



Manoela Ruchiga Balesteros

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ATRAZINA E
SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ELETROFORESE CAPILAR

Manoela Ruchiga Balesteros

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE
ATRAZINA E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química da
Universidade Federal de Juiz de Fora
como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de Mestre em
Química

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-Orientadora: Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Juiz de Fora

2009

Balesteros, Manoela Ruchiga

Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

134 f. :il.

Dissertação (Mestrado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

1. Herbicidas. 2. Biodegradação ambiental. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Eletroforese capilar de zona. I.
Título.

CDU 632.954



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

UFJF
Pós-Graduação
em Química

A presente dissertação, intitulada “**Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**” de autoria de **Manoela Ruchiga Balesteros**, submetida à Comissão Examinadora abaixo assinada, foi aprovada para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA** em 06 de abril de 2009.

Juiz de Fora, 06 de abril de 2009.

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão
Instituto Nacional de Tecnologia

Dra. Edna Maria Morais Oliveira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Rio de Janeiro

Prof.ª Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta dissertação a minha avó e minha mãe que me ensinaram a lutar por tudo na vida

Aos meus irmãos Bernardo e Elio e minha cunhada Fátima pelo amor e a torcida

Minha sobrinha Laura por me mostrar a cada dia como é bom viver

Ao meu marido Raphael por todo amor, carinho e companheirismo dedicados a mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o Marcone, muito obrigada pela confiança, respeito e dedicação ao longo da minha vida científica.

A minha co-orientadora Viridiana Ferreira-Leitão, muito obrigada por toda confiança, respeito, carinho e dedicação.

Aos colegas do GQAQ Adriana, Fernando, Vívian e Patrícia pelo carinho e torcida.

A Maryane pela ajuda no trabalho por eletroforese capilar.

A Vanézia e a Carla pela amizade e acolhida.

As amigas Mara e Valéria pelo carinho, mesmo distante.

A todos da DCAP em especial, Lúcia, Michele, Ana Paula, Joice, Maria Alice, Vânia e Adriene pelo incentivo e carinho.

A Lílian por toda ajuda nos ensaios de extração em fase sólida.

*A Patrícia pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos com o fungo *Pleurotus ostreatus*.*

A amiga Lívian que sempre me incentivou, ajudou e me levantou muitas vezes.

A Débora, Cristiano e Ricardo por todo incentivo no início do trabalho.

A Andréa Mattos pelas contribuições durante o mestrado.

A Dra Irene Alleluia pelo incentivo no trabalho científico.

Ao Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Setor de Microbiologia Agrícola da UFLA – Universidade Federal de Lavras por ter gentilmente cedido o fungo.

As professoras Nádia e Cherrine por participarem da banca de qualificação e por todas as contribuições.

A Dra. Claudete Kunigami por toda presteza e delicadeza nos ensaios de cromatografia gasosa.

A Dra Edna Maria Oliveira e Maria Auxiliadora Mattos por participarem da banca e por todas as colaborações.

A todos que contribuíram para o meu crescimento científico e moral.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADA!

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

Fernando Sabino

RESUMO

A atrazina é um herbicida muito utilizado em culturas de grande expressão econômica como o milho e a cana-de-açúcar. Entretanto, sua ampla utilização pode provocar o acúmulo deste herbicida, ou ainda dos seus derivados de degradação, em matrizes ambientais, tais como solo e água. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias para a análise de atrazina e derivados por eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e aplicação destas metodologias na detecção e quantificação destes compostos na degradação da atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.

As melhores condições cromatográficas para análise de atrazina, simazina e propazina por CLAE foram obtidas utilizando como fase móvel ACN/H₂O 30/70 (v/v%), coluna analítica C18 150 x 4,6 mm 5 µm, fluxo de 1 mL/min, temperatura de 25 °C e detecção em 221nm. Antecedendo as análises por CLAE foram realizadas extrações líquido-líquido com acetato de etila.

A análise de atrazina, desetilatrizona (DEA), deisoprilatrizona (DIA), hidroxiatrizona (HA), desetildeisopropilatrizona (DEDIA), desetilhidroxiatrizona (DEHA) e deisopropilhidroxiatrizona (DIHA) foi realizada por EC em meio não aquoso. O eletrólito consistiu de Tris-HCl 100 mmol/L em ACN/MeOH 50/50 (v/v%), com comprimento total do capilar de 48,5 cm (comprimento efetivo 40 cm), 25 °C, +20 kV, 50 mbar/1s, detecção em 221 nm e tempo de análise de 9 min. Apesar de ocorrer a coeluição de três compostos nesta separação (HÁ, DEHA, DEDIA), o curto tempo de análise e uso de pequenos volume de solvente orgânico faz com que o método seja utilizado de forma qualitativa na análise de atrazina e seus produtos de degradação, indicando os possíveis compostos presentes. A análise destes compostos por CLAE foi realizada utilizando-se como fase móvel ACN/Tampão fosfato de sódio 5 mmol/L pH 7,2 em um gradiente de eluição, com um fluxo de 1 mL/min, temperatura de 25 °C, em 221 nm. Apesar do tempo de análise elevado (70 min), esta metodologia permite a quantificação de todas as triazinas estudadas. Portanto as duas técnicas desenvolvidas podem ser utilizadas em conjunto, já que a identificação dos compostos pode ser realizada por CE sem utilizar grandes volumes

de solventes orgânicos em um curto intervalo de tempo, e sua quantificação pode ser realizada por CLAE.

A degradação promovida por *P. ostreatus* num período de 15 dias, gerou majoritariamente o derivado DEA. A formação deste composto foi observada por CLAE e confirmada por CG-MS, ratificando que as metodologias desenvolvidas no presente trabalho podem ser utilizadas em matrizes aquosas complexas, apesar de possuírem LODs superiores aos determinados pela legislação.

Palavras – chaves: Atrazina. Cromatografia líquida de alta eficiência. Eletroforese capilar. Biodegradação.

ABSTRACT

Atrazine is an herbicide widely used on crops of major economic relevance as corn and sugar cane. The widespread use of this herbicide can cause its accumulation or contamination of environmental matrices. In addition, the degradation products of atrazine also deserve attention. This study aims to develop methodology for the analysis of atrazine and its derivatives by capillary electrophoresis (CE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Both methodologies developed during the present work, HPLC and CE, were applied to the detection and quantification of atrazine and its degradation products after treatment using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*.

The best chromatographic conditions for atrazine, simazine and propazine analysis by HPLC were obtained using as mobile phase ACN/H₂O 30/70 (v/v%), with analytical column C18 (150 X 4.6 mm 5 μ m), flow of 1 mL/min, temperature at 25 °C and detection at 221 nm . Liquid-liquid extractions with ethyl acetate were performed before the HPLC analyses.

Analysis of atrazine, desetilatrizona (DEA), deisoprilatrizona (DIA), hidroxiatrizona (HA), desetildeisoprilatrizona (DEDIA), desetilhidroxiatrizona (DEHA) and deisoprilhidroxiatrizona (DIHA) was performed by CE in a non-aqueous medium (NACE) . The electrolyte consisted of Tris-HCl 100 mmol/L in ACN / MeOH 50/50 (v/v%) with total capillary length of 48.5 cm (effective length of 40 cm) Experimental conditions were: cartridge temperature at 25 ° C, voltage applied of +20 kV, injection of 50 mbar.1s, detection at 221 nm and the analysis time of 9 min. Despite the co-elution of three compounds (HA, DEHA, DEDIA), due to the short time of analysis and the use of small quantity of organic solvent, the method is very useful for the screening of atrazine and its degradation products. The HPLC analysis of these compounds was performed using as mobile phase ACN / sodium phosphate buffer 5 mmol/L (pH 7.2) under gradient elution mode, flow of 1 mL/min, temperature at 25 ° C and wavelength at 221 nm. Although the long time required for the analysis (70 min), the methodology allows the quantification of all triazines compounds studied. Therefore, the two methodologies developed can be used in a complementary way, since that the compounds identification can be performed by

CE without using large volumes of organic solvents in a short time analysis; and their quantification can be performed by HPLC.

The degradation promoted by *P. ostreatus* during a period of 15 days generated predominantly the DEA derivative. The degradation product obtained was detected by HPLC and confirmed by GC-MS, supporting that the methodologies developed in this work can be used in complex aqueous matrices, successfully.

Keywords: Atrazine. High performance liquid chromatography. Capillary electrophoresis. Biodegradation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Participação percentual dos estados brasileiros no valor das vendas de defensivos agrícolas em 2006.	27
Figura 1.2	Participação percentual das classes de agroquímicos no valor das vendas de defensivos agrícolas no Brasil em 2006.	28
Figura 1.3	Estrutura geral das s-triazinas.	31
Figura 1.4	Estrutura química da atrazina.	33
Figura 1.5	Estrutura química da simazina.	33
Figura 1.6	Estrutura química da propazina.	34
Figura 1.7	Processos de degradação mais utilizados por herbicidas.	36
Figura 1.8	Principais produtos de degradação da atrazina e seus respectivos pKa.	37
Figura 2.1	Instrumentação de cromatografia líquida de alta eficiência.	49
Figura 2.2	Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.	51
Figura 3.1	Variação da atividade enzimática da HRP em meios contendo solvente orgânico.	67
Figura 4.1	Espectros de absorção UV-Vis da atrazina, simazina e propazina solubilizadas em ACN na concentração 0,150 µmol/L.	72
Figura 4.2	Fluxograma dos testes de extração realizados para as s-triazinas.	73
Figura 4.3	Separação de uma mistura de padrões de simazina (1), atrazina (2) e propazina (3) utilizando como fase móvel MeOH/H ₂ O 60/40 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, coluna Zorbax 300SB C18 em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 33,3 mg/L.	75
Figura 4.4	Nomógrafo para modo reverso de eluição, com a comparação da força de eluição dos dois solventes utilizados, ACN e MeOH.	76
Figura 4.5	Separação de uma mistura de padrões de simazina (1), atrazina (2) e propazina (3) utilizando como fase móvel ACN/Tampão	77

50/50 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, coluna C18 em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 33,3 mg/L.

