



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

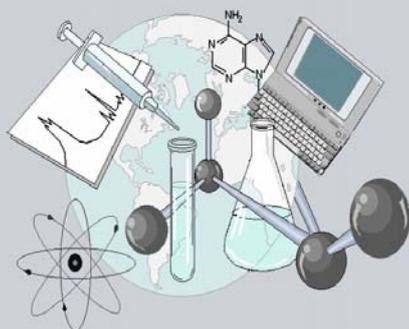
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos  
para a determinação de compostos orgânicos  
explorando ambientes micelares**

Tese apresentada por  
*Eliane Cristina Vidotti* ao Programa  
de Pós-Graduação em Química do  
Departamento de Química do Centro  
de Ciências Exatas da Universidade  
Estadual de Maringá como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, JUNHO/2006**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

V654d Vidotti, Eliane Cristina  
Desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos  
para a determinação de compostos orgânicos  
explorando ambientes micelares / Eliane Cristina  
Vidotti. -- Maringá : [s.n.], 2006.  
102 f. : il. color., fig., tab.

Orientador : Prof. Dr. Noboru Hioka.  
Tese(doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá. Departamento de Química. Programa de Pós-  
Graduação em Química, 2006.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2.  
Ambientes micelares. 3. Desenvolvimento de métodos.  
4. Determinação de herbicidas. 5. Determinação de  
corantes têxteis. I. Universidade Estadual de  
Maringá. Departamento de Química. Programa de Pós-  
Graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed. 543.0894



**Universidade Estadual de Maringá**  
**Centro de Ciências Exatas**  
**Departamento de Química**  
**Programa de Pós-graduação em Química**

Desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos para a determinação de compostos orgânicos explorando ambientes micelares

**Eliane Cristina Vidotti**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador: Prof. Dr Noboru Hioka**

Maringá, maio de 2006.

“Jamais te desesperes,  
mesmo perante as mais sombrias aflições de sua vida,  
pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda ”.

**Provérbio Chinês**

## DEDICATÒRIA

- A Deus, por estar sempre ao meu lado, não deixando que as dificuldades pudessem apagar a chama da esperança, do amor e da persistência;
- Aos meus pais, João e Maria, minha irmã e meu sobrinho, Adriana e Lucas, pelo amor, apoio e incentivo;
- Ao Cláudio, pelo carinho e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Hioka, pela orientação, paciência, confiança, amizade e por compartilhar não apenas seus conhecimentos acadêmicos, mas também suas experiências de vida;

Ao Cláudio pelo carinho, dedicação, orientação e paciência;

Ao Prof. Dr Willian pela amizade e pelos empréstimos;

Ao Programa de Pós Graduação em Química pela oportunidade;

Aos amigos: Adriana, Alessandro, André, André (Tupã), Ana Cláudia, Ana Paula, Angela, Augusto, Carlos, Daniela, Elaine, Franciele, Marina, Polyana, Rafael, Simone, Silvana, Vagner, Valquíria, Vanessa e Victor que sempre me ajudaram nas horas em que mais precisei;

Ao Claudemir e Cristina pela amizade e disposição em ajudar sempre que necessário;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

E a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| <b>Resumo.....</b>   | <b>i</b>       |
| <b>Abstract.....</b>   | <b>iii</b>     |
| <br>   |                |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>01</b>      |
| <br>   |                |
| <b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                              | <b>03</b>      |
| 2.1.Pesticidas.....  | 03             |
| 2.2.Corantes Têxteis.....  | 16             |
| 2.3.Cromatografia.....   | 24             |
| 2.4.Ambientes Micelares.....                                     | 28             |
| 2.5.Validação de Métodos.....                                    | 31             |
| <br>   |                |
| <b>3.OBJETIVOS.....</b>  | <b>35</b>      |
| 3.1.Objetivo Geral.....  | 35             |
| 3.2.Objetivos Específicos.....                                   | 35             |
| <br>   |                |
| <b>4.MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                | <b>36</b>      |
| 4.1.Reagentes e Soluções.....                                    | 36             |
| 4.2.Equipamentos e Acessórios.....                               | 39             |
| 4.3.Métodos.....   | 40             |
| 4.3.1.Método convencional para a determinação de herbicidas..... | 40             |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.2.Espectros eletromagnéticos das espécies químicas a serem estudadas<br>determinadas..... | 41        |
| 4.3.3.Planejamento fatorial e otimização dos métodos<br>comatográficos.....                   | 41        |
| 4.3.4.Aplicações.....   | 46        |
| 4.4.Escolha das espécies orgânicas analisadas.....  | 49        |
| <b>5.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>   | <b>50</b> |
| 5.1.Metodologia tradicional.....  | 50        |
| 5.2.Espectros eletromagnéticos.....   | 52        |
| 5.3.Planejamento fatorial e otimização das variáveis dos métodos<br>cromatográficos.....      | 56        |
| 5.4.Aplicações.....   | 83        |
| 5.4.1.Herbicidas triazínicos.....   | 83        |
| 5.4.2.Corantes têxteis.....   | 84        |
| <b>6.CONCLUSÕES.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>87</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| Figura 01. Diagrama do processo de lixiviação ocorrido no ambiente.....  | 10             |
| Figura 02. Ambientes micelares em meio aquoso.....   | 28             |
| Figura 03. Diferentes aglomerados de sistemas micelares.....   | 30             |
| Figura 04. Estruturas moleculares dos herbicidas triazínicos.....  | 36             |
| Figura 05. Estrutura molecular dos corantes têxteis.....   | 38             |
| Figura 06. Cromatógrafo líquido de alta eficiência.....  | 40             |
| Figura 07. Extração em fase sólida.....  | 46             |
| Figura 08. Cromatograma obtido através do método convencional para a mistura dos herbicidas triazínicos ametrina, atrazina e simazina..... | 51             |
| Figura 09. Espectros eletrônicos dos herbicidas.....   | 53             |
| Figura 10. Espectros eletrônicos da mistura dos surfactantes.....  | 54             |
| Figura 11. Estrutura molecular do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio.....   | 54             |
| Figura 12. Espectros moleculares dos corantes.....   | 55             |
| Figura 13. Estrutura molecular do surfactante não iônico Triton X-100.....   | 56             |
| Figura 14. Cromatograma obtido para a mistura dos herbicidas ametrina, atrazina e simazina.....  | 57             |
| Figura 15. Cromatograma obtido para o experimento 8.....   | 59             |
| Figura 16. Variação da concentração de cloreto de amônio.....  | 60             |
| Figura 17. Variação de concentração do surfactante SDS.....  | 62             |
| Figura 18. Variação da vazão da fase móvel.....  | 63             |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19. Variação do pH da fase móvel.....   | 64 |
| Figura 20. Efeito da concentração de tampão fosfato.....   | 65 |
| Figura 21. Cromatograma de uma solução padrão dos herbicidas.....  | 66 |
| Figura 22. Curvas analíticas para os herbicidas: Simazina, Atrazina e Ametrina.....  | 67 |
| Figura 23. Cromatograma da mistura dos corantes têxteis.....   | 69 |
| Figura 24. Cromatograma obtido para o experimento 8.....   | 72 |
| Figura 25. Variação do pH.....   | 73 |
| Figura 26. Variação da concentração de fosfato de sódio (pH 7).....  | 75 |
| Figura 27. Variação da concentração de EtOH.....   | 76 |
| Figura 28. Efeito da concentração de Triton X-100.....   | 77 |
| Figura 29. Efeito da vazão no sinal analítico.....   | 79 |
| Figura 30. Cromatograma obtido para a mistura dos corantes amarelo procion H-4R,<br>vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol..... | 80 |
| Figura 31- Curvas analíticas para os corantes textéis: Amarelo Procion H-4R,<br>Vermelho Procion H-E7B e Azul Brilhante Remazol.....     | 81 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| Tabela 01. Alguns dos principais grupos, funções e classes de pesticidas.....  | 07             |
| Tabela 02. Determinação de pesticidas em amostras de frutas, vegetais, águas e solos utilizando CLAE.....                | 15             |
| Tabela 03. Fatores utilizados no planejamento fatorial $2^3$ na separação dos herbicidas triazínicos.....                | 42             |
| Tabela 04. Coeficientes de contraste para um fatorial $2^3$ .....  | 43             |
| Tabela 05. Fatores utilizados no planejamento fatorial $2^3$ na separação dos corantes têxteis.....                      | 44             |
| Tabela 06. Coeficientes de contraste para um fatorial $2^3$ .....  | 45             |
| Tabela 07. Características do método convencional para a determinação dos herbicidas triazínicos.....                    | 51             |
| Tabela 08. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial $2^3$ para determinação dos herbicidas triazínicos..... | 58             |
| Tabela 09. Cálculo dos efeitos de cada variável e da interação entre elas na resolução cromatográfica.....               | 59             |
| Tabela 10. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração de cloreto de amônio.....                  | 60             |
| Tabela 11. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração do surfactante SDS.....                    | 61             |
| Tabela 12. Resoluções cromatográficas obtidas no estudo do efeito da vazão da fase móvel no sistema cromatográfico.....  | 63             |

|  |    |
|--|----|
| Tabela 13. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação dos valores de pH da fase móvel.....   | 64 |
| Tabela 14. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração da solução tampão fosfato.....   | 65 |
| Tabela 15. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial $2^3$ para determinação dos corantes têxteis.....   | 68 |
| Tabela 16. Cálculo dos efeitos de cada variável e da interação entre elas na resolução cromatográfica.....   | 71 |
| Tabela 17. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação dos valores de pH da fase móvel.....   | 72 |
| Tabela 18. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração da solução tampão fosfato.....   | 74 |
| Tabela 19. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação do teor de álcool etílico.....   | 75 |
| Tabela 20. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração de Triton X-100.....   | 77 |
| Tabela 21. Resoluções cromatográficas obtidas para o estudo da vazão da fase móvel no sistema cromatográfico.....  | 78 |
| Tabela 22. Características do método proposto.....   | 79 |
| Tabela 23. Determinação dos herbicidas em amostras de água, solo e vegetal através do método proposto (limpo) e método orgânico utilizando adição de padrão..... | 82 |
| Tabela 24. Características do método cromatográfico para a determinação dos corantes têxteis.....  | 83 |

|   |    |
|---|----|
| Tabela 25. Ensaio de recuperação dos corantes têxteis amarelo procion, vermelho procion e azul brilhante remazol..... | 84 |
|---|----|

# **Desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos para a determinação de compostos orgânicos explorando ambientes micelares**

Autora: Eliane Cristina Vidotti

Orientador: Prof. Dr Noboru Hioka

## **Resumo**

Neste trabalho é proposta a separação e determinação de moléculas orgânicas com diferentes polaridades utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada a ambientes micelares, sem a utilização de reagentes tóxicos como fase móvel. Como aplicações foram selecionadas: a determinação de herbicidas triazínicos em amostras de águas, solos e alimentos e a determinação de corantes têxteis em amostras de efluentes industriais, sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica RP-18, sendo esta temporariamente modificada, durante a análise química, pelos constituintes da própria fase móvel, o que amplia as possibilidades de aplicação da estratégia e possibilita o desenvolvimento de métodos analíticos limpos explorando a CLAE. O método cromatográfico desenvolvido para a determinação de herbicidas triazínicos utilizou como fase móvel SDS 2,25 % (m/v), álcool etílico 25,0 % (v/v) em água,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50,0 mmol/L e solução tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 7,0) e, como fase estacionária uma coluna RP-18; a metodologia mostrou-se seletivo, sensível, robusto, simples, de alta frequência analítica, com tempos de retenção de 11,4, 15,6 e 24,4 min e limites de detecção de 100, 100 e 150  $\mu\text{g/L}$  para simazina, atrazina e ametrina, respectivamente. Estes resultados foram comparáveis aos métodos convencionais, que utiliza solventes orgânicos caros e

relativamente tóxicos. O método cromatográfico desenvolvido para a determinação dos corantes têxteis utilizou como fase móvel Triton X-100 1,0 % (v/v), álcool etílico 20,0 % (v/v) em água e tampão fosfato 5,00 mmol/L (pH 7,0) e como fase estacionária uma coluna RP-18; o método igualmente mostrou-se simples, seletivo, sensível, robusto e de alta frequência analítica, com tempos de retenção de 2,0, 2,9 e 5,1 min e limites de detecção de 0,40, 0,80 e 0,80 mg/L para Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brillante Remazol, respectivamente. Os resultados de ensaios de recuperação foram satisfatórios chegando próximo de 100 %.

# **Development of Green Chromatographic methods for organic compounds determination exploiting micellar medium**

Author: Eliane Cristina Vidotti

Adviser: Prof. Dr Noboru Hioka

## **Abstract**

In this work is proposed the separation and determination of organic molecules presenting different polarities by using the high performance liquid chromatography (HPLC) associated to the micellar medium, avoiding the usage of hazardous reagents as mobile phase. The determination of triazine herbicides in water, soil and food samples and the determination of textile dyes in industrial effluents are selected as applications, always using a RP-18 column as stationary phase, which was temporary modified by the constituents of the mobile phase during the analysis, increasing the possibilities of the usage of the strategy and become possible the development of green analytical methods exploiting the HPLC. The developed analytical method for triazine herbicides determination used 2.25 % (w/v) of SDS, 25.0 % (v/v) of ethylic alcohol, 50.0 mmol/L of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 0.100 mol/L (pH 7.0) phosphate buffer solution as mobile phase and RP-18 column as stationary phase. The method was selective, sensitive, robust, simple and present high analytical frequency with retention times of 11.4, 15.6 and 24.4 min and detection limits of 100, 100 and 150  $\mu\text{g/L}$  for simazine, atrazine and ametrine, respectively. The results are in agreement to those obtained by the conventional HPLC method that uses expensive and toxic organic solvents. The developed analytical method for textile dyes

determination used 1.0 % (v/v) of Triton X-100, 20.0 % (v/v) of ethylic alcohol and 5.00 mmol/L of phosphate buffer solution (pH 7.0) as mobile and a RP-18 column as stationary phases. The method was simples, selective, sensitive, robust and present high analytical frequency with retention times of 2.0, 2.9 and 5.1 min and detection limits of 0.40, 0.80 and 0.80 mg/L for Yellow Procion H-4R, Red Procion H-E7B and Brilliant Blue Remazol, respectively. The recovery tests were considered satisfactory as for all the samples were obtained almost 100 % for analyte recovery.

## **1. Introdução**

A sobrevivência do homem depende da ampliação da produção de alimentos e do uso da água, mas o crescimento acelerado da população, o aumento da urbanização das cidades, o grande desenvolvimento industrial e a intensa expansão das atividades agrícolas tem contribuído para a poluição dos corpos d'águas, dos solos e alimentos.

A utilização de defensivos agrícolas em plantações trouxe para a sociedade aspectos positivos e negativos. A principal vantagem é o controle eficaz de pragas e de outros elementos nocivos às plantações, ocasionando a aceleração do crescimento da produção de alimentos, suprimindo assim grande parte da demanda mundial. Em contrapartida, o uso descontrolado de agrotóxicos tem provocado contaminação de águas, solos e produtos de consumo humano [1]. Apesar do conflito de opiniões entre toxicidade e a necessidade de utilização dos pesticidas, observa-se um constante aumento no emprego de herbicidas, fungicidas, inseticidas e outros praguicidas na agricultura [2].

Por outro lado o grande desenvolvimento industrial, como por exemplo, a indústria têxtil também, vem contribuindo para a poluição de sistemas aquáticos, pois nem todo corante utilizado na etapa de tingimento se fixa às fibras dos tecidos, fazendo com que os efluentes líquidos das indústrias têxteis sejam ricos em corantes, que se lançados diretamente nos rios sem tratamento adequado, podem causar destruição da vida aquática. Além de causar poluição visual, os corantes têm a tendência de sequestrar metais, causando microtoxicidade aos peixes e outros organismos aquáticos. Adicionalmente a presença de corantes nos corpos d'águas afeta os processos de adsorção da luz por microorganismos, essenciais a sobrevivência dos ambientes aquáticos. Deve-se ressaltar que alguns corantes são carcinogênicos [3].

Devido a este cenário, o desenvolvimento de metodologias analíticas e instrumentos de monitoração dos níveis de pesticidas e de corantes, em especial, os têxteis em amostras variadas, é uma necessidade para o controle permanente da qualidade ambiental e da saúde pública, pois o problema da poluição ambiental tem caráter mundial e vem exigindo ações preventivas e corretivas para situá-lo em níveis aceitáveis, compatíveis com a preservação da qualidade de vida.

Atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) vem se destacando entre as demais técnicas analíticas devido a sua grande versatilidade e confiabilidade em análises de compostos químicos orgânicos, que necessitam de uma separação prévia, antes de sua quantificação. Porém, esta técnica analítica normalmente está associada a solventes orgânicos que são utilizados como fase móvel, provocando a geração de resíduos tóxicos após a análise química, sendo que estes solventes nem sempre são degradados no meio ambiente, não estando assim associada à tendência internacional moderna que exige o desenvolvimento de métodos analíticos limpos<sup>1</sup> [4]. Deve-se ressaltar que alguns métodos cromatográficos minimizam a utilização de solventes orgânicos tóxicos, mas não os eliminam completamente, pois muitas vezes, solventes orgânicos tóxicos são necessários como modificadores químicos [5].

Como tese de doutorado, vislumbrou-se a possibilidade de separar compostos orgânicos com diferentes polaridades utilizando-se a CLAE associada a ambientes micelares [6], sem a utilização de reagentes tóxicos como fase móvel. Neste sentido efetuou-se a determinação de herbicidas em amostras de águas, solos e alimentos e de corantes têxteis em amostras de efluentes industriais, sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica RP-18.

---

<sup>1</sup> Do inglês “Green Chemistry”.

## **2. Revisão Bibliográfica**

Nesta tese é proposta o desenvolvimento de métodos cromatográficos limpos explorando ambientes micelares para a determinação de pesticidas e corantes têxteis em amostras de solos, alimentos e águas. Devido às características dos métodos cromatográficos e dos ambientes micelares que permitem separar espécies químicas e solvatar moléculas orgânicas de baixa polaridade em meio aquoso, é possível prever que a união destas duas ferramentas pode dar origem a sistemas cromatográficos com características benéficas de ambos, possibilitando o desenvolvimento de métodos cromatográficos sem a utilização de solventes orgânicos tóxicos que poderão ser classificados como limpos. Assim, esta revisão foi subdividida de forma a destacar as características dos pesticidas e dos corantes têxteis, os fundamentos da cromatografia e dos ambientes micelares e informações sobre a validação de métodos analíticos.

### **2.1. Pesticidas**

No princípio, o homem gastava todo seu tempo buscando suprir suas necessidades básicas: alimentos, meios para manter seu corpo aquecido e abrigo contra seus inimigos naturais. Com o tempo, aprendeu que poderia domesticar e utilizar animais, que facilitava sua vida e exigia menos esforço em algumas tarefas. Assim passaram-se séculos nos quais o homem foi nômade, percorrendo terras em busca de pastagem para seus animais e alimentos para si mesmo. Com a descoberta de alguns instrumentos o homem começou a arar o solo e a cultivá-lo, economizando grande parte do tempo que antes era gasto na procura de alimentos.

Somente nos últimos séculos é que o homem conseguiu acabar com o fantasma de não conseguir produzir alimentos em quantidade e com qualidade suficientes para alimentar a população mundial. Assim, foram selecionadas variedades de culturas que apresentassem melhores características, principalmente com relação à produtividade, e foi descoberto que os fertilizantes ajudavam a melhorar as quantidades máximas de alimentos que podiam ser produzidos por unidade de área plantada. Recentemente o homem começou a travar outra batalha, desta vez, contra as pragas que consomem parte de suas lavouras, buscando salvar das doenças e da destruição suas reservas de alimentos [7].

De modo geral o controle das pragas das lavouras através do emprego de compostos químicos pode ser dividido em dois períodos distintos, aproximadamente separados entre si pela Segunda Guerra Mundial. A fase anterior a 2ª Guerra teve início em 1867 quando o acetoarsenito de cobre, conhecido pelo nome de Verde Paris, foi preparado comercialmente e indicado no controle de uma grande variedade de pragas. Depois, surge o arseniato de chumbo, utilizado como inseticida a partir de 1925, o ziram e o sulfato de tálio em 1930 e o pentaclorofenol em 1936, introduzido no mercado como preservativo de madeira.

O ano de 1939 marcou uma brusca transição na metodologia do controle das pragas com a descoberta, por Paul Müller, das propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) [8,9]. Antes deste fato histórico, a maioria dos produtos utilizados para controlar as pragas, especialmente na agricultura, era constituída de compostos inorgânicos e de extratos de vegetais, com destaque para a nicotina e a rotenona.

As primeiras moléculas de DDT, sintetizadas por Otmar Zeidler, foram descritas e apresentadas em 1873 (laboratório do professor Adolf Baeyer, na Universidade de Estrasburgo, cidade pertencente, neste período, a Alemanha). Adolf von Baeyer foi agraciado com o Prêmio Nobel em 1905 em reconhecimento a seus trabalhos na área de

química orgânica, particularmente na síntese de corantes orgânicos de emprego industrial [9].

O pesticida DDT ficou esquecido por 65 anos para ser redescoberto por Paul Müller nos laboratórios da Geigy, na Suíça, em 25 de setembro de 1939. Nesta época, Müller trabalhava na síntese de novos corantes industriais e, ao repetir o processo descrito por Zeidler, descobriu o poder surpreendente do DDT contra traças, besouros e uma grande variedade de insetos, incluindo mosquitos e outras pragas. A importância de sua descoberta pode ser evidenciada pelo Prêmio Nobel que recebeu em 1948 “pela descoberta da forte ação do DDT contra uma ampla variedade de artrópodes” [8,9]. Assim, a síntese de novos compostos químicos utilizados no controle de pragas é realizada até os dias atuais, sempre buscando compostos mais eficientes e de baixa toxicidade. A década de 1970 é caracterizada pelo lançamento dos compostos piretróides como a cipermetrina, a deltametrina, o fenpropanato e o fenvalerato de emprego mais seguros devido a menor toxicidade [9].

Na agricultura brasileira, o composto orgânico DDT foi introduzido na década de 40. Pelo seu notável poder residual, o DDT foi amplamente divulgado, e mais tarde, devido a esta mesma característica, foi proibido em diversos países e nacionalmente teve seu emprego restringido, podendo ser utilizado apenas em programas de controle da malária em áreas endêmicas [10].

Muitas são as pragas que competem com o homem na tentativa de conseguir alimentos. Daí a necessidade cada vez maior de se utilizar substâncias químicas que, geralmente, recebem a denominação de praguicidas, pesticidas ou biocidas.

O Decreto Federal nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, define como “agrotóxicos e afins” todos os “produtos e agentes de processos físicos, químicos e biológicos, destinados

ao uso de setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento” [11].

Nos últimos quarenta anos, é observada uma crescente utilização dos pesticidas principalmente devido ao controle eficaz de pragas e de outros elementos nocivos às plantações, ocasionando a aceleração do crescimento da produção de alimentos. Sem o uso de pesticidas, a produção e a qualidade dos alimentos seriam afetadas, podendo ter riscos graves de escassez de alimentos ou de elevação de preços [12]. Porém, muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização destes produtos na agricultura para gerar uma maior produção de alimentos, principalmente devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente em geral devido à utilização inadequada destes produtos [13]. Dessa forma alguns métodos alternativos de pequeno impacto à saúde e ao ambiente estão sendo desenvolvidos para realizar o controle de pragas, como por exemplo, o controle biológico [14], porém nada indica que os pesticidas convencionais possam ser substituídos por essas técnicas nos próximos anos com a eficiência desejada.

No Brasil, a década de 70 foi à época de grande expansão da produção e do uso de praguicidas, em razão dos incentivos para a produção agrícola e da política de exportação. Assim, movido por um grande aumento dos níveis populacionais, a pesquisa de novos praguicidas tem crescido consideravelmente [15]. Os pesticidas são classificados, segundo sua ação ou uso (Tab. 01).

**Tabela 01. Alguns dos principais grupos, funções e classes de pesticidas.**

| <b>Grupo e Função</b>                               | <b>Classes</b>  |
|---|---|
| <b>inseticidas</b><br>(controle de insetos)         | organofosforados, organoclorados, carbamatos, benzoiluréias e organometálicos   |
| <b>herbicidas</b><br>(controle de plantas daninhas) | triazinas, uréias, tiocarbamatos, amidas substituídas, ácidos benzóicos, piridinas, dinitrofenóis   |
| <b>fungicidas</b><br>(controle de fungos)           | ditiocarbamatos, dicaroximidas, ftalimidas, benzimidazóis, imidazóis, acilalaninas, sais inorgânicos (sulfato de cobre)                           |
| <b>rodenticidas</b><br>(controle de roedores)       | fosfito de zinco, fósforo branco, cumarina  |
| <b>algicidas</b><br>(controle de algas)             | sais de ferro, acetato de fentina, clinoclamina, cloretos, brometos de alquibenzilamônio, hipocloretos de cálcio                                  |
| <b>molusquicidas</b><br>(controle de moluscos)      | metaldeído  |
| <b>nematicidas</b><br>(controle de nematóides)      | metilcarbamato de benzofuralina, metilcarbamato de oxima e organofosforado  |
| <b>acaricidas</b><br>(controle de ácaros)           | organoclorados, organofosforados, piretróide, dinitrofenóis, benzoiluréia, organoestânicos, carbamatos, formamidina, e reguladores de crescimento |

Fonte: EPA - Environmental Protection Agency-USA [25]

O ideal seria que os pesticidas exercessem uma ação tóxica específica para um dado organismo alvo. Há casos onde a ação é específica, como, por exemplo, os herbicidas sistêmicos, que atuam nas plantas, porém, algumas vezes, eles não apresentam a ação específica desejada e atingem todo o ecossistema.

