não se pode parar esta FM no sistema e, depois de cada análise, é necessário lavar todo o sistema com metanol (aproximadamente 10 mL) e depois com água durante toda a noite, a uma vazão de 0,2 mL/min. O sistema deve ser bem lavado para evitar que o sal encruste e assim obstrua o sistema cromatográfico e provoque danos na bomba de alta pressão.

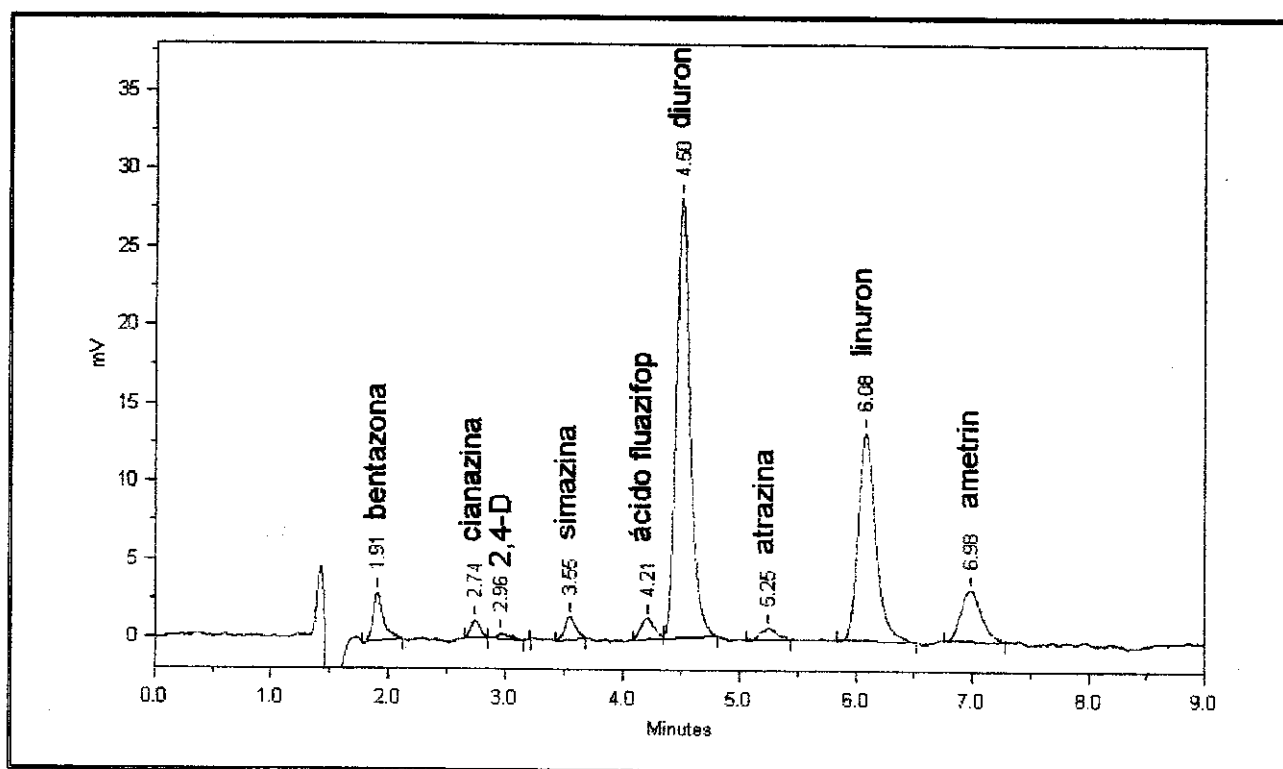


Figura 9. Cromatograma obtido para a separação da mistura de herbicidas. FM 50% MeOH : 50% HAc/NaAc, v/v pH=3,8, F= 0,8 mL/min, volume de injeção= 10 μ L; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS).

O pico negativo que aparece na figura 9 ocorre devido a menor absorção do solvente (MeOH:H₂O 60:40, v/v) da amostra de herbicidas, em relação à FM 50% MeOH : 50% HAc/NaAc, v/v.

IV.2. Avaliação da Separação Cromatográfica

A tabela 2 apresenta os valores de t_R , k , R_s e α obtidos para a separação da mistura de herbicidas, utilizando as melhores condições cromatográficas, FM MeOH:H₂O 60:40, v/v pH= 4,6 e F= 0,8 mL/min.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos t_R , k , R_s e α obtidos para a separação de herbicidas nas melhores condições cromatográficas (cromatograma da figura 7b).

HERBICIDA	t_R (min)	k	R_s	α
bentazona	1,58	0,444	2,38	2,61
2,4-D	2,36	1,15		
cianazina	2,58	1,35	1,50	1,17
simazina	3,24	1,95	2,21	1,44
ác. fluazifop	4,07	2,70	4,52	1,38
atrazina	4,62	3,20	2,57	1,19
diuron	5,36	3,87	3,34	1,21
linuron	7,36	5,69	2,88	1,47
ametrin	11,7	9,66	3,76	1,70

Obs: $t_M = 1,12$ min.

Analisando os resultados da tabela 2 observa-se que os valores de k , R_s e α são bons para todos os herbicidas, estando dentro dos intervalos ideais descritos na literatura. O único parâmetro que está um pouco abaixo do recomendado é o k para a bentazona, entretanto ele não afetou os resultados de validação, uma vez que a precisão e exatidão obtidas para este herbicida foram boas. Portanto, a análise da mistura de herbicidas nas condições cromatográficas selecionadas apresenta boa retenção, resolução e seletividade.

IV.3. Análise da Retenção e Comportamento Cromatográfico dos Herbicidas

O grupo SO_2 , juntamente com os dois nitrogênios e o oxigênio (item I.5), conferem a bentazona um caráter ácido, pois tornam o hidrogênio (do grupo -NH) bastante lábil. O 2,4-D e o ácido fluazifop apresentam caráter ácido devido

ao grupo carboxílico (-COOH) presente na estrutura destes herbicidas (item I.5). Portanto, a ordem de eluição destes três herbicidas é governada pelo pH da fase móvel e pelo seus respectivos valores de pKa. Dessa forma, os herbicidas bentazona; 2,4-D e ácido fluazifop, por possuírem caráter ácido e iônico, apresentam pouca retenção na coluna cromatográfica C-18, sendo que esta retenção aumenta a medida que eles estiverem na forma não dissociada. Assim, um ajuste de pH é responsável por grandes variações na retenção destes compostos, e um valor de pH menor que o pKa destes herbicidas é necessário para garantir que eles estejam na forma não dissociada.

As propriedades físico-químicas das triazinas (cianazina, simazina, atrazina e ametrin) são, em primeiro lugar, determinadas pelo substituinte em -R₁ (figura 10). Se este for -Cl o nome comercial do herbicida termina em -azina, se for -SCH₃ termina em -trin e se for -OCH₃ termina em -ton. A basicidade destes herbicidas aumenta de acordo com estes substituintes: -Cl < -SCH₃ < -OCH₃. As substituições nas posições 4 e 6 afetam menos a basicidade, que aumenta com o aumento do número de H no grupo amino substituinte e com o comprimento da cadeia alquil [45].

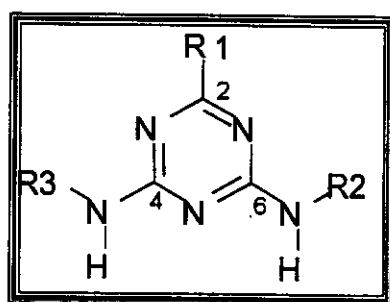


Figura 10. Estrutura básica das triazinas: heterociclo de três membros com N localizados simetricamente. Quando R₁= Cl, tem-se Cl-triazinas; R₁= SCH₃, tem-se S-triazinas.