- Figura 4.6** Cromatogramas de misturas de padrões de Simazina (1), Atrazina (2) e Propazina (3) utilizando como fase estacionária coluna C18, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, coluna C18 em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 3,3 mg/L. As fases móveis utilizadas estão descritas na tabela 4.3. 79
- Figura 4.7** Cromatogramas de misturas de padrões de Simazina (1), Atrazina (2) e Propazina (3) com diferentes proporções de fase móvel ACN/Tampão, utilizando como fase estacionária coluna C18, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 3,3 mg/L. As proporções de fase móvel utilizadas encontram-se na tabela 4.4. 82
- Figura 4.8** Curvas analíticas para atrazina, simazina e propazina. 87
- Figura 5.1** Espectros na região do UV dos padrões de atrazina e derivados. As varreduras foram realizadas com 0,150 µmol/L de cada padrão solubilizados em tampão fosfato de sódio. 95
- Figura 5.2** Espectros na região do UV dos padrões de atrazina e derivados. As varreduras foram realizadas com 0,150 µmol/L de cada padrão solubilizados em acetonitrila. 95
- Figura 5.3** Cromatograma da separação de uma mistura de atrazina e derivados por HPLC utilizando a coluna Zorbax 300SB com gradiente de eluição linear 2 – 90% de ACN. 96
- Figura 5.4** Cromatograma de uma mistura de padrões de atrazina e derivados utilizando a coluna Shimpack, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL/min, detecção a 221 nm com as condições de eluição da tabela 4.2. Onde 1- DIHA; 2-DEDIA; 3-DEHA; 4-DIA; 5-HA; 6-DEA e 7-atrazina com altas concentrações. 98
- Figura 5.5** Procedimento de extração em fase sólida utilizando o cartucho Oasis MCX. 100

- Figura 5.6** Cromatograma de uma mistura de atrazina e derivados com os solventes de condicionamento e o solvente de eluição com os padrões. 101
- Figura 5.7** Curvas analíticas de atrazina e seus produtos de degradação sem extração. 104
- Figura 6.1** Principais produtos de degradação da atrazina e seus respectivos pKa. 110
- Figura 6.2** Eletroferogramas da mistura de: atrazina e derivados. Utilizando eletrólito: 100 mmol/L tampão Tris/HCl em ACN/MeOH (A) 0/100 (B) 25/75 e (C) 75/25 % (v/v), com comprimento total do capilar: 48,5 cm (comprimento efetivo: 40 cm), Ø: 75 µm, 25 °C, + 20 kV, 50mbar / 1s e detecção em 221 nm. 112
- Figura 6.3** Eletroferogramas da mistura de padrões : (A) HA, DIA, A e DEA; (B) DIHA, HA, DEHA, DIA, A e DEA e (C) DIHA, HA, DEHA, DEDIA, DIA, A e DEA . Utilizando eletrólito: 100 mmol/L tampão Tris/HCl em ACN/MeOH 50/50, comprimento total do capilar: 48,5 cm (comprimento efetivo: 40 cm), Ø: 75 µm, 25 °C, + 20 kV, 50mbar / 1s e detecção em 221 nm. 113
- Figura 7.1** Cromatogramas com a degradação da atrazina e formação de DEA. As condições da análise estão na tabela 5.1, foi utilizada a coluna Shimpack C18, um volume de injeção de 20 µL e detecção em 221 nm. (A) 5 dias de incubação, (B) 10 dias de incubação e (C) 15 dias de incubação. 121
- Figura 7.2** Foto do cultivo realizado após cinco dias de incubação. 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Propriedades da atrazina.	33
Tabela 1.2	Propriedades da simazina.	34
Tabela 1.3	Propriedades da propazina.	35
Tabela 4.1	Recuperações obtidas das s-triazinas nas diferentes condições de extração.	74
Tabela 4.2	Planejamento de mistura utilizado no estudo para a separação de uma mistura de atrazina, simazina e propazina.	77
Tabela 4.3	Fases móveis utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina em um planejamento de experimentos.	78
Tabela 4.4	Fases móveis utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina em uma otimização da separação com a fase móvel ACN/Tampão.	81
Tabela 4.5	Cálculo da resolução entre os picos adjacentes para as diferentes fases móveis testadas para misturas de 1mg/L com fluxo de 1 mL/min, coluna C18 e detecção em 221 nm.	83
Tabela 4.6	Resolução dos pares adjacentes com fase móvel ACN/H ₂ O e ACN/Tampão para misturas de 1mg/L, utilizando coluna C18 e fluxo de 1 mL/min e detecção em 221 nm.	84
Tabela 4.7	Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação das triazinas nas melhores condições cromatográficas.	84
Tabela 4.8	Valores calculados para a falta de ajuste dos modelos.	88
Tabela 4.9	Valores de LOD e LOQ para simazina, atrazina e propazina.	89
Tabela 5.1	Gradiente de eluição para separação de atrazina e derivados com a coluna shimpack.	97
Tabela 5.2	Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de atrazina e derivados utilizando a coluna shimpack C18, com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, detecção de 221 nm, e condições de eluição da tabela 5.1.	102
Tabela 5.3	Valores de F para as curvas analíticas de atrazina e derivados.	105

- Tabela 5.4** Valores calculados para LOD e LOQ dos padrões de atrazina e derivados. 106
- Tabela 5.5** Valores calculados de recuperação após a extração da atrazina e derivados com cartucho Oasis MCX. 106
- Tabela 6.1** Porcentagem de solvente orgânico utilizado em cada experimento. 111

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Atrazina
ABTS	2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)diamônio
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
C18	octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CONAMA	Conselho nacional do meio ambiente
CZE	Eletroforese capilar de zona
DAD	<i>Diode array detector</i>
DEA	Desetilatrazina
DEDIA	Desetildeisopropilatrazina
DEHA	Desetilhidroxiatrazina
DIA	Deisopropilatrazina
DIHA	Deisopropilhidroxiatrazina
EC	Eletroforese capilar
EFS	Extração em fase sólida
EtOH	Etanol
HA	Hidroxiatrazina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massa

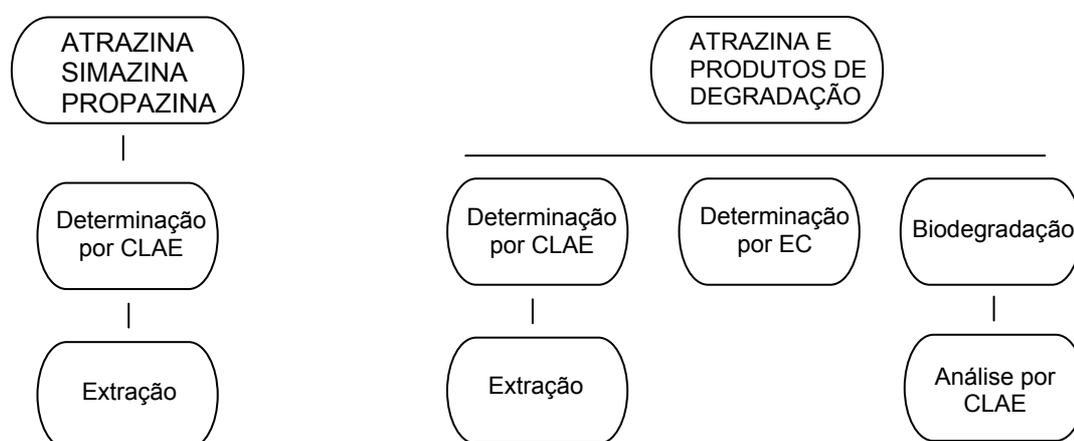
NPD	Detector de nitrogênio e fósforo
P	Propazina
PIB	Produto interno bruto
PTFE	Teflon
S	Simazina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SINDAG	Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa agrícola
Tris	Tris(hidroximetil)amino metano
UFLA	Universidade Federal de Lavras
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV-Vis	Ultravioleta – visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Retenção relativa
C_s	Concentração do analito
$H_{\text{máx}}$	Altura máxima do pico
$H_{\text{mín}}$	Altura da linha base
k'	Fator de retenção
pK_a	Constante de dissociação
r	Coefficiente de correlação
R^2	Coefficiente de determinação
R_s	Resolução
S_b	Desvio padrão da linha base
t'_R	Tempo de retenção ajustado
t_M	Tempo de eluição do soluto não retido
t_R	Tempo de retenção do soluto
V	Potencial aplicado
w_i	Largura da base do pico para o soluto i , em unidade de tempo

PREFÁCIO

A dissertação em questão teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de metodologias alternativas para a análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar (CE). O texto está composto de oito capítulos. O primeiro capítulo apresenta um breve histórico do uso de herbicidas no Brasil, descreve algumas características da atrazina e outros herbicidas triazínicos e analisa a degradação destes herbicidas com suas vantagens e desvantagens. O segundo mostra os fundamentos básicos gerais sobre Cromatografia líquida de rápida eficiência e Eletroforese capilar e discussão baseada em dados da literatura, de como é realizada a análise de atrazina e derivados. O terceiro apresenta a parte instrumental e o preparo das amostras analisadas. O quarto mostra o desenvolvimento de metodologia por CLAE para determinação de atrazina, simazina e propazina. O quinto apresenta o desenvolvimento de metodologia por CLAE para determinação de atrazina e derivados bem como a otimização de metodologia de extração em fase sólida. O sexto capítulo descreve o desenvolvimento de metodologia por EC para determinação de atrazina e derivados. O sétimo capítulo descreve a aplicação do método desenvolvido no capítulo 5 para análise dos produtos formados na biodegradação de atrazina promovida pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. O último capítulo apresenta as considerações finais e os trabalhos futuros. O fluxograma a seguir apresenta os métodos analíticos desenvolvidos.