Dentre os grupos de pesticidas apresentados, neste trabalho temos interesse nos herbicidas. Estes são utilizados para prevenir o aparecimento, reduzir ou destruir ervas

daninhas e outros tipos de plantas terrestres ou aquáticas. O termo planta daninha apresenta uma série de significados de acordo com a situação, para a agricultura e horticultura é considerada toda planta que difere da cultura específica em cultivo [16].

A principal fonte de alimentos é a vegetal, que está exposta a milhares de plantas daninhas, muitas delas causando sérias perdas econômicas, em virtude de privar as plantas de umidade e nutrientes do solo, impedir a incidência direta da luz solar, reduzindo, assim, seu crescimento. Entretanto, não é somente no ponto de vista econômico que reside a importância dos herbicidas, pois seu uso oferece mais vantagens na preservação do ambiente do que os demais praguicidas. Além disso, estes geralmente apresentam baixa toxicidade para organismos não alvos, inclusive o homem; porém sempre que utilizados indiscriminadamente podem trazer consequências nocivas para o homem, entre elas, a presença de seus resíduos nos alimentos. É bastante elevado o uso de herbicidas no Brasil, sendo que as culturas que mais os utilizam são as de soja, cana-de-açúcar, milho e arroz [17].

A discussão que se estabelece em torno da nocividade desse tipo de pesticida está centralizada nas propriedades mutagênicas e carcinogênicas, suspeitas ou demonstradas, associadas a alguns compostos ou subprodutos [7]. Assim, novos produtos com características mais interessantes surgem a cada ano [18].

Os herbicidas são ativos em um ou mais locais dentro da planta. Os locais de ação são enzimas, proteínas ou outros onde estes possam se ligar e dificultar alguma função normal da planta. O modo de ação se dá por uma sequência de eventos, desde o contato do produto (herbicida) com a planta até o resultado final, de morte ou desativação. O mecanismo de ação é a forma específica pela qual um herbicida interfere de modo significativo em determinado processo biológico. O sítio de ação é o ponto exato numa

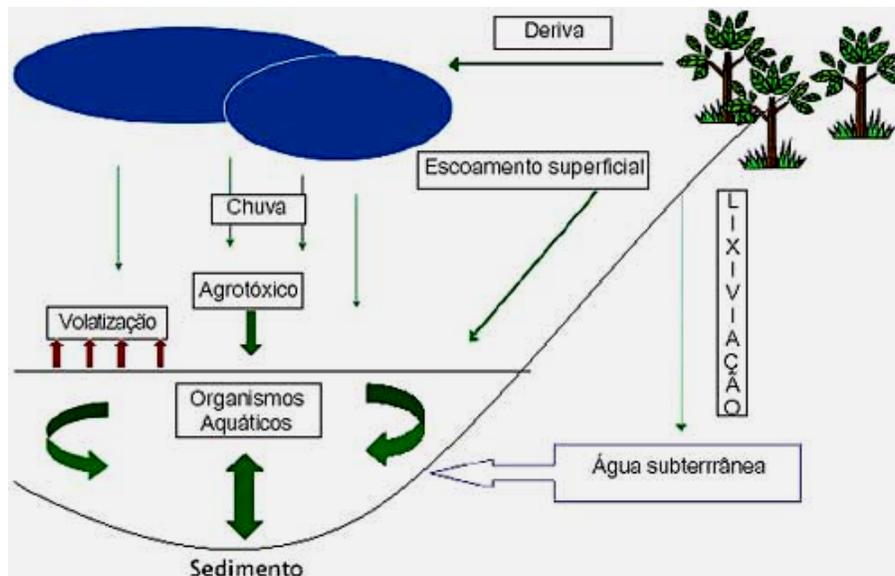
estrutura onde se dá o acoplamento ou etapa de processo em que um agente exerce sua ação. Exemplos deste tipo de ação são encontrados nos produtos inibidores do fotossistema II pertencentes ao chamado Grupo C (triazinas, triazonas, uréias substituídas, aminas e benzotiadiazoles), que apresentam como mecanismo de ação a inibição da fotossíntese.

O local de ação destes herbicidas é na membrana do cloroplasto, onde ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons. Uma planta é susceptível aos herbicidas inibidores da fotossíntese se o herbicida for acoplado ao sistema fotossintético e, assim, impossibilitar a ocorrência do transporte do elétron até a plastoquinona [19]; assim, não existe a produção de ATP e conseqüentemente ocorrerá à morte da planta ou sua desativação. Esta ação específica de alguns herbicidas é que faz com que os mesmos tenham menor grau de toxicidade que, por exemplo, os inseticidas, pois foram sintetizados para inibir uma ação específica das plantas, inexistentes nos seres humanos.

Os pesticidas são compostos orgânicos que podem ser classificados como xenobióticos. Paracelso (1493-1541), no século XVI relatou alguns trabalhos que, ainda hoje, são utilizados no monitoramento de resíduos, buscando assim definir limites (doses) de xenobióticos que não causem danos à saúde [20].

A contaminação direta causada por pesticidas é consequência da exposição excessiva das pessoas que trabalham com estes compostos e a forma indireta resulta da exposição da população aos pesticidas, seja por causa de acidentes, por contaminação do ambiente por resíduos industriais, por aplicações pouco cuidadosas ou ainda por contaminação dos produtos de consumo. Esta pode ser compreendida através de algumas características físico-químicas, por exemplo, os pesticidas organoclorados apresentam elevada estabilidade química, baixa solubilidade em água, baixa volatilidade à temperatura

ambiente, baixa biodegradação, fácil acumulação em tecidos adiposos e alguns destes compostos persistem por 15 a 20 anos no solo e podem ser arrastados pelas chuvas para o interior dos cursos de água, que também recebem estes compostos através de efluentes industriais, de esgotos, de sedimentos, dos solos, da atmosfera e por contaminação direta durante a aplicação [21]. Assim, o uso dos pesticidas pode causar sérios problemas relacionados à toxicidade devido a estabilidade, poluição do solo, água e ar, chegando até o produto para o consumo humano (Fig. 01).



**Figura 01. Diagrama do processo de lixiviação ocorrido no ambiente (fonte: [23])**

Estudos desenvolvidos em algumas regiões têm mostrado que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os ambientes aquáticos é geralmente baixa, entretanto, pesticidas persistentes e com grande mobilidade no ambiente tem sido detectados em águas superficiais e subterrâneas, devido aos processos de lixiviação [22,23].

Devido a grande quantidade de processos envolvidos na dinâmica da contaminação dos ambientes aquáticos, a avaliação de riscos de contaminação é difícil e a preocupação aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em águas destinadas ao consumo humano, tendo como base estudos toxicológicos e epidemiológicos; estes limites máximos variam de acordo com toxicidade, por exemplo, o herbicida atrazina, pode apresentar concentração máxima de 3 µg/L [24,25].

No Brasil, a portaria nº 020/CONAMA, de 18.06.86, estabelece limites máximos de contaminantes em águas dependendo do seu destino; sendo que, dentre estes, estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos e triazinas. A Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde (estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade) e assim estabelece limites de pesticidas em águas destinadas ao consumo humano que varia de acordo com a toxicidade do composto orgânico; para o herbicida atrazina o limite máximo permitido é de 2 µg/L [26].

Enfatiza-se que, ainda hoje existem muitas controvérsias com relação aos efeitos tóxicos crônicos dos pesticidas para o ser humano, principalmente quando consumidos em baixas doses ao longo da vida. Isto indica a necessidade de desenvolver estudos sobre a presença de resíduos no ambiente e seus efeitos sobre a saúde.

A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa, devido ao fato destes serem geralmente pouco solúveis neste meio, e também porque estes são diluídos em grandes volumes de água, mas, isto não torna impossível que concentrações muito altas venham a ocorrer depois de chuvas fortes. Os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos mesmo em concentrações baixas, pois estes compostos

podem ser concentrados em até 1000 vezes [24], portanto, não existe nível seguro previsível para pesticidas em água.

Em face ao cenário atual, torna-se necessário o desenvolvimento de instrumentos de monitoração dos níveis de resíduos de pesticidas nos alimentos, nos solos e nas águas, a fim de que sejam permanentemente controladas a qualidade ambiental e a saúde pública. Este monitoramento pode influenciar também relações de comércio exterior, já que uma importante fração da produção agrícola brasileira é destinada a mercados externos.

### **Análise química dos pesticidas**

Atualmente centenas de pesticidas são analisados em frutas, vegetais, águas e solos, buscando controlar níveis de resíduos, e assim melhorar a qualidade do meio ambiental e a saúde pública [27].

As análises de resíduos de pesticidas foram inicialmente reportadas na década de 50, primeiramente utilizando espectrofotometria e polarografia [28] e em seguida, por volta dos anos 60, a análise de pesticidas teve um grande avanço através da utilização das técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (CL) [29-31]. Somente na década de 70 a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) começou a se destacar como técnica de análise de pesticidas, juntamente com a CG, sendo estas duas técnicas as mais utilizadas até os dias atuais [32].

As duas técnicas são complementares, pois a CG, é utilizada para análises de compostos voláteis, ou daqueles que possam ser facilmente convertidos em derivados voláteis, e requer que os analitos possuam estabilidade térmica, sendo empregada principalmente na análise de inseticidas organoclorados e organofosforados [33]. A CLAE,

devido a sua versatilidade, pode ser aplicada a uma gama mais ampla de classes de pesticidas, especialmente os herbicidas, fungicidas e alguns inseticidas [34].

A análise dos pesticidas, em geral não é realizada diretamente, pois esta requer algumas etapas prévias como a extração do analito da matriz, muitas vezes complexa; a remoção de interferentes, que são extraídos junto com os analitos, e a separação, identificação e quantificação dos compostos de interesse. Mas, geralmente, ainda faz-se necessário uma etapa adicional, a pré-concentração dos analitos que é realizada antes da quantificação, pois é comum os pesticidas serem encontrados no ambiente em baixas concentrações.

A necessidade de controle permanente dos resíduos de pesticidas levou ao desenvolvimento de novas metodologias analíticas de extrações que apresentam como características simplicidade, boa seletividade, alta sensibilidade e baixo custo. Dentre as metodologias de extrações mais empregadas podem ser destacadas a extração líquido - líquido (ELL) e extração sólido - líquido (ESL), a extração em fase sólida (EFS), e microextração em fase sólida (MEFS), sendo esta última uma técnica em grande ascensão [35].

A extração líquido-líquido (ELL) ou a extração sólido-líquido (ESL), ainda são muito utilizadas e se baseiam na partição de diferentes analitos. Porém estas extrações apresentam a desvantagem de utilizar grandes quantidades de solventes orgânicos, na maioria das vezes tóxicos, inflamáveis, de difícil recuperação e degradação, além de requerer um longo tempo de extração, possuir custo elevado, ser trabalhosa e de difícil automação [36,37].

Buscando melhorar as condições das extrações e minimizar a utilização de solventes orgânicos, a EFS está sendo utilizada como uma alternativa, substituindo a ELL e ESL, ou

reduzindo as etapas existentes, através da junção entre as metodologias. A EFS utiliza uma coluna contendo um adsorvente apropriado para reter os analitos, e a eluição dos analitos é realizada quando da passagem de solvente adequado para eluir os analitos por gravidade, pressão de uma seringa ou através de uma bomba de vácuo. Esta apresenta grandes vantagens em relação a ELL, como menor tempo de análise, consumo reduzido de solventes e automação simplificada [38-40]. O aumento na utilização de metodologias empregando EFS propiciou o desenvolvimento de novos materiais para a construção de colunas de extração, tornando assim a metodologia analítica mais seletiva e sensível. A extração de pesticidas utilizando como fase sólida polímeros com C<sub>18</sub> teve grande destaque nos últimos anos [41-43]. Atualmente há grupos de pesquisas que desenvolvem adsorventes quimicamente modificados como, por exemplo, o grupo amino que é ligado ao suporte de sílica, a fim de melhorar as extrações pela diminuição de interferentes durante a análise, podendo estas fases sólidas serem consideradas mais seletivas [44].

A MEFS está sendo utilizada em muitos processos de extração, esta difere das outras técnicas de extração para amostras aquosas pelo menor tempo de análise e pela não utilização de solventes orgânicos em CG, minimizando a geração de descartes e a exposição ocupacional. Esta extração consiste em duas etapas básicas; a adsorção e a desorção dos compostos em uma fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico. A etapa de adsorção é realizada expondo a fibra diretamente na amostra ou em sua fase gasosa e a desorção ocorre no próprio injetor do cromatógrafo a gás ou no injetor da CLAE. Em comparação com outras metodologias, esta é simples, rápida e de fácil manuseio, além da vantagem da utilização de pequena quantidade de amostra, podendo ser aplicada a diversas áreas. Embora seja um método versátil, as condições de extração devem ser

otimizadas para cada tipo de amostra [45-47]. Após estas etapas prévias, inicia-se a análise qualitativa e quantitativa dos analitos.

A seguir estão apresentadas algumas aplicações recentes da CLAE para análises dos pesticidas em amostras variadas (Tab. 02)

**Tabela 02. Determinação de pesticidas em amostras de frutas, vegetais, águas e solos utilizando CLAE.**

| Matriz           | Pesticida               | Coluna          | Fase móvel                      | Detector | LD            | Ref |
|------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------------|----------|---------------|-----|
| Solo             | inseticidas             | C <sub>18</sub> | MeOH:H <sub>2</sub> O           | UV       | 0,20-95 ng/mL | 48  |
| uva              | fungicidas              | C <sub>18</sub> | ACN:H <sub>2</sub> O            | UV       | 20-200 µg/kg  | 49  |
| água             | herbicidas              | C <sub>18</sub> | ACN:H <sub>2</sub> O            | UV       | 9,0-33 ng/L   | 50  |
| uva e vinho      | inseticidas             | C <sub>18</sub> | MeOH:H <sub>2</sub> O           | UV       | 3,0 µg/kg     | 51  |
| água             | fungicidas              | C <sub>18</sub> | ACN:H <sub>2</sub> O            | UV       | 1,0-10 ng/mL  | 52  |
| tomate e uva     | herbicidas e fungicidas | C <sub>18</sub> | ACN:0,01%<br>NH <sub>4</sub> OH | UV       | 14-28 µg/L    | 53  |
| morango          | multiresíduos           | C <sub>18</sub> | MeOH:H <sub>2</sub> O<br>:ACN   | UV       | 13-22 µg/kg   | 54  |
| soluções salinas | herbicidas              | C <sub>18</sub> | ACN:H <sub>2</sub> O            | UV       | 4,8-46 µg/L   | 55  |

Torna-se interessante apontar que a coluna C<sub>18</sub> é uma das mais comumente utilizadas em laboratórios que utilizam a CLAE.

Adicionalmente outras técnicas analíticas utilizadas atualmente nas análises de pesticidas (em menor escala), são: cromatografia em camada delgada [56], eletrocinética micelar [57], métodos eletroanalíticos [58] e eletroforese capilar [59].

## 2.2. Corantes Têxteis

Há milhares de anos atrás teve início o uso das cores pelo homem, e acredita-se que o primeiro corante a ser empregado foi o Negro-de-Fumo (Carbon Black). No período glacial os caçadores utilizavam fuligem e ocre para pintar as paredes das cavernas reservadas ao culto, criando obras que resistiram milênios. Por volta de 3.000 a.C., surgiram alguns corantes inorgânicos sintéticos, como o Azul Egípcio. Com o tempo muitos corantes naturais foram descobertos pelo homem, como o vermelho imponente das capas dos centuriões romanos que era obtido de um molusco chamado Murex, um caramujo marinho, ou o corante índigo (ainda hoje utilizado para dar coloração às calças jeans), extraído da planta *Isatis Tinctoria*; este corante era conhecido desde os egípcios até os bretões [60].

Na segunda metade do século XIX, o químico alemão Hofmann convidou um de seus alunos, William H. Perkin, para ser seu assistente. Perkin trabalhava sem descanso em seu pequeno laboratório caseiro, estudando a oxidação da fenilamina, também conhecida como Anilina, com dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Certa vez ao fazer a reação entre estes compostos apareceu um estranho precipitado; após jogá-lo fora, e lavar os resíduos do frasco com álcool, Perkin se admirou com o aparecimento de uma bonita coloração avermelhada. Ele repetiu a reação sob as mesmas circunstâncias e obteve o corante novamente, que denominou “Púrpura de Tito”; este posteriormente foi denominado pelos franceses de Mauve, nome adotado até hoje. Imediatamente Perkin patenteou sua descoberta e montou uma indústria [61,62].

Após a descoberta da Mauve, os químicos tentaram sintetizar diversos outros corantes; inclusive, Perkin montou um amplo laboratório de pesquisa, onde conseguiu

sintetizar outros corantes. Em 1874, Perkin vendeu sua indústria para se dedicar exclusivamente à pesquisa, passando a descobrir sínteses históricas. Nessa época, os corantes naturais, cultivados extensamente na Índia, já não conseguiam competir com os sintéticos, já que estes últimos possuem cores vivas e muitas variedades [61,62].

Características como facilidade de produção, baixo custo, constância de estrutura e grande variedade de cores, fazem com que a produção de corantes sintéticos seja cada vez maior, pois a utilização destes é economicamente viável principalmente para a indústria têxtil [63].

Sem sombra de dúvidas é a indústria de tecidos o ramo que consome as maiores quantidades de corantes. Apesar da tintura de tecidos ser uma arte que começou há milhares de anos, a tecnologia moderna contempla inúmeras etapas que dependem da natureza da fibra têxtil, características estruturais, classificação e disponibilidade do corante para aplicação, propriedade de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido, considerações econômicas e muitas outras condições [62,64].

O processo de tingimento é um dos fatores fundamentais no sucesso comercial dos produtos têxteis. A seguir estão algumas características dos principais tipos de corantes utilizados industrialmente no processo de tingimento [2,62,65].

#### ❖ *Corantes Azóicos*

Estes corantes são constituídos de dois compostos quimicamente reativos que são aplicados à fibra em dois estágios, produzindo pigmento insolúvel dentro da fibra. Produzem tonalidades brilhantes e escuras de amarelo, laranja, vermelho, marrom, preto e azul. Corantes azóicos apresentam grande estabilidade frente à luz e ao calor e resistência ao peróxido e outros alvejantes. No entanto, seu uso tem declinado nos últimos anos por

causa dos custos de aplicação e suspeitas sobre a possível presença de naftilaminas carcinogênicas no efluente.

Para o tingimento, inicialmente a fibra é tratada com solução alcalina de naftol (naftolato). A adição de formaldeído é necessária para estabilização do naftol dentro da fibra. Após a secagem, a fibra é imersa em solução de base diazotada. A base, insolúvel em água, é solubilizada por meio de nitrito de sódio e ácido, com adição de tamponante para neutralização do excesso de ácido mineral. A reação entre os dois compostos produz o cromóforo azo colorido dentro da fibra. O tratamento final consiste em ensaboamento e enxágue.

#### ❖ *Corantes Ácidos*

Corantes ácidos são compostos aniônicos com um ou mais grupos sulfônicos ou carboxílicos em sua estrutura molecular e, portanto, são solúveis em água. A afinidade fibra-corante é resultante das ligações iônicas entre a parte sulfônica ácida do corante e os grupos aminos básicos presentes nas fibras, que são convertidos em grupos catiônicos pela adição de ácido no processo de tingimento. As cores são, geralmente, brilhantes e o material tingido apresenta resistência considerada de boa a excelente. Esta classe de corantes inclui os metais: cromo, cobre, estanho e alumínio e caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, cetanimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação.

A sua aplicação é feita por imersão da fibra em solução aquosa do corante, geralmente a temperaturas elevadas (fervura). A adição de ácidos e sais ao banho de

tingimento facilita a montagem do corante e a igualização. O controle do processo por temperatura ou por pH é utilizado para regular o processo de tingimento.

❖ ***Corantes Básicos***

Corantes básicos são fortemente fixados através de ligações iônicas da parte catiônica aos sítios aniônicos das fibras (não migram com facilidade). Produzem cores brilhantes e de boa resistência (exceto em fibras naturais), e apresentam uma cartela de cores ilimitada. Sua aplicação exige uma boa preparação (purga), em banhos levemente ácidos e a temperaturas elevadas (fervura).

❖ ***Corantes à Cuba***

Os corantes à cuba apresentam uma grande quantidade de cores, mas as tonalidades, geralmente, são opacas. Estes são praticamente insolúveis em água, porém durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco). São usados, principalmente, no tingimento e estamparia de algodão e fibras celulósicas, ou em produtos que requeiram boa resistência a vários agentes. Apresentam ótima estabilidade e constância nas cores frente à lavagem, luz e transpiração.

A preparação do tecido, incluindo alvejamento e mercerização, é importante. A aplicação do corante por esgotamento pode ser conduzida pelos processos leuco, pré-impregnação e alta temperatura.

❖ ***Corantes Diretos***

Esta classe de corante compreende compostos aniônicos e solúveis em água. Produzem cores escuras e brilhantes que variam enormemente quanto a solidez e a luz. A

estrutura molecular dos corantes diretos é estreita e plana, permitindo que estas moléculas se alinhem com as fibrilas planas da celulose, sendo as moléculas de corante retidas por interações de van der Waals e ligações de hidrogênio. Os corantes são absorvidos dentro das fibras hidrofílicas à medida que elas se expandem na solução aquosa. Esta classe é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo, etc.).

Corantes diretos são comercializados pulverizados, e devem ser dissolvidos em água morna, formando uma pasta, que é diluída em água quente, fervida e filtrada antes da adição ao banho. Sais como cloreto de sódio ou sulfato de sódio são adicionados ao banho para contrabalançar a carga ligeiramente negativa que a celulose apresenta em solução aquosa, facilitando a montagem do corante. O material têxtil é tingido e enxaguado com água fria. Do ponto de vista de prevenção da poluição ambiental, os corantes diretos são os melhores, pois utilizam menores quantidades de sal e outros produtos poluentes.

#### ❖ *Dispersivos*

São compostos aniônicos, com solubilidade extremamente baixa em água e são comercializados nas formas pulverizada e líquida. São aplicados como uma dispersão de particulados em um banho. São utilizados para tingir fibras (acetato celulose, nylon, polyester e poliacrilonitrila) e também para a obtenção de cores claras em poliamidas e acrílicos. No tingimento as partículas são dissolvidas a baixas concentrações no meio aquoso, mas migram para a superfície da fibra sintética dos polímeros devido à sua grande solubilidade no substrato. Temperaturas elevadas (130°C) e pressão superior à atmosférica geralmente são usadas em sua aplicação, pois essas condições reduzem a necessidade de aceleradores químicos, que são requeridos a baixas temperaturas. Apresentam boa estabilidade frente à luz e resistência à transpiração e lavagens a úmido e a seco.

### ❖ *Corantes de Enxofre*

É uma classe de corantes que após a aplicação forma compostos macromoleculares com ligações de polissulfetos ( $-S_n-$ ), os quais são altamente insolúveis em água. Estes compostos têm sido utilizados principalmente na tintura de fibras celulósicas, conferindo as cores, preto, verde oliva, azul marinho e marrom. São insolúveis em água e reduzidos em solução alcalina de agentes redutores. O uso destes corantes tem diminuído devido aos resíduos contendo sulfetos, gerados nos processos de tingimento.

O procedimento de utilização dos corantes de enxofre leuco consta das seguintes etapas: umectação do tecido com agente penetrante e enxágue; preparo de um novo banho com mais agentes antioxidantes e complexantes; adição lenta do corante; adição lenta de sal; contato por 30 minutos; lavagem por transbordamento; oxidação; enxágue, ensaboamento e novo enxágue. São muito resistentes a agentes oxidantes e à remoção por lavagem, possuem boa estabilidade frente à luz e são relativamente baratos quando comparados a outros corantes, sendo geralmente usados para cores escuras.

### ❖ *Corantes Reativos*

São compostos aniônicos largamente utilizados na indústria têxtil. Estes corantes contêm um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligações químicas covalentes com as fibras, tornando-se parte dela e apresentando excelente resistência. A elevada taxa de difusão conduz ao rápido estabelecimento do equilíbrio de tingimento e igualização de irregularidades de tingimento. Existem numerosos tipos de corantes reativos, mas os principais são os que possuem a função azo e antraquinona como os grupos cromóforos e os clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila. A ligação existente entre o corante e a fibra confere

grande estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes [2,62,63].

### **Efluentes Têxteis**

Como nem todo corante utilizado na etapa de tingimento se fixa às fibras, os efluentes das indústrias têxteis contêm corantes, que devido à sua própria natureza, são facilmente detectáveis até mesmo a olho nu.

Estima-se que cerca de 15% da produção mundial de corantes é perdida para o meio ambiente durante a síntese, processamento ou aplicação desses, sendo a fixação incompleta dos corantes na etapa de tingimento a principal fonte desta perda, o que representa um dos grandes problemas ambientais enfrentados pelo setor têxtil [66].

Quando não tratados adequadamente e lançados em águas naturais, os efluentes provenientes do processo de tingimento das fibras podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, o que modifica a atividade fotossintética dos organismos aquáticos [67]. Porém, os aspectos ambientais e os riscos toxicológicos destes compostos são baseados na estrutura, solubilidade, possíveis interações, rota metabólica e principalmente a relação risco/custo/ benefício.