O efeito indutivo (-I) mais forte do íon Cl^- (substituinte R_1 da cianazina, simazina e atrazina), na posição 2, em relação ao grupo -SCH_3 (substituinte R_1 do ametrin), gera um aumento na densidade de carga no anel da triazina, em particular no átomo de N da posição 1 e 3, fazendo com que a espécie fique mais polar e com menor afinidade pela fase estacionária. Assim, as Cl-triazinas têm menor retenção que as S-triazinas, concordando com o que foi observado na prática: cianazina, simazina e atrazina apresentaram menor valor de k (menor retenção) que o ametrin [31].

Comparando diferentes compostos com o mesmo substituinte -R_1 , o valor de k pode ser explicado considerando a estrutura dos grupos nas posições 4 e 6. Assim, os valores de k para as Cl-triazinas mostram a seqüência: cianazina < simazina < atrazina, na qual a cianazina tem o menor valor de retenção devido ao substituinte $\text{-NHCH(CH}_3\text{)CN}$, que é um grupo polar por causa da presença do -CN [31].

Os valores de pK_a mostram que há uma protonação significativa em $\text{pH} < 2$ para Cl-triazinas, e em $\text{pH} < 4$ para S-triazinas. Portanto, no caso da FM usada, de $\text{pH} = 4,6$, não deve ocorrer protonação para nenhuma das triazinas estudadas. Porém, os valores de pH influenciam outros parâmetros, como a resolução, sendo que, de acordo com o valor de pK_a , o efeito do pH é maior para as S-triazinas. Isto também é confirmado pelo valor de assimetria dos picos, pois S-triazinas mostram maior assimetria em pH ácidos de FM [31].

IV.4. Obtenção dos Espectros de Absorção no UV dos Herbicidas

A figura 11 apresenta os espectros de absorção no UV, obtidos na faixa de 220 a 400 nm, para todos os herbicidas estudados, utilizando para tal um detector por arranjo de diodos.

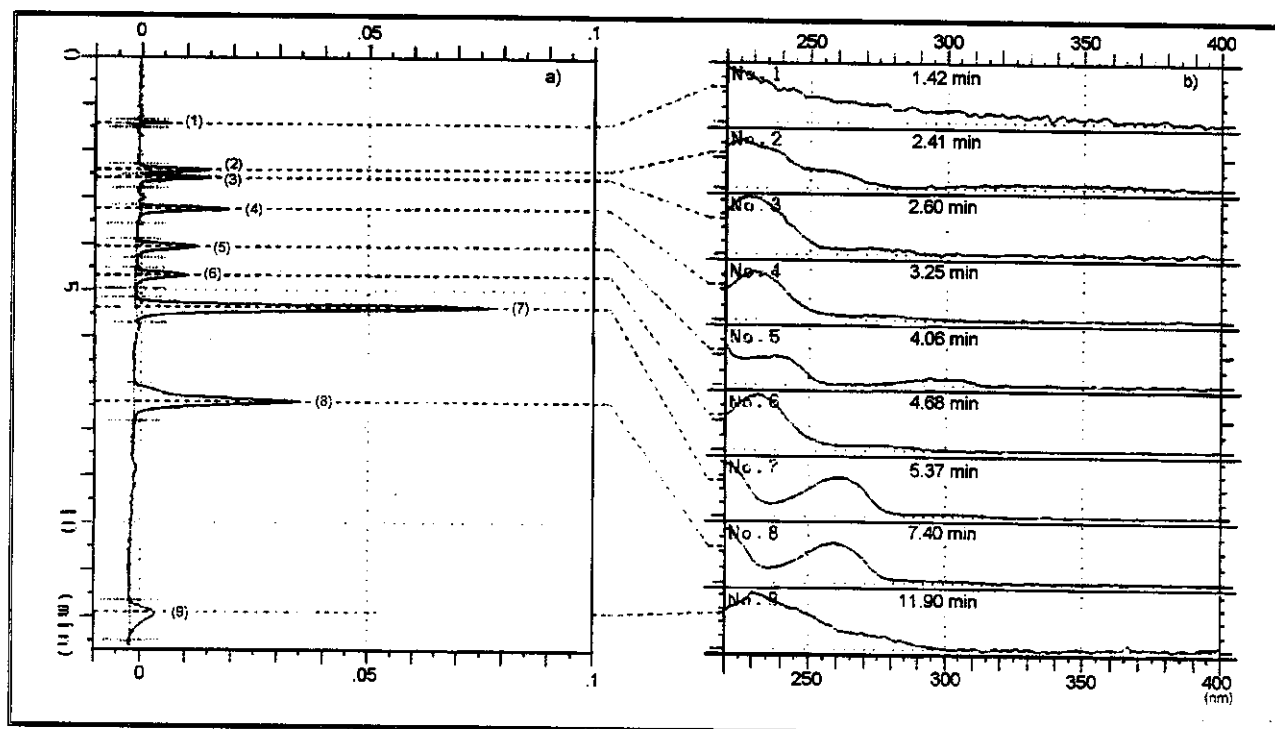


Figura 11. a) Cromatograma obtido para a mistura de herbicidas mostrando b) os respectivos espectros de absorção UV. FM MeOH:H₂O 60:40, v/v pH=4,6 (H₃PO₄); F= 0,8 mL/min ; volume de injeção = 10 µL; detecção UV, 230 nm (0.001 AUFS). Picos: 1= bentazona, 2= 2,4D, 3= cianazina, 4= simazina, 5= ácido fluazifop, 6= atrazina, 7= diuron, 8= linuron, 9= ametrin.

Analisando os espectros de absorção no UV observa-se que 230 nm é o melhor comprimento de onda para detectar todos os herbicidas presentes em uma mesma amostra. Observa-se também que os herbicidas pertencentes a uma mesma família, como por exemplo triazinas: simazina, atrazina, cianazina e ametrin, e uréias substituídas: diuron e linuron, apresentam espectros bem semelhantes.

A análise de pureza dos padrões confirmou a pureza dos mesmos.

IV.5. Medida de Absortividade Molar dos Herbicidas

Tendo os valores medidos para absorvância dos diferentes herbicidas em concentrações variadas e utilizando a Lei de Beer, $Abs = conc \times b \times \epsilon$, traçou-se uma curva de absorvância versus concentração, cujo coeficiente angular é igual a $b \cdot \epsilon$, sendo $b = 10$ mm. Considerando que as soluções padrão dos herbicidas eram puras, pode-se aproximar que o ϵ é a absortividade molar dos herbicidas em estudo. A tabela 3 apresenta estes valores.

Tabela 3. Valores de ϵ obtidos para os herbicidas em estudo (230 nm)*.

HERBICIDAS	ϵ (L / mol cm)
bentazona	33642
2,4D	11052
cianazina	33698
simazina	54448
ácido fluazifop	15336
atrazina	40979
diuron	9324
linuron	9964
ametrin	38646

* solvente das soluções dos herbicidas: FM MeOH:H₂O 60:40, v/v pH=4,6.

Analisando os valores da tabela 3 nota-se que a absortividade molar de alguns herbicidas são bem menores que as de outros. Estes valores são concordantes com as inclinações das curvas analíticas obtidas, e dão um bom indicativo da sensibilidade do método para cada herbicida.