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVO

1.1	INTRODUÇÃO	26
1.1.1	Defensivos agrícolas no Brasil	26
1.1.2	Expansão de culturas no Brasil	28
1.1.3	Legislação	29
1.1.4	Herbicidas	30
1.1.5	Herbicidas triazínicos: atrazina, simazina e propazina	30
1.1.5.1	Atrazina	32
1.1.5.2	Simazina	33
1.1.5.3	Propazina	34
1.1.6	Produtos de degradação	35
1.1.7	Biodegradação	37
1.1.8	Enzimas	39
1.1.8.1	Enzimas oxidativas	39
1.1.8.1.1	Peroxidases	39
1.1.8.1.2	Oxidases	40
1.2	JUSTIFICATIVA	40
1.3	OBJETIVO	41
	REFERÊNCIAS	42

2 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR

2.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	46
2.1.1	Princípios e fundamentos	46
2.1.2	Instrumentação	48
2.2	ELETROFORESE CAPILAR (EC)	49
2.2.1	Princípios e fundamentos	49
2.2.2	Instrumentação	51

2.3	ANÁLISE DE PESTICIDAS	52
2.3.1	Análise de triazinas	52
2.3.1.1	Análise de triazinas por CLAE	53
2.3.1.2	Análise de triazinas por EC	53
	REFERÊNCIAS	54

3 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA, MATERIAIS, REAGENTES E SOLUÇÕES

3.1	INSTRUMENTAÇÃO	59
3.1.1	Equipamentos utilizados no Instituto Nacional de Tecnologia	59
3.1.1.1	Equipamento para Cromatografia Líquida	59
3.1.1.2	Equipamento para Cromatografia gasosa	59
3.1.1.3	Espectrofotômetro UV-Vis	59
3.1.1.4	Equipamento para Extração em fase sólida	59
3.1.1.5	Equipamento para Extração líquido-líquido	60
3.1.2	Equipamento utilizado na Universidade Federal de Juiz de Fora	60
3.1.2.1	Eletroforese capilar	60
3.2	COLUNAS CROMATOGRÁFICAS	60
3.3	CAPILARES	61
3.4	CARTUCHOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)	61
3.5	CAPELA DE FLUXO LAMINAR	61
3.6	AUTOCLAVE	61
3.7	REAGENTES E SOLVENTES	62
3.7.1	Padrões	62
3.7.2	Reagentes utilizados para análise de atrazina, simazina e propazina por CLAE	62
3.7.3	Reagentes utilizados para análise de atrazina e derivados por CLAE	62
3.7.4	Reagentes utilizados para análise de atrazina e derivados por EC	63
3.7.5	Reagentes utilizados para análise de atrazina e derivados por CG	63
3.7.6	Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com HRP	63
3.7.7	Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com	63

	lacase	
3.7.8	Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	64
3.8	SOLUÇÕES	64
3.8.1	Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina por CLAE	64
3.8.2	Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina e derivados por CLAE	65
3.8.3	Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina e derivados por EC	66
3.8.4	Preparo de soluções para reações de biodegradação	66
3.8.4.1	Preparo de soluções para reações de degradação e determinação da atividade enzimática da HRP	66
3.8.4.2	Preparo de soluções para reações de degradação e determinação da atividade enzimática da lacase	66
3.8.4.3	Preparo de soluções para reações de degradação com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	67
3.9	BIODEGRADAÇÃO DE ATRAZINA	67
3.9.1	Preparo do meio reacional para degradação de atrazina com HRP	67
3.9.2	Preparo do meio reacional para degradação de atrazina com lacase	68
3.9.3	Preparo do meio reacional para degradação de atrazina com <i>Pleurotus ostreatus</i>	68
	REFERÊNCIAS	69

4 **DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA, SIMAZINA E PROPAZINA POR CLAE**

4.1	INTRODUÇÃO	71
4.2	OBJETIVOS	71
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.3.1	Seleção do comprimento de onda de máxima absorvância dos analitos	72

4.3.2	Extração	73
4.3.3	Otimização de metodologia por CLAE para análise de atrazina, simazina e propazina	75
4.3.3.1	Estudos preliminares	75
4.3.3.2	Otimização da fase móvel	80
4.3.3.3	Mudança de solvente aquoso	83
4.3.3.4	Avaliação da separação cromatográfica	84
4.3.4	Avaliação da metodologia	85
4.3.4.1	Curva analítica	85
4.3.4.2	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	88
4.4	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	91

5 *DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E DERIVADOS POR CLAE*

5.1	INTRODUÇÃO	93
5.2	OBJETIVO	93
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
5.3.1	Seleção do comprimento de onda de máxima absorvância para análise de atrazina e derivados	94
5.3.2	Desenvolvimento de metodologia para determinação de atrazina e derivados por CLAE	96
5.3.3	Extração em fase sólida	99
5.3.4	Avaliação da separação cromatográfica	101
5.3.5	Avaliação da metodologia	103
5.3.5.1	Curva analítica	103
5.3.5.2	Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	105
5.3.5.3	Recuperação	106
5.4	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108

6	<i>DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E DERIVADOS POR EC</i>	
6.1	INTRODUÇÃO	110
6.2	OBJETIVO	110
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
6.3.1	Desenvolvimento de metodologia para determinação de atrazina e derivados por EC	111
6.4	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	115
7	<i>BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA</i>	
7.1	INTRODUÇÃO	117
7.2	OBJETIVO	117
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
7.3.1	Reações de degradação da atrazina com a enzima HRP	118
7.3.2	Reações de degradação da atrazina com a enzima lacase	119
7.3.3	Reações de degradação da atrazina com o fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	119
7.4	ANÁLISE DO EXTRATO DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA POR CG-MS	122
7.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA COM O FUNGO <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	123
7.6	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	125
8	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHOS FUTUROS</i>	
8.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
8.2	TRABALHOS FUTUROS	128
	<i>ANEXO A</i>	
	<i>Curriculum vitae</i>	130

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Defensivos agrícolas no Brasil

No Brasil o agronegócio ocupa uma posição de destaque na economia com expressivos 25,11% do Produto Interno Bruto (PIB), sendo 17,85% proveniente da agricultura e 7,26% proveniente da pecuária¹. Este mercado anualmente movimentava bilhões de dólares, contribuindo para o crescimento da economia. No cenário mundial o Brasil ocupa uma posição relevante na produção de grãos como milho e soja, e também merece destaque na produção de cana – de – açúcar.

Evitando-se as perdas e temendo escassez, foram desenvolvidas tecnologias para serem utilizadas na agricultura. Atualmente, uma grande preocupação mundial tem sido a segurança e a qualidade dos alimentos, que está relacionada à presença ou não de contaminantes químicos ou microrganismos indesejáveis, assim como a contaminação do meio-ambiente, principalmente no solo e na água.

Dentre as tecnologias desenvolvidas, as substâncias químicas controladoras de pragas, as quais atacam culturas agrícolas e prejudicam colheitas, são as que têm sido mais utilizadas. Muitos termos genéricos são usados para designar estas substâncias químicas, como: fitossanitário, pesticida, praguicida, veneno, remédio, agroquímico, defensivo agrícola e agrotóxico.

Conforme definição apresentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), defensivos agrícolas são:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes e estimuladores e inibidores de crescimento².

Cada agrotóxico possui uma definição específica de acordo com a sua utilização, os acaricidas combatem os ácaros, os escorpionicidas combatem os escorpiões, inseticidas combatem aos insetos, fungicidas combatem fungos, assim como herbicidas combatem ervas daninhas.

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) no período de janeiro a outubro de 2008, constatou-se aumento de 31%, nas vendas de defensivos agrícolas no Brasil, em relação ao mesmo período do ano anterior, totalizando cerca de R\$ 10 milhões³.

Desta forma, considerando-se o consumo entre os dez países que representam 70% do mercado mundial de defensivos agrícolas, o Brasil aparece em 4º lugar no *ranking*⁴. Como pode ser observado na Figura 1.1, o emprego de defensivos agrícolas nos Estados de São Paulo, Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, representou no ano de 2006 80% do total utilizado no País.

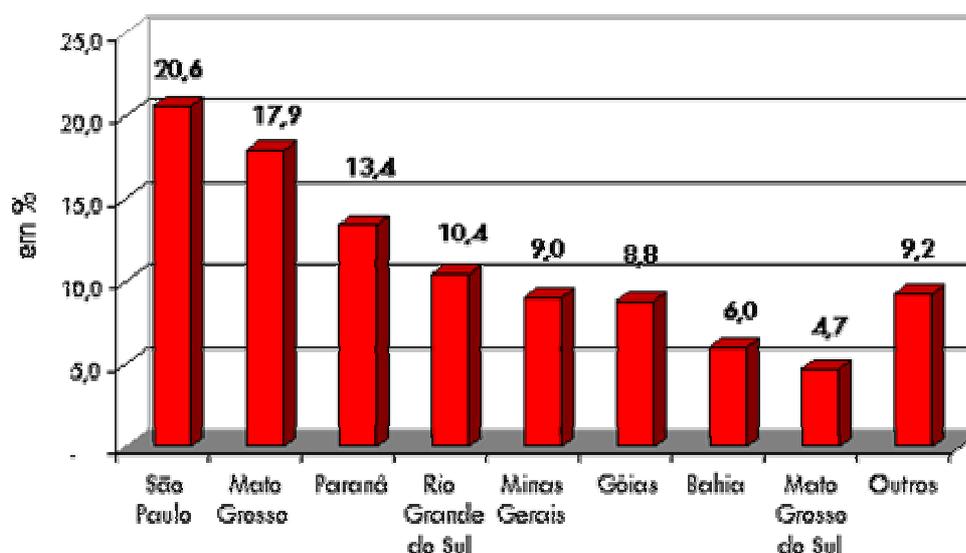


Figura 1.1 - Participação percentual dos estados brasileiros no valor das vendas de defensivos agrícolas em 2006⁴.

Conforme apresentado na Figura 1.2, do total de defensivos agrícolas consumidos no Brasil, 7,6% são acaricidas, 2,6% antibrotantes, reguladores do crescimento, óleo mineral e espalhantes adesivos, 16,6% são fungicidas, 30,1% são inseticidas e 43,1% são herbicidas⁵.

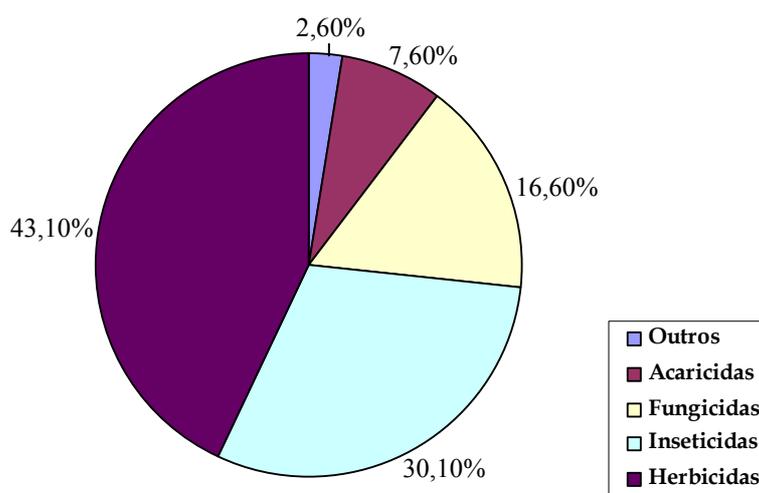


Figura 1.2- Participação percentual das classes de defensivos agrícolas no valor das vendas no Brasil em 2006.