Os corantes sintéticos também apresentam riscos à saúde humana que estão diretamente relacionados à forma e tempo de exposição, ingestão oral, sensibilidade da pele e sensibilidade das vias respiratórias. A análise do grau de toxicidade oral de corantes, medido através de 50% da dose letal ( $LD_{50}$ ) tem demonstrado que apenas um número reduzido de corantes pode apresentar toxicidade aguda ( $LD_{50} < 5\text{g/kg}$ ) e são encontrados particularmente nos corantes bis-azo e catiônicos [62].

Estudos recentes realizados com corantes mostraram que estes e seus intermediários podem apresentar riscos à saúde, devido as suas propriedades carcinogênicas e mutagênicas. O grupo que tem atraído maior atenção é o dos corantes que contêm função azo - aromático como cromóforos; a biotransformação destes corantes orgânicos pode levar a formação de aminas, benzinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica [68].

Nos últimos anos, o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o tratamento de efluentes tem sido objeto de grande interesse mundial, devido a maior conscientização da população e também da maior rigidez das legislações ambientais. As principais metodologias disponíveis para descoloração das águas de rejeito envolvem principalmente processos de adsorção [69], precipitação [70], eletroquímicos [71], fotoquímicos [72], biodegradação [73] e atualmente a união de dois ou mais processos convencionais [74, 75].

Seguindo uma tendência mundial, a indústria têxtil tem dedicado grande esforço para atender às regras de proteção ambiental, embora a aplicação destes corantes no processo de tinturaria constitua efetivamente um grande problema, uma vez que grande parte destas indústrias são pequenas, o que torna difícil a atividade de fiscalização. O problema da poluição ambiental tem caráter mundial e vem exigindo ações preventivas e corretivas para situá-lo em níveis aceitáveis, compatíveis com a preservação da qualidade de vida.

Por outro lado, métodos analíticos para a identificação e quantificação dos corantes têxteis são restritos, visto que métodos espectrofotométricos sofrem interferências espectrais [76], voltamétricos sobreposição de picos [77] e métodos cromatográficos [78] apresentam dificuldade de separação devido à alta polaridade das moléculas, em especial aqueles corantes que apresentam vários grupos sulfônicos; estes grupos iônicos limitam a

interação com colunas cromatográficas apolares ou opostamente reagem de forma irreversível com colunas polares na CLAE. Ao mesmo tempo corantes iônicos não são voláteis para serem analisados por CG [79].

### **2.3. Cromatografia**

Os termos “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que em 1906, descreveu suas experiências com colunas de vidro recheado com vários sólidos, finamente divididos, para separar componentes de extrato de folhas e gema de ovo que eram arrastados através da coluna com éter de petróleo. O nome deriva-se das palavras gregas “chrom” (cor) e “graphe” (escrever) [80].

Cromatografia é um método físico - químico de separação de espécies de uma mistura, que é realizada através da distribuição destes entre duas fases. Uma das fases permanece fixa (fase estacionária) enquanto a outra se move através da primeira (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais que provocam a separação dos compostos [81]. Compostos que apresentam alta afinidade pela coluna cromatográfica (fase estacionária) apresentarão tempo de retenção mais elevado, enquanto que aqueles que apresentam baixa afinidade pela coluna cromatográfica serão caracterizados por um baixo tempo de retenção e serão eluídos rapidamente da coluna. É esta diferença de interação que permite que compostos químicos sejam separados utilizando a cromatografia.

Os diferentes métodos cromatográficos podem ser classificados considerando-se diversos critérios, sendo alguns deles:

❖ *Forma física do sistema cromatográfico*

O sistema cromatográfico pode ser subdividido em cromatografia planar e cromatografia em coluna. A cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel (CP), cromatografia por centrifugação (chromatotron) e cromatografia em camada delgada (CCD), enquanto que a cromatografia em coluna é dividida em vários tipos de cromatografias, classificados através da fase móvel, fase estacionária e modo de separação.

❖ *Fase móvel*

É dividida em três tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa (CG) que utiliza como fase móvel um gás inerte, a cromatografia supercrítica (CSC) que utiliza um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica, e a cromatografia líquida (CL) que apresenta uma subdivisão: cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel (líquido) é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, enquanto que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utiliza fases estacionárias de partículas menores, fazendo-se necessário à utilização de uma bomba de alta pressão para que a eluição da fase móvel seja realizada.

❖ *Fase estacionária*

Esta pode ser classificada diferenciando fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar suportado sobre um sólido ou imobilizado sobre este, sendo considerado como fases quimicamente ligadas.

❖ *Processos de separação*

As separações cromatográficas ocorrem devido a processos de adsorção, partição, troca iônica, exclusão, bioafinidade ou misturas desses mecanismos:

*cromatografia por adsorção* - utiliza uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido na superfície da partícula sólida. O equilíbrio entre as duas fases justifica a separação dos diferentes solutos.

*cromatografia por partição* - utiliza uma fase estacionária líquida que forma um filme fino na superfície de um suporte sólido e o soluto fica em equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel.

*cromatografia de troca iônica* - utiliza ânions ou cátions ligados covalentemente à fase estacionária sólida, geralmente uma resina. Os íons de carga oposta do soluto são atraídos para a fase estacionária por forças eletrostáticas.

*cromatografia por exclusão molecular* - esta técnica separa as moléculas pelo tamanho, com os maiores solutos passando pela fase estacionária com maior velocidade. Ao contrário de outros tipos de cromatografia, não há interação atrativa entre a fase estacionária e o soluto, mais exatamente, a fase líquida ou gasosa passa pelo gel poroso.

*Cromatografia por bioafinidade* - esta se baseia no isolamento de macromoléculas biológicas, através da utilização das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos [82-84].

A utilização da CLAE teve início na década de 70, através do desenvolvimento de suportes para fase estacionária com partículas de diâmetros pequenos (~ 5µm), que foi responsável por melhores separações, comparado com a cromatografia líquida clássica

(CLC); devido à utilização destas partículas fez-se necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido à baixa permeabilidade [85], diferenciando assim a CLAE da CLC.

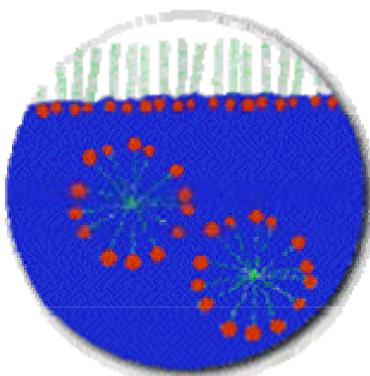
Atualmente, existem inúmeras fases estacionárias para CLAE, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla variedade de compostos. A sílica é comumente utilizada como suporte para as fases estacionárias, mas o uso de suportes modificados possibilita a produção de uma variedade de colunas com diferentes propriedades e seletividade. De acordo com a polaridade da fase estacionária, a cromatografia pode ser classificada como normal ou reversa; quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel esta é considerada normal, e por outro lado, quando esta possui menor polaridade que a fase móvel é considerada reversa. Atualmente a utilização da fase reversa  $C_{18}$  é destaque em separações, como por exemplo, de pesticidas [43].

Devido a sua versatilidade e confiabilidade, a CLAE tem sido utilizada como técnica de análise em várias áreas da ciência. Normalmente, a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência está associada a solventes orgânicos que são utilizados como fase móvel, provocando a geração de resíduos tóxicos após a análise química, sendo que estes nem sempre são degradados no meio ambiente. Assim, esta técnica analítica não está associada à tendência internacional moderna que exige o desenvolvimento de métodos analíticos limpos. Na tentativa de solucionar esta deficiência, têm sido propostos métodos analíticos explorando a cromatografia líquida de par iônico, em ambientes micelares aquosos [5]. Nesta modalidade cromatográfica, é usado como fase móvel soluções contendo íons (par iônico) para neutralizar a carga da molécula a ser separada podendo o par iônico formado ser separado de forma semelhante às moléculas orgânicas sem carga.

Deve-se ressaltar que esta estratégia minimiza a utilização de solventes orgânicos tóxicos, mas não o elimina completamente, pois muitas vezes, solventes orgânicos tóxicos são utilizados como modificadores químicos.

## 2.4. Ambientes micelares

Surfactantes<sup>2</sup> são moléculas anfifílicas que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Moléculas anfifílicas típicas são aquelas que possuem uma cabeça polar (hidrofílica) e uma parte hidrofóbica (formada em geral por uma ou duas cadeias parafínicas). O comportamento destas moléculas está diretamente relacionado ao meio em que elas se encontram. Em solventes polares as moléculas anfifílicas posicionam as cabeças polares para a parte mais externa do agregado (contato com o meio) e encerram a cadeia parafínica para a região interna (Fig. 02). A estes sistemas coloidais estruturados dá-se o nome de micelares.



**Figura 02. Ambientes micelares em meio aquoso.**

---

<sup>2</sup>A definição da palavra surfactante é baseada na contração da frase em inglês que descreve “surface-active agents”. Estes possuem uma superfície ativa, devido à concentração de determinadas espécies em uma região interfásica: água-ar, óleo-água ou sólido líquido.

Agora se as mesmas moléculas estão em um meio apolar surge à formação de micelas reversas onde as cabeças polares se posicionam na parte interna e as cadeias parafínicas tendem a maximizar o contato com o solvente apolar [86,87].

A formação das micelas é predominantemente um efeito entrópico, uma vez que a aproximação das cabeças polares (no caso, carregadas) resulta em contribuição entálpica desfavorável o que levaria a energia livre de Gibbs de micelização positiva; não é o caso, pois o processo de micelização dá-se espontaneamente.

A contribuição entrópica natural vem da estruturação local da água devido, principalmente, às ligações de hidrogênio. A comparação que deve ser realizada é: surfactantes isolados constituem  $n$  moléculas de monômeros solvatadas (com grande estruturação do solvente ao redor destas) formando  $n$  “gaiolas” de solvente, contra, no caso da micela, apenas uma “gaiola” de solvente com maior tamanho e maior grau de estruturação da água. A primeira situação impõe quantitativamente uma estruturação maior do solvente como um todo uma vez que para o resultado total deve-se considerar a somatória de estruturas – gaiolas ( $n$  vezes), enquanto que na segunda situação tem-se apenas uma única gaiola (estruturada), o que no balanço final é entropicamente favorecido (menor estruturação total do sistema), devido a esta reordenação da estrutura da água quando são formadas as micelas, estas são entropicamente favorecidas quando comparadas às moléculas de surfactantes não associadas entre si, ou seja, monômeros individuais [88, 89].

Estes sistemas micelares tendem a se associar em aglomerados (Fig. 03), na forma de esferas, cilindros, lamelas entre outros.



**Figura 03. Diferentes aglomerados de sistemas micelares.**

Os surfactantes são classificados de acordo com a carga do grupo polar, podendo ser: catiônicos quando possuem carga positiva, aniônicos quando possuem a carga negativa, neutros quando não possuem carga e Zwitteriônicos quando a carga líquida é nula em virtude destas moléculas possuírem dois grupos na cabeça polar, um positivo e um negativo [90].

Entre os surfactantes sintéticos, os aniônicos são mais largamente produzidos, sendo os catiônicos produzidos em menor escala; uma razão para o menor uso dos surfactantes catiônicos é a sua alta toxicidade em água comparada a outros tipos. Os surfactantes Zwitteriônicos são amplamente utilizados na fabricação de cosméticos, pois estes não irritam a pele e os olhos. Os surfactantes não iônicos são tão produzidos quanto os aniônicos e geralmente são compatíveis com outros tipos de surfactantes [90].

Nas últimas décadas, o uso de surfactantes teve um aumento significativo em praticamente todos os campos da química analítica onde são frequentemente empregados para modificar o meio reacional permitindo solubilizar espécies polares ou apolares de baixa solubilidade ou promover um novo meio que altere a velocidade reacional [88].

Considerando as características dos métodos baseados em cromatografia líquida de alta eficiência e as características dos ambientes micelares, é proposta exploração da CLAE associada à ambientes micelares, sem a utilização de reagentes tóxicos como fase móvel.

Este sistema é investigado em determinações de herbicidas triazínicos e de corantes têxteis, sempre utilizando como fase estacionária uma coluna cromatográfica RP-18, temporariamente modificada durante a análise química pelos constituintes da própria fase móvel, o que amplia as possibilidades de aplicação da estratégia e possibilita o desenvolvimento de métodos analíticos limpos explorando a CLAE.

Considerando que esta tese preconiza o desenvolvimento de métodos analíticos, a seguir são descritos os principais testes de validação de um novo método analítico.

## **5. Validação do método**

A confiabilidade de um novo método analítico é avaliada através da submissão do mesmo, aos procedimentos de validação do método. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado.

No Brasil existem duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: exatidão, precisão, linearidade, faixa de aplicação, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou figuras analíticas de mérito [91-94].

### **Exatidão**

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor referência, isto é, se refere a proximidade

entre o valor determinado e o valor verdadeiro. A exatidão é expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade conhecida da substância em exame incorporada em um meio de composição definida.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Para verificar a exatidão, recomenda-se que a coleta de dados seja de nove determinações sobre um mínimo de três diferentes (por exemplo, três diferentes concentrações para análises em triplicatas). Os dados obtidos devem ser registrados como o percentual de resposta da quantidade conhecida adicionada ou como a diferença entre a média e o valor teórico com os respectivos intervalos de confiança.

### **Precisão**

A precisão é uma medida da reprodutibilidade de um resultado, representa o grau de repetitividade entre os resultados de análise individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes para uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade corresponde aos resultados obtidos através de várias reproduções de um método, nas mesmas condições, em curto intervalo de tempo (precisão entre ensaios). Essa determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, três repetições cada um).

A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do próprio laboratório devido a eventos como diferentes dias de análise, analistas, equipamentos, etc.

A reprodutibilidade refere-se ao grau de concordância entre os resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios.

### **Limite de Detecção (LD)**

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente três vezes; e o método baseado em parâmetros da curva analítica [91-94].

### **Limite de Quantificação (LQ)**

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância a ser analisada que pode ser quantificada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ também pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, normalmente dez vezes; e o método baseado em parâmetros da curva analítica. A determinação do limite de quantificação representa um compromisso entre a concentração, precisão e a exatidão exigida [91-94].

### **Linearidade e faixa linear**

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise dentro de uma determinada variação. A faixa linear corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda os requisitos de precisão, exatidão e

linearidade através do método. A faixa de variação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos através do método utilizado [91-94].

### **Robustez**

Corresponde à capacidade de um método não ser afetado por uma pequena modificação em seus parâmetros. A robustez do método é avaliada através de parâmetros modificados como a composição da fase móvel, pH, força iônica, etc, e a respectiva determinação do seu efeito (se houver) sobre os resultados a serem obtidos com a metodologia [91-94].

### **3. Objetivos**

#### **3.1 – Objetivo Geral**

Desenvolver métodos cromatográficos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sem recorrer a solventes tóxicos, explorando ambientes micelares.

#### **3.2 – Objetivos Específicos**

Desenvolver método cromatográfico limpo utilizando CLAE para determinar os herbicidas triazínicos simazina, atrazina e ametrina em amostras água, solo e alimentos.

Desenvolver método cromatográfico limpo utilizando CLAE para determinar os corantes Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brilhante Remazol em amostras de efluentes têxteis.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Reagentes e Soluções

#### Herbicidas

Soluções estoque de 1000 mg/L dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina (Fig. 04) (Research Triangle Park NC) foram preparados através de dissoluções de 0,1000 g dos reativos em metanol e completando-se o volume para 100,0 mL com o mesmo solvente, sendo esta solução resfriada a 4 °C. Soluções de trabalho (1,00 – 50,0 mg/L) foram preparadas diariamente através de diluições adequadas das soluções estoque com água desionizada.

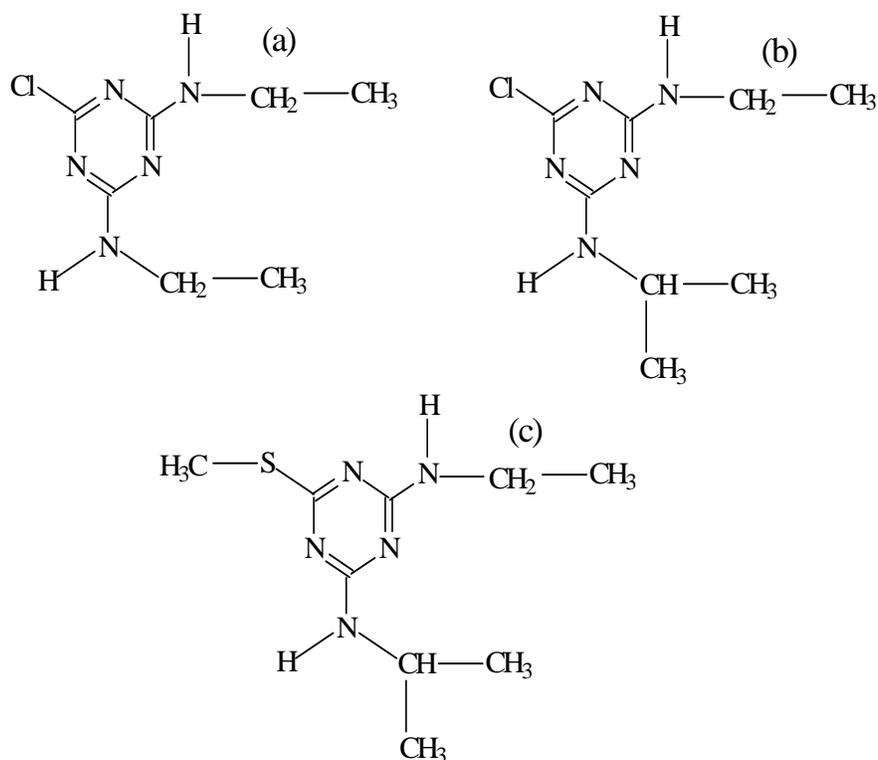


Figura 04. Estruturas moleculares dos herbicidas triazínicos. (a) simazina, (b) atrazina e (c) ametrina.

Soluções dos surfactantes: CTAB (brometo de cetiltrimetil amônio) 0,50 % (m/v), SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,50 % (m/v) e SDBS (dodecil benzeno sulfonato de sódio) 0,50 % (m/v) foram preparadas pela dissolução de 0,5000 g dos surfactantes em 100,0 mL de água desionizada, e Triton X-100 (polioxietileno (9-10) p-tercetil fenol) 0,50 % (v/v) foi preparada pela dissolução de 0,50 mL do surfactante em balão volumétrico de 100,0 mL com água desionizada.

Solução tampão 0,100 mol/L de hidrogeno fosfato de sódio pH 7,0 foi preparada pela dissolução de 0,2840 g de fosfato de sódio, sendo o pH da solução ajustado com ácido clorídrico (HCl) 1,0 mol/L, tendo como volume final da solução 100,0 mL.

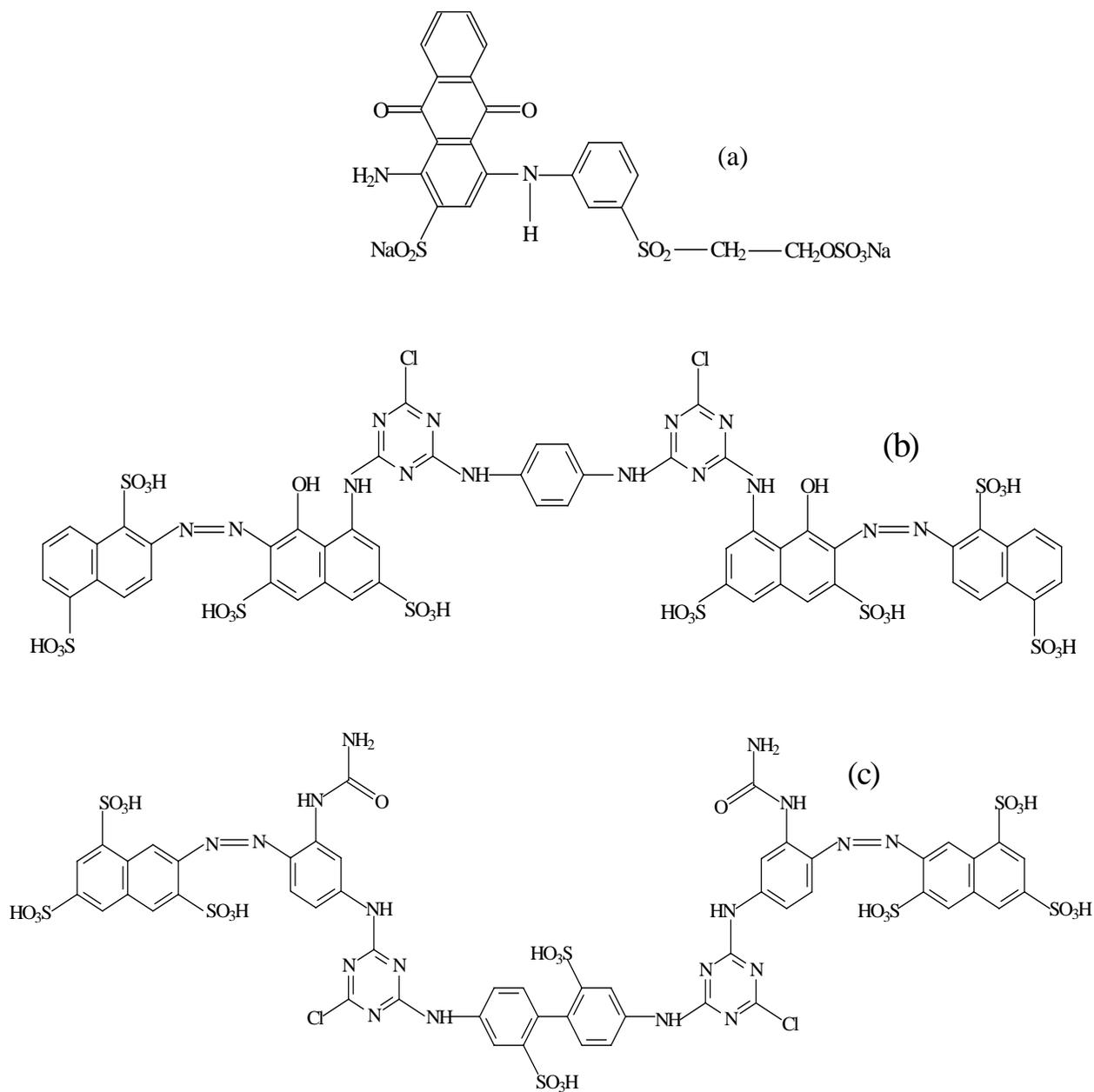
Solução de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,050 mol/L, foi preparada pela dissolução de 0,5350 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  em 100,0 mL água desionizada.

Solução de álcool etílico (EtOH) 25,0 % (v/v) foi preparada pela dissolução de 25,0 mL de EtOH até um volume de 100,0 mL com água desionizada.

Solução de SDS 2,25 % (m/v) foi preparada pela dissolução de 2,2500 g do surfactante em 100,0 mL de água desionizada.

### **Corantes**

Os corantes têxteis Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brilhante Remazol (Fig. 05) foram fornecidos por uma indústria têxtil (Região de Maringá). As soluções estoque (1000,0 mg/L) foram preparadas através de dissolução de 0,1000 g dos reativos (corantes têxteis) em água e completando-se o volume para 100,0 mL com o mesmo solvente. Soluções trabalho (1,00 a 200 mg/L) foram preparadas diariamente através de diluições adequadas das soluções estoque com água desionizada.



**Figura 05. Estrutura molecular dos corantes têxteis.** (a) Azul Brillhante Remazol, (b) Vermelho Procion H-E7B e (c) Amarelo Procion H-4R.

As soluções dos surfactantes (CTAB, SDS, SDBS e Triton X-100) foram preparadas como descrito anteriormente para os herbicidas.

Solução estoque de tampão hidrogeno fosfato de sódio 0,1000 mol/L (pH 7,0) foi preparada pela dissolução de 0,2840 g de fosfato de sódio, sendo o pH da solução ajustado com ácido clorídrico (HCl) 1,000 mol/L e o volume final da solução foi 100,0 mL e as soluções de trabalho foram preparadas diariamente através de diluições adequadas.

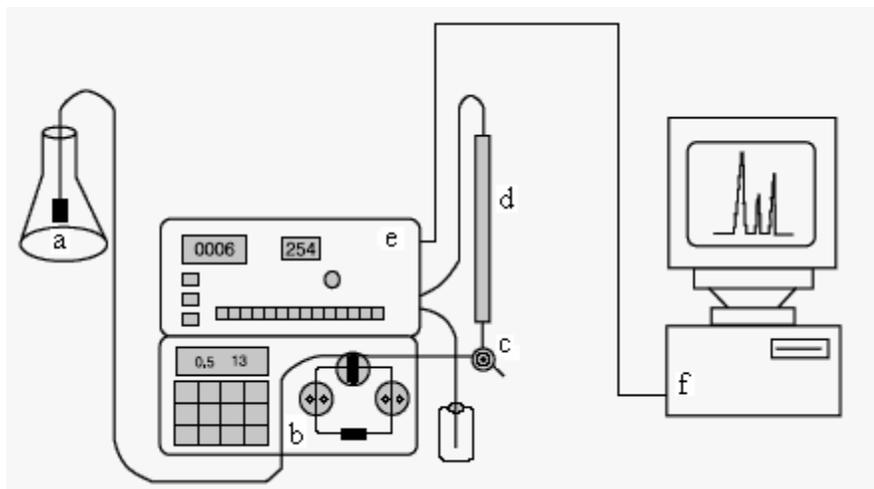
Solução de álcool etílico (EtOH) 20,0 % (v/v) foi preparada pela dissolução de 20,0 mL de EtOH até um volume de 100,0 mL com água desionizada.