O resultado para o ácido fluazifop é discordante, pois ele apresentou a menor sensibilidade cromatográfica, mas não o menor valor de absortividade molar. Isto pode ser explicado pois foi medida a absorção da solução do padrão

do herbicida considerando que o ácido fluazifop fosse a única espécie em solução, porém, o padrão de ácido fluazifop disponível, provavelmente, deve conter uma certa quantidade de fluazifop butil, do qual o ácido fluazifop deriva.

Deve-se lembrar que os valores de absortividade dependem do solvente, da solução e do pH do meio, pois alterando-se estes parâmetros varia-se o cromóforo, estrutura responsável pelo espectro de absorção.

IV.6. Estudo da Extração em Fase Sólida dos Herbicidas

A substituição do ácido sulfúrico por fosfórico não modificou os resultados obtidos na extração, então passou-se a empregar o ácido fosfórico, já que este também foi utilizado na preparação da FM.

A extração da água Milli-Q pura e da água destilada pura mostraram praticamente os mesmos picos desconhecidos. Amostras de água Milli-Q contendo NaCl e ácido, sem os herbicidas, portanto o branco, apresentaram resultados similares aos das águas puras. Isto indica que os picos não identificados devem ser provenientes da própria matriz de água. Tentou-se, sem sucesso, realizar limpezas prévias do tubo de extração e utilizar diferentes solventes de eluição.

Os tubos de extração apresentaram melhores recuperações com o uso de volumes de amostras aquosas de até 250 mL (que corresponde ao volume de "breakthrough" do tubo de extração, isto é, volume máximo de amostra para o qual a eficiência de recuperação permanece inalterada). Assim, passou-se a utilizar volume de amostra de 250 mL e fortificações de 0,3 µg. O aumento do nível de fortificação visou melhorar a quantificação do pico do herbicida obtido após a extração, pois os picos não identificados causavam algumas interferências, principalmente para a bentazona que eluia com t_R pequeno. Esta interferência afetava a quantificação do pico.

O fator de concentração, partindo-se de 250 mL de amostra aquosa e chegando em 0,5 mL no final, é de 500 vezes. Este fator é bastante adequado, pois após fortificação de 0,3 μg , fornece picos que se encontram aproximadamente no centro da curva analítica (entre 500 a 600 $\mu\text{g/L}$) com recuperações próximas a 100%.

IV.7. Validação do Método de Determinação dos Herbicidas em Amostras Aquosas

IV.7.1 - Curva Analítica

A tabela 4 apresenta os resultados das equações das curvas analíticas obtidas para os herbicidas bentazona, 2,4D, cianazina, simazina, ácido fluazifop, atrazina, diuron, linuron e ametrin. A figura 12 mostra as curva analíticas dos herbicidas, menos do ácido fluazifop que foi preparado em uma faixa de concentração diferente.

Analisando as equações das retas obtidas conclui-se que o modelo linear é bastante adequado já que o coeficiente de correlação foi maior que 0,99. Fazendo o teste t-Student para os coeficientes linear e angular obtêm-se coeficientes angulares estatisticamente diferentes de zero, mostrando que a equação obtida é adequada. Este teste realizado para o intercepto da curva, mostra que a não é estatisticamente diferente de zero. Na verdade, para determinar a de maneira adequada teria que se construir uma curva que englobasse a região do zero, como este não foi o caso, é esperado que este parâmetro contenha erro.

Tabela 4. Equações de curvas analíticas obtidas para os herbicidas estudados. FM MeOH:H₂O 60:40, v/v pH=4,6; F= 0,8 mL/min; detecção UV, 230 nm; volume de injeção =10 µL.

HERBICIDAS	FAIXA DE CONC. (µg/L)	INTERCEPTO (a) / 10 ³	INCLINAÇÃO (b)	COEF. DE CORRELAÇÃO
bentazona	13,3-1330,0	(-1,6 ± 0,8)	(71 ± 1)	0,99921
2,4D	14,0-1400,0	(-0,6 ± 0,7)	(29,4 ± 0,9)	0,99871
cianazina	11,1-1110,0	(-0,8 ± 1)	(81 ± 2)	0,99898
simazina	10,5-1050,0	(-1,1 ± 0,9)	(157 ± 2)	0,99981
ác. fluazifop	1320,0-18800,0	(-0,1 ± 0,3)	(0,16 ± 0,01)	0,99880
atrazina	11,2-1120,0	(-0,5 ± 1)	(111 ± 2)	0,99953
diuron	13,2-1320,0	(-0,7 ± 0,5)	(31,2 ± 0,8)	0,99926
linuron	12,2-1220,0	(-0,2 ± 0,2)	(25,9 ± 0,3)	0,99983
ametrin	17,9-1790,0	(-3,5 ± 2)	(89 ± 2)	0,99948

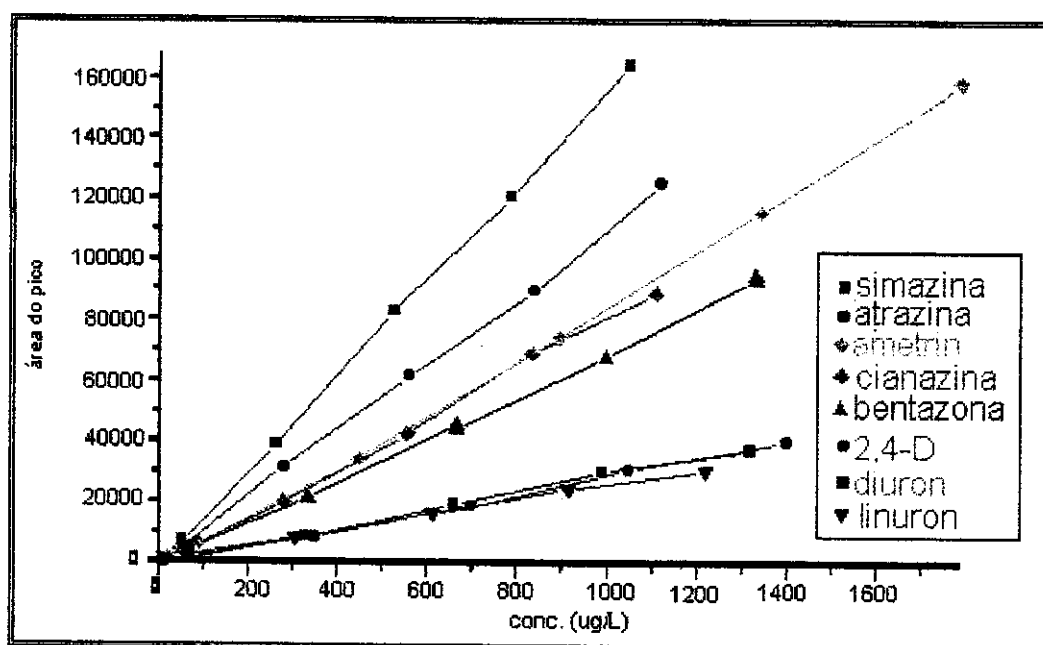


Figura 12. Curvas analíticas da bentazona, 2,4-D, cianazina, simazina, atrazina, diuron, linuron e ametrin.

Através da figura 12 pode-se avaliar a sensibilidade cromatográfica para cada herbicida, já que quanto maior inclinação da curva analítica mais sensível é o método. Assim, nota-se que a sensibilidade é maior para as triazinas, sendo melhor para a simazina, e menor para as uréas substituídas e para o 2,4-D, por estes apresentarem o máximo de absorção um pouco afastado do comprimento de onda utilizado para detecção, que foi de 230 nm.