1.1.2 Expansão de culturas no Brasil

Em 2008, houve uma expansão na produção de algumas culturas, devido ao aumento de interesse na exploração de novas matrizes energéticas. Uma das culturas que teve um pronunciado crescimento foi a de cana-de-açúcar, devido ao fato de haver uma demanda maior na produção de álcool combustível.

Atualmente o que vem aquecendo o mercado de álcool no país, é a anunciada escassez de petróleo e a grande demanda de automóveis bi-combustível.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a estimativa para a produção da cana-de-açúcar em 2008 foi de 561,8 milhões de toneladas, volume 9,3% superior a de 2007 (514,1 milhões de toneladas) e um aumento de 8,3% da área plantada em relação à /2007, quando foram plantados 6,7 milhões de hectares de cana⁶.

O total de álcool exportado pelo Brasil até o final de junho de 2008, desde o início da safra, cresceu 43,8% em relação à safra anterior, totalizando 1,1 bilhão de litros. Apenas no mês de junho de 2008, as exportações atingiram 500 milhões de litros, contra 390 milhões de litros em junho de 2007⁷.

A produção mundial de álcool aproxima-se dos 40 bilhões de litros, dos quais presume-se que até 25 bilhões de litros sejam utilizados para fins energéticos. O Brasil responde por 15 bilhões de litros deste total⁸.

A presença de plantas daninhas pode interferir no processo produtivo de cana-de-açúcar, competindo com a cultura pelos recursos do meio, principalmente água, luz e nutrientes, podendo inibir a brotação da cana, e ainda, interferir na produtividade final.

Existem vários métodos de controle de plantas daninhas. Devido à ineficiência de outros métodos, e da grande quantidade de perdas, o controle de plantas daninhas na lavoura canavieira reveste-se de importância em face das extensas áreas cultivadas. Por esse fator territorial e pela eficácia dos herbicidas, o controle químico, é amplamente utilizado na cultura canavieira⁹.

Com todo este aumento na produção de álcool, ocorrerá um aumento no cultivo da cana-de-açúcar, o que acarretará um consumo significativo de herbicidas. Estima-se que as vendas de agroquímicos para cana devem dobrar no país nos próximos cinco anos, alcançando US\$ 1 bilhão¹⁰.

1.1.3 Legislação

Um parâmetro que pode ser levado em consideração, como prioridade, é a toxicidade dos compostos. Tal toxicidade depende principalmente de sua concentração em água.

A *Commission of the European Communities* fixou como nível máximo de pesticidas individuais 0,1 µg/L e para pesticidas totais 0,5 µg/L. Já a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) estabeleceu para a atrazina em água potável como 3 µg/L¹¹.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA – é o órgão que regulamenta os limites de pesticidas em águas no Brasil. De acordo com a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, o limite máximo permitido para atrazina e simazina em águas doces é de 2 µg/L¹⁰, já para a propazina, não existe legislação no Brasil que regulamente seus limites.

1.1.4 Herbicidas

São substâncias ou misturas das mesmas que tem como função, destruir, reduzir ou mesmo prevenir o aparecimento de ervas daninhas ou outros tipos de plantas que sejam indesejáveis. No Brasil as principais culturas que utilizam herbicidas são: soja, milho, cana-de-açúcar, café, arroz, citros, feijão, algodão e trigo.

Conforme apresentado na figura 1.2 os herbicidas são a classe de defensivos agrícolas mais utilizados no Brasil. Este fato ocorre devido ao seu consumo em culturas de grande expressão econômica, como cana-de-açúcar, soja e milho. Por sua vez o forte crescimento da cultura de cana-de-açúcar se deve ao grande interesse na produção de álcool combustível.

1.1.5 Herbicidas triazínicos: atrazina, simazina e propazina

Dentre as classes de herbicidas existentes as triazinas possuem maior destaque compondo cerca de 30% da produção mundial⁴.

Os herbicidas triazínicos foram introduzidos no mercado há aproximadamente 40 anos e são aplicados em uma grande variedade de culturas para o controle de ervas daninhas¹². As triazinas possuem à sua capacidade de inibir a fotossíntese, inibindo o fotossistema II.

As propriedades das triazinas simétricas (s-triazinas) foram descobertas em 1952, por um grupo de pesquisadores da Geigy, em Basileia, na Suíça. As primeiras aplicações em solo foram feitas em 1954, quando se observou sua ação sobre o crescimento de plantas. A ação seletiva de tais compostos e suas propriedades herbicidas foram citadas pela primeira vez em 1955¹². Nos últimos anos as s-triazinas tornaram-se um dos mais importantes grupos de herbicidas, sendo utilizadas em culturas de grande expressão econômica, tais como cana-de-açúcar, milho e sorgo.

Quanto ao aspecto químico, as s-triazinas são derivados nitrogenados heterocíclicos, que apresentam átomos de nitrogênio simetricamente localizados e

substituições (R_1 , R_2 , R_3) nas posições 2, 4 e 6. No caso das triazinas, o anel é composto de átomos de nitrogênio e carbono. A Figura 1.3 apresenta a estrutura geral das s-triazinas¹³.

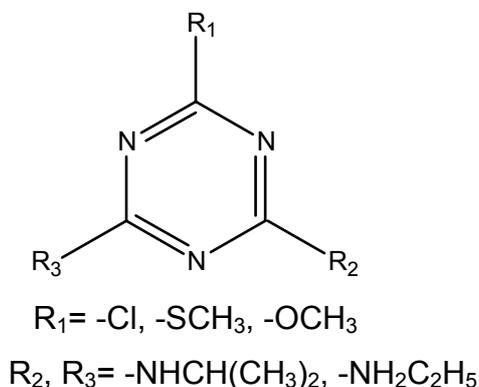


Figura 1.3: Estrutura geral das s-triazinas.

A estabilidade das s-triazinas é menor quando comparada ao benzeno, uma vez que o sistema de ligação π perfeitamente deslocalizado é interrompido pela introdução dos átomos de nitrogênio no anel nas posições 1, 3 e 5. Ocorre então um aumento da densidade eletrônica nestas posições e uma correspondente diminuição da densidade eletrônica nas posições 2, 4 e 6. Desta forma, a substituição nucleofílica nas últimas posições é facilitada. Todavia, a estabilidade estereoquímica das s-triazinas é ainda muito grande e a persistência dos herbicidas triazínicos e seus produtos de degradação no solo e na água é considerável, podendo variar de alguns meses para os compostos originais há muitos anos para os seus produtos de degradação, que são frequentemente mais tóxicos¹³.

A nomenclatura das s-triazinas, assim como suas principais propriedades são determinadas principalmente pelo substituinte na posição 2 (R_1). Sendo assim, as s-triazinas podem ser divididas em três grupos: clortriazinas ($R_1 = -Cl$), metoxitriazinas ($R_1 = -OCH_3$) e metiltiotriazinas ($R_1 = -SCH_3$). Quando o substituinte na posição 2 é o $-Cl$, $-SCH_3$ e $-OCH_3$ o nome comercial é terminado em -azina, -trina e -tona, respectivamente.

Os herbicidas triazínicos são sólidos brancos cristalinos, fracamente básicos que possuem baixa solubilidade em água, alta solubilidade em solventes orgânicos. Eles são estáveis em fase sólida e em solução e possuem baixa pressão de vapor a temperatura ambiente.

Dentre os herbicidas triazínicos, a atrazina é o mais utilizado. Outros herbicidas triazínicos muito utilizados pertencentes ao mesmo grupo da atrazina são a simazina e a propazina.

A persistência das triazinas, ou outros herbicidas é bastante dependente do meio onde este se encontra. Nos solos, a principal via de degradação é a atividade microbiana, produzindo metabólitos dealquilados e/ou hidroxilados.

Um grande número de trabalhos envolvendo a atrazina têm sido publicado¹⁴⁻¹⁸, todavia, na maioria dos casos não são incluídos os principais metabólitos.

1.1.5.1 Atrazina

A atrazina, nome comum para 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina, é um herbicida seletivo utilizado no controle pré e pós emergência* de plantas invasoras de diversas culturas agrícolas, principalmente milho, sorgo e cana-de-açúcar¹⁹. A figura 1. 4 apresenta a estrutura química da atrazina.

A atrazina atua de forma a inibir a fotossíntese das ervas daninhas. Estes herbicidas causam inibição, ligando-se a proteína D1, no sítio em que se acopla a plastoquinona “Qb”, impedindo o fluxo de elétrons entre os fotossistemas³⁸. As plantas sensíveis à atrazina sofrem clorose (amarelamento das folhas) a qual conduz à necrose dos tecidos. Nas espécies tolerantes à atrazina, como é o caso do milho, o herbicida é eficientemente metabolizado em formas não tóxicas¹⁹.

Segundo a Anvisa, a atrazina pertence a classe toxicológica III, pouco tóxica²⁰. A tabela 1.1 apresenta algumas propriedades desta substância.

* Aplicações pré-emergentes – são as aplicações realizadas antes do surgimento da erva daninha; aplicações pós-emergente – são aplicações realizadas após a emergência das ervas daninhas, porém antes que estas interfiram no desenvolvimento da cultura.

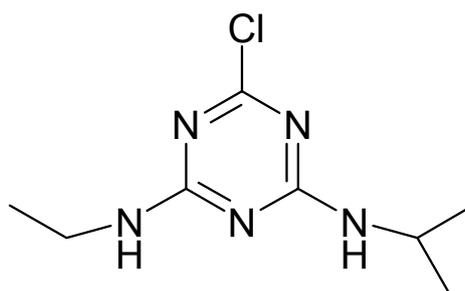


Figura 1.4 - Estrutura química da atrazina.