Solução de Triton X-100 1,0 % (v/v) foi preparada pela dissolução de 1,0 mL do surfactante em balão volumétrico de 100,0 mL com água.

## **4.2. Equipamentos e acessórios**

Foi utilizado um espectrofotômetro de varredura (Cary 50 - Varian UV/VIS) para a obtenção de espectros de radiação eletromagnética das espécies químicas analisadas na região do visível e ultravioleta.

Para a obtenção dos cromatogramas, foi utilizada uma Estação de Trabalho Cromatográfica Star (Fig. 06) com programa para gerenciamento (Varian Instrumentos) contendo: bomba de pistão recíprocante com três vias, modelo 240 série 00752, injetor automático Varian (AutoSample ProStar 410) com alça de amostragem de 60 µL, coluna cromatográfica RP-18 (microsorb C<sub>18</sub> 250mm x 4,6 mm com partículas de 5µm) e detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodo modelo ProStar 350 com programa Polyview. Os sinais dos compostos eluídos da coluna cromatográfica foram monitorados em 222 nm para as triazinas simazina, atrazina e ametrina e para os corantes têxteis eluídos o monitoramento foi em 400, 545 e 600 nm para amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol, respectivamente.



**Figura 06. Cromatógrafo líquido de alta eficiência:** (a) reservatório da fase móvel, (b) bomba de alta pressão, (c) válvula de injeção, (d) coluna cromatográfica, (e) detector e (f) registrador. (Fonte: [85])

Demais materiais e vidrarias utilizados são de uso comum em laboratórios de Química Analítica.

### 4.3. Métodos

#### 4.3.1. Método convencional para a determinação de herbicidas triazínicos

A primeira etapa do trabalho foi reproduzir um método analítico convencional [53] utilizado para a determinação dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina. O método utiliza como detector um espectrofotômetro efetuando medidas em 235 nm; coluna cromatográfica RP-18 e como fase móvel a composição de duas soluções (65,0 % da solução A: solução aquosa de amônia 0,010 % (v/v) em pH 8,4 e 35,0 % da solução B: acetonitrila (ACN)) com vazão de 1,0 mL/min e tempo de aquisição dos dados de 30 minutos, sendo este método posteriormente utilizado na validação do método alternativo proposto.

### **4.3.2. Espectros eletromagnéticos das espécies químicas a serem determinadas**

Esta etapa do trabalho consistiu em obter os espectros eletrônicos na região do ultravioleta e visível dos herbicidas (simazina, atrazina e ametrina) e corantes têxteis (amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol) em meio de solventes orgânicos, água e em soluções aquosas de diferentes agentes surfactantes (Triton X-100 (surfactante não iônico), CTAB (surfactante catiônico), dodecil benzeno sulfato de sódio e dodecil sulfato de sódio (surfactantes aniônicos) objetivando verificar as possibilidades de monitoramento dos sinais cromatográficos, possíveis deslocamentos nos comprimentos de onda de máxima absorção e o grau de solvatação e estabilização das espécies pelos agentes surfactantes.

### **4.3.3. Planejamento fatorial e otimização dos métodos cromatográficos**

#### **Herbicidas**

Após experimentos preliminares utilizando diversas soluções de diferentes agentes surfactantes para promover a eluição dos herbicidas de uma coluna cromatográfica RP-18, a otimização da composição da fase móvel, foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial  $2^3$  (Tab. 03) [95], tendo como variáveis as concentrações de dodecil sulfato de sódio (SDS), álcool etílico e cloreto de amônio. Este meio eluente foi o que apresentou os resultados mais promissores nas determinações prévias.

**Tabela 03. Fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^3$  na separação dos herbicidas\*.**

| Ensaio | 1=[EtOH] | 2=[SDS] | 3=[NH <sub>4</sub> Cl] |
|--------|----------|---------|------------------------|
| 1      | -        | -       | -                      |
| 2      | +        | -       | -                      |
| 3      | -        | +       | -                      |
| 4      | +        | +       | -                      |
| 5      | -        | -       | +                      |
| 6      | +        | -       | +                      |
| 7      | -        | +       | +                      |
| 8      | +        | +       | +                      |

Experimento realizado com vazão constante de 0,4 mL/min. Teores de: EtOH (- corresponde a 20,0 % (v/v) e + 25,0 % (v/v)); SDS (- corresponde 1,10 % (m/v) e + 1,50 % (m/v)); NH<sub>4</sub>Cl (- corresponde 10,0 mmol/L e + 50,0 mmol/L).

Através da matriz do planejamento fatorial pode-se obter os coeficientes de contraste, buscando avaliar os efeitos cooperativos entre os componentes da fase móvel. Os coeficientes de contrastes são obtidos através da multiplicação dos sinais um a um das colunas apropriadas para obtenção das interações. Teremos agora, além dos três efeitos principais 1, 2 e 3, três interações de fatores 12, 13 e 23 e também o efeito da interação entre os três fatores 123 (Tab. 04). Empregando os sinais apropriados como coeficientes observados e em seguida aplicando os divisores calculam os sete efeitos e a média global.

**Tabela 04. Coeficientes de contraste para um fatorial 2<sup>3</sup> obtidos para separação dos herbicidas.**

| média | 1=[EtOH] | 2=[SDS] | 3=[NH <sub>4</sub> Cl] | 12 | 13 | 23 | 123 |
|-------|----------|---------|------------------------|----|----|----|-----|
| +     | -        | -       | -                      | +  | +  | +  | -   |
| +     | +        | -       | -                      | -  | -  | +  | +   |
| +     | -        | +       | -                      | -  | +  | -  | +   |
| +     | +        | +       | -                      | +  | -  | -  | -   |
| +     | -        | -       | +                      | +  | -  | -  | +   |
| +     | +        | -       | +                      | -  | +  | -  | -   |
| +     | -        | +       | +                      | -  | -  | +  | -   |
| +     | +        | +       | +                      | +  | +  | +  | +   |

Teores de: EtOH (- corresponde 20,0 % (v/v) e + 25,0 % (v/v)); SDS (- corresponde 1,10 % (m/v) e 1,50 % (m/v)); NH<sub>4</sub>Cl (- corresponde 10,0 mmol/L e + 50,0 mmol/L).

Através do planejamento fatorial foi possível direcionar as melhores concentrações das variáveis utilizadas como componentes da fase móvel, assim como também foi possível avaliar os efeitos cooperativos existentes entre as variáveis. Entretanto o planejamento fatorial utilizado 2<sup>3</sup> não fornece as condições ótimas para a separação cromatográfica, indica somente a composição da fase móvel que permite realizar esta separação.

Assim, a otimização das condições cromatográficas foi realizada estudando os seguintes fatores: concentrações de NH<sub>4</sub>Cl e SDS, vazão da fase móvel, pH e concentração da solução tampão. Deve-se ressaltar que apenas álcool etílico, NH<sub>4</sub>Cl e SDS apresentam efeitos cooperativos.

## Corantes

Os ensaios preliminares indicaram que a fase móvel mais adequada seria aquela constituída por Triton X-100, fosfato de sódio e álcool etílico. Assim o planejamento fatorial  $2^3$  [95] foi também utilizado para estudar a composição da fase móvel para promover a separação mais efetiva dos corantes têxteis envolvendo esses fatores em dois níveis de concentração (Tab.05).

**Tabela 05. Fatores utilizados no planejamento fatorial  $2^3$  na separação dos corantes têxteis\*.**

| Ensaio | 1=[Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ] | 2=[Triton X-100] | 3=[EtOH] |
|--------|---------------------------------------|------------------|----------|
| 1      | -                                     | -                | -        |
| 2      | +                                     | -                | -        |
| 3      | -                                     | +                | -        |
| 4      | +                                     | +                | -        |
| 5      | -                                     | -                | +        |
| 6      | +                                     | -                | +        |
| 7      | -                                     | +                | +        |
| 8      | +                                     | +                | +        |

\*Experimento realizado com vazão constante de 1,0 mL/min. Teores de: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (- corresponde a 2,00 mmol/L e + 5,00 mmol/L), Triton X-100 (- corresponde 0,50 % (v/v) e 0,90 % (v/v)), EtOH (- corresponde 15,0 % (v/v) e + 20,0 % (v/v)).

Através da matriz do planejamento fatorial pode-se obter os coeficientes de contraste, buscando avaliar os efeitos cooperativos entre as componentes da fase móvel (Tab. 06). Os coeficientes de contrastes foram obtidos como descritos anteriormente.

**Tabela 06. Coeficientes de contraste para um fatorial 2<sup>3</sup> obtidos para separação dos corantes têxteis.**

| média | 1=[Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ] | 2=[Triton X-100] | 3=[EtOH] | 12 | 13 | 23 | 123 |
|-------|---------------------------------------|------------------|----------|----|----|----|-----|
| +     | -                                     | -                | -        | +  | +  | +  | -   |
| +     | +                                     | -                | -        | -  | -  | +  | +   |
| +     | -                                     | +                | -        | -  | +  | -  | +   |
| +     | +                                     | +                | -        | +  | -  | -  | -   |
| +     | -                                     | -                | +        | +  | -  | -  | +   |
| +     | +                                     | -                | +        | -  | +  | -  | -   |
| +     | -                                     | +                | +        | -  | -  | +  | -   |
| +     | +                                     | +                | +        | +  | +  | +  | +   |

Teores de: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (- corresponde a 2,00 mmol/L e + 5,00 mmol/L), Triton X-100 (- corresponde 0,50 % (v/v) e + 0,90 % (v/v)), EtOH (- corresponde 15,0 % (v/v) e + 20,0 % (v/v)).

Através do planejamento fatorial foi possível direcionar as concentrações das espécies químicas utilizadas como componentes da fase móvel, assim como também foi possível avaliar os efeitos cooperativos existentes entre as variáveis. Entretanto, o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> não fornece as condições ótimas para a separação cromatográfica, fazendo-se necessário as otimizações dos seguintes fatores: pH, concentrações de tampão fosfato, de Triton X-100, teor de álcool etílico e vazão da fase móvel. Deve-se ressaltar que somente álcool etílico, tampão fosfato e Triton X-100 apresentaram efeitos cooperativos.

#### 4.3.4. Aplicações

##### 4.3.4.1. Extração dos herbicidas (simazina, atrazina e ametrina) e determinação destes nas amostras

###### Extração dos herbicidas triazínicos de alimentos (ESL e EFS)

Amostra de tomate (supermercado) foi triturada em liquidificador; tomou-se *ca* de 10,0 g da amostra triturada, adicionando-se 40,0 mL de H<sub>2</sub>O:ACN 40:60 (v/v) e deixando-se em repouso por 20 min. Em seguida, a amostra foi filtrada através de papel de filtro e o eluato foi diluído para 100,0 mL com água destilada. O solvente orgânico (ACN) presente na amostra foi evaporado utilizando-se um evaporador Kuderna-Danish, sendo o volume restante completado novamente com água destilada para 100,0 mL. Em seguida nesta solução efetuou-se o processo de extração em fase sólida (Fig. 07), utilizando-se uma microcoluna de carvão ativado (150,0 mg) para retenção dos analitos e descarte da matriz da amostra (*Clean-up*), sendo os analitos posteriormente recuperados utilizando primeiro 10,0 mL de uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 80:20 (v/v) seguido da passagem de mais 10,0 mL de CHCl<sub>3</sub> [96].

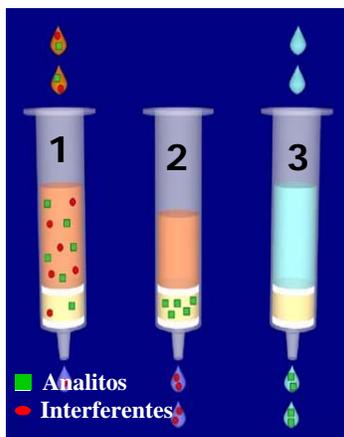


Figura 07. Extração em fase sólida.

- 1) amostra passando através da coluna de carvão ativado.
- 2) analitos (pesticidas) retidos na fase sólida e descarte dos interferentes.
- 3) eluição dos analitos com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH e CHCl<sub>3</sub>.

Após o processo de extração em fase sólida, a mistura de solventes foi evaporada utilizando-se um evaporador Kuderna-Danish, sendo o volume retomado para 5,0 mL com a fase móvel (solução contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50,0 mmol/L, SDS 2,25 % (m/v) e etanol 25,0 % (v/v) e tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 7,0)). Esta solução final foi filtrada utilizando-se membrana Millipore 45  $\mu\text{m}$  e em seguida injetada no cromatógrafo.

#### **Extração dos herbicidas triazínicos de amostras de água (EFS)**

Amostra de água (500,0 mL) coletada no rio Pirapó (Região de Maringá) sofreu processo de extração em fase sólida (Fig. 07), utilizando-se uma microcoluna de carvão ativado (150,0 mg) para retenção dos analitos e descarte da matriz da amostra, sendo os analitos recuperados utilizando primeiro 10,0 mL de uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  80:20 (v/v) seguido da passagem de 10,0 mL de  $\text{CHCl}_3$  [97].

Após o processo de extração em fase sólida, a mistura de solventes foi evaporada (Kuderna-Danish), sendo o volume retomado para 5,0 mL com a fase móvel (solução contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50,0 mmol/L, SDS 2,25 % (m/v), etanol 25,0 % (v/v) e tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 7,0)). Esta solução final foi filtrada utilizando-se membrana Millipore 45  $\mu\text{m}$  e em seguida injetada no cromatógrafo.

#### **Extração dos herbicidas triazínicos do solo (ESL e EFS)**

Amostra de solo (plantação de milho da região de Maringá) foram coletadas e secas em estufa a 60 °C. Pesou-se *ca* de 50,0 g de cada amostra de solo, sendo adicionado a esta 100,0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COCH}_3$  50:50 (v/v), sonicou-se a mistura por 10 min. Após decantação, o sobrenadante foi reservado, e o processo de extração com a mistura de

solventes foi repetido por mais duas vezes. As três porções do sobrenadante foram misturadas e filtradas utilizando papel de filtro, a seguir retirou-se água residual do extrato através da passagem por uma coluna de sulfato de sódio.

O solvente orgânico presente na amostra foi evaporado ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) utilizando-se um evaporador Kuderna-Danish, sendo os analitos redissolvidos em 100,0 mL de água destilada. Após, esta solução sofreu processo de extração em fase sólida (Fig. 07), utilizando-se uma microcoluna de carvão ativado (150,0 mg) para retenção dos analitos e descarte da matriz da amostra, sendo os analitos recuperados utilizando primeiro 10,0 mL de uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  80:20 (v/v) seguido da passagem de 10,0 mL de  $\text{CHCl}_3$  [97].

Posteriormente ao processo de extração em fase sólida, a mistura de solventes foi evaporado (Kuderna-Danish), sendo o volume retomado para 5,0 mL com a fase móvel (solução contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50,0 mol/L, SDS 2,25 % (m/v), etanol 25,0 % (v/v) e tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 7,0)). Esta solução final foi filtrada utilizando-se membrana Millipore 45  $\mu\text{m}$  e em seguida injetada no cromatógrafo.

#### **4.3.4.2. Determinação dos corantes têxteis (amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol) em efluentes industriais**

Os efluentes têxteis foram coletados de uma indústria de malhas (Região de Maringá), filtrados utilizando-se membrana Millipore 45 $\mu\text{m}$  e em seguida foram injetados diretamente no cromatógrafo.

#### **4.4. Escolha das espécies orgânicas analisadas**

##### **Herbicidas**

Os herbicidas estudados neste trabalho foram selecionados devido à alta frequência de aplicação destes na agricultura e devido às dificuldades de separação e análise.

As triazinas são herbicidas de pré e pós-colheita, que representam um importante grupo de herbicidas, amplamente empregado na agricultura há mais de duas décadas. Os herbicidas são compostos, em geral, menos tóxicos do que, por exemplo, a maioria dos inseticidas, porque atuam em processos bioquímicos importantes para os vegetais, mas inexistentes nos animais.

##### **Corantes**

Os corantes têxteis estudados neste trabalho Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brilhante Remazol foram selecionados devido a grande utilização dos mesmos na indústria têxtil visitada (Malharia da Região de Maringá) e também porque na literatura não existe metodologia analítica adequada para a determinação destes em efluentes têxteis.

## **5. Resultados e Discussões**

A escolha da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector espectrofotométrico UV/VIS para a identificação e quantificação dos herbicidas triazínicos e dos corantes têxteis, deveu-se a possibilidade de separação das espécies químicas antes da etapa de quantificação, evitando-se assim interferências espectrais, muitas vezes observadas em outros métodos analíticos.

### **5.1. Metodologia tradicional**

#### **5.1.1. Aplicação do método convencional para a determinação de herbicidas**

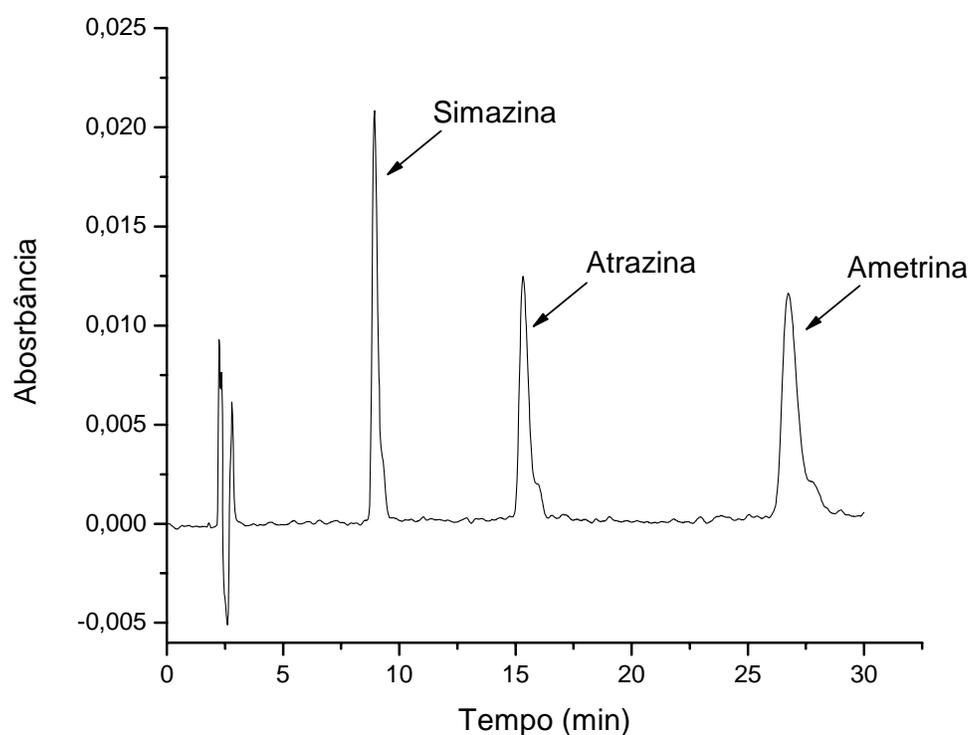
Determinou-se os herbicidas triazínicos simazina, atrazina e ametrina através de uma metodologia tradicional utilizando CLAE (item 4.3.1).

O método convencional utilizado apresentou excelentes resultados com relação à sensibilidade e seletividade, assim como tempo total de análise (Fig. 08). Foram obtidos tempos de retenção de 9,0, 15,4 e 26,5 min para simazina, atrazina e ametrina, respectivamente. As resoluções cromatográficas ( $R_s$ ) foram estimadas como 10,0 entre simazina e atrazina e 11,8 entre atrazina e ametrina.

Através da variação da concentração dos três herbicidas em função da área obtida nos picos cromatográficos, curvas analíticas foram construídas evidenciando linearidade na faixa de 1,00 – 50,0 mg/L para injeções de 10  $\mu$ L (Tab.07).

**Tabela 07. Características do método convencional para a determinação dos herbicidas triazínicos.**

|                    | <b>simazina</b>       | <b>atrazina</b>       | <b>ametrina</b>       |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Equação da reta    | $y = 225150x - 40944$ | $y = 213808x + 84004$ | $y = 333683x - 26513$ |
|                    | $R^2 = 0,9998$        | $R^2 = 0,9990$        | $R^2 = 0,9990$        |
| Limite de detecção | 100 µg/L              | 100 µg/L              | 100 µg/L              |



**Figura 08. Cromatograma obtido através do método convencional para a mistura dos herbicidas triazínicos simazina, atrazina e ametrina:** Solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,010 % (pH 8,4) 65,0 % (v/v) e acetonitrila 35,0 % (v/v), vazão 1,0 mL/min e 5,00 mg/L de cada herbicida.

Porém este método apresenta um grande problema, pois o principal componente da fase móvel é um solvente orgânico tóxico (acetonitrila), de difícil recuperação e de degradação no meio ambiente. Considerando estas características, este método não está de

acordo com a nova tendência mundial, de se utilizar métodos que minimizem a quantidade de solventes tóxicos utilizados ou que até mesmo os eliminem por completo.

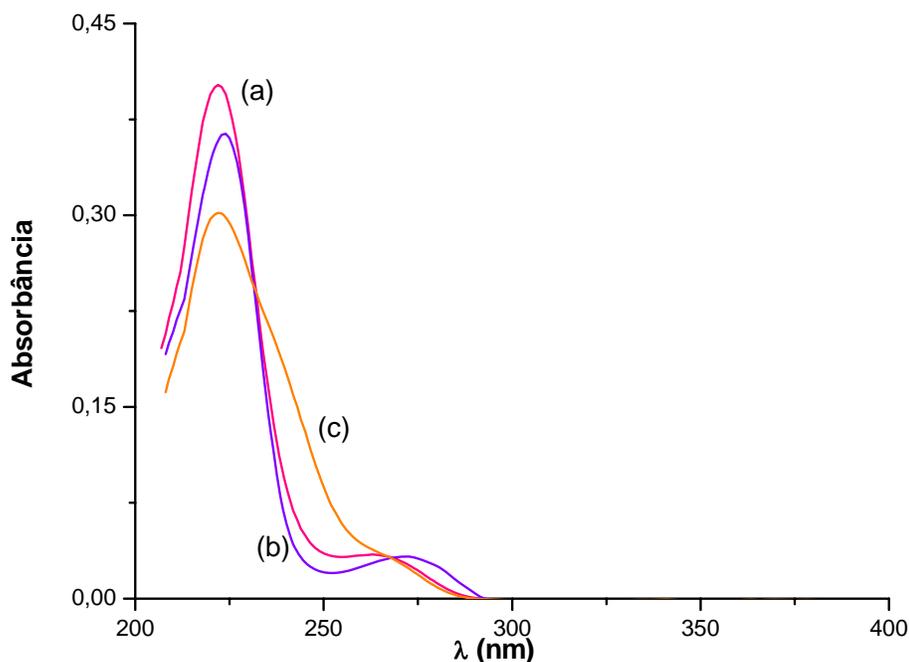
Neste sentido, buscou-se desenvolver métodos analíticos limpos, isto é, desenvolver métodos sem utilizar solventes orgânicos tóxicos. Neste trabalho os solventes orgânicos, utilizados como fases móveis na CLAE, foram substituídos por soluções de agentes surfactantes com concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC), objetivando a formação de micelas que poderiam solvatar as moléculas dos analitos orgânicos sem necessitar de solventes orgânicos tóxicos. Deve-se ressaltar que o surfactante também interage com a fase estacionária, coluna cromatográfica RP-18, modificando também suas propriedades. Assim, a fase móvel aquosa adquire propriedades benéficas para solubilizar compostos orgânicos pouco polares no interior das micelas ao mesmo tempo em que coluna cromatográfica fica temporariamente mais polar devido a adsorção do agente surfactante. Esta dupla mudança no mecanismo de separação amplia a aplicabilidade da cromatografia líquida utilizando como fase estacionária uma fase reversa. Nesta nova abordagem os conceitos de fase normal e reversa perdem o sentido, pois a coluna apolar temporariamente será polar devido à adsorção de moléculas do surfactante.