IV.7.2 - Linearidade

Na ausência de erros indeterminados, isto é, com $r^2 = 1$, e dentro da faixa linear, pode-se provar que $(S/Q)_i = b$ para todos os pares de valores experimentais usados para construir a curva. Na presença de erros indeterminados ($r^2 < 1$), que é o que ocorre na prática, e dentro da faixa linear, $(S/Q)_i \approx b$. Se $(S/Q)_i \ll b$ ou $(S/Q)_i \gg b$, então o resultado pode ser assumido como estando fora da faixa linear. Assim, no presente trabalho foi considerado na faixa linear os pontos com valores de $(S/Q)_i$ no intervalo $(1,00 \pm 0,05) b$, isto é, pontos cujas razões sinal/concentração não diferiram mais que 5% do coeficiente angular da reta. Este intervalo de tolerância foi sugerido com base nas normas da IUPAC para cromatografia [89].

Os valores obtidos para as curvas analíticas evidenciaram linearidade satisfatória. A tabela 5 apresenta os intervalos de linearidade para os herbicidas estudados.

Tabela 5. Valores de intervalo de linearidade para os herbicidas em estudo.

HERBICIDA	INTERVALO LINEAR ($\mu\text{g/L}$)
bentazona	6,95 - 1330,0
2,4D	11,6 - 1400,0
cianazina	4,9 - 1110,0
simazina	6,2 - 1050,0
ác. fluazifop	6000,0 - 90000,0
atrazina	9,3 - 1120,0
diuron	8,7 - 990,0
linuron	20,3 - 915,0
ametrin	16,7 - 1790,0

IV.7.3 - Exatidão e precisão

A precisão (repetibilidade), medida pelo RSD, e as exatidões obtidas são mostradas na tabela 6.

Tabela 6. Valores de precisão e exatidão obtidos para os herbicidas.

HERBICIDA	PRECISÃO (%)*	EXATIDÃO (%)*
bentazona	2,2	-1,4
2,4D	1,3	3,7
cianazina	1,5	-3,9
simazina	3,1	2,1
ác. fluazifop	13,5	1,4
atrazina	2,3	0,3
diuron	2,8	-1,0
linuron	3,3	0,5
ametrin	0,2	-2,2

* Valores calculados para concentrações de herbicidas de aproximadamente 500 $\mu\text{g/L}$, exceto para o ácido fluazifop cuja concentração foi de da ordem de 60000 $\mu\text{g/L}$. n = 5

Os resultados de precisão e exatidão obtidos para a concentração da ordem de 500 µg/L (exceto para o ácido fluazifop cuja concentração é de 60000 µg/L), bem como para as demais concentrações estudadas, são considerados bons, uma vez que estão dentro do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos aplicados a pesticidas [87], no qual tanto as precisões quanto as exatidões devem ser $\leq 15\%$ e $\pm 15\%$, respectivamente.

IV.7.4 - Recuperação

A tabela 7 apresenta os valores de recuperação e RSD, obtidos com fortificação de aproximadamente 0,3 µg, para os herbicidas estudados.

Tabela 7. Valores de recuperação e RSD para os herbicidas estudados.

HERBICIDAS	RECUPERAÇÃO (%)	RSD (%)
Bentazona	97,8	0,9 (n=2)
2,4D	80,6	9,4 (n=3)
Cianaziana	80,7	0,8 (n=3)
Simazina	77,8	0,8 (n=2)
ác. Fluazifop	63,1	5,0 (n=2)
Atrazina	76,0	1,9 (n=2)
Diuron	72,0	9,5 (n=3)
Linuron	81,4	2,7 (n=2)
Ametrin	97,4	0,9 (n=2)

O teste de recuperação realizado com a fortificação de todos os herbicidas conjuntamente apresentou resultados muito próximos a 100%, para todos os herbicidas, mostrando que é possível realizar a extração simultânea dos nove herbicidas estudados.

De acordo com o roteiro de validação de métodos cromatográficos aplicado aos pesticidas [87] as recuperações devem estar entre de 70 a 110%, portanto os valores obtidos, com exceção do ácido fluazifop, apresentam-se dentro deste intervalo. Os valores de RSD apresentados de um modo geral, são muito bons, uma vez que são aceitos valores de até 15%.

IV.7.5 - Sensibilidade

A tabela 8 apresenta os resultados de LOD e LOQ obtidos para a bentazona, 2,4D, cianazina, simazina, ácido fluazifop, atrazina, diuron, linuron e ametrin.

Tabela 8. Resultados cromatográficos de LOD e LOQ obtidos para os herbicidas estudados.

HERBICIDAS	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Bentazona	7,0	20,8
2,4D	11,6	34,9
Cianazina	4,9	14,8
Simazina	6,2	18,6
ácido fluazifop	6000,0	18000,0
Atrazina	9,3	27,9
Diuron	8,7	26,2
Linuron	20,3	61,0
Ametrin	16,7	50,1

Estes valores de LOD e LOQ são bastante satisfatórios, pois lembrando-se que a etapa de pré-concentração permite concentrar uma amostra até 500 vezes, com estes limites torna-se possível analisar amostras aquosas com $C = 36 \mu\text{g/L}$

para o ácido fluazifop e menos de 0,1 µg/L para os demais herbicidas, atendendo as exigências da legislação.

A tabela 9 apresenta os valores de LOD e LOQ para os herbicidas em estudo considerando a etapa de pré-concentração, de aproximadamente 500 vezes. Nestes valores também foram levados em conta as recuperações obtidas para cada herbicida, na etapa de extração.

Tabela 9. Valores de LOD e LOQ para os herbicidas incluindo a etapa de pré-concentração e os resultados de recuperação.

HERBICIDAS	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Bentazona	0,014	0,042
2,4D	0,024	0,069
Cianazina	0,0098	0,024
Simazina	0,012	0,037
ácido fluazifop	12,0	36,0
Atrazina	0,018	0,055
Diuron	0,018	0,053
Linuron	0,041	0,12
Ametrin	0,034	0,10

Foi realizada uma extração em branco, isto é, uma extração com uma amostra de água Milli-Q sem fortificação com herbicidas. Esta análise mostrou alguns picos cromatográficos de pequena intensidade, mas estes não interferem na determinação dos herbicidas, e portanto não prejudicam o cálculo do LOD e LOQ.

IV.7.6. Robustez

A figura 13 apresenta o cromatograma obtido no teste de robustez, empregando analista, instrumento, colunas e laboratório diferentes dos que foram utilizados no desenvolvimento do método.