Tabela 1.1- Propriedades da atrazina ²¹

Nome	Massa molecular (g/mol)	Solubilidade em H ₂ O (25 °C)	Ponto de fusão (°C)	Toxicidade ¹ LD 50% (mg/Kg)
Atrazina	215,69	70 (mg/L)	171-174	1750

¹ - Dose Letal – LD₅₀ - dose de amostra que causa mortalidade de 50% dos organismos no tempo de exposição e condições do teste²²- via oral em camundongos.

1.1.5.2 Simazina

Simazina é o nome comum para a 2-cloro-4,6-etilamino-s-triazina, é um herbicida utilizado exclusivamente na pré-emergência. No Brasil é muito utilizado nas culturas de milho, cacau, café, citrinos e cana de açúcar. A figura 1.5 apresenta a estrutura da simazina. A tabela 1.2 apresenta algumas propriedades deste composto²¹.

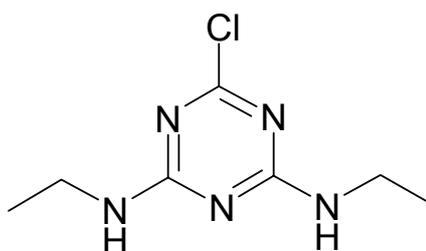


Figura 1.5 - Estrutura química da simazina.

Tabela 1.2- Propriedades da simazina.

Nome	Massa molecular (g/mol)	Solubilidade em H ₂ O (25 °C)	Ponto de fusão (°C)	Toxicidade ¹ LD 50% (mg/Kg)
Simazina	201,66	-----	226-227	5000

¹ - Estudos de toxicidade em ratos.

Assim como a atrazina, este composto age inibindo a fotossíntese das ervas daninhas. Segundo a Anvisa, a simazina pertence a classe toxicológica III, pouco tóxica ²⁰.

1.1.5.3 Propazina

Propazina é o nome comum para a 2-cloro-4,6-isopropilamino-s-triazina, é um herbicida utilizado exclusivamente na pré-emergência. No Brasil é menos utilizado que a simazina e atrazina. Não existe nenhum limite máximo de concentração de propazina permitido por lei. A Figura 1.6 apresenta a estrutura química da propazina. A tabela 1.3 apresenta algumas propriedades desta substância²¹.

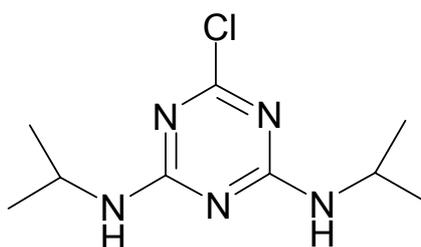


Figura 1.6 - Estrutura química da propazina.

Tabela 1.3- Propriedades da propazina.

Nome	Massa molecular (g/mol)	Solubilidade em H ₂ O (20 °C)	Ponto de fusão (°C)	Toxicidade ¹ LD 50% (mg/Kg)
Propazina	229,71	8,6 mg/L	213	>5000

¹ - Estudos de toxicidade em ratos.

Assim como a atrazina, este composto age inibindo a fotossíntese das ervas daninhas.

1.1.6 Produtos de degradação

O mecanismo de degradação de um pesticida, em geral, baseia-se nas características estruturais do composto, a partir da presença de grupos funcionais reativos.

A degradação dos pesticidas pode ser via processos químicos, como hidrólise, oxi-redução, substituição, eliminação, desalogenação e fotólise; por um processo biológico ou ainda por processos combinados, onde mais de uma técnica pode ser utilizada, podendo haver uma completa mineralização ou a formação de metabólitos.

A figura 1.7 apresenta alguns processos de degradação de herbicidas mais comuns.

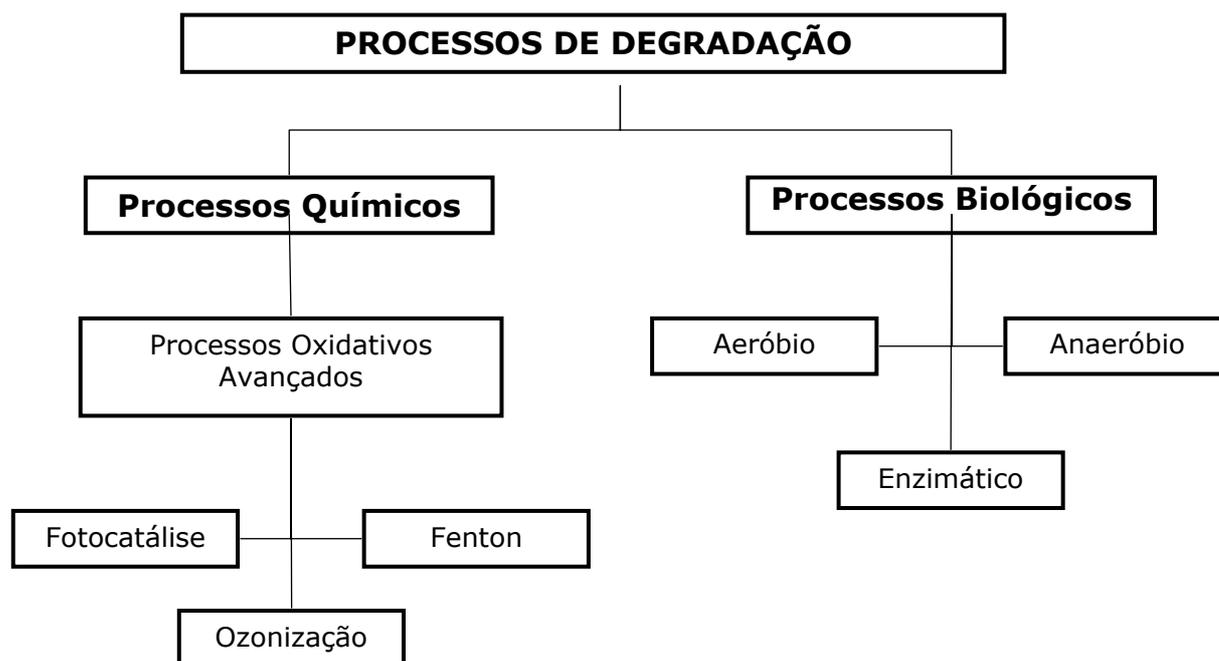


Figura 1.7 - Processos de degradação mais comuns e que podem ser utilizados na degradação de herbicidas.

Os principais produtos de degradação da atrazina são compostos hidroxilados e clorados. São eles: Desetilatrazina (2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina - DEA), Deisopropilatrazina (2-cloro-4-etilamino-6-amino-s-triazina - DIA), Desetildeisopropilatrazina (2-cloro-4,6-amino-s-triazina - DEDIA), Desetilhidroxiatrazina (2-hidroxi-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina - DEHA), Deisopropilhidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-amino-s-triazina - DIHA) e Hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina - HA).

Os compostos clorados apresentam toxicidade semelhante à do composto original, atrazina²³.

A Figura 1.8 apresenta os principais produtos de degradação da atrazina¹¹.

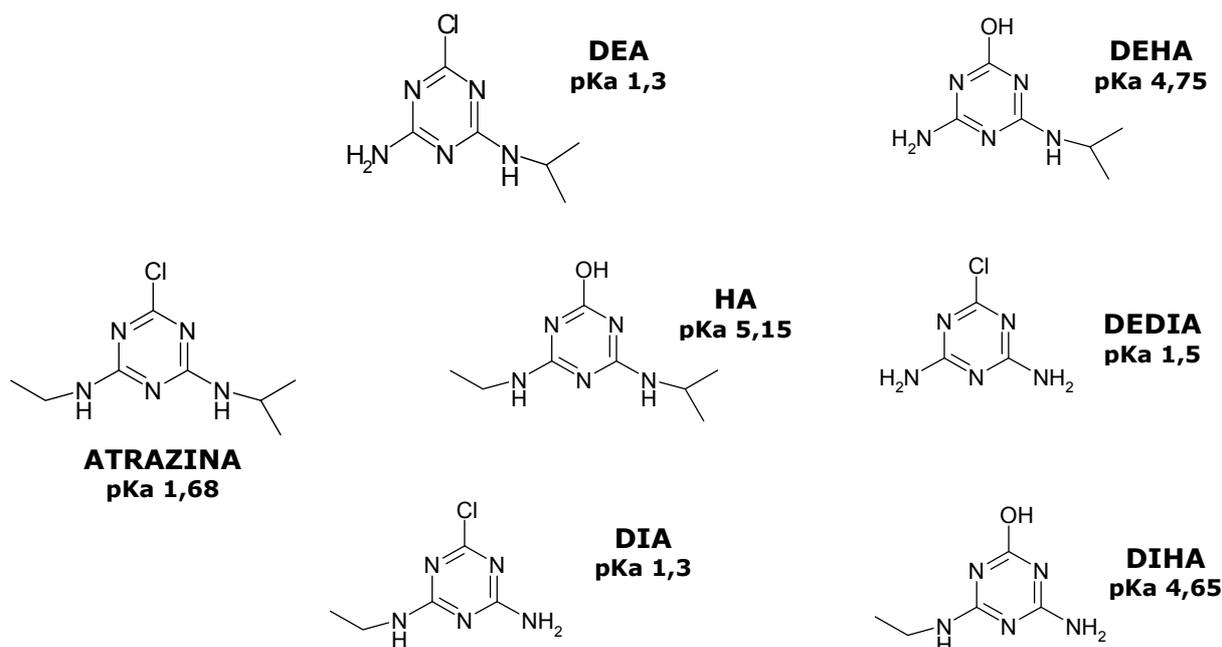


Figura 1.8 - Principais produtos de degradação da atrazina e seus respectivos pKa.

1.1.7 Biodegradação

A descontaminação dos solos e da água pode ser promovida por técnicas de remediação que usualmente são de alto custo. Algumas tecnologias avançadas, como o uso de sistemas biológicos de tratamento para reduzir ou destruir resíduos perigosos são vistas como uma opção para as tecnologias convencionais de descontaminação.

Um dos campos mais promissores da biotecnologia, visando o emprego dos microrganismos, direciona-se para a remediação de locais contaminados devido ao uso de defensivos agrícolas. Uma vez que microrganismos presentes em solos são capazes de degradar e mineralizar pesticidas, pode-se desenvolver a técnica de remediação biológica ou biorremediação de sítios contaminados empregando-se microrganismos selecionados.