## **5.2. Espectros eletromagnéticos**

### **5.2.1. Herbicidas**

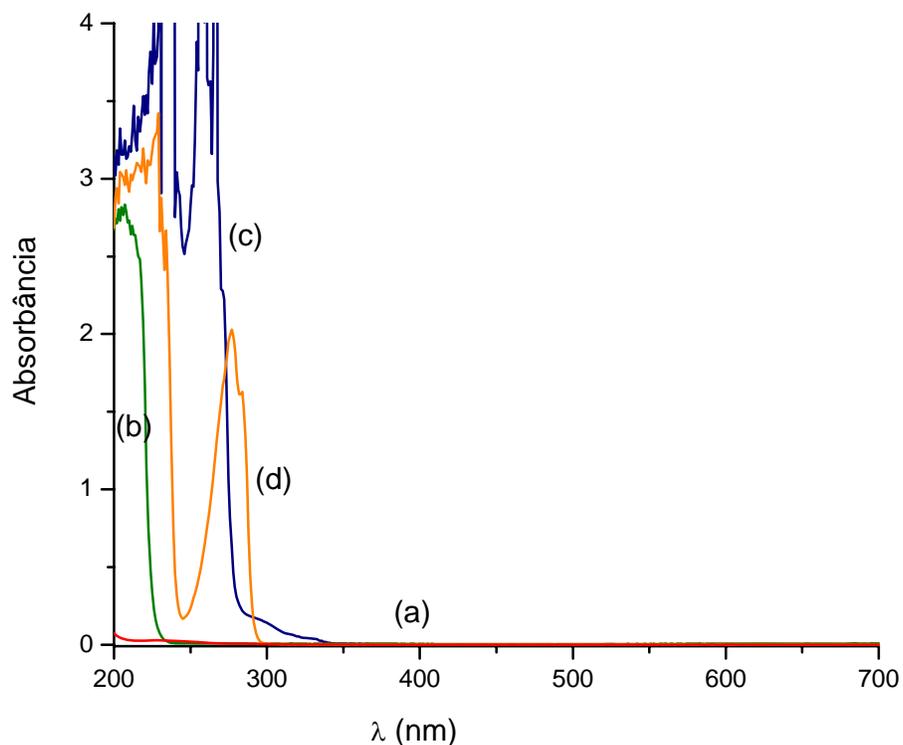
Espectros dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina mostram que estas moléculas absorvem fortemente radiação eletromagnética na região do ultravioleta (Fig. 09). Portanto, é muito difícil a separação espectral, uma vez que, todos os herbicidas apresentam máximo

de absorção na região de 222 nm, indicando claramente a necessidade de um método como a CLAE devido a separação dos analitos antes da etapa de quantificação, evitando prováveis erros na análise devido à sobreposição de sinais.



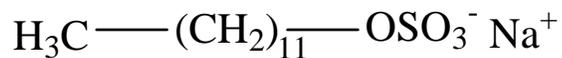
**Figura 09. Espectros eletrônicos dos herbicidas em meio aquoso.** (a) simazina, (b) atrazina e (c) ametrina; C = 2,00 mg/L.

Nesta fase, a utilização de soluções do surfactante CTAB (surfactante catiônico) foi descartada devido ao intenso espalhamento de luz que este composto provocava na região de 222 nm, o que impossibilitava qualquer determinação analítica dos herbicidas em estudo. Soluções de SDBS (surfactante aniônico) e Triton X-100 (surfactante não iônico) também não puderam ser utilizadas porque além do espalhamento, o anel benzênico, constituinte destas moléculas, apresentam forte absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (Fig 10).



**Figura 10. Espectros eletrônicos da mistura dos surfactantes:** (a) SDS, (b) CTAB, (c) SDBS (C = 0,50 % (m/v)) e (d) Triton X-100 (C = 0,50 % (v/v)).

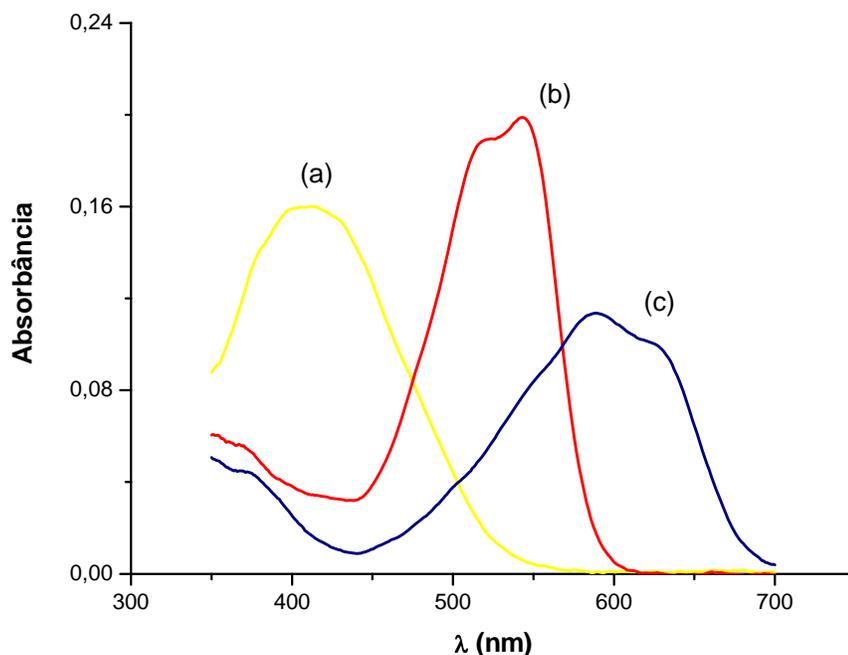
Assim, por exclusão dos demais, o surfactante SDS (Fig. 11), surfactante aniônico, foi escolhido como agente modificador da fase móvel e da fase estacionária.



**Figura 11. Estrutura molecular do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio.**

### 5.2.2. Corantes

Espectros dos corantes têxteis amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol mostram que estas moléculas absorvem fortemente radiação eletromagnética (Fig. 12).



**Figura 12. Espectros eletrônicos dos corantes:** (a) amarelo procion H-4R, (b) vermelho procion H-E7B e (c) azul brilhante remazol; C = 10,0 mg/L.

Embora cada um dos corantes apresente máximo de absorção em comprimentos de ondas distintos de 400, 545 e 600 nm para amarelo, vermelho e azul, respectivamente ainda assim, verifica-se sobreposição dos sinais, fato que dificulta a utilização de métodos analíticos que não efetuem uma separação dos corantes antes da medida do sinal analítico.

Diferentemente do caso dos compostos triazínicos, os surfactantes estudados (Triton X-100, CTAB, SDBS e SDS) não apresentaram restrições com relação a espalhamento de luz ou absorção de radiação eletromagnética na região do visível (Fig. 10); no entanto, nos estudos preliminares o único surfactante que permitiu modificar a fase móvel e estacionária de forma que a separação dos três corantes fosse possível foi o Triton X-100. Este surfactante é não iônico, biodegradável e de baixo custo (Fig. 13).

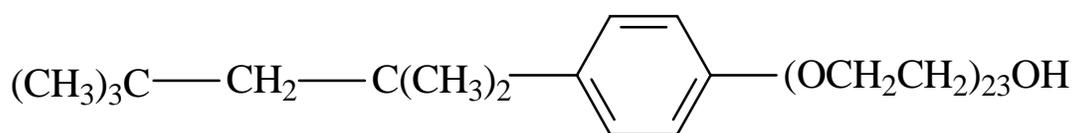


Figura 13. Estrutura molecular do surfactante não iônico Triton X-100.

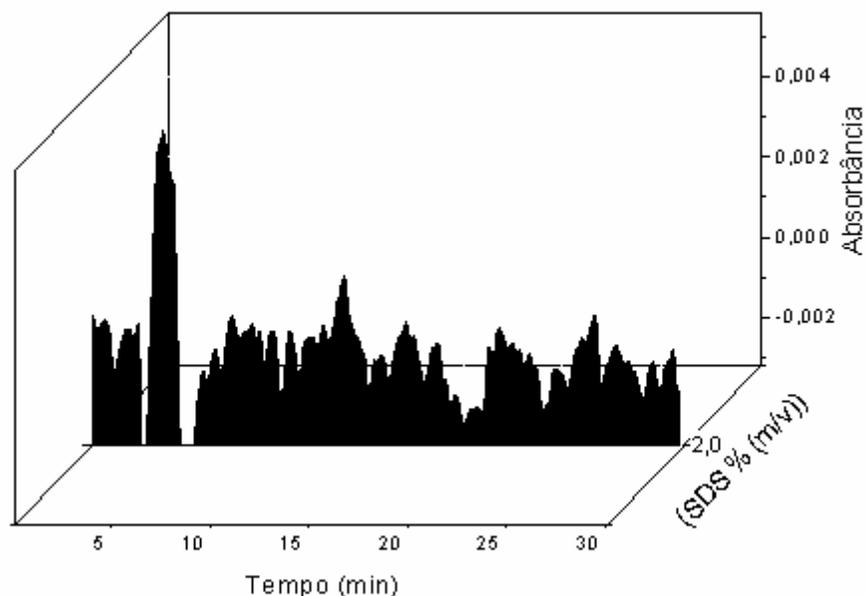
### 5.3. Planejamento fatorial e otimização das variáveis dos métodos cromatográficos.

#### 5.3.1. Herbicidas

Experimentos preliminares demonstraram não ser possível conduzir a separação cromatográfica dos herbicidas triazínicos (Fig. 14) utilizando-se somente solução aquosa do agente surfactante (SDS).

Assim, foi verificada a influência da adição de álcool etílico e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como modificadores químicos da fase móvel, uma vez que estes compostos não são considerados altamente tóxicos, o que mantém o método limpo. Estes aditivos provocaram modificações favoráveis nas características físico-químicas do meio, abrindo possibilidade para separação

analítica dos herbicidas. Deve-se ressaltar que devido ao grande aumento da pressão do sistema a concentração máxima de álcool etílico utilizada na otimização foi de 25,0 % (v/v), principalmente devido à sua alta viscosidade.



**Figura 14.** Cromatograma obtido para a mistura dos herbicidas simazina, atrazina e ametrina. Vazão 0,4 mL/min, [SDS] 2,0 % (m/v) em água.

Desta forma, os teores de álcool etílico,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e SDS foram selecionados como fatores no planejamento experimental para seleção da melhor composição da fase móvel (Tab. 03, pág. 42), permitindo efetuar o estudo simultâneo de todas as variáveis envolvidas neste processo [95]. Nesta fase, as melhores respostas foram selecionadas em função da resolução cromatográfica obtida (Tab. 08).

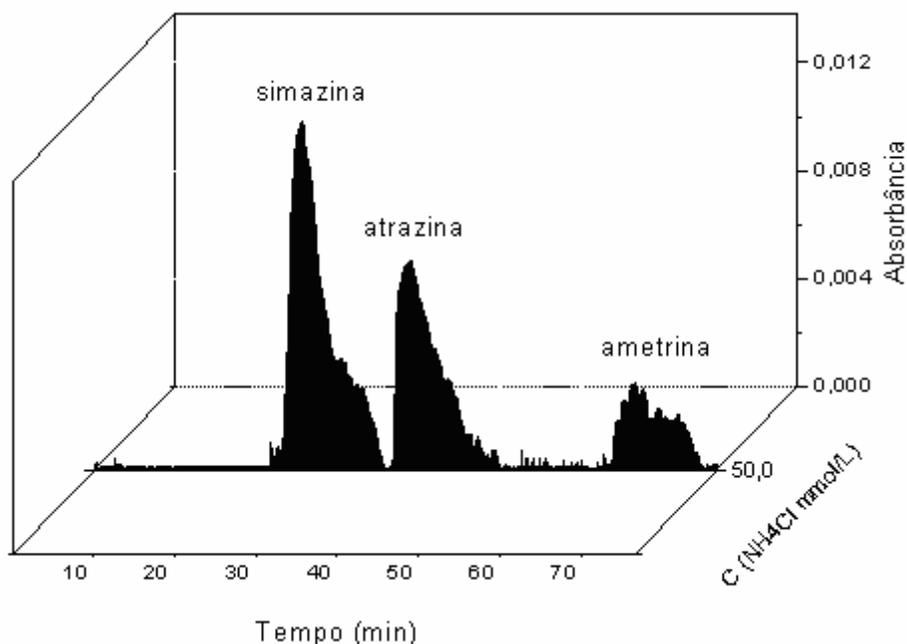
**Tabela 08. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial 2<sup>3</sup> para determinação dos herbicidas triazínicos\*.**

| Experimento | Rs simazina e atrazina | Rs atrazina e ametrina |
|-------------|------------------------|------------------------|
| 1           | 2,24                   | 3,62                   |
| 2           | 1,58                   | --                     |
| 3           | 1,62                   | 3,71                   |
| 4           | 1,59                   | 3,66                   |
| 5           | 2,60                   | 4,05                   |
| 6           | 2,41                   | 3,92                   |
| 7           | 2,39                   | --                     |
| 8           | 1,50                   | 3,40                   |

\*Dados obtidos para vazão constante de 0,4 mL/min.

As condições utilizadas no experimento 8 (Tab. 08), concentração de SDS 1,50 % (m/v), NH<sub>4</sub>Cl 50,0 mmol/L e EtOH 25,0 % (v/v), foram escolhidas como ótimas pois, apresentaram resoluções cromatográficas adequadas para determinações quantitativas associada a um menor tempo de análise, aumentando a frequência analítica e diminuindo a quantidade de reagentes utilizados (Fig. 15).

Através dos valores de Rs entre simazina e atrazina, utilizados como fator de resposta, pode-se realizar cálculos dos efeitos das variáveis (Tab. 09) na eficiência de separação. Estes demonstraram que a concentração de SDS, NH<sub>4</sub>Cl e a concentração de álcool etílico são os fatores que mais influenciam a resolução cromatográfica. Ainda, segundo os dados da Tab. 09, existe interação entre as variáveis 1, 2 e 3, interação média entre as variáveis 1 e 3, 2 e 3 e pequena interação entre as variáveis 1 e 2 demonstrando a complexidade do processo de separação. Este fato está associado à mudança da polaridade da fase estacionária pelo agente surfactante e ao mesmo tempo as mudanças ocorridas na fase móvel devido ao estabelecimento do ambiente micelar.

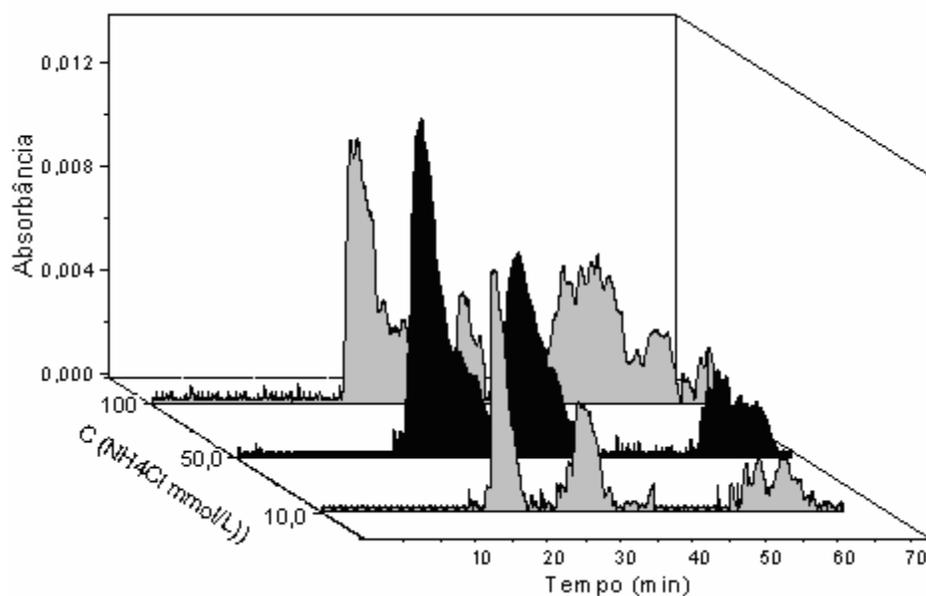


**Figura 15.** Cromatograma obtido para o experimento 8. Vazão 0,4 mL/min, [SDS] 1,50 % (m/v), EtOH 25,0 % (v/v), NH<sub>4</sub>Cl 50,0 mmol/L e 10,0 mg/L de cada herbicida.

**Tabela 09.** Cálculo dos efeitos de cada variável e da interação entre elas resolução cromatográfica.

| Parâmetros               | Efeito das variáveis e das interações entre simazina e atrazina |
|--------------------------|---|
| média                    | 2,0   |
| 1 (≡ EtOH)               | -0,44   |
| 2 (≡ SDS)                | -0,43   |
| 3 (≡ NH <sub>4</sub> Cl) | 0,47  |
| 12                       | -0,018  |
| 13                       | -0,10   |
| 23                       | -0,13   |
| 123                      | -0,33   |

O estudo das variáveis que influenciam o processo de separação e determinação dos compostos triazínicos em relação à concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  confirmou o efeito deste parâmetro experimental na faixa de 10,0 – 100 mmol/L. No entanto, a melhor concentração deste sal para a separação dos herbicidas pode ser definida como 50,0 mmol/L (Fig. 16 e Tab. 10).



**Figura 16. Variação da concentração de cloreto de amônio.** Vazão 0,4 mL/min, pH 8,0, [SDS] 1,50 % (m/v), [EtOH] 25,0 % (v/v) e 10,0 mg/L de cada herbicida.

Tabela 10. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração de cloreto de amônio.

| $\text{NH}_4\text{Cl}$ (mmol/L) | $R_s$ simazina e atrazina | $R_s$ atrazina e ametrina |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 10,0                            | 2,05                      | 3,13                      |
| 50,0                            | 1,60                      | 3,40                      |
| 100                             | 2,07                      | 1,41                      |

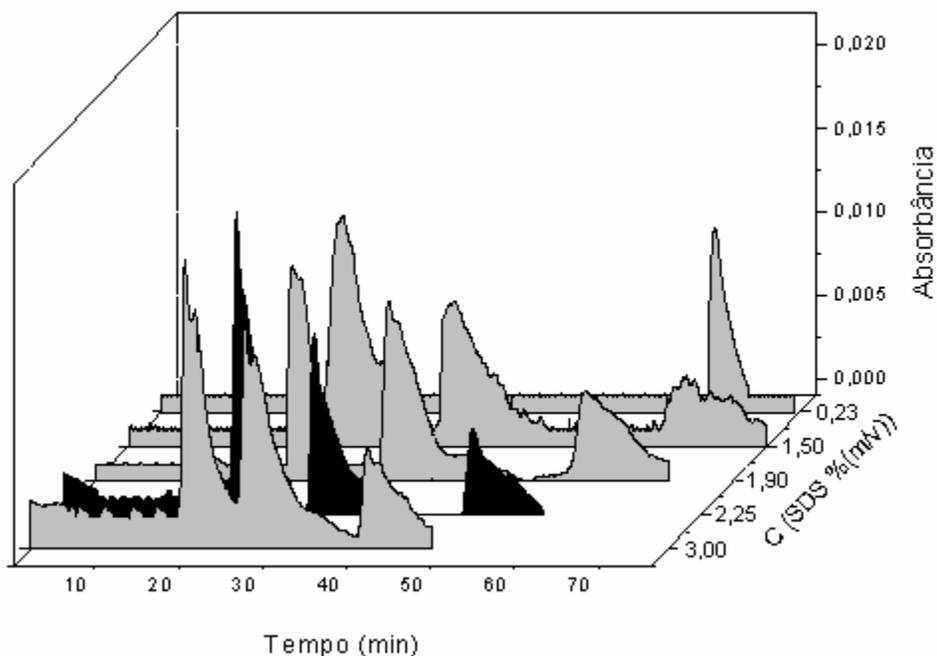
Provavelmente a necessidade de se utilizar  $\text{NH}_4^+$  está associada ao fato de este cátion neutralizar de forma mais efetiva as cargas negativas do SDS adsorvido na coluna

cromatográfica, permitindo melhor interação desta com as moléculas dos herbicidas que são neutras. Quando a concentração de  $\text{NH}_4^+$  era superior a 50,0 mmol/L um aumento do ruído era observado, provavelmente devido à diminuição da solubilidade dos compostos polares em meio alcoólico, o que diminuía a sensibilidade analítica. Para concentrações de  $\text{NH}_4^+$  menores que 50,0 mmol/L provavelmente nem todos os sítios carregados da coluna eram neutralizados, impedindo de alguma forma a eluição de parte dos herbicidas, acarretando em uma diminuição o sinal analítico e conseqüentemente da sensibilidade.

Estudos da concentração de agente surfactante demonstraram que o tempo de análise podia ser reduzido aumentando-se a concentração de SDS (Fig. 17), o que refletiu de forma benéfica na frequência analítica do método desenvolvido. Este fator está associado ao aumento da quantidade das micelas na fase móvel que podem melhor acomodar as moléculas dos herbicidas, aumentando a afinidade destes por esta fase e ocasionando a sensível diminuição do tempo de retenção. Entretanto em concentrações altas de SDS (3,00 % m/v) este fato leva a uma baixa resolução cromatográfica (Tab. 11) e com sobreposição dos picos da simazina e atrazina Fig. 17).

Tabela 11. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração do surfactante SDS.

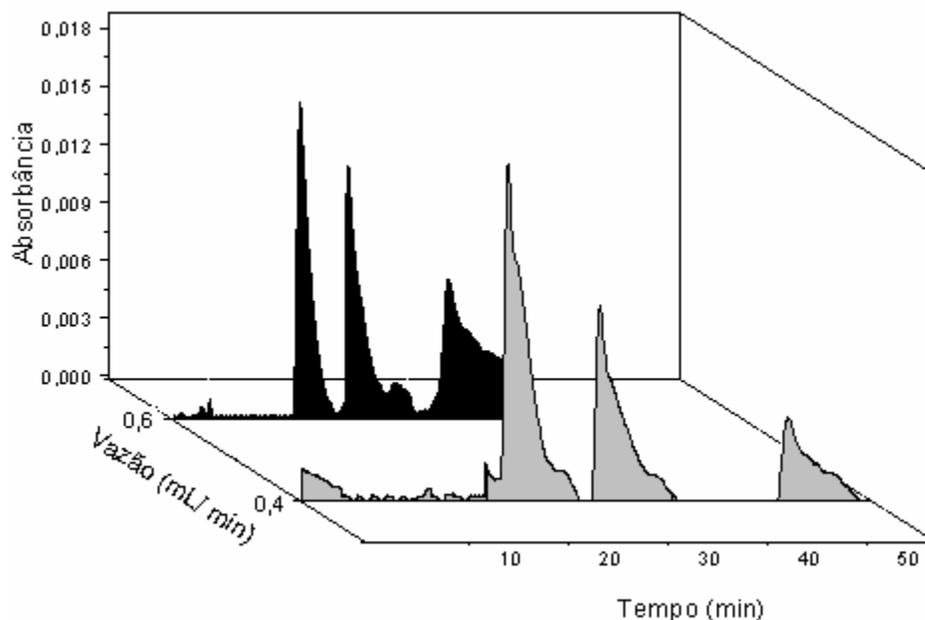
| SDS % (m/v) | Rs simazina e atrazina | Rs atrazina e ametrina |
|-------------|------------------------|------------------------|
| 1,50        | 1,5                    | 3,3                    |
| 1,90        | 1,5                    | 3,4                    |
| 2,25        | 1,6                    | 3,5                    |
| 3,00        | 0,7                    | 2,0                    |



**Figura 17. Variação de concentração do surfactante SDS.** Vazão 0,4 mL/min, pH 8,0,  $[\text{NH}_4\text{Cl}]$  50,0 mmol/L, EtOH 25,0 % (v/v) e 10,0 mg/L de cada herbicida.

Assim, a concentração do surfactante SDS de 2,25 % (m/v) foi escolhida como o melhor compromisso entre sensibilidade, frequência analítica, consumo de reagentes e geração de rejeitos químicos.

Na tentativa de diminuir ainda mais o tempo de análise o efeito da vazão da fase móvel no sinal analítico foi estudado (Fig. 18 e Tab. 12), sendo verificado que este não apresenta efeitos relevantes no perfil dos picos cromatográficos de 0,4 e 0,6 mL/min. O único efeito observado foi uma esperada diminuição do tempo de retenção. Assim, a vazão da fase móvel foi selecionada como 0,6 mL/min. Deve ser salientado que a vazão não pode ser aumentada indefinidamente devido a um aumento da pressão hidrodinâmica do sistema e a diminuição excessiva do tempo de contato dos analitos com a fase estacionária.



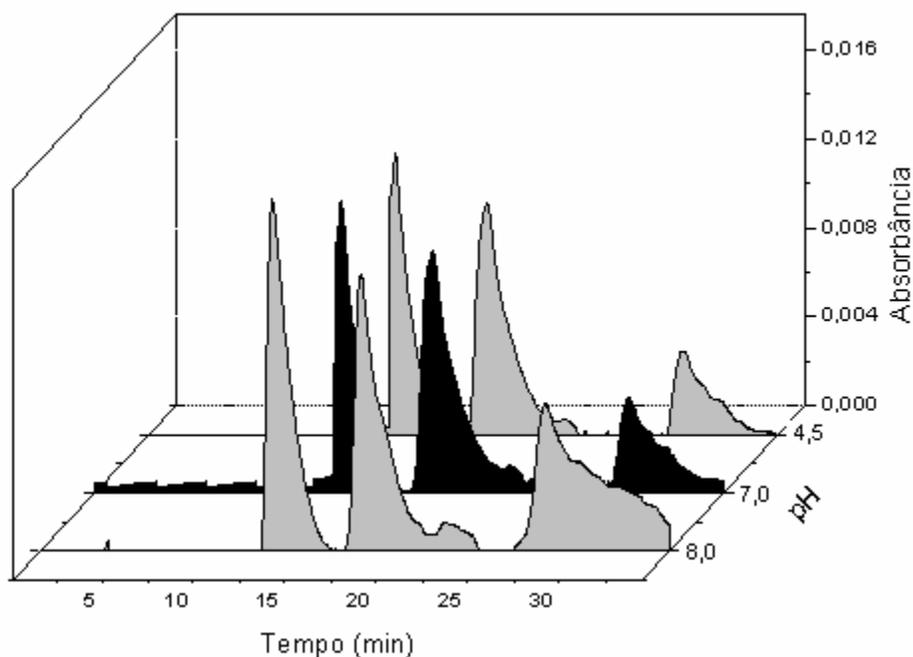
**Figura 18.** Variação da vazão da fase móvel. pH 8,0, [NH<sub>4</sub>Cl] 50,0 mmol/L, [SDS] 2,25 %, EtOH 25,0 % (v/v) e 10,0 mg/L de cada herbicida.