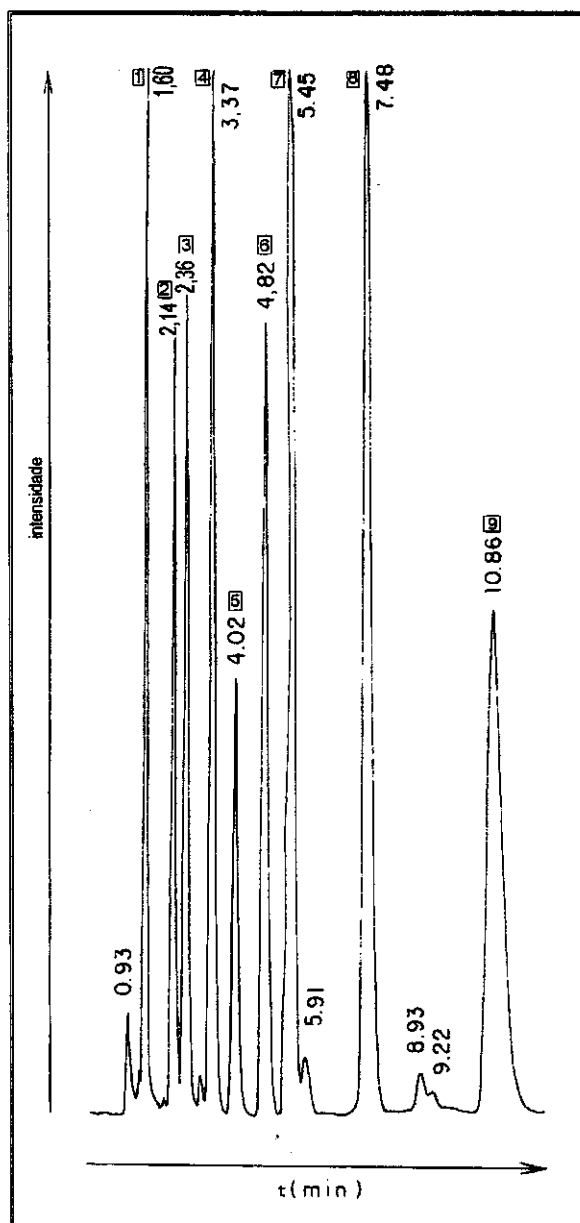


Figura 13. Cromatograma obtido para amostra completa de herbicidas utilizando diferentes analista, instrumento, colunas e laboratório. Demais condições cromatográficas idem a figura 11. [1] bentazona; [2] 2,4-D; [3] cianazina; [4] simazina; [5] ácido fluazifop; [6] atrazina; [7] diuron; [8] linuron; [9] ametrin.

Analisando o cromatograma da figura 13 verifica-se que o tempo de análise foi menor que o obtido no desenvolvimento do método e que todos os herbicidas encontram-se bem resolvidos.

IV.8. Aplicação do Método Desenvolvido

O principal problema de análise de amostras reais é a contaminação com substâncias húmicas, como ácidos húmicos, que apresentam pouca retenção na coluna C-18. Esta interferência foi observada, em todos os cromatogramas obtidos para amostras de água, como um pico de grande intensidade localizado no início do cromatograma. Além deste pico intenso, foram observados picos de pouca intensidade, sendo que alguns destes apresentaram t_R coincidentes com os dos herbicidas em estudo. Estas características podem ser observadas na figura 14, que apresenta um cromatograma para amostra de água recolhida de um filtro doméstico de uma região urbana.

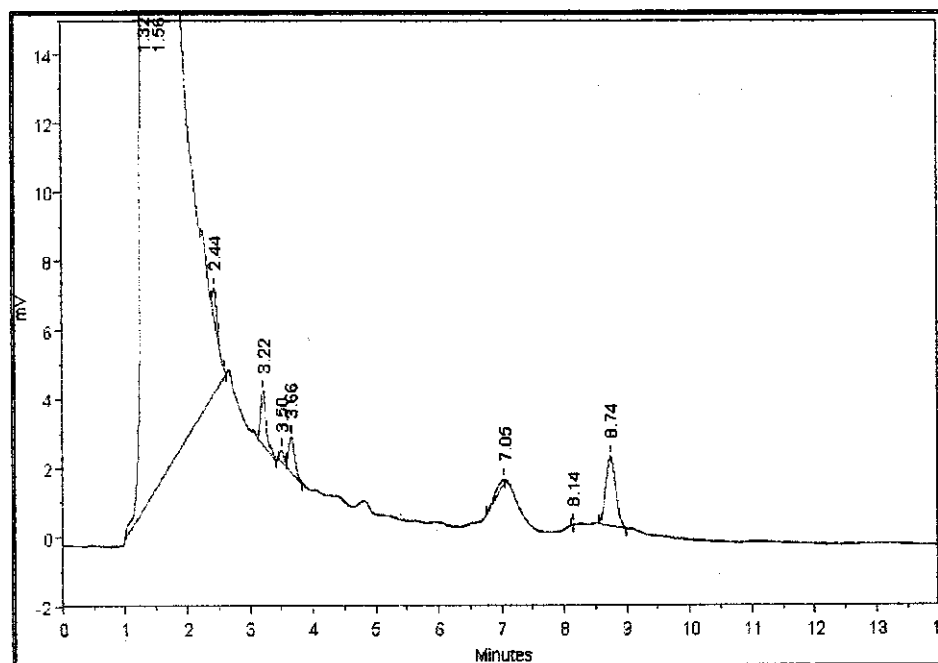


Figura 14. Cromatograma obtido para análise de amostra real (água de filtro doméstico), após pré-concentração. Condições idênticas a da Figura 11.

A confirmação da identidade dos picos com t_R coincidentes não foi conseguida por co-cromatografia, devido a pequena quantidade de amostra disponível após a etapa de pré-concentração (ao todo 0,5 mL). Assim, na tentativa de confirmar a identidade dos picos, a detecção da amostra foi feita utilizando um detector de arranjo de diodos (figura 15).