A biorremediação tem por objetivo inocular o solo com microrganismos com capacidade de metabolizar os resíduos tóxicos presentes no ambiente. A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica destes microrganismos para a transformação

de contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. Estudos baseados no uso de microrganismos para degradar compostos químicos são descritos freqüentemente na literatura, bem como a degradação total ou parcial de pesticidas por populações de microrganismos naturais presentes em solos²⁴. Os maiores agentes envolvidos na degradação biológica são as bactérias, os fungos e as algas.

A biodegradação microbiana tem enormes vantagens. Em primeiro lugar, como os microrganismos estão presentes em todos os ambientes, o processo pode ser realizado no próprio local. Em segundo lugar, é um processo que permite grande desenvolvimento:

- 1- pela seleção de mutantes capazes de uma degradação mais eficiente;
- 2- pela engenharia genética, que permite a transferência de genes responsáveis pela enzima de degradação a microrganismos já ambientados no local²⁵.

Alguns microrganismos como *Rhodococcus corallinus*²⁶, *Moraxella (Branhamella)*, *Penicillium steckii*²⁷, *Pleurotus pulmonarius*²⁸, *Phanerochaete chrysosporium*^{29, 30}, *Tulipa gesneriana*³¹, *Pseudomonas sp. Strain ADP*³², *Mycellia sterilia INBI 2-26*³³ foram utilizados na biodegradação das s-triazinas.

O gênero *Pleurotus* inclui espécies comestíveis e medicinais que pertencem ao grupo do fungo da podridão branca que apresenta habilidade de produzir enzimas ligninolíticas extracelulares como: lacase, duas peroxidases: manganês peroxidase e aril-alcool oxidase que modificam ou degradam a lignina³³.

Bending e colaboradores (2002) utilizaram nove espécies de fungo da podridão branca para degradar atrazina e outros pesticidas. Foi utilizada degradação em cultura líquida e os resultados obtidos após 42 dias foram mais satisfatórios para os fungos *Coriolus versicolor*, *Hypholoma fasciculares* e *Stereum hirsutum*. Foram realizados testes com *Pleurotus ostreatus*, e os resultados apresentaram redução de 15,5 % de atrazina no meio³⁴.

Todos estes microrganismos metabolizam estes compostos xenobióticos através de reações enzimáticas.

1.1.8 Enzimas

Os tratamentos utilizados para remoção de poluentes recalcitrantes de água e solos são, na maioria das vezes, divididos em tratamento físico-químico e tratamento biológico. O tratamento enzimático está compreendido na fronteira entre estes dois, pois não envolve diretamente o microrganismo, mas está baseado na ação de um catalisador biológico, uma enzima, portanto com uma função catalítica específica.

1.1.8.1 Enzimas Oxidativas

Enzimas redox ou oxidoreduções (EC 1.11.1) catalisam as reações de óxido-redução. Estão incluídas nesta classe as hidrogenases, oxidases, peroxidases e hidroxilases (introduzem hidroxilas em moléculas insaturadas).

A *Horseradish peroxidase* (HRP) é a peroxidase vegetal mais conhecida e estudada até o momento³⁵. Utilizou-se a peroxidase de raiz forte HRP que é uma enzima que oxida substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio como aceptor de elétrons.

Outra enzima muito utilizada na degradação de xenobióticos é a lacase proveniente do fungo *Aspergillus oryzae*.

1.1.8.1.1 Peroxidases

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são enzimas que atuam na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que age como aceptor de elétrons, resultando na formação de água (H₂O) e na oxidação de uma grande variedade de compostos, segundo o esquema simplificado apresentado a seguir:



Estas enzimas podem ser encontradas em microrganismos, plantas e também em mamíferos. Os nomes das peroxidases podem derivar de suas fontes (*horseradish*, *soybeans*, *peanut*, *tealeaf*, lacto e mielo peroxidase); dos seus substratos (bromo, cloro, lignina, manganês peroxidase), ou ainda de seu centro ativo (heme peroxidase, vanádio peroxidase e peroxidases não metálicas)³⁶.

Stiborova *et al* em 1991, promoveram a degradação da atrazina com a enzima *Horseradish peroxidase* na presença de peróxido de hidrogênio, com a adição de cloreto, brometo e iodeto. Apesar de não identificar o produto gerado, foi observada a formação de uma segunda banda quando realizada a cromatografia em camada delgada (TLC) após a reação enzimática. No trabalho não foi descrita a atividade enzimática utilizada na reação³⁷.

1.1.8.1.2 Oxidases

Na literatura, encontrou-se um estudo, em que foi realizada a degradação de atrazina utilizando a lacase, uma enzima oxidativa proveniente do fungo *Mycelia sterilia* INBI 2-26. O trabalho mostra, a degradação do herbicida, realizada com e sem indutores, além de utilizar cepas que continham e não continham lacase. A conclusão do trabalho mostra que a degradação da atrazina não possui dependência com a atividade da lacase³².

1.2 JUSTIFICATIVA

Devido à ampla utilização de atrazina como defensivo agrícola em culturas de crescente ascendência, faz-se necessário o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos de alta eficiência para a análise de tais substâncias. Adicionalmente, o estudo da degradação destes compostos por microrganismos, bem como enzimas isoladas surge como uma alternativa ambiental para descontaminação.

1.3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver metodologia analítica através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar, para a separação de triazinas e seus derivados de degradação.

REFERÊNCIAS

1. PIB do Agronegócio Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em :<http://www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 07 dez. 2008.
2. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 08 dez. 2008.
3. Câmara temática de insumos agropecuários – Nov/2008. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php>. Acesso em 10 dez. 2008.
4. Ferreira, C. R. R. P. T.; **Defensivos agrícolas: expectativas de vendas menores em 2005**. Instituto de economia agrícola. APTA. Secretaria de agricultura e abastecimento. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em 15 out. 2006.
5. Instituto de economia agrícola– **Defensivos Agrícolas: Rumo A Uma Retomada Sustentável**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em 12 jun. 2008.
6. **Safra 2008/09**: redução das chuvas não melhora desempenho da lavoura de cana. Disponível em <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em 28 jul. 2008.
7. Álcool - Etanol Brasileiro. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/energia/alcool/etanol.htm>>. Acesso em 28 jul. 2008.
8. Barela, J. F.; **Seletividade de herbicidas para a cultura de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) afetada pela interação com nematicidas aplicados no plantio**. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
9. Jornal O valor econômico, 19 set. 2007.
10. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em 15 jan. 2009.
11. Barceló, D.; Hennion, M.C.; Trace determination of pesticides and their degradation products in water. **Techniques and instrumentation in analytical chemistry**, 1997, Ed. Elsevier, v.19, cap 1, p. 47-51.
12. Cabral, M.F.; Souza, D.; Alves, C.R.; Machado, S.A.S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica da onda quadrada. **Eclética Química**, v. 28, n. 2, p. 41-47, 2003.
13. Almeida, F.S.; Rodrigues, B.; Guia de Herbicidas, Londrina, IAPAR, p.482, 1985 *Apud*, 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. **Journal of chromatography A**, v. 869, p. 463-469, 2000.
14. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-RF) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Qui. Nova**, v. 25, n 4, p. 616-623, 2002.

15. Norrgran, J.; Bravo, R.; Bishop, A.M.; Retrepo P.; Whitehead R.D. ; Needhama, L.L.; Barr D. B.; Quantification of six herbicide metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 185 –195, 2006.
16. Nascimento, P.C.; Rohlfes, A. L.B.; Bohrer, D.; Carvalho, L.M.; Pilau, E.J.; HPLC based method using sample precolumn cleanup for the determination of triazines and thiolcarbamates in hemodialysis saline solutions, **Talanta**, v. 65, p. 211-216. 2005.
17. Melo, L.F.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F; High – performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH₂ and C18 solid-phase extraction materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 75-81, 2005.
18. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 463-469, 2000.
19. Prade, L.; Huber, R.; Bieseler, B., Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase–explanation for the selectivity of the enzyme in plants, Structure, p. 1445-1452, 1998, *Apud*, O herbicida atrazina, disponível em: <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=377>>. Acesso em: 05 dez. 2008.
20. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 18 dez. 2008.
21. The Merck Index, 12° edição, p. 147, 1996.
22. Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G.; A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, p. 1820-1830, 2008.
23. Gevao, B.; Semple, K.T.; Jones, K.C.; Bond pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 3-14, 2000.
24. Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação
Microrganismos degradadores do herbicida Atrazina. Disponível em:
<<http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>>. Acesso em: 12 jul. 2006.
25. Langenbach, T.; Biodegradação de xenobiontes: potencialidade e limites, **Apostila de microbiologia**, c. 7. p.218.
26. Kodama, T.; Linxian,D.; Yoshida, M.; Yajima, M.;Biodegradatio of an s-triazine herbicide, simazine; Jounal of molecular catalysis B: Enzimatic, v. 11, p. 1073-1078, 2001. *Apud* A.M. Cook, R. Huetter, **J. Agri. Food Chem.** v.32 p. 581-585, 1984.
27. Kodama, T.; Linxian,D.; Yoshida, M.; Yajima, M.;Biodegradatio of an s-triazine herbicide, simazine. **Jounal of molecular catalysis B: Enzimatic**, v. 11, p. 1073-1078, 2001.
28. Pointing, S. B.; Feasibility of bioremediation by white-rot fungi; Appl. Microbiol. Biotechnol, v. 57, p. 20-33, 2001. *Apud* Mougín C, Laugero C, Asther M, Dubroca J, Frasse P.; Biotransformation of the herbicide atrazine by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 705-708, 1994.