Tabela 12. Resoluções cromatográficas obtidas no estudo do efeito da vazão a fase móvel no sistema cromatográfico.

| Vazão (mL/min) | Rs simazina e atrazina | Rs atrazina e ametrina |
|----------------|------------------------|------------------------|
| 0,4            | 1,7                    | 3,6                    |
| 0,6            | 1,7                    | 1,8                    |

Considerando-se que os valores de pKas para os compostos triazínicos estão na faixa de 2,0, com exceção da ametrina (pKa 4,0), e que para estes valores de pH a CLAE não é aplicável devido a deterioração rápida da coluna cromatográfica, foi considerado que as moléculas dos herbicidas não deveriam sofrer modificações consideráveis na faixa de pH de 4,5 a 8,0 (faixa ótima para utilização da CLAE e ajustado para 4,5 com solução tampão acetado e entre 7,0 e 8,0 com solução tampão fosfato). Este fato foi comprovado uma vez que não foram observadas mudanças consideráveis no cromatograma com a variação de pH

nesta faixa pré-determinada (Fig. 19 e Tab. 13). Assim, o pH 7,0 foi selecionado como condição ótima, principalmente porque o rejeito químico gerado é neutro, sendo compatível com a estratégia de se desenvolver método analítico limpo.



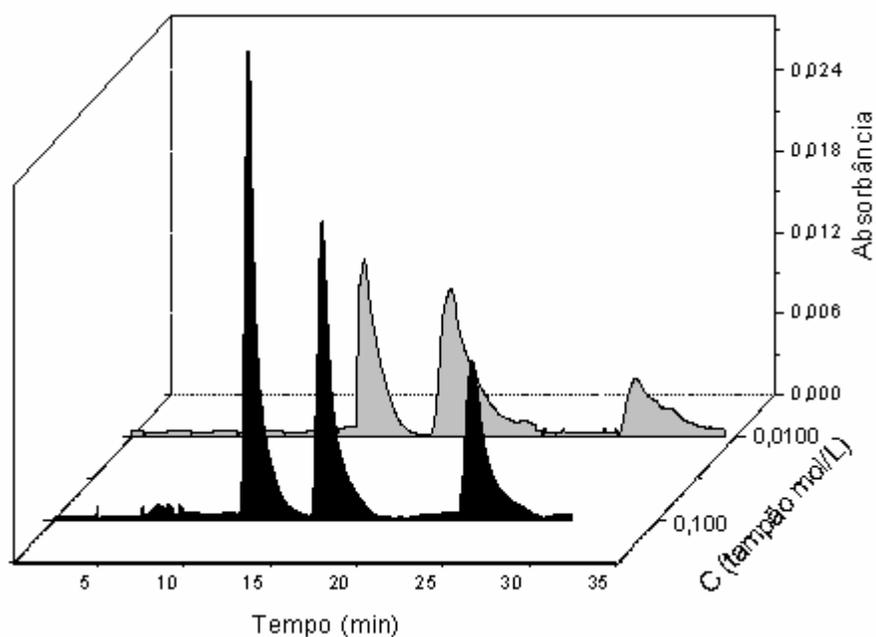
**Figura 19. Variação do pH da fase móvel.** Vazão 0,6 mL/min, [NH<sub>4</sub>Cl] 50,0 mmol/L, [SDS] 2,25 % (m/v), álcool etílico 25,0 % e 10,0 mg/L de cada herbicida.

Tabela 13. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação dos valores de pH da fase móvel.

| pH  | Rs simazina e atrazina | Rs atrazina e ametrina |
|-----|------------------------|------------------------|
| 4,5 | 1,6                    | 2,8                    |
| 7,0 | 1,6                    | 2,9                    |
| 8,0 | 1,7                    | 1,8                    |

Considerando que o pH ótimo foi 7,0, solução tampão fosfato foi selecionada para manter este pH por apresentar pKa próximo do valor escolhido e também porque os constituintes desta solução tampão não são considerados tóxicos.

Estudos de concentração da solução tampão evidenciaram que melhores resultados analíticos no processo de separação são obtidos quando a concentração da solução tampão fosfato é fixada em 0,100 mol/L (Fig. 20 e Tab. 14), pois os picos cromatográficos obtidos com esta concentração de fosfato são mais finos levando a obtenção de melhores resoluções cromatográficas, em um tempo total de análise menor.



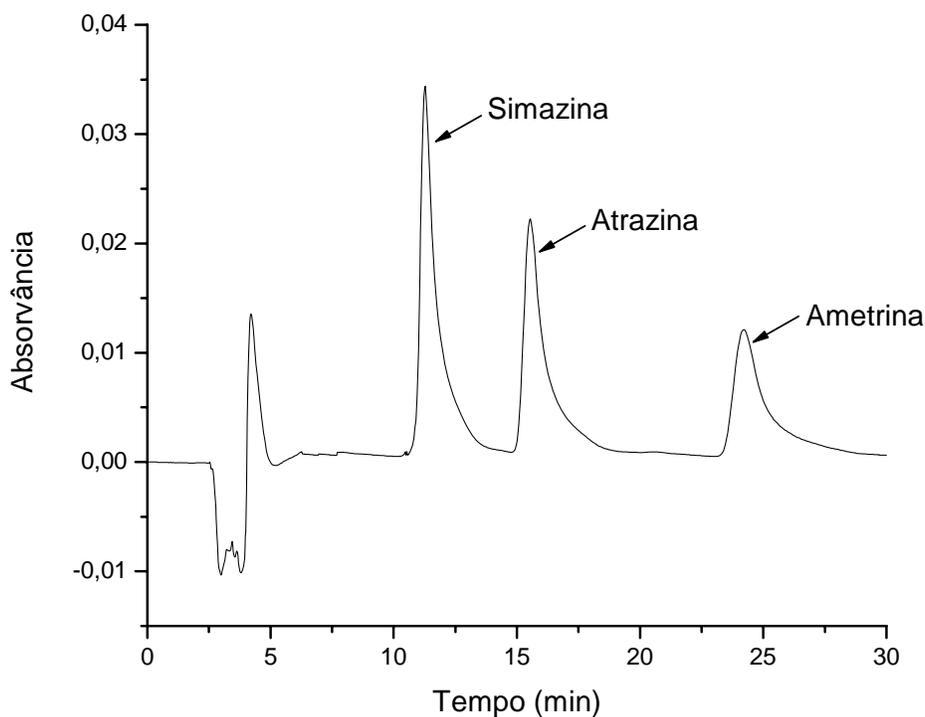
**Figura 20. Efeito da concentração de tampão fosfato.** Vazão 0,6 mL/min,  $[\text{NH}_4\text{Cl}]$  50,0 mmol/L,  $[\text{SDS}]$  2,25 % (m/v) , EtOH 25,0 % ( v/v) e 10,0 mg/L de cada herbicida.

**Tabela 14. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração da solução tampão fosfato.**

| tampão fosfato (mol/L) | $R_s$ simazina e atrazina | $R_s$ atrazina e ametrina |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0,0100                 | 1,7                       | 2,9                       |
| 0,100                  | 2,0                       | 3,4                       |

Após o processo de otimização verificou-se que os três compostos triazínicos podiam ser determinados, com boa seletividade, sensibilidade e alta frequência analítica,

sendo a determinação dos herbicidas possível em menos de 30 min, seguindo-se as melhores condições estabelecidas nos experimentos de otimização (Fig. 21).



**Figura 21. Cromatograma de uma solução padrão dos herbicidas.** Dados obtidos para injeção de 10 $\mu$ L da solução padrão de 10,0 mg/L de cada herbicida, vazão 0,6 mL/min, [NH<sub>4</sub>Cl] 50,0 mmol/L, [SDS] 2,25 % (m/v), EtOH 25,0 % (v/v) e tampão fosfato 0,100 mol/L, (pH 7,0).

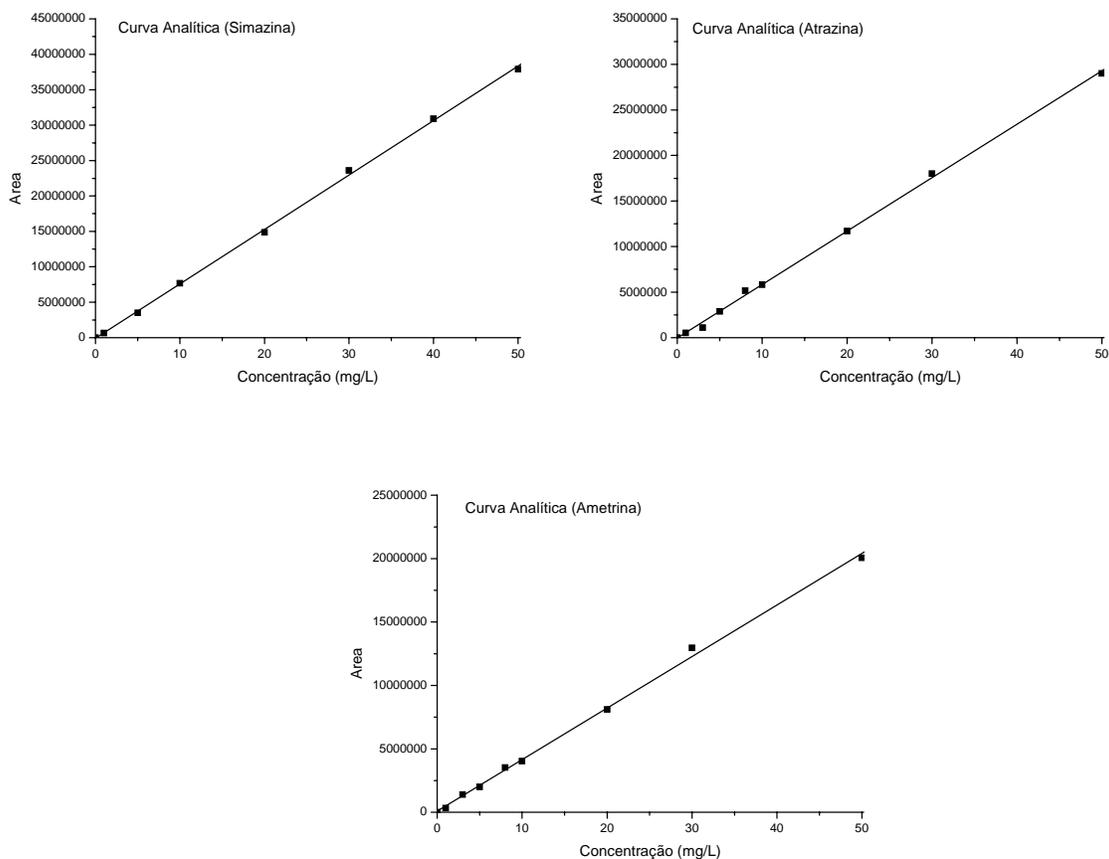
O procedimento cromatográfico proposto apresentou sensibilidade e frequência analítica comparáveis às obtidas quando da utilização do procedimento cromatográfico convencional que utiliza solventes orgânicos como fase móvel (item 5.1.1).

Foram obtidos tempos de retenção de 11,4, 15,6 e 24,4 min para simazina, atrazina e ametrina, respectivamente. As resoluções cromatográficas foram estimadas como 3,5 entre simazina e atrazina e 5,4 entre atrazina e ametrina, indicando que os resultados obtidos

podem ser utilizados para fins quantitativos uma vez que não são observadas sobreposições de picos.

Alguns autores preconizam que uma resolução cromatográfica acima de 1,5 é suficiente para determinações quantitativas [82].

Curvas analíticas para os três herbicidas (Fig. 22) evidenciam linearidade na faixa de 1,00 – 50,0 mg/L para injeções de 10 $\mu$ L.



**Figura 22** - Curvas analíticas para os herbicidas: Simazina, Atrazina e Ametrina.

Os limites de detecção (Tab. 15) foram obtidos através da relação sinal/ruído (3x) e os limites de quantificação (Tab. 15) também foram estimados através da relação

sinal/ruído (10x) e são comparáveis aqueles do procedimento cromatográfico convencional (Tab. 07). Deve ser observado que os valores de limites de detecção podem ser melhorados, quando necessário, aumentando-se o volume de amostra injetado ou através de procedimentos de pré-concentração.

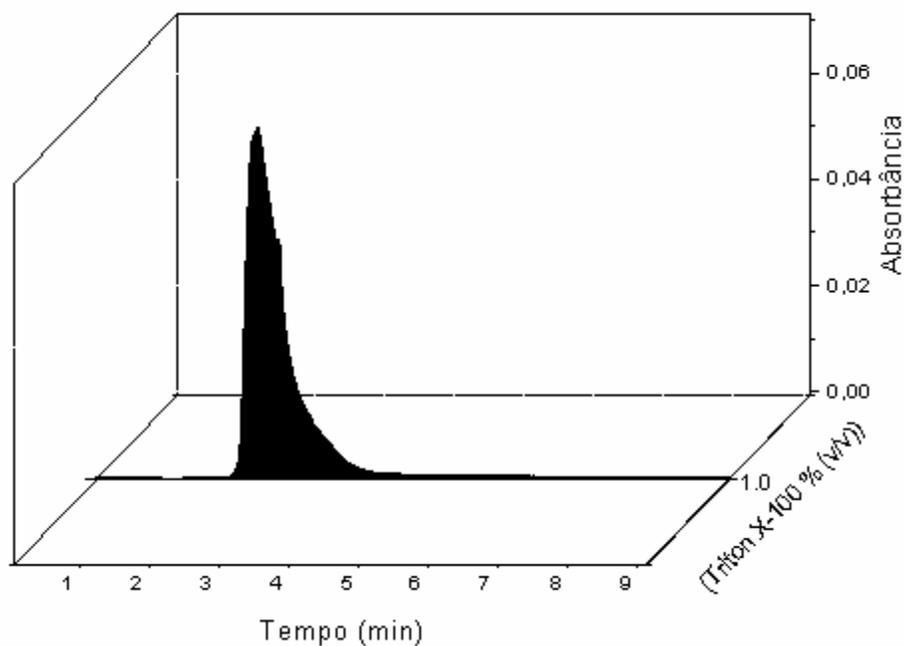
**Tabela 15. Características do método proposto para a determinação de herbicidas.**

|                         | <b>simazina</b>       | <b>atrazina</b>       | <b>ametrina</b>       |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Equação da reta         | $y = 768398x - 97622$ | $y = 586672x - 35569$ | $y = 406611x + 81172$ |
|                         | $R^2 = 0,9996$        | $R^2 = 0,9994$        | $R^2 = 0,9990$        |
| Limite de detecção      | 100 µg/L              | 100 µg/L              | 150 µg/L              |
| Limite de quantificação | 333 µg/L              | 333 µg/L              | 500 µg/L              |

### 5.3.2. Corantes têxteis

Estudos preliminares foram realizados buscando-se verificar qual a sequência de eluição dos corantes da coluna cromatográfica RP-18, assim como a separação destes utilizando diferentes ambientes micelares. Considerando que a região de absorção da radiação eletromagnética pelos corantes está na faixa do visível e que os agentes surfactantes estudados não absorvem e não provocam espalhamento de luz considerável nesta região do espectro, inicialmente foi investigado qual dos agentes surfactantes promovia a melhor modificação da coluna cromatográfica e da fase móvel resultando em uma possível separação dos três corantes. Nesta fase foi verificado que o Triton X-100 apresentava as melhores características para ser utilizado como fase móvel, sendo que a sequência de eluição era amarelo procion, vermelho procion e azul brilhante remazol.

Os corantes amarelo procion e vermelho procion apresentaram pouca interação com a coluna cromatográfica RP-18 quando a fase móvel era constituída apenas por solução aquosa do surfactante Triton X-100 e os tempos de retenção para ambos corantes era igual ao tempo morto, indicando que a interação destes corantes com a coluna cromatográfica era insuficiente para promover uma separação que pudesse ser utilizada para fins analíticos. Diferentemente dos outros dois corantes anteriores, o corante azul brilhante remazol apresentou boa interação com a coluna cromatográfica (Fig. 23).



**Figura 23. Cromatograma da mistura dos corantes têxteis.** Vazão 1,0 mL/min, [Triton X-100] 1,0 % (v/v) e 50,0 mg/L de cada corante.

A possível explicação para a interação semelhante dos corantes amarelo e vermelho está na grande semelhança estrutural existente entre eles (Fig. 05), enquanto que a pouca afinidade de ambos pela fase estacionária pode ser explicada pela grande diferença de polaridade existente entre as moléculas dos corantes (amarelo e vermelho) e a fase

estacionária (C<sub>18</sub>); devido aos vários grupos sulfonatos presentes nas moléculas dos corantes que os tornam muito iônicos enquanto a fase estacionária apresenta baixa polaridade.

Na tentativa de neutralizar as cargas dos corantes e aumentar sua interação com a coluna cromatográfica foi adicionado um sal que pudesse também funcionar como solução tampão; o sal escolhido foi fosfato de sódio, devido à possibilidade de preparar soluções tampão em três faixas de pH distintas (2,0, 7,0 e 12,0) e devido ao fato deste não ser considerado um composto tóxico.

Foi também verificado nesta fase inicial que os corantes têxteis em ambiente micelar apresentavam tendência a aglutinarem-se, formando auto - agregados, fato normal nas moléculas orgânicas de alta massa molar (1586,5, 1598,4 e 626,5 g/mol para amarelo, vermelho e azul, respectivamente). Estes processos de agregação dificultaram a separação cromatográfica, principalmente devido ao aparecimento de diversos picos que foram atribuídos a monômeros, dímeros e trímeros dos corantes. Para corrigir este problema, foi necessário adicionar álcool etílico à fase móvel como tentativa de aumentar a estabilidade dos corantes têxteis na forma monomérica.

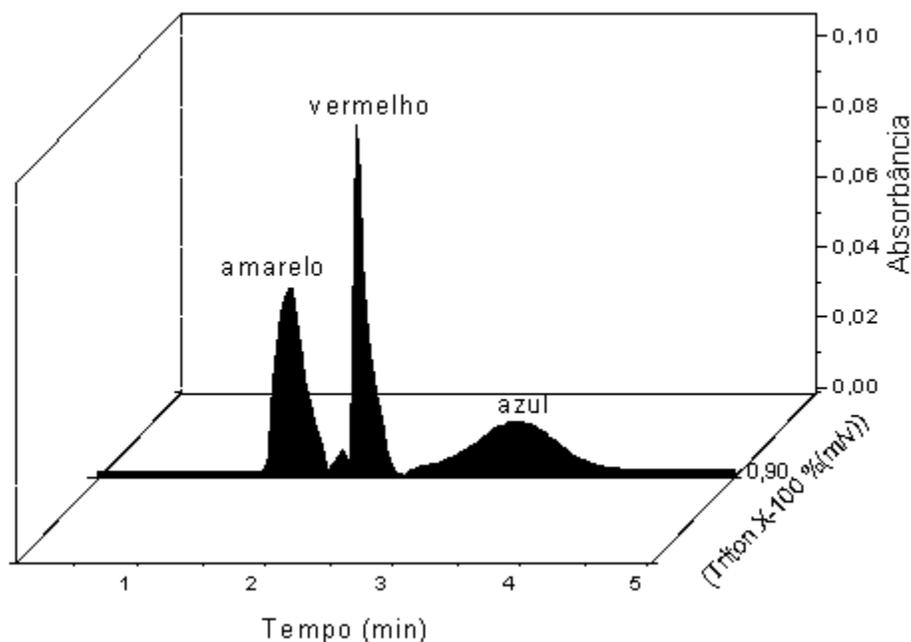
Assim, a seleção dos componentes da fase móvel e suas respectivas concentrações que permitiriam efetuar a separação dos corantes têxteis foram selecionadas partindo-se do planejamento fatorial (Tab. 05, pág. 44), sendo as melhores respostas selecionadas em função da resolução cromatográfica obtida (Tab. 16)

**Tabela 16. Resoluções cromatográficas para planejamento fatorial  $2^3$  para determinação dos corantes têxteis\*.**

| Experimento | Rs amarelo e vermelho | Rs vermelho e azul |
|-------------|-----------------------|--------------------|
| 1           | 2,43                  | 1,56               |
| 2           | 2,44                  | 3,90               |
| 3           | 2,05                  | -----              |
| 4           | 2,40                  | 2,60               |
| 5           | 2,42                  | 1,55               |
| 6           | 2,13                  | 4,27               |
| 7           | 2,57                  | -----              |
| 8           | 1,98                  | 2,41               |

\*Dados obtidos para vazão constante de 1,0 mL/min.

As condições utilizadas no experimento 8 (Tab. 16), concentração de Triton X-100 0,90 (v/v),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5,00 mmol/L e EtOH 20,0 % (v/v), foram escolhidas como ótimas (Fig 24). Quando as separações foram conduzidas sob estas condições foram obtidas resoluções cromatográficas adequadas para determinações quantitativas dos corantes têxteis sem a presença de picos de agregados e apresentando o menor tempo de análise, o que aumenta a frequência analítica e diminui a quantidade de reagentes utilizados. Os fatores que apresentaram maior influência na separação cromatográfica dos corantes têxteis, calculados através das resoluções cromatográficas (fator de resposta obtido entre amarelo procion e vermelho procion), foram a concentração de tampão fosfato e a concentração da solução do surfactante (Triton X -100), enquanto que a concentração de álcool etílico exerceu contribuição mais discreta (Tab. 17). Verificou-se intensa interação entre as variáveis 1 e 3, interação média entre as três variáveis e interação discreta entre as variáveis 2 e 3 (Tab. 17).



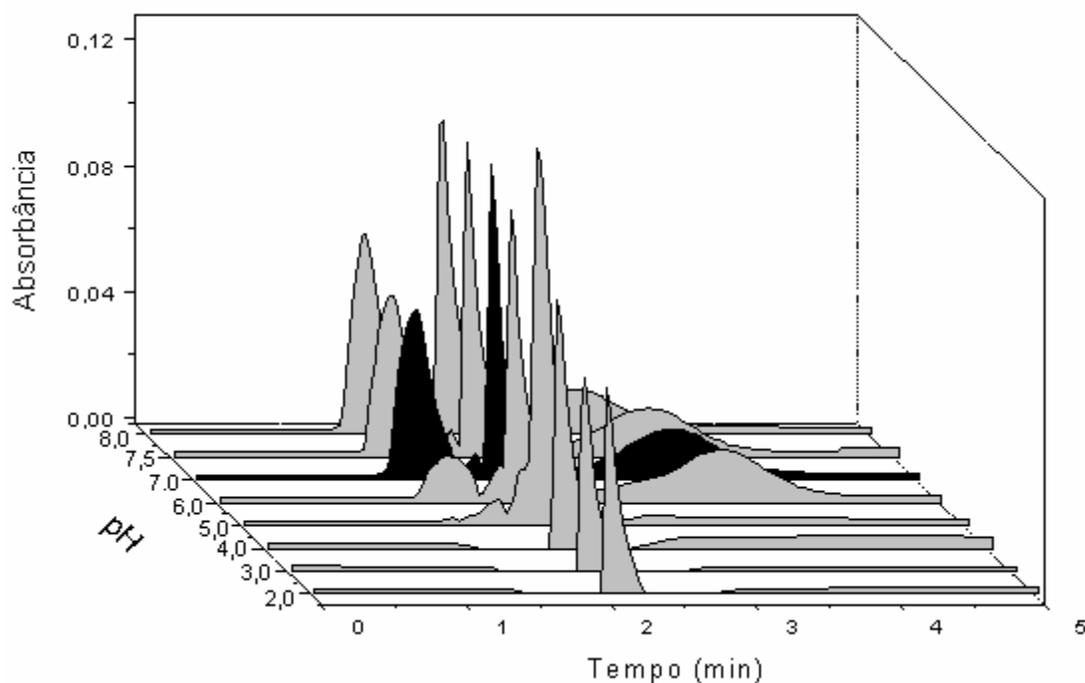
**Figura 24.** Cromatograma obtido para o experimento 8. Vazão 1,0 mL/min, Triton X-100 0,90 % (v/v), solução tampão fosfato 5,00 mmol/L (pH 7,0), EtOH 20,0 % (v/v) e 50,0 mg/L de cada corante têxtil.

**Tabela 17.** Cálculo dos efeitos de cada variável e da interação entre elas na resolução cromatográfica.

| Parâmetros                                      | Efeito das variáveis e das interações entre amarelo e vermelho |
|---|--|
| Média   | 2,3  |
| 1 ( $\equiv$ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | -0,13  |
| 2 ( $\equiv$ Triton X-100)                      | -0,11  |
| 3 ( $\equiv$ EtOH)                              | -0,055   |
| 12  | 0,010  |
| 13  | -0,31  |
| 23  | 0,11   |
| 123   | -0,16  |

Estes fatores de interação demonstram a complexidade do processo de separação dos três corantes têxteis que provavelmente envolvem modificação da coluna cromatográfica pelo agente surfactante, mudança da fase móvel devido à formação de micelas e variações nas condições de estabilidade dos corantes devido a presença de cargas associadas a cargas da solução tampão e o teor de álcool etílico.

Adicionalmente foi verificado que para valores de pH baixos o processo de separação não se mostrava eficiente, provavelmente devido ao aumento do processo de auto-agregação dos corantes, ocorrido através da neutralização de alguns grupos negativos dos mesmos (Fig.25).



**Figura 25. Variação do pH da fase móvel.** Solução tampão 5,00 mmol/L, EtOH 20,0 % (v/v), vazão de 1,0 mL/min, [Triton X-100] 0,90 % (v/v) e 50,0 mg/L de cada corante.