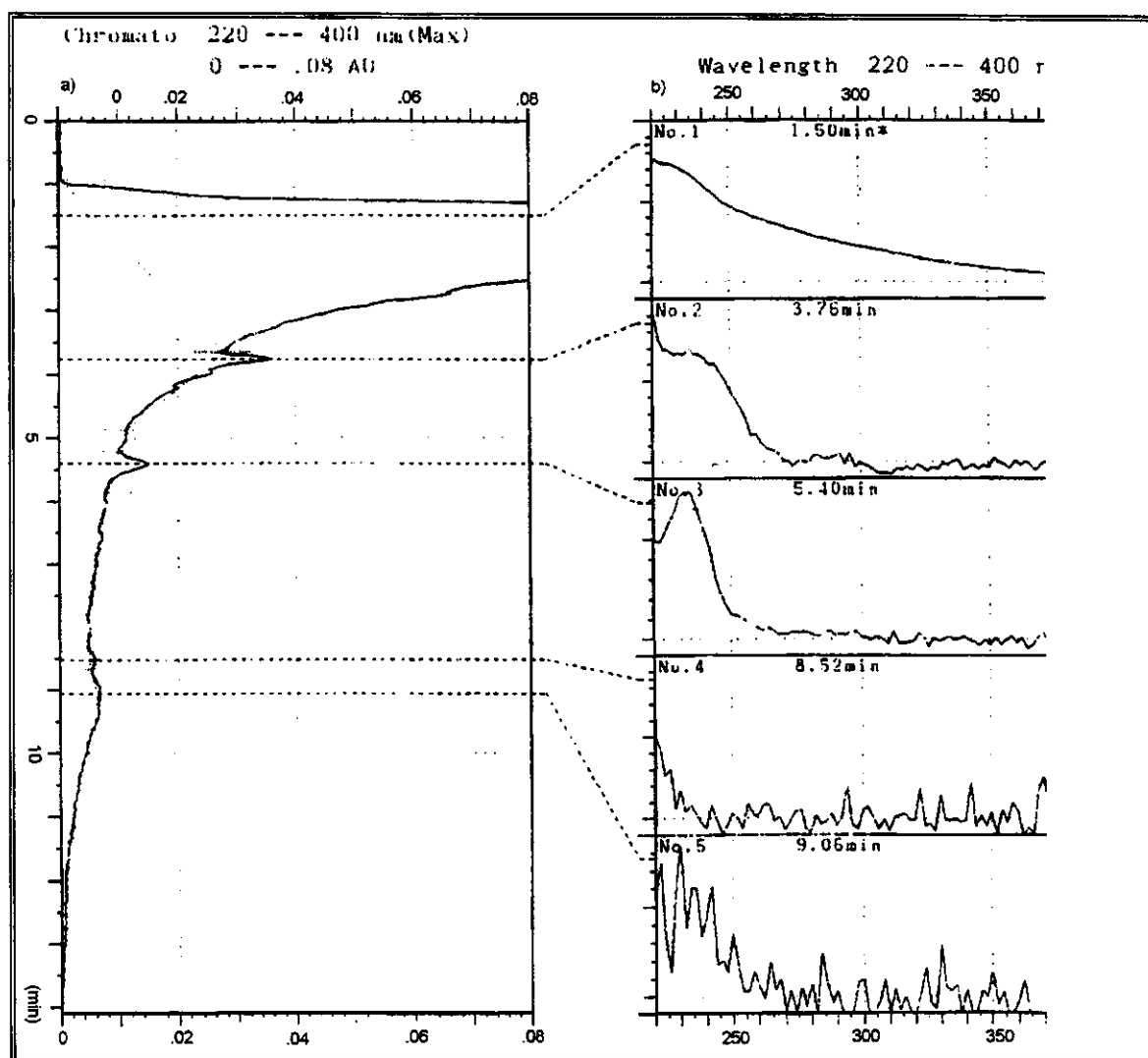


Figura 15. a) Cromatograma da amostra real (água de filtro doméstico).

b) Espectros referentes aos picos cromatográficos detectados. Detector de arranjo de diodos, volume de injeção 25 μ L, demais condições idênticas as da Figura 11.

Entretanto, o DAD disponível para a análise possui sensibilidade menor que o detector UV/Vis utilizado nas demais análises, portanto alguns picos não foram detectados e outros, de pequena intensidade, não apresentaram os espectros de absorção UV ou apresentaram com muito ruído. Comparando os espectros disponíveis com os obtidos para os padrões dos herbicidas (figura 11) nota-se uma grande semelhança entre o espectro nº 2 da amostra real e o espectro do ácido fluazifop, sendo que os t_R também foram coincidentes. Assumindo que este pico correspondesse ao do herbicida ácido fluazifop, este estaria presente em uma concentração de aproximadamente 54 $\mu\text{g/L}$. Contudo, para uma identificação mais segura seria necessário o uso de um cromatografo a líquido acoplado a um espectrômetro de massas, que não estava disponível.

A amostra de água recolhida na lavoura apresentou diversas dificuldades de análise devido a grande concentração de compostos, provavelmente de natureza orgânica, que foi responsável pela coloração castanha do material extraído. Ao injetar este resíduo no sistema cromatográfico houve retenção na coluna, a partir da segunda injeção, e para reverter esta retenção foram necessárias diversas injeções de metanol puro, que arrastou o material adsorvido. Isto prejudicou as tentativas de identificação dos picos.

A figura 16 apresenta o cromatograma obtido na análise desta amostra. Através da análise desta figura nota-se que se obteve uma boa separação dos componentes e que alguns picos apresentaram tempo de retenção coincidentes com os herbicidas estudados, mas infelizmente a identificação dos compostos não foi possível pelas razões expostas acima.

Estes resultados mostraram que o método desenvolvido é mais adequado para amostra de água tratada, pois, no caso de amostras de águas de outra natureza é necessário um tratamento prévio da amostra, antes de injetá-la no cromatógrafo, de modo a eliminar os resíduos, protegendo, desta forma, a coluna cromatográfica.

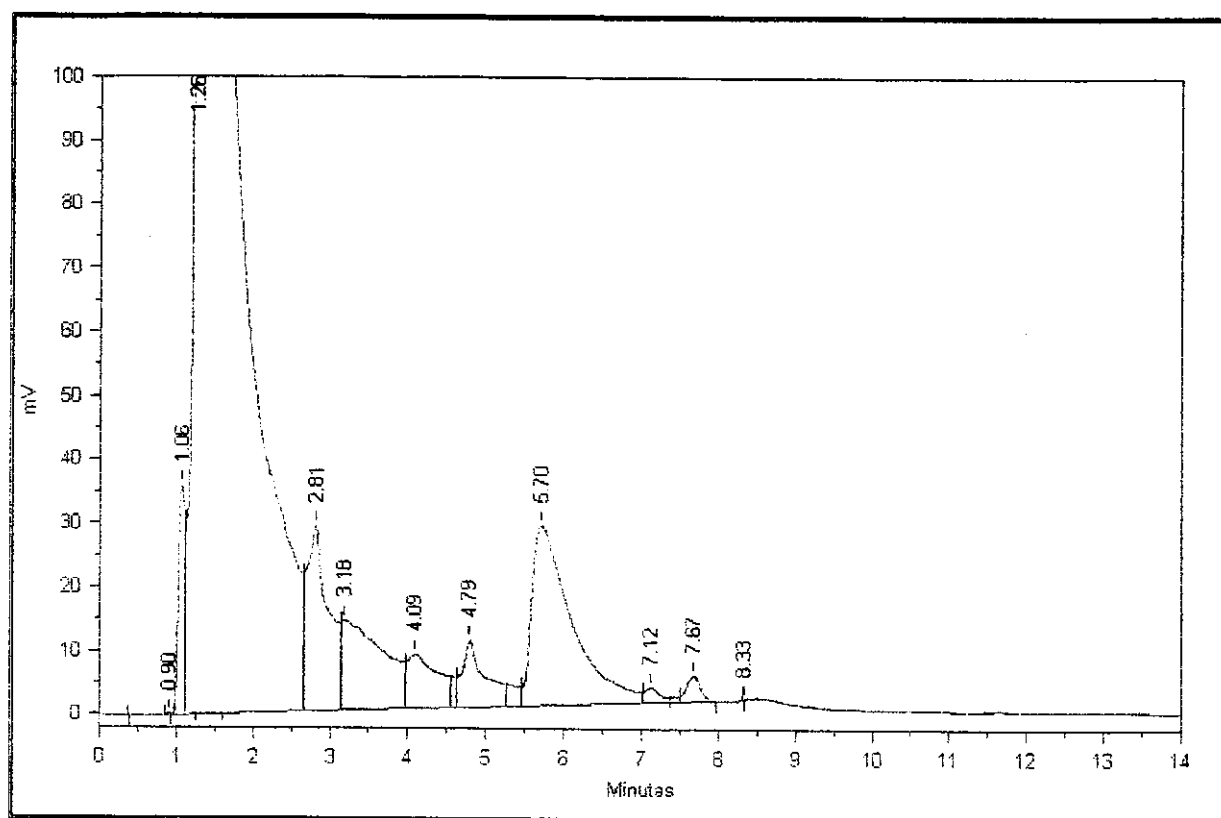


Figura 16. Cromatograma obtido para análise de amostra real (água de lavoura), após pré-concentração. Condições idênticas a da Figura 11.

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que se conseguiu desenvolver um método rápido, simples e eficiente, utilizando CLAE, para a análise simultânea de multirresíduos dos herbicidas, bentazona; 2,4-D; cianazina; simazina; ácido fluazifop; atrazina; diuron; linuron e ametrin, presentes em matrizes de água. A etapa de extração e pré-concentração foi realizada por extração em fase sólida, utilizando tubos C-18. Esta técnica mostrou-se bastante adequada à matrizes de água.