29. Pointing, S. B.; Feasibility of bioremediation by white-rot fungi; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 57, p. 20-33, 2001. *Apud* Masaphy S.; Levanon D.; Vaya, J.; Henis, Y.; Isolation and characterisation of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.4342-4346, .
30. Mashaphy, S.; Levanon, D.; Henis, Y.; Degradation of atrazina by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 56, p. 207-214, 1996.
31. Topal, A.; Adams, N.; Hodgson, E.; Kelly, S. L.; In vitro metabolism of atrazina by tulip cytochrome P450. **Chemosphere**, v. 32, p. 1445-1451,1996.
32. Souza, L. M.; Sadowsky, M. J.; Wackett, L.P.; Atrazina Chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. Strain ADP: Gene Sequence, Enzyme Purification, and Protein Characterisation. **Journal of bacteriology**, v. 178, p. 4894-4900, 1996.
33. Vasil'chenko, L. G.; Khromonygina, V. V.; Koroleva, O. V.; Landesman, E. O.; Gaponenko, V. V.; Kovaleva, T. A.; Kozlov Y. P.; Rabinovich, M. L.; Consumption of Triazine herbicide atrazina by laccase-positive and laccase-negative strains of soil fungus *Mycelia sterilia* INBI 2-26; **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, p. 454-459, 2002.
34. Bending, G. D.; Friloux, M.; Walker, A.; Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potencial. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 59-63, 2002.
35. Ribeiro, C. P. **Estudo sobre a biooxidação do limoneno**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
36. Stajic, M; Persky, L.; Friesem, D.; Hadar, Y.; Wasser, S. P.; Nevo, E.; Vukojevic, J.; Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 65-73, 2006.
37. Stiborova, M.; Nachazelova, I.; Anzenbacher, P; Metabolism of xenobiotics in plants Horseradish peroxidase catalyses N-dealkylation of the S-triazine herbicide, atrazine. **Biologia**, 1991.
38. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do58_4.htm>. Acesso 03 abr. 2009.

Capítulo 2

*PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E
ELETROFORESE CAPILAR*

2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

2.1.1 Princípios e fundamentos

Cromatografia é um processo físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados distribuem-se entre duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, que percola pela fase estacionária, arrastando seletivamente os diversos componentes da mistura¹.

Dentre os modos de CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR). Sistemas de CLAE-FR consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas em relação à primeira. A fase móvel de maior polaridade possui algumas vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção².

Na cromatografia líquida, existem dois modos de eluição, a eluição isocrática e a eluição por gradiente. Na eluição isocrática somente um solvente, ou uma mistura de solventes com composição constante é utilizada. Já a eluição por gradiente, que é muito utilizada quando apenas um solvente ou uma mistura constante de solventes não propicia a eluição de todos os analitos, é uma eluição com variação contínua ou segmentada da composição do solvente para modificar a força eluente, ou seja, a força necessária para arrastar o soluto pela coluna. Para eluir mais fortemente os solutos retidos é necessário uma força eluente maior³.

Para avaliar a eficiência de uma separação cromatográfica é necessário determinar alguns parâmetros. Os parâmetros mais comumente avaliados são o tempo de retenção (t_R) para cada componente, que é o tempo necessário, a partir da injeção da mistura na coluna, para que o composto alcance o detector; tempo de retenção

ajustado (t'_R), que é o tempo adicional necessário para o soluto percorrer o comprimento da coluna, além do tempo necessário para o soluto, que não sofre retenção (t_M), percorrer o mesmo caminho. A equação 1 descreve o modo que se calcula o tempo de retenção³.

$$t'_R = t_R - t_M \quad \text{(equação 1)}$$

O t_M é determinado através da observação do primeiro pico encontrado no cromatograma, ou seja, o tempo que do soluto não retido leva para percorrer o comprimento da coluna.

Outro parâmetro analisado é o fator de retenção (k'). Este fator relaciona os tempos de retenção relativos e o tempo do soluto não retido, demonstrando que quanto mais um componente é retido pela coluna, maior é o seu fator de capacidade. O fator de retenção pode ser calculado pela equação 2³.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{(equação 2)}$$

Onde:

t_R = tempo de retenção do soluto.

t_M = tempo de eluição do soluto não retido.

O valor ideal de k' para evitar problemas relacionados à perturbação inicial da linha base, a qual pode sobrepor a primeira banda e evitar excessivo alargamento da banda e tempo de corrida muito longo é $1 < k' < 10^4$.

Retenção relativa (α) é a razão entre os tempos de retenção ajustado. Quanto maior a separação entre dois compostos, maior a retenção relativa. Este parâmetro pode ser calculado através da equação 3³.

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} \quad \text{(equação 3)}$$

Onde:

$t'_{R_2} > t'_{R_1}$ de modo que $\alpha > 1$.

Este parâmetro define a seletividade do sistema cromatográfico. Quanto maior a seletividade de retenção do composto, maior o valor de α . Um valor elevado de α implica em uma boa separação se os picos forem estreitos. Os valores desejados para α são $1,05 < \alpha < 2,0^4$.

Resolução (R) é a diferença dos tempos de retenção e a largura das bandas de dois analitos adjacentes; é uma medida quantitativa da habilidade da coluna em separar os analitos 1 e 2. O parâmetro analisado pode ser determinado através da equação 4³.

$$R = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) \quad \text{(equação 4)}$$

Onde:

t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção de dois picos adjacentes;

w_{b1} e w_{b2} são as larguras dos picos na base, em unidades de tempo.

O valor ideal de resolução entre os picos adjacentes é $1,5 < R < 20$, isto permite afirmar que os picos estão bem separados, e não apresentam um longo tempo de análise.

2.1.2 Instrumentação

Um equipamento moderno de CLAE é equipado com um ou mais reservatórios de vidro ou aço, cada um deles contendo os solventes que serão utilizados, uma bomba capaz de gerar altas pressões, com velocidades de fluxos que podem variar de 0,1 a 10 mL/min, uma coluna geralmente constituída por tubos de aço inoxidável capaz de resistir a altas pressões, sendo empacotadas com os mais variados tipos e tamanhos de fase estacionária. Geralmente uma coluna de guarda é introduzida antes da coluna analítica para aumentar sua duração por remoção, não somente de material particulado e de contaminantes dos solventes, mas também de componentes da amostra que se ligam irreversivelmente à fase estacionária. Um detector apropriado à análise é acoplado a saída da coluna.

Um sistema com a instrumentação utilizada na separação por CLAE está esquematizado na figura 2.1. Uma bomba de alta pressão bombeia o solvente ou uma mistura destes, através do injetor onde a amostra está inserida. A amostra é levada em direção a coluna analítica onde irá ocorrer a interação entre os analitos e as fases móvel e estacionária. Em seguida os analitos são levados para o detector. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento dos dados são feitos mediante a interface com o computador.

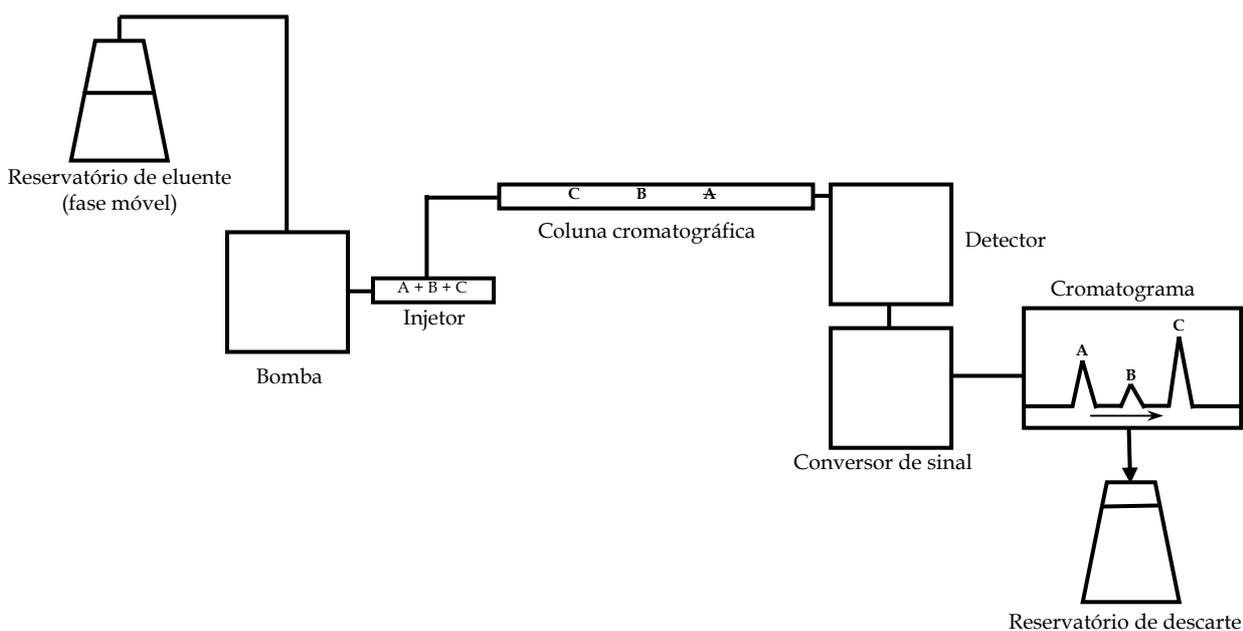


Figura 2.1 – Instrumentação de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

2.2.1 Princípios e fundamentos

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis, através de uma solução de eletrólito contida no interior de um tubo capilar (sílica fundida, teflon), mediante a aplicação de um campo elétrico da ordem de kVolts/m^{5,6}.

Em EC, a separação é conduzida em tubos com dimensões que podem variar de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento⁷.

O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande), um capilar possibilita a dissipação do calor, gerado pela passagem da corrente elétrica (efeito Joule). Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos), resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens da eletroforese capilar são: pequena demanda de amostra, com volumes tipicamente da ordem de 1 a 10 nL, e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo.

Na eletroforese capilar é possível empregar diversos modos de separação, com mecanismos e seletividade característicos. Dentre as metodologias mais utilizadas, as que merecem maior destaque são: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia electrocinética micelar (MEKC). Outra metodologia que vem sendo muito utilizada para a separação de compostos com baixo pKa (ou valores aproximados) é a eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE).

A CZE é a técnica mais utilizada na separação por eletroforese, de compostos iônicos ou ionizáveis.

Já a MEKC é utilizada normalmente na separação de compostos neutros. Utiliza-se um surfactante aniônico acima da concentração micelar crítica, ou seja, para que haja formação de micelas carregadas negativamente. Cada molécula neutra entra em equilíbrio com a micela e o eletrólito, migrando então em diferentes tempos³.