Muitos dos agregados formados apresentam baixa polaridade diminuindo a possibilidade de serem solvatados pela fase móvel e aumentando a possibilidade de serem atraídos pela fase estacionária.

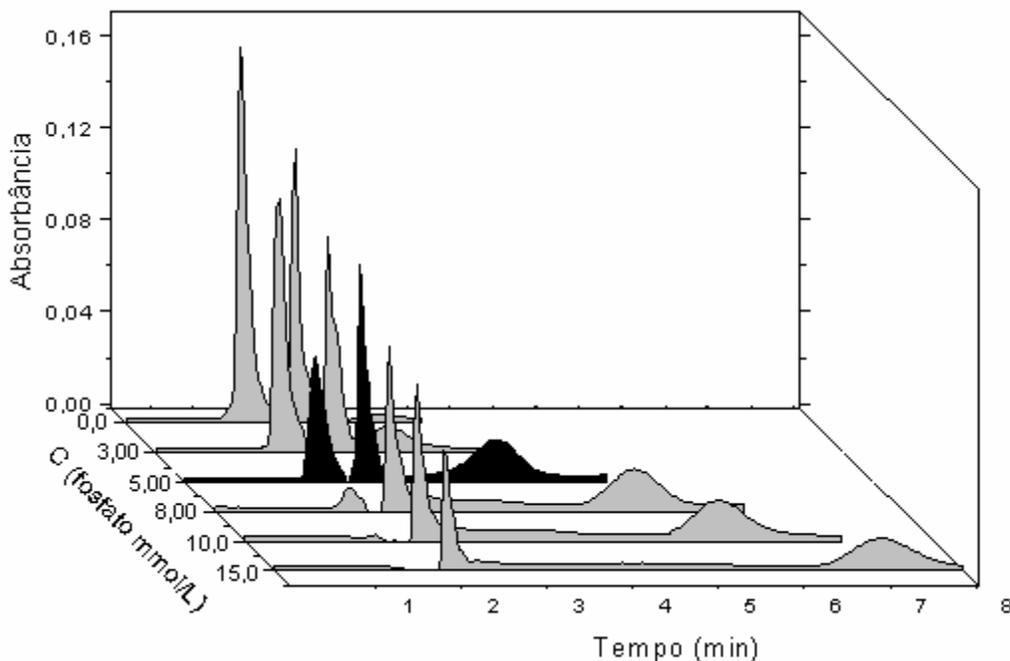
Devido a este fato, com a diminuição do pH percebeu-se a diminuição do número de picos devido à adsorção dos agregados na coluna cromatográfica. Observou-se que os melhores valores de pH para a separação cromatográfica estavam entre 7,0 e 8,0 (Fig. 25 e Tab. 18), sendo escolhido o pH 7,0 devido a neutralidade dos rejeitos gerados, fato que torna o método mais limpo.

Tabela 18. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação dos valores de pH da fase móvel.

| <b>pH</b> | <b>Rs amarelo e vermelho</b> | <b>Rs vermelho e azul</b> |
|-----------|------------------------------|---------------------------|
| 3,0       | ----                         | -----                     |
| 4,0       | ----                         | -----                     |
| 5,0       | 1,1                          | -----                     |
| 6,0       | 1,1                          | 2,2                       |
| 7,0       | 1,9                          | 2,4                       |
| 7,5       | 1,8                          | 1,7                       |
| 8,0       | 1,8                          | 1,6                       |

Com relação à concentração da solução tampão foi observado que o valor ótimo para o processo de separação era de 5,00 mmol/L (Fig. 26 e Tab. 19). Quando a concentração da solução tampão fosfato era menor que 5,00 mmol/L foi verificada diminuição das resoluções cromatográficas e uma substancial diminuição do pico do corante azul, fatos que impediram a obtenção de dados quantitativos (Fig. 26). Para concentrações da solução tampão superiores a 5,00 mmol/L foi observado constante

aumento do tempo de retenção e maior tendência de auto - agregação do corante amarelo, chegando até mesmo a desaparecer o pico referente a este corante quando a concentração do tampão era superior a 10,0 mmol/L (Fig. 26).

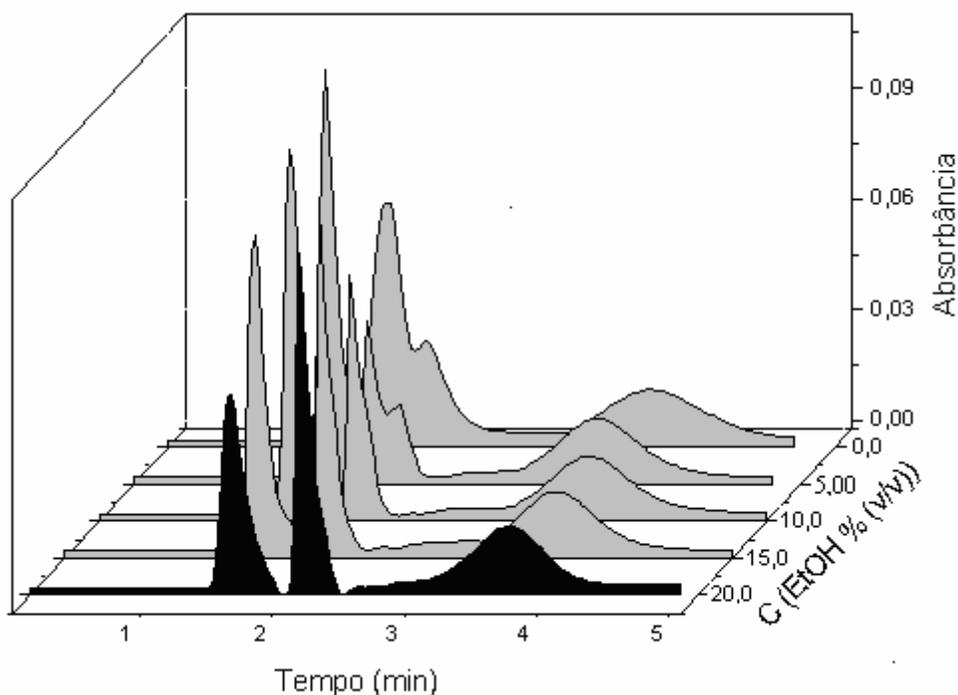


**Figura 26.** Variação da concentração da solução tampão fosfato (pH 7,0). EtOH 20,0 % (v/v), [Triton X-100] 0,90 % (v/v), vazão 1,0 mL/min e 50,0 mg/L de cada corante.

Tabela 19. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração da solução tampão fosfato.

| Tampão fosfato (mmol/L) | Rs simazina e atrazina | Rs atrazina e ametrina |
|-------------------------|------------------------|------------------------|
| 0,00                    | 3,2                    | -----                  |
| 3,00                    | 2,1                    | 1,6                    |
| 5,00                    | 2,0                    | 2,4                    |
| 8,00                    | 1,9                    | 4,4                    |
| 10,0                    | -----                  | 5,1                    |
| 15,0                    | -----                  | 6,3                    |

O estudo da concentração de álcool etílico, modificador da fase móvel, mostrou que a concentração de 20,0 % (v/v) era adequada (Tab. 20 e Fig. 27). Para concentrações de álcool etílico inferiores a 20,0 % (v/v) a tendência de auto - agregação foi observada, principalmente para o corante vermelho, sendo este efeito mais acentuado quanto menor a concentração de álcool na fase móvel. Para valores de concentração de etanol maiores que 20,0 % (v/v) o sinal analítico mantinha-se praticamente constante, porém a pressão do sistema aumentava consideravelmente devido à alta viscosidade do etanol. Assim, a concentração de etanol foi fixada em 20,0 % (v/v).

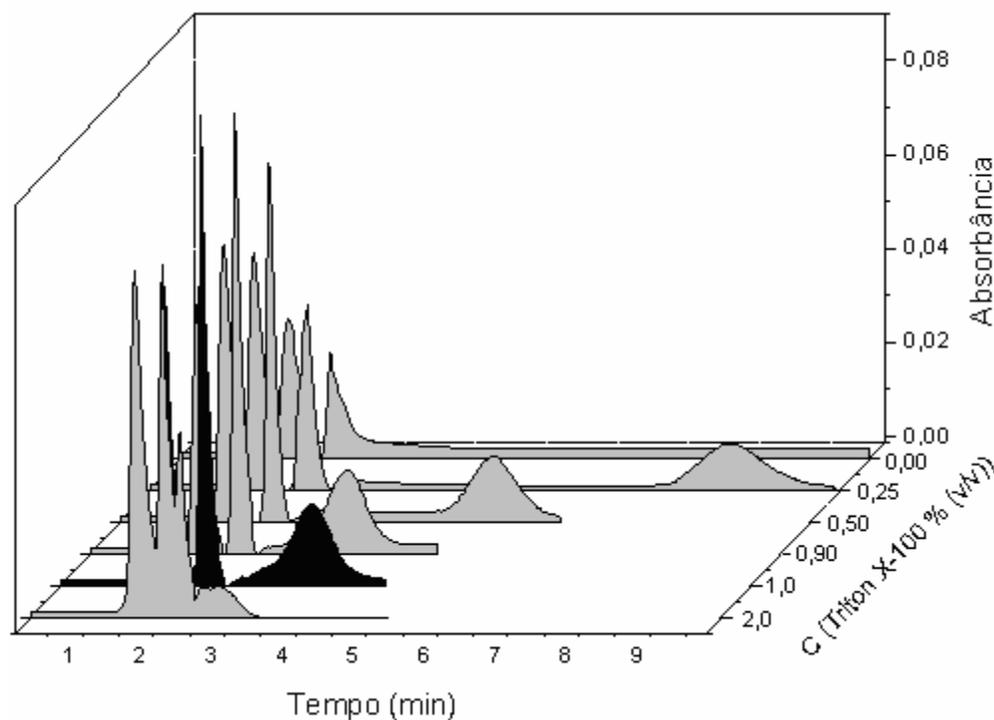


**Figura 27. Variação da concentração de EtOH.** [tampão fosfato] 5,00 mmol/L (pH 7,0), [Triton X-100] 0,90 % (v/v), vazão 1,0 mL/min e 50,0 mg/L de cada corante.

Tabela 20. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação do teor de álcool etílico.

| álcool etílico % (v/v) | Rs amarelo e vermelho | Rs vermelho e azul |
|------------------------|-----------------------|--------------------|
| 0,00                   | 1,1                   | 2,3                |
| 5,00                   | 1,6                   | 2,4                |
| 10,0                   | 1,9                   | 2,6                |
| 15,0                   | 2,1                   | 2,6                |
| 20,0                   | 2,0                   | 2,5                |

Quanto à presença de Triton X-100, verificou-se que este era fundamental ao processo de separação dos corantes têxteis (Fig. 28 e Tab. 21).



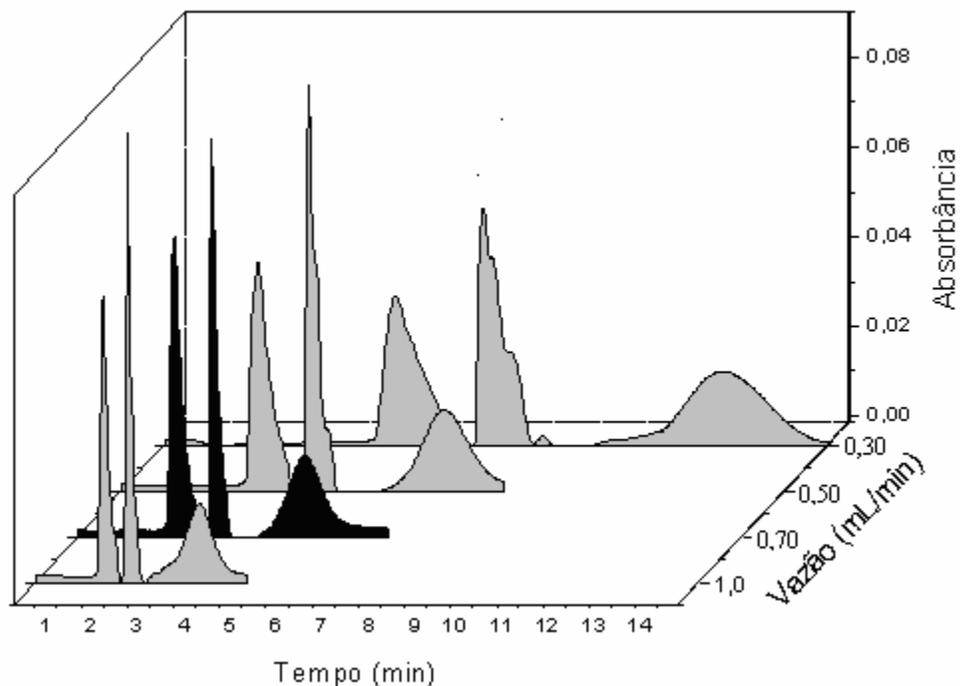
**Figura 28. Efeito da concentração de Triton X-100.** [tampão fosfato] 5,00 mmol/L (pH 7,0), EtOH 20,0 % (v/v), vazão 1,0 mL/min e 50,0 mg/L de cada corante.

Sendo observado que para concentrações de Triton X-100 inferiores 0,90 % (v/v) ocorria um aumento do tempo de retenção para o corante azul bem como sobreposição dos picos dos corantes amarelo e vermelho. Sem a presença de Triton X-100, o pico do corante azul desaparecia, ou seja, o corante não era eluído da coluna cromatográfica enquanto a resolução cromatográfica entre os corantes amarelo e vermelho não atingia o valor mínimo para fins quantitativos. Para valores de concentração de Triton superiores a 1,0 % (v/v) era observada constante diminuição da resolução cromatográfica com o aumento da concentração do mesmo, chegando-se a obter intensa sobreposição dos picos quando a concentração era 2,0 % (v/v). Este fato está associado a um aumento da afinidade dos corantes pela fase móvel, e conseqüente diminuição da interação com a coluna cromatográfica. Assim, a concentração de Triton X-100 foi fixada em 1,0 % (v/v).

Tabela 21. Resoluções cromatográficas obtidas para a variação da concentração de Triton X-100.

| <b>Triton X-100 % (v/v)</b> | <b>Rs amarelo e vermelho</b> | <b>Rs vermelho e azul</b> |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| 0,00                        | 1,2                          | -----                     |
| 0,25                        | 1,9                          | 5,7                       |
| 0,50                        | 2,0                          | 4,3                       |
| 0,90                        | 2,0                          | 2,5                       |
| 1,0                         | 2,1                          | 2,7                       |
| 2,0                         | -----                        | -----                     |

A vazão da fase móvel não apresentava outros efeitos na separação cromatográfica, além de mudanças na dispersão e tempo de análise. Desta forma, este fator foi estudado (Fig. 29 e Tab 22) para se obter menor tempo de análise, consumo de reagentes e pressão gerada no sistema cromatográfico.



**Figura 29. Efeito da vazão no sinal analítico.** [tampão fosfato] 5,00 mmol/L (pH 7,0), EtOH 20,0 % (v/v), [Triton X-100] 1,00 % (v/v) e 50,0 mg/L de cada corante.

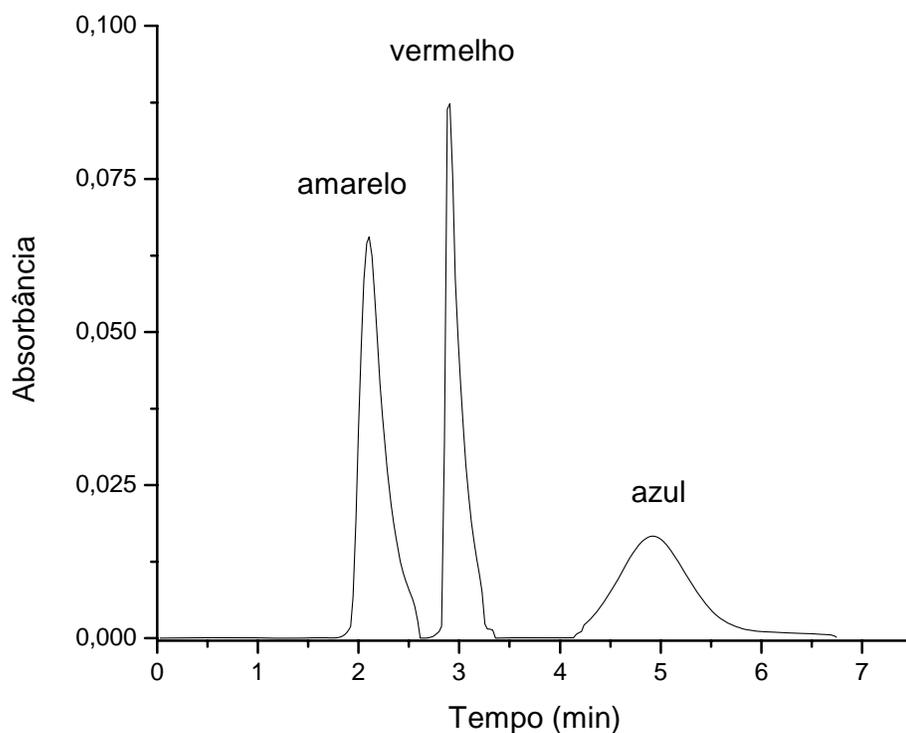
Tabela 22. Resoluções cromatográficas obtidas para o estudo da vazão da fase móvel no sistema cromatográfico.

| vazão (mL/min) | Rs amarelo e vermelho | Rs vermelho e azul |
|----------------|-----------------------|--------------------|
| 0,30           | 1,7                   | 2,6                |
| 0,50           | 2,0                   | 2,9                |
| 0,70           | 2,2                   | 3,1                |
| 1,0            | 2,1                   | 2,7                |

O valor de 0,70 mL/min foi selecionado como ótimo; sob esta condição o método analítico apresenta boa sensibilidade, sendo possível quantificar os corantes de interesse em apenas 8,0 min.

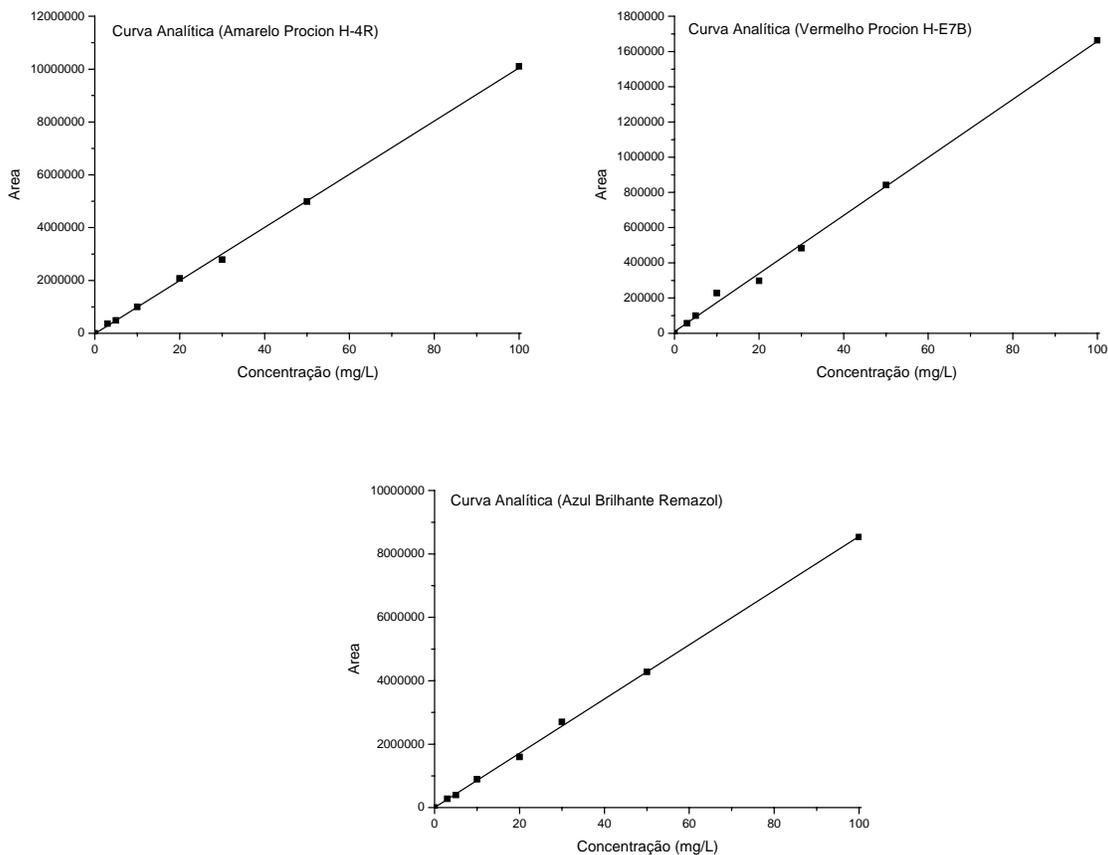
Utilizando as condições ótimas do método proposto para a separação dos corantes (Triton X-100 1,0 % (v/v), tampão fosfato 5,00 mmol/L (pH 7,0), álcool etílico 20,0 % (v/v) e vazão de 0,7 mL/min) obteve-se tempos de retenção de 2,0, 2,9 e 5,1 min para amarelo procion, vermelho procion e azul remazol, respectivamente (Fig.30).

As resoluções cromatográficas obtidas para as condições otimizadas (2,2 para a separação dos corantes amarelo procion e vermelho procion e 3,1 para a separação do vermelho procion e azul brilhante remazol) demonstram que os dados obtidos podem ser utilizados para fins analíticos (Fig. 30).



**Figura 30. Cromatograma obtido para a mistura dos corantes amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol:** Dados obtidos para uma injeção de 30 $\mu$ L e 50,0 mg/L de cada corante, [tampão fosfato] 5,00 mmol/L (pH 7,0), [EtOH] 20,0 % (v/v), [Triton X-100] 1,0 % (v/v) e vazão de 0,7 mL/min.

Curvas analíticas obtidas para os corantes têxteis Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brillhante remazol (Fig. 31) evidenciam linearidade na faixa de 3,00 – 100 mg/L para injeções de 30 µL da solução padrão.



**Figura 31-** Curvas analíticas para os corantes têxteis: Amarelo Procion H-4R, Vermelho Procion H-E7B e Azul Brillhante Remazol.

Os limites de detecção (Tab. 23) foram obtidos através da relação sinal/ruído (3x) e os limites de quantificação (Tab. 23) também foram estimados através da relação sinal/ruído (10x) e estes permitem que sejam determinados corantes têxteis em efluentes industriais através do método proposto.

**Tabela 23. Características do método cromatográfico para a determinação dos corantes têxteis.**

|                            | <b>Amarelo Procion<br/>H-4R</b> | <b>Vermelho Procion<br/>H-E7B</b> | <b>Azul Brillhante<br/>Remazol</b> |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Equação da reta            | $y = 100351x - 29637$           | $y = 16492x + 9378$               | $y = 85499x + 3981$                |
|                            | $R^2 = 0,9991$                  | $R^2 = 0,9990$                    | $R^2 = 0,9996$                     |
| Limite de detecção         | 0,40 mg/L                       | 0,80 mg/L                         | 0,80 mg/L                          |
| Limite de<br>quantificação | 1,3 mg/L                        | 2,7 mg/L                          | 2,7 mg/L                           |

## 5.4. Aplicações

### 5.4.1. Herbicidas

O método desenvolvido para determinação de compostos triazínicos (simazina, atrazina e ametrina) foi utilizado em amostras de solo, água e tomate. Nas amostras de água e tomate, os herbicidas não foram detectados; provavelmente às concentrações estavam abaixo do limite de determinação. Para amostras de solo (plantação de milho) foram encontradas concentrações de  $260 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 4\%$  e  $390 \mu\text{g}/\text{kg} \pm 3\%$  dos herbicidas atrazina e ametrina, respectivamente.

A validação do método analítico foi realizada através de ensaios de recuperação e também através de comparação dos resultados com aqueles obtidos quando da utilização do procedimento convencional que emprega solvente orgânico (Tab. 24). Os resultados obtidos através do método proposto e do método convencional mostraram-se concordantes, os valores médios das percentagens de recuperação não são estatisticamente diferentes ao

nível de 95 % (teste *t* de student), evidenciando assim a exatidão dos resultados obtidos quando da utilização do método proposto.

**Tabela 24. Determinação dos herbicidas em amostras de água, solo e vegetal através do método proposto (limpo) e método comparativo, através de ensaios de recuperação (n=4).**

| Amostras         | Concentração<br>(mg/L) | Método proposto<br>(recuperação %) |          |          | Método comparativo<br>(recuperação %) |          |          |
|------------------|------------------------|------------------------------------|----------|----------|---------------------------------------|----------|----------|
|                  |                        | adicionado                         | simazina | atrazina | ametrina                              | simazina | atrazina |
| água (destilada) | 1,0                    | 96,0±2,1                           | 93,0±1,7 | 87,5±1,5 | 93,0±2,4                              | 90,0±2,1 | 90,5±1,5 |
| água (torneira)  | 2,0                    | 95,8±1,6                           | 91,0±2,2 | 89,0±1,8 | 93,0±2,0                              | 95,0±0,9 | 92,0±1,8 |
| água (rio)       | 4,0                    | 95,8±0,7                           | 96,5±2,5 | 87,0±0,9 | 97,0±1,7                              | 92,0±1,2 | 89,0±2,0 |
| solo (milho)     | 3,0                    | -----                              | 85,0±2,5 | 78,3±3,2 | ----                                  | 81,0±3,0 | 84,0±1,9 |
| solo (milho)     | 4,0                    | -----                              | 86,0±2,3 | 77,0±1,7 | ----                                  | 90,0±2,8 | 80,0±1,4 |
| tomate           | 2,0                    | 94,5±1,5                           | 91,5±1,9 | 91,3±1,1 | 92,0±1,6                              | 87,0±1,8 | 89,0±0,6 |
| tomate           | 3,0                    | 83,0±3,3                           | 84,3±2,0 | 81,8±1,6 | 90,0±1,5                              | 87,5±1,5 | 79,0±2,1 |

Os resultados obtidos para o teste de recuperação estão entre 77,0-97,0 % e podem ser considerados satisfatórios para a faixa de concentração estudada e principalmente devido a complexidade de se analisar pesticidas em amostras de frutas e solos.