As condições cromatográficas foram otimizadas através do estudo da melhor composição e pH de fase móvel. A FM MeOH:H₂O 60:40, v/v, pH=4,6, ajustada com ácido fosfórico, foi a que permitiu a melhor separação cromatográfica, avaliada visualmente e através da análise dos parâmetros cromatográficos k , α e R_s . A vazão da FM de 0,8 mL/min foi considerada a que apresentou o melhor compromisso entre resolução e rapidez de análise.

O comprimento de onda utilizado na determinação simultânea dos nove herbicidas foi de 230 nm, pois permitiu uma boa sensibilidade para todos os herbicidas em estudo. Este comprimento de onda foi escolhido após a análise dos espectros de absorção no UV dos herbicidas, que mostraram que somente o diuron e o linuron (uréias substituídas) apresentaram absorção mínima próxima a este comprimento de onda, entretanto isto não prejudicou a determinação destes herbicidas.

As melhores condições de análise para o emprego da extração em fase sólida foram avaliadas e determinadas, sendo que o volume de amostra deve ser de 250 mL, o que permite uma pré-concentração dos herbicidas de quinhentas vezes, o volume de metanol para eluição dos herbicidas da coluna de extração deve ser de 1 mL e a vazão de eluição da amostra deve ser menor ou igual a 3 mL/min. Também foi desenvolvido um sistema para realização desta etapa em duplicata.

Depois de estudadas e otimizadas as melhores condições de análise realizou-se a validação do método desenvolvido.

As curvas analíticas obtidas mostraram bons coeficientes de correlação ($r > 0,999$).

A linearidade das curvas foi muito boa, se estendendo até três ordens de grandeza. As recuperações obtidas estavam dentro dos valores aceitos na literatura [87], 70-110%, exceto para o ácido fluazifop.

A exatidão e precisão para todos os herbicidas tiveram valores muito bons, uma vez que não ultrapassaram os valores aceitos na literatura [87], que chegam até 15% para precisão e de $\pm 15\%$ para exatidão.

A sensibilidade do método (LOD e LOQ) em relação aos herbicidas em estudo foi da ordem de dezenas de ng/L para a maioria dos herbicidas, após a etapa de extração e pré-concentração. Mais uma vez o ácido fluazifop apresentou-se como uma exceção, tendo resultados discrepantes em relação aos demais herbicidas. Este fato pode estar associado a uma contaminação do padrão de ácido fluazifop com o seu precursor, o fluazifop butil.

A robustez do método cromatográfico foi demonstrada com outro analista realizando a separação dos nove herbicidas, utilizando outra coluna, outro equipamento e outro laboratório, porém nas mesmas condições de análise estabelecidas. Os resultados obtidos mostraram que o método apresenta robustez frente a estas variáveis.

Ao comparar o método desenvolvido com o estabelecido pela EPA, que utiliza ELL, pode-se dizer que o novo método é menos trabalhoso, não apresenta o problema de formação de emulsões, utiliza volumes reduzidos de solventes orgânicos, mantendo a eficiência comparável à ELL. Em relação ao custo, pode-se dizer que a redução do uso dos solventes orgânicos diminui o custo operacional da técnica de EFS, porém a aquisição de tubos de extração, necessários para extração e pré-concentração, elevam o custo total da EFS.

Durante todo o trabalho foi utilizada a mesma coluna comercial, o que comprova que, se forem tomados os devidos cuidados, FM ácida e até mesmo a tamponada, podem ser usadas sem danos a coluna e ao sistema cromatográfico.

Para aumentar o tempo de vida útil da coluna analítica o uso de coluna de guarda é imprescindível.

A aplicação do método à amostras reais de água mostrou-se bastante eficiente. Nas águas analisadas foram detectados picos que provavelmente correspondem a alguns pesticidas estudados, tal como o ácido fluazifop. Mesmo utilizando-se os espectros de absorção no UV dos componentes encontrados na amostra, obtidos com DAD, e comparando-os com os espectros dos padrões não foi possível identificar os analitos, permanecendo a suspeita de que, possivelmente, um dos picos seria o ácido fluazifop. A partir destes resultados concluiu-se que o detector de arranjo de diodos, disponível para os testes, não apresenta sensibilidade suficiente que permita uma identificação de herbicidas presentes a níveis de traços. Na realidade, para uma confirmação segura da identidade dos picos detectados seria mais adequado a utilização de um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a líquido.

CAPÍTULO VI

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Biziuk; A. Przyjazny; J. Czerwinski; M. Wiergowski; *J. Chromatogr. A* **754** (1996) 103.
- [2] T. Colborn; D. Dumanoski; J.P. Myers; "O Futuro Roubado"; L & PM editores; Porto Alegre; 1997; p. 281.
- [3] D. Barceló; *Analyst*, **116** (1991) 681.
- [4] H.S. Dórea; M.A. Barbirato; F.M. Lanças; *Pest. R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*; **7** (1997) 109.
- [5] C. Aguilar; F. Borrull; R.M. Marcé; *LC-GC*, **14** (1996) 1048.
- [6] M. Ibáñez; Y. Picó; J. Mānes; *J. Chromatogr. A*, **728** (1996) 325.
- [7] A.G.S. Prado; E.M. Vieira; M.O.O. Rezende; *An. Assoc. Bras. Quim.*, **43** (1998) 239.
- [8] S. A. Schuette; R.G. Smith; L.R. Holden; J.A. Graham; *Anal. Chim. Acta*, **236** (1990) 141.
- [9] E. Bolygó; N.C. Atreya; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** (1991) 423.
- [10] C. Hidalgo; J.V. Sancho; F. Hernández; *Anal. Chim. Acta*, **338** (1997) 223.
- [11] A. Balinova; *J. Chromatogr. A*, **728** (1996) 319.
- [12] A. Balinova; *J. Chromatogr. A*, **643** (1993) 203.

- [13] I. Liska; J. Slobodník; *J. Chromatogr. A*, **733** (1996) 235.
- [14] H.A. Moyer; "Analysis of Pesticides Residues", Publishing Company, Florida, 1990, p. 157.
- [15] M.D. Osselton; R.D. Snelling; *J. Chromatogr.*, **368** (1986) 265.
- [16] M. Patumi; C. Marucchini; M. Businelli; C. Vischetti; *Pest. Sci.*, **21** (1987) 193.
- [17] V. Pacáková; K. Stulik; M. Prikoda; *J. Chromatogr.*, **442** (1988) 147.
- [18] R. Hamann; M. Meier; A. Kettrup; *Fresenius Z Anal. Chem.*, **334** (1989) 231.
- [19] M. Meier; R. Hamann; A. Kettrup; *Fresenius Z Anal. Chem.*, **334** (1989) 235.
- [20] R.B. Geerdink; A.M.B.C. Graumans; J. Viveen; *J. Chromatogr.*, **547** (1991) 478.
- [21] P.R. Loconto; *J. Liq. Chromatogr.*, **14** (1991) 1297.
- [22] A. Orinák; K. Holovská; V. Budínská; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** (1991) 436.
- [23] H.J. Brauch; S. Schullerer; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** (1991) 420.
- [24] J.E. Conaway; *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, **74** (1991) 715.
- [25] J. Legler; V.D.L.U. Forschungsanstalten; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**

(1991) 417.

[26] C. Schlett; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339** (1991) 344.