#### 5.4.2. Corantes

O método limpo desenvolvido para determinação dos corantes têxteis amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol foi aplicado para análise de efluentes têxteis. A validação do método analítico foi realizada através de ensaios de recuperação (Tab. 25), devido à ausência de métodos alternativos na literatura.

**Tabela 25. Ensaio de recuperação dos corantes têxteis amarelo procion, vermelho procion e azul brilhante remazol (n=4).**

| Amostra | Concentração determinada<br>(mg/L) |           |           | Concentração adicionada<br>de cada corante (mg/L) | Recuperação (%) |          |       |
|---------|------------------------------------|-----------|-----------|---|-----------------|----------|-------|
|         | amarelo                            | vermelho  | azul      |   | amarelo         | vermelho | azul  |
| 1       | 9,60±0,23                          | -----     | 19,8±0,5  | 05  | 96,7            | -----    | 99,0  |
| 2       | 4,50±0,16                          | -----     | -----     | 05  | 93,0            | -----    | ----- |
| 3       | 15,8±0,6                           | 14,9±0,3  | -----     | 10  | 101,6           | 99,5     | ----- |
| 4       | 10,4±0,2                           | 6,90±0,32 | 6,10±0,10 | 10  | 97,5            | 90,8     | 92,0  |
| 5       | 18,0±0,4                           | 23,0±0,7  | 28,7±0,8  | 15  | 101,0           | 95,5     | 100,5 |
| 6       | -----                              | 7,10±0,10 | 9,40±0,25 | 20  | -----           | 95,0     | 96,8  |

Através dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação pode-se verificar que as percentagens de recuperação variaram entre 90,0 -102,0 % indicando que o método proposto não sofre interferências da matriz para as amostras estudadas. Deve ser ressaltado que o teste de recuperação é o teste indicado para a validação de métodos analíticos quando amostras de referência certificada e métodos analíticos comparativos não estão disponíveis, sendo este o caso do presente trabalho.

## 6. Conclusões

Foi possível desenvolver métodos cromatográficos limpos de CLAE minimizando a utilização de solventes orgânicos tóxicos explorando ambientes micelares em água para separação de herbicidas triazínicos e corantes têxteis industriais.

O método cromatográfico desenvolvido para a determinação dos herbicidas triazínicos simazina, atrazina e ametrina utilizando como fase móvel SDS 2,25 % (m/v), álcool etílico 25,0 % (v/v),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50,0 mmol/L, tampão fosfato 0,100 mol/L (pH 7,0) em água e como fase estacionária uma coluna RP-18, mostrou-se seletivo, sensível, robusto, simples, de alta frequência analítica, sendo os resultados obtidos comparáveis aqueles fornecidos quando da utilização do procedimento convencional, mas com a vantagem de não utilizar reagentes tóxicos. Foram obtidos tempos de retenção de 11,4, 15,6 e 24,4 min para simazina, atrazina e ametrina, respectivamente e as resoluções cromatográficas foram estimadas como 2,0 entre simazina e atrazina e 3,4 entre atrazina e ametrina. As curvas analíticas obtidas para os três herbicidas evidenciam linearidade na faixa de 1,00 – 50,0 mg/L para injeções de 10 $\mu\text{L}$  e os limites de detecção foram estimados em 100, 100 e 150  $\mu\text{g/L}$  para simazina, atrazina e ametrina, podendo ser melhorados, quando necessário, aumentando-se o volume de amostra injetado ou através de procedimentos de pré-concentração.

O método cromatográfico desenvolvido para a determinação dos corantes têxteis amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol utilizando como fase móvel: Triton X-100 1,0 % (v/v), álcool etílico 20,0 % (v/v) e tampão fosfato 5,00 mmol/L (pH 7,0) em água e como fase estacionária uma coluna RP-18, mostrou-se simples, seletivo, sensível, robusto e de alta frequência analítica, pois foi possível realizar a análise

dos corantes estudados em apenas 8 min, com a vantagem adicional de ser um método cromatográfico limpo. Após as otimizações da fase móvel, foram obtidos tempos de retenção de 2,0, 2,9 e 5,1 min para amarelo procion H-4R, vermelho procion H-E7B e azul brilhante remazol, respectivamente e resoluções cromatográficas de 2,2 para a separação dos corantes amarelo procion e vermelho procion e 3,1 para a separação do vermelho procion e azul brilhante remazol. As curvas analíticas para os três corantes têxteis em estudo apresentam linearidade na faixa de 3,00 - 100 mg/L para injeções de 30 µL da solução padrão e os limites de detecção estimados de 0,40, 0,80 e 0,80 mg/L para amarelo procion, vermelho procion e azul remazol, respectivamente. O método proposto, além de ser limpo, é uma ferramenta útil para análise destes corantes em efluentes têxteis industriais uma vez que não se verifica na literatura metodologia disponível para essa análise.

## Referências

- [1]TESFAMICHAEL, A. A.; KALUARACHCHI, J. J. A methodology to assess the risk of an existing pesticide and potential future pesticide for regulatory decision - marking. Environ. Sci. Policy, v. 9, p. 275, 2006.
- [2]DELGADO, I. F.; PAUMGARTTIN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultura do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. Cad. Saúde Pública, v. 20, p. 180, 2004.
- [3]GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. Quím. Nova, v. 23, p. 71, 2000.
- [4]LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C.; SILVEIRA, C. C. “Green Chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. Quim. Nova, v. 26, p. 123, 2003.
- [5]OKADA, T. Micellar chromatography of inorganic compounds. J. Chromatogr. A, v. 780, p. 343, 1997.
- [6]VIDOTTI, E. C.; COSTA, W. F.; OLIVEIRA, C. C. Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples. Talanta, v. 68, p. 516, 2006.
- [7]MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de Alimentos. São Paulo, Varela Editora e Livraria LTDA, 2000, p. 189, 225.
- [8]MATOLCSY, M.; NÁDASY, M.; ANDRISKA, V. Pesticide Chemistry, Washington, Elsevier, 1998. p. 22-60.
- [9]LARINI, L. Toxicidade dos praguicidas, São Paulo, Editora Manole Ltda, 1999. p. 1-8.

- [10]VILLA, R. D.; DORES, E. F. G. C.; CABO, L.; CUNHA, M. L. F. Dissipation of DDT in a heavy contaminated soil in Mato Grosso, Brasil. Chemosphere, 2006 (in press).
- [11]BRASIL. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 - Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial, de 08 de janeiro de 2002.
- [12]MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. Cam. Geog., v. 3, p. 26, 2003.
- [13]FARIA, L. J. S. Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia. Campinas – SP. 2004. Dissertação (Mestrado), Instituto de química – Unicamp.
- [14]PARRA, J. R. P.; BATEHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores, Barueri, Editora Manole Ltda, 2002. p. 1-14.
- [15]MACIEL, E. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para a quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera indica*). Piracicaba-SP. 2005. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo.
- [16]JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R. A. F.; PEREIRA, J. L.; VIANA, R. G. Efeitos de herbicidas no consórcio de milho com *Brachiaria brizantha*. Planta Daninha, v. 23, p. 69, 2005.

- [17]RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de Herbicidas, 4º Ed. Londrina,1998. p. 30, 67, 513.
- [18]OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTATIN, J. Planta Daninha e seu Manejo. Guaíba, Livraria e Editora Agropecuária LTDA, 2001, p. 24.
- [19]CRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. Aspectos da Resistência de Plantas Daninhas, Londrina, Associação Brasileira de ação a resistência de plantas aos herbicidas (HRAC-BR), 2003. p. 27-28.
- [20]MELO, L. F. C. Desenvolvimento de metodologias e de novos materiais para a determinação multiresidues de pesticidas em uva e tomate por cromatografia líquida de alta eficiência. Campinas. 2003. Tese (Doutorado), Instituto de Química – Unicamp.
- [21]RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GRAFFERES, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de mananciais, água potável e solo na região de Bauru (SP). Quím. Nova, v. 27, p. 739, 2004.
- [22]INOQUE, M. H.; OLIVEIRA JR., R. S.; REGITANO, J. B.; TORMENTA, C. A.; TORNISIELO, V. L.; CONSTANTIN, J. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. Planta Daninha, v. 21, p. 313, 2003.
- [23]TOMITA, R. Y.; BEYREITH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. O Biológico, v. 64, p. 135, 2002.
- [24]DORES, E. F. G.; DE - LAMONICA - FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – análise preliminar. Quím. Nova, v. 24, p. 27, 2001.

- [25]EPA – Environmental Protection Agency (USA). Citação de referência e documentos eletrônicos. Disponível em: [www.epa.gov](http://www.epa.gov). Acessada em março de 2006.
- [26]BRASIL, MINISTÉRIO DO ESTADO DA SAÚDE. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Decreto nº 79.367, de 09 de março de 1977. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial, Brasília, 26 de março de 2004.
- [27]ALMED, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. Trends Anal. Chem., v. 20, p. 649, 2001.
- [28]GUNTHER, F. A.; BLINN, R. C. Pesticides residues: basic principles for quantitative determination. Agric. Food Chem., v. 1, p. 325, 1953.
- [29]ZWEIG, G. Chromatographic techniques for pesticides residues analysis. Chromatogr. Rev., v. 6, p. 110, 1964.
- [30]PARKER, K. D.; DEWEY, M.; DE VRIES, D. M.; LAU, S. C. Tissue and fat preparation for pesticides determination by gas chromatography, Toxicol. Appl. Pharmacol., v. 7, p. 719, 1965.
- [31]FISHBEIN, L. Chromatographic and biological aspects of DDT and its metabolites. J. Chromatogr., v. 98, p. 177, 1974.
- [32]TADEU, J. L.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; PEREZ, R. A.; FERNANDEZ, M. D. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. J. Chromatogr. A, v. 882, p. 175, 2000.
- [33]BALLESTEROS, E.; PARRADO, M. J. Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorous pesticides in natural and drinking waters. J. Chromatogr. A, v. 1029, p. 267, 2004.

- [34]TOPUZ, S.; ÖZHAN, G.; ALPERTUNGA, B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. Food Control, v. 16, p. 87, 2005.
- [35]GONÇALVEZ, C.; ALPENDURA, M. F. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. J. Chromatogr. A, v. 1026, p. 239, 2004.
- [36]DOMMARCO, R.; SANTILIO, A.; FORNARELLI, L. Simultaneous quantitative determination of thirteen urea pesticides at sub-ppb levels on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> column. J. Chromatogr. A, v. 825, p. 200, 1998.
- [37]BARDALAYE, P. C.; WHELLER, W. B. Simplified method for the clean-up and reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of benomyl in mangoes. J. Chromatogr., v. 330, p. 403, 1985.
- [38]DOPICO, G. M. S.; GONZÁLEZ R. M. V.; CASTRO, R. J. M.; GONZÁLEZ, S. E.; PÉREZ, I. J.; RODRÍGUEZ, T. M.; CALLEJA, A.; VILARIÑO, J. M. L. Determination of chlorotriazines, methylthiotriazines and one methoxytriazine by SPE-LC-UV in water samples. Talanta, v. 59, p. 561, 2003.
- [39]PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. J. Chromatogr. A, v. 869, p. 463, 2000.
- [40]ÖNNERFJORD, P.; BARCELÓ, D.; EMNÉUS, J.; GORTON, L.; MARKO-VARGA, G. On-line solid-phase extraction in liquid chromatography using restricted access pre-columns for the analysis of s-triazines in humic-containing waters. J. Chromatogr. A, v. 737, p. 35, 1996.

- [41]COQUART, V.; HENNIAN, M. C. Interference removal in the organic trace-level analysis of aqueous environmental samples by on-line liquid chromatographic preconcentration techniques with two precolumns. J. Chromatogr. A, v. 553, p. 329, 1991.
- [42]BALINOVA, A.; Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. J. Chromatogr. A, v. 643, p. 203, 1993.
- [43]BALINOVA, A. Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acid herbicides in water. J. Chromatogr. A, v. 728, p. 319, 1996.
- [44]MELO, L. F. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. New materials for solid-phase extraction and multiclass high-performance liquid chromatographic analysis of pesticides in grape. J. Chromatogr. A, v. 1032, p. 51, 2004.
- [45]GONÇALVES, G.; ALPESDURA, M. F. Comparison of three different poly(dimethylsiloxane)-divylbenzene fibres for the analysis of pesticide multiresidues in water samples: structure and efficiency. J. Chromatogr. A, v. 963, p. 19, 2002.
- [46]KOMATSU, E.; VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduos de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. Quim. Nova, v. 27, p. 720, 2004.
- [47]HUANG, S.; HUANG, H.; SUNAG, Y. Analysis of triazines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. Talanta, v. 64, p. 887, 2004.

- [48]PADRÓN-SANZ, C.; HALKO, P.; SOSA-FERREIRA, Z.; SANTANA-RODRIGUES, J. J. Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorous pesticides in soil samples. J. Chromatogr. A, v. 1078, p. 13, 2005.
- [49]OTERO, R. R.; GRANDE, C. B.; GÁNDARA, S. J. Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. J. Chromatogr. A, v. 992, p. 121, 2003.
- [50]ZHOU, Q.; XIÃO, J.; WANG, W.; LIU, G.; SHI, Q.; WANG, J. Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. Talanta, v. 68, p. 1309, 2006.
- [51]MILIADIS, G. E.; TSIROPOULOS, G.; APLADA-SARLIS, P. G. High-performance liquid chromatographic determination of benzoylurea insecticides residues in grape and wine using liquid and solid-phase extraction. J. Chromatogr. A, v. 835, p. 113, 1999.
- [52]AULAKH, J. S.; MALIK, A. K.; MAHAJAN, R. K. Solid phase microextraction-high pressure liquid chromatographic determination of nabam, thiram and azamethiphos in water samples with UV detection: preliminary data. Talanta, v. 66, p. 266, 2005.
- [53]MELO, L. F. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. High-performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH<sub>2</sub> and C<sub>18</sub> solid-phase extraction materials. J. Chromatogr. A, v. 1073, p. 75, 2005.

- [54]FALQUI-CAO, C.; WANG, Z.; URRUTY, L.; POMMIER, J. J.; MONTURY, M. Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME-HPLC-DAD. J. Agric. Food Chem., v. 49, p. 5092, 2001.
- [55]NASCIMENTO, P. C.; ROHLFES, A. L. B.; BOHRER, D.; CARVALHO, L. M.; PILAU, E. J. HPLC based method using samples precolumm cleanup for the determination of triazines and thiolcarbamates in hemodialysis saline solutions. Talanta, v. 65, p. 211, 2005.
- [56]MORAES, S. L.; RESENDE, M. O.O.; NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C. Análise de resíduos de pesticidas em tomates por cromatografia em camada delgada. Quim. Nova, v. 25, p. 196, 2002.
- [57]ACEDO-VALENZUELA, M. I.; GALEANO-DIAZ, T.; MORA-DIEZ, N.; SILVA-RODRIGUEZ, A. Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. Anal. Chim. Acta, v. 519, p. 65, 2004.
- [58]PEDROSA, V. A.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L. A. Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. Quim. Nova, v. 26, p. 844, 2003.
- [59]SILVA, C. L.; LIMA, E. C.; TAVARES, M. F. M. Investigation of preconcentration strategies for the trace analysis of multi-residue pesticide in real samples by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A, v. 1014, p. 109, 2003.
- [60]BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; GANGLBERG, E.; GEISSLER, S. Natural dyes in modern textile dyeshouses \_ how combine experiences of two centuries to meet the demands of the future? J. Clean. Product., v. 11, p. 499, 2003.

- [61]MCMURRY, J. Organic Chemistry. 4º Ed. California, Cole Publishing Company, 1984.
- [62]ZOLLINGER, H. Color chemistry: Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 2º Ed. New York, USA, VCH Publishers, 1991. p. 137-179 e 426.
- [63]RIBEIRO, R. M.; BERGAMASCO, R., GIMENES, M. L. Estudo de sínteses de membranas para tratamento de efluentes. Rev. Tecnol. v. 9, p. 19, 2000.
- [64]GUARATINI, C. C, I.; FOGG, A. G.; ZANONI, M. V. B. Assessment of the application of cathodic stripping voltammetry to the analysis of diazo reative dyes and their hidrolisis products. Dyes and Pigments, v. 50, p. 211, 2001.
- [65]ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química. Citação de referência e documentos eletrônicos. Disponível em: [www.abiquim.org.br](http://www.abiquim.org.br). Acessada em 20 de março de 2006.
- [66]SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/ peróxido de hidrogênio. Quim. Nova, v. 28, p. 226, 2005.
- [67]DÖNMIZ, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. Enzyme Microb. Technol., v. 30, p. 363, 2002.
- [68]PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dyes reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. Dyes and Pigments, v. 61, p. 121, 2004.
- [69]BASAVA RAO, V. V.; RAM MOHAN RAO, S. Adsorption studies on treatment of textile dyeing industrial effluent by flyash. Chem. Eng. J., v. 116, p. 77, 2006

- [70]SANGHI, R.; BHATTACHARYA, B.; DIXIT, A.; SINGH, V. *Ipoema dasysperma* seed gum: an effective natural coagulant for the decolorization of textile dye solutions. J. Environ. Manage., (in press)
- [71]RAJKUMAR, D.; SONG, B. J.; KIM, J. G. Electrochemical degradation of Reactive Blue 19 on chloride medium for the treatment of textile dyeing waste water with identification of intermediate compounds. Dyes and Pigments, v. 71, p. 244, 2006.
- [72]CISNEROS, R. L.; ESPINOZA, A. G.; LITTER, M. I. Photodegradation of an azo dyes of the textile industry. Chemosphere, v. 48, p. 393, 2002.
- [73]KHEHRA, M. S.; SAINI, H. S.; SHARMA, D. K.; CHADHA, B. S.; CHIMNI, S. S. Biodegradation of azo dye C. I. Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. Dyes and Pigments, v. 70, p. 1, 2006.
- [74]ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour. Technol., v. 77, p. 247, 2001.
- [75]KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. Quim. Nova, v. 25, p. 78, 2002.
- [76]ALMEIDA, V. C.; COSTA, W. F.; NOZAKI J.; OLIVEIRA, C. C. Spectrophotometric determination of blue procion HEGN in effluents of textile industry exploiting the dye aggregation effect and flow injection analysis. Anal. Sci., v. 22, p. 445, 2006.
- [77]ZANONI, M. V. B.; FOGG, A. G.; BAREK, J.; ZIMA, J. Electrochemical investigations of reactive dyes; polarographic determination of anthraquinone-based chlorotriazine dyes. Anal. Chim. Acta, v. 315, p. 41, 1995.

- [78]SOCHER, G.; NUSSBAUM, R.; RISSLER, K.; LANKMAYR, E. Analysis of sulfonated compounds by ion-exchange high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, v. 912, p. 53, 2001.
- [79]SCHENCK, F. J.; DONOGHUE, D. J. Determination of organochlorine and organophosphorus pesticides residues in eggs using a solid phase extraction cleanup. J. Agric.Food Chem., v. 48, p. 6412, 2000.
- [80]COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos, 5ª Ed., Campinas-SP, Editora da Unicamp, 1993. p. 13.
- [81]BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. Chromatographic Methods, 5º Ed. London, Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 2.
- [82]SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Principles of Instrumental Analysis. 5ª Ed. Saunders College Publishing, United States of American, 1998. p. 739-756.
- [83]HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 6ª Ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2001. p. 557.
- [84]LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice, London, Blackie Academic & Professional, 1996. p. 37-78, 156-161.
- [85]DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. Quim. Nova Escola, v. 7, p. 21, 1998.
- [86]DIAS GARCIA, E.; SANZ-MEDEL, A. Dye-surfactants interactions: a review. Talanta, v.33, p. 255, 1986.
- [87]PANDIT, P.; BASU, S. Removal of organic dyes from water by liquid-liquid extraction using reverse micelles. J. Colloid Interface Sci., v. 245, p. 208, 2002.

- [88]ROSEN, M. J. Surfactants and Interface Phenomena, 2º Ed. United States of America, John Wiley & Sons, 1989. p. 112-113.
- [89]JONSSON, B.; LINDMAN, B.; HOLMBERG, K.; KRONBERG, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, Chichester, John Wiley & Sons, 1998. p. 146.
- [90]MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. Quim. Nova, v. 24, p. 87, 2001.
- [91]RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim. Nova, v. 27, p. 771, 2004.
- [92]VAN DER VOET, H.; VAN RHIJIN, J. A. H.; VAN DER WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. Anal. Chim. Acta, v. 391, p. 159, 1999.
- [93]KUTTATHARMMAKUL, S.; MASSARR, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J. Comparison of alternative measurement methods. Anal. Chim. Acta, v. 391, p. 203, 1999.
- [94]CHRISTAN, G. D. Analytical Chemistry. 6º Ed., United States of American, John Wiley & Sons, 2004. p. 126-132.
- [95]BANCANETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 5º Ed., Campinas-SP, Editora da Unicamp, 2001. Cap. 3, p. 83-146.
- [96]BATTISTA, M.; DI CORCIA, A.; MARCHETTI, M. Extraction and isolation of triazine herbicides from water and vegetables by a double trap tandem system. Anal. Chem. v. 61, p. 935, 1989.

[97]LOPES-AVILA, V.; HITARA, P.; KRASKA, S.; FLANAGAN, M.; TAYLOR, J. H.

Determination of atrazine, lindane, pentachlorophenol, and diazinan in water and soil by isotopo dilution gas chromatography/ mass spectrometry. Anal. Chem., v. 57, p. 2797, 1985.

[98]GRUZDYEV. G. S.; ZINCHENKO, V. A.; KALININ, V. A.; SLOVTSOV, R. I.

Chemical Protection of Plants, 2° Ed., Russian, Mir Publishers Moscow, 1988. p. 401-414.



## **Anexos**

A seguir são listados os herbicidas escolhidos e suas principais características [15]:

### **Simazina**

- ❖ grupo químico – triazinas
- ❖ fórmula molecular -  $C_7H_{12}Cl N_5$
- ❖ nome químico – 2-cloro-4,6-bis-etilamino-S-triazina
- ❖ massa molar - 201,66 g/mol
- ❖ classe toxicológica: classe III, mediamente tóxica
- ❖ irritabilidade: pele - levemente irritante, olhos - moderadamente irritante
- ❖ sintomas de envenenamento – ataxia, dispnéia e convulsões
- ❖ dissociação ácida (pKa): 1,6 (25°C)
- ❖ LD<sub>50</sub> (camundongos): 971 mg/kg
- ❖ solubilidade em água: 5 mg/L

No Brasil a simazina é utilizada em culturas de milho, plantações de abacaxi, bananeira, cacau, café, cana-de-açúcar, cítricos, macieira, videira, roseira e seringueira [15].

A simazina é uma das mais importantes triazinas, sendo um dos herbicidas mais usados na agricultura atual. Sua persistência no solo é bastante acentuada e seu transporte no meio ambiente causa poluição do sistema aquático. A degradação das triazinas no solo ocorre geralmente devido hidrólise, radiação UV, oxidação e ação de microorganismos. Seu principal produto de decomposição no solo e na água são as respectivas hidróxi - triazinas [98].

### **Atrazina**

- ❖ grupo químico – triazinas
- ❖ fórmula molecular -  $C_8H_{14}ClN_5$
- ❖ nome químico – 2-cloro-4 (etilamino)-6-(isopropilamino)-S-triazina
- ❖ massa molar – 215,68 g/mol
- ❖ classe toxicológica: classe III, mediamente tóxica
- ❖ irritabilidade: pele e olhos - levemente irritante
- ❖ sintomas de envenenamento: fraqueza muscular, apatia, dispnéia e prostração
- ❖ dissociação ácida (pKa): 1,7 (25°C)
- ❖ LD<sub>50</sub> (camundongos): 1750 mg/kg
- ❖ solubilidade em água: 28 mg/L.

No Brasil a atrazina é utilizada em culturas de milho, plantações de abacaxi, bananeira, cacau, manga, cana-de-açúcar, pêsego, pimenta-do-reino, etc. Juntamente com a simazina é a mais persistente no meio ambiente [15].

### **Ametrina**

- ❖ grupo químico – triazinas
- ❖ fórmula molecular -  $C_9H_{17}N_5S$
- ❖ nome químico – 2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-S-triazina
- ❖ massa molar - 227,33 g/mol
- ❖ classe toxicológica: classe III, mediamente tóxica
- ❖ irritabilidade: pele e olhos - levemente irritante

- ❖ sintomas de envenenamento: sonolência, fraqueza muscular, perda de peso, diarreia e dificuldade respiratória.
- ❖ dissociação ácida (pKa): 4,0 (25°C)
- ❖ LD<sub>50</sub> (camundongos): 1100 mg/kg
- ❖ solubilidade em água: 185 mg/L

No Brasil a ametrina é utilizada em culturas de milho, plantações de abacaxi, bananeira, café, cana-de-açúcar, citrus, uva [15].