[27] G. Durand; V. Bouvot; D. Barceló; *J. Chromatogr.*, **607** (1992) 319.

[28] M. Zanco; G. Pfinter ; A. Kettrup; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **344** (1992) 39.

[29] G. Font; J. Mañes; J.C. Molto; Y. Pico; *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 135.

[30] S. Chiron; A.F. Alba; D. Barceló; *Environ. Sci. Technol.*, **27** (1993) 2352.

[31] G. Sacchero; S. Apone; C. Sarzanini; E. Mentasti; *J. Chromatogr. A*, **668** (1994) 365.

[32] A. Laganà; G. Fago; A. Marino; B.P. Martinez; *Chromatographia*, **38** (1994) 88.

[33] S. Chiron; E. Martinez; D. Barceló; *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 283.

[34] V. Pichon; M.C. Hennion; *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 269.

[35] S. Chiron; S. Papilloud; W. Haerdi; D. Barceló; *Anal. Chem.*, **67** (1995) 1637.

[36] P. MacCarthy; R.W. Klusman; S.W. Cowling; J.A. Rice; *Anal. Chem.*, **67** (1995) 557.

[37] F. Rouberty; J. Fournier; *Chromatographia*, **41** (1995) 553.

- [38] S. Butz; H.J. Stan; *Anal. Chem.* **67** (1995) 620.
- [39] J. Schülein; D. Martens; P. Spitzauer; A. Kettrup; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **325** (1995) 565.
- [40] J. Sherma; *Anal. Chem.*, **67** (1995) 1R.
- [41] M.C. Gennaro; C. Abrigo; D. Giacosa; L. Rigotti; A. Liberatori; *J. Chromatogr. A*, **718** (1995) 81.
- [42] K.P. Hupe; M. Riedmann; G. Rozing; *Chromatographia*, **40** (1995) 631.
- [43] R.M. Marcé; H. Prosen; C Crespo; M. Calull; F. Borrull; U.A. Th. Brinkman; *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 63.
- [44] J.R. Dean; G. Wade; I.J. Barnabas; *J. Chromatogr. A*, **733** (1996) 295.
- [45] V. Pacáková; J. Stulík; J. Jiskra; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 17.
- [46] L.E. Vera-Avila; P.C. Padilla; M.G. Hernandez; J.L.L. Meraz; *J. Chromatogr. A*, **731** (1996) 115.
- [47] D. Barceló; M.F. Alpendura; *Chromatographia*, **42** (1996) 704.
- [48] V. Gökmen; J. Acar; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19** (1996) 1917.
- [49] M. Nakamura; M Nakamura; S. Yamada; *Analyst*, **121** (1996) 469.
- [50] H.B. Wan; M.K. Wong; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 43.

- [51] K. Jinno; T. Muramatsu; Y. Saito; Y. Kiso; S. Magdic; J. Pawliszyn; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 137.
- [52] A. Junker-Buchheit; M. Witzemberger; *J. Chromatogr. A*, **737** (1996) 67.
- [53] I. Tolosa; J.W. Readman; L.D. Mee; *J. Chromatogr. A*, **725** (1996) 93.
- [54] M.C. Gennaro; D. Giacosa; C. Baglietto; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **916** (1996) 911.
- [55] M.J. Sánchez-Martín; R. Delgado-Pascual; E. Iglesias-Jimenez; M. Sánchez-Camazano; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 295.
- [56] E.A. Hogendoorn; R. Hoogerbrugge; R.A. Baumann; H.D. Meiring; A.P.I.M. de Jong; P. van Zoonen; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 49.
- [57] A. Balinova; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 125.
- [58] S. Hartrík; J. Tekel; *J. Chromatogr. A*, **733** (1996) 217.
- [59] C. Aguilar; F. Borrull; R.M. Marcé; *J. Chromatogr. A*, **754** (1996) 77.
- [60] C. Aguilar; F. Borrull; R.M. Marcé; *Chromatographia*, **43** (1996) 592.
- [61] L.Y.T. Li; P.A. Campbell; D.K. Bennett; J. Henion; *Anal. Chem.*, **68** (1996) 3397.
- [62] M.E. Báez; M. Rodrigues; O. Lastra; P. Contreas; *J. High Resol. Chromatogr.*, **20** (1997) 591.

- [63] H.S. Kim; S.K. Lee; D.W. Lee; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **20** (1997) 871.
- [64] M.M. Galera; J.L.M. Vidal; A.G. Frenich; M.D.G. Garcia; *J. Chromatogr. A*, **778** (1997) 139.
- [65] J.A. Field; R.L. Reed; T.E. Sawyer; M. Martinez; *J. Agric. Food Chem.*, **45** (1997) 3897.
- [66] J.J. Jiménez; J.L.Bernal; M.J. del Nozal; J.M. Rivera; *J. Chromatogr.*, **778** (1997) 289.
- [67] S. Rodolico; R. Giovinnazzo; M. Mosconi; *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, **38** (1997) 644.
- [68] M.J. Ruiz; M.J. Redondo; G. Font; *J. Chromatogr. A*, **776** (1997) 348.
- [69] J. Slobodník; A.J.H. Louter; J.J. Vreuls; I. Liska; U.A.Th. Brinkman; *J. Chromatogr. A*, **768** (1997) 239.
- [70] F. Hernández; C. Hidalgo; J.V. Sancho; F.J. Lopes; *Anal. Chem.*, **70** (1998) 3322.
- [71] WSSA Herbicide Handbook Committee, "Herbicide Handbook"; Weed Scienci Society of America; 3rd ed, 1974.
- [72] F.S. Almeida; B.N. Rodrigues; " Guias de Herbicidas"; Livroceres, 2º ed, Londrina, 1988.

[73] P.C. Kearney; D.D. Kaufman; "Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action"; Marcel Dekker Inc., 2º ed, New York, 1969.

[74] <http://www.arsusda.gov>

[75] wysiwyng://1L/<http://www.24d.org>

[76] T.A. Anazawa; "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, Tipo C8, para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1996, p 23-28.

[77] C.H. Collins; G.L. Braga; P.S. Bonato; coordenadores; " Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª ed, Editora da UNICAMP, Campinas, 1990, p 22-25.

[78] 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.

[79] F. Bressolle; M. Bromet-Petit; M. Audran; *J. Chromatogr. B*, **686** (1996) 3.

[80] A.A.M. Chasin; M. Chasin; M.C. Salvador; *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, **30** (1994) 49.

[81] G.W. Peng; W.L. Chiou; *J. Chromatogr. B*, **531** (1990) 3.

[82] G. Szepesi; M. Gazdag; K. Mihályfi; *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 265.

[83] E. Francotte; A. Davatz; R. Richert; *J. Chromatogr. B*, **686** (1996) 77.

- [84] 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.
- [85] J.R. Laug; S. Bolton; *J. Pharm. and Biom. Anal.*, **9** (1991) 357.
- [86] R. Causon; *J. Chromatogr. B*, **689** (1997) 175.
- [87] "Roteiro para Validação de Metodologia Analítica Visando a Determinação de Resíduos de Pesticidas", Laboratório Vegetal do Ministério da Agricultura, GARP, ANDEF; versão 1, 1997.
- [88] 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.
- [89] <http://gdamcq.iqm.unicamp.br/~dandrade/assuntge/curcallib/parametr.htm> (Chemkeys).
- [90] C.W. Bergquist; P.R. Forchito; "LC School - Escola de Cromatografia Líquida Waters", Curso Apostilado, Waters Comercial, São Paulo, 1996, p 1.20.