A eletroforese capilar em meio não aquoso, é muito utilizada para a separação de compostos que diferem levemente em suas mobilidades eletroforéticas. Alguns compostos básicos possuem valores de pKa, referentes aos ácidos conjugados, muito baixos e próximos. A determinação destes por CZE torna-se difícil, pois para torná-los ionizados, deve-se utilizar um tampão com um baixo valor de pH, o que tornaria muito pequeno ou nulo o fluxo eletrosmótico. Com a mistura de solventes não aquosos, as características ácido-base destes compostos são modificadas, formando espécies protonadas que são suscetíveis à migração quando aplicado o campo elétrico⁸.

2.2.2 Instrumentação

A CE possui uma instrumentação simples, o sistema contém fonte de alta tensão, tubos capilares com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno e 50 a 100 cm de comprimento, eletrodos (geralmente de platina), um amostrador e um detector apropriado. A Figura 2.2 apresenta um esquema geral para um aparelho de EC. Uma fonte regulada, de alta tensão, é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Tais fontes podem, em geral, ser operadas a tensão constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0 - 50 kV e corrente, de 0 - 200 μA . O operador é protegido contra o contato com a alta voltagem pela inclusão do sistema inteiro, ou pelo menos o terminal de voltagem, numa caixa de acrílico, equipada com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios da solução para completar o circuito elétrico. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido a temperatura constante. Há várias possibilidades para termostatização do sistema, incluindo circulação de um líquido ou ar através de um cartucho contendo o capilar, além do uso de ventiladores e fornos. Os comandos para controle do equipamento e aquisição de dados são feitos mediante interface com computador⁹.

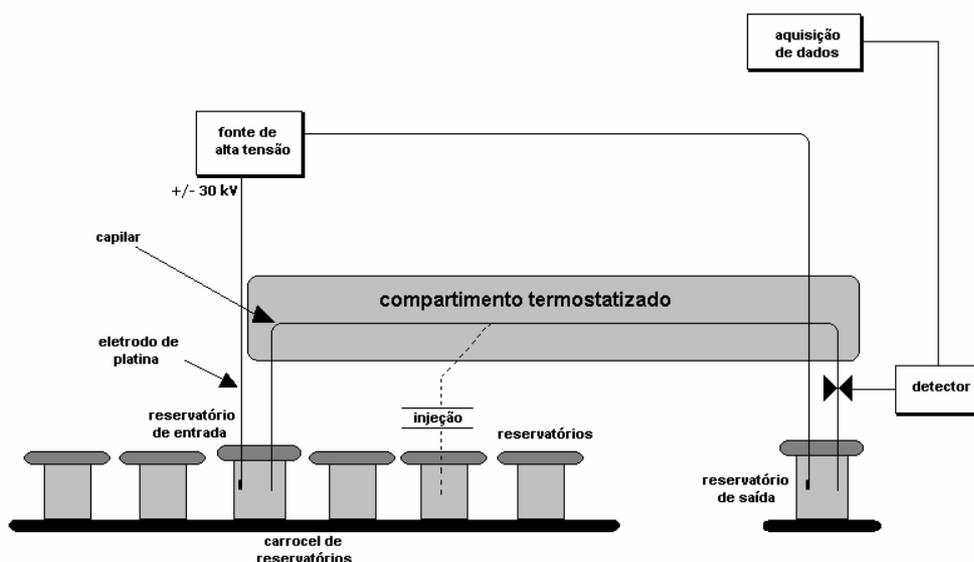


Figura 2.2 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.

2.3 ANÁLISE DE PESTICIDAS

A rigorosa legislação existente no mundo para a determinação de pesticidas em solos, águas, bem como outras matrizes, exige o desenvolvimento de novos métodos analíticos sensíveis e seletivos capazes de fornecer resultados confiáveis frente aos crescentes níveis de exigência e demanda.

Muitas técnicas analíticas têm sido utilizadas para análise quantitativa e qualitativa de triazinas e seus produtos de degradação, entre elas, a cromatografia gasosa (CG)¹⁰⁻¹², cromatografia em camada delgada (CCD)¹³ e métodos eletroquímicos¹⁴.

A US EPA possui um método padrão para análise de triazinas (EPA 619)¹⁵, esta análise é realizada por meios de cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (NPD).

No entanto a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa tem demonstrado ser uma metodologia capaz de fornecer excelentes resultados na separação destes compostos¹⁶⁻¹⁸, assim como a determinação por eletroforese capilar (EC)¹⁹⁻²³.

2.3.1 Análise de triazinas

Uma técnica cromatográfica muito utilizada na análise de atrazina e derivados é a Cromatografia gasosa (CG). Nesta técnica, é possível analisar compostos que possuem um caráter volátil. Entretanto, compostos hidroxilados como as hidroxitriazinas, que não apresentam este caráter, não podem ser analisados diretamente através desta técnica, para isto seria necessário uma etapa de derivatização. Tendo em vista a pequena concentração do analito e o número de etapas necessário para uma completa preparação da amostra, esta técnica não se mostra tão viável a análise de atrazina e dos derivados propostos neste trabalho.

A técnica mais adequada encontrado na literatura para análise de atrazina e derivados é a CLAE.

A EC é uma técnica relativamente nova, que está começando a ser utilizada para análise de atrazina e derivados, o que propicia um cenário atrativo e com muitas lacunas na literatura a serem preenchidas.

2.3.1.1 Análise de triazinas por CLAE

Para análise de atrazina e derivados, o método analítico mais utilizado de acordo com a literatura, foi CLAE. Foi possível observar que muitos pesquisadores utilizam como fase estacionária colunas C18²⁴⁻³⁴, ou seja, colunas cromatográficas com fase reversa.

Alguns autores realizam a separação de seus analitos, que na maioria das vezes são compostos de diferentes classes de pesticidas, utilizando acetonitrila (ACN) e água (H₂O). Outros realizam a separação com metanol (MeOH) e H₂O.

Para manter um pH constante durante a separação, muitos autores adicionam a fase móvel uma solução tampão. Isto confere ao cromatograma um perfil diferente, do que quando se trabalha com H₂O. A maior preocupação que se deve ter quando se trabalha com uma solução tampão na fase móvel, é a concentração do mesmo, pois excesso de eletrólitos pode causar precipitação de sais em todo o sistema como, por exemplo, entupimento da coluna e prejudicar o bom funcionamento do aparelho.

2.3.1.2 Análise de triazinas por EC

Na literatura encontram-se descritos alguns trabalhos que utilizam EC para a determinação de triazinas, sendo que a maior parte dos artigos utiliza MEKC para a determinação destes herbicidas³⁵⁻³⁹. A CZE não se mostrou uma técnica capaz de separar clorotriazinas⁴⁰, porém quando adicionado um tensoativo catiônico, a separação tornou-se possível⁴¹. A técnica que melhor separa as triazinas e derivados é a técnica de eletroforese capilar em meio não aquoso. Alguns trabalhos encontrados na literatura definem esta metodologia como a que melhor se aplica para compostos que diferem levemente em suas mobilidades eletroforéticas^{20,8}.

REFERÊNCIAS

1. Peres, T. B.; **Noções básicas de cromatografia**. Centro de pesquisa e desenvolvimento ambiental-Instituto Biológico, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, jul./dez., 2002.
2. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-RF) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Qui. Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
3. Harris, D. C.. **Análise Química Quantitativa**. 6° edição, p.661, Editora LTC, 2005.
4. Snyder, I. R.; Kirkland, J. J.. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2° edição, Editora John Wiley & Sons, 1979.
5. Bier, M., Electrophoresis- Theory, Methods and applications; Ed.; Academic Press Inc.; New York, 1959, *Apud* Tavares, M. F. M.; Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quim. Nova**, v.19, n. 2, p. 173,1996.
6. Deyl, A., Electrophoresis; Ed.; J. Chromatogr. Lib., Vol. 18; Elsevier; Amsterdam, 1970, *Apud* Tavares, M. F. M.; Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quim. Nova**, v.19, n. 2, p. 173,1996.
7. De Oliveira, M. A. L.; **Análise de ácidos graxos em óleos e gorduras por eletroforese capilar**. 2003. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2003.
8. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Dominguez-Álvarez, J.; Hernández-Méndez, J.; Capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents in the presence of ionic additives. **Anal. Chemistry** v.69, p. 4437-4444, 1997.
9. Tavares, M. F. M.; Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Quim. Nova**, v.19, n. 2, p. 173,1996.
10. Bagheri, H.; Khalilian, F.; Immersed solvent microextraction and gás chromatography-mass spectrometric detection of s-triazine herbicides in aquatic media. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 81-87, 2005.
11. Bruzzoniti, M. C.; Sarzanini, C.; Costantino, G.; Fungi, M.; Determination of herbicides by Solid Phase Extraction gás chromatography-mass spectrometry in drinking waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 2, p. 241-249, 2006.
12. Azevedo, D. A.; Gerchon, E.; Reis, E. O.; Monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water from Paraíba do Sul river, Brazil. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 15, p. 292-299, 2004.
13. Butz, S.; Stan, H. J.; Screening of 265 pesticides in water by thin-layer chromatography with automated multiple development. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 620-630, 1995.
14. Santos, L. B. O.; Abate, G.; Masini, J. C.; Developing a continuous flow-square wave voltammetry method for determination of atrazina in soil solutions using the hanging mercury drop electrode. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 17, p. 36-42, 2006.

15. Disponível em <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/619.pdf>. Acesso em 02 dez. 2006.
16. Norrgran, J.; Bravo, R.; Bishop, A. M.; Retrepo, P.; Whitehead, R. D.; Needhama, L. L.; Barr, D. B.; Quantification of six herbicide metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 185 –195. 2006.
17. Katsumata, H.; Kaneco, S.; Suzuki, T.; Ohta, K.; Determination of atrazine and simazine in water samples by high performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, n. 2, p. 214-219, 2006.
18. Prosen, H.; Zupancic-Kralj, L.; Marsel, J.; Optimization of an analytical procedure for the determination of triazine herbicides in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 121-130, 1995.
19. Frias, S.; Sánchez, M. J.; Rodríguez, M. A.; Determination of triazine compounds in ground water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 271-278, 2004.
20. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Dominguez-Álvarez, J.; Hernández-Méndez, J.; Determination of Triazine herbicides in natural waters by solidphase extraction and non-aqueous capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 451-461, 2000.
21. Schmitt, Ph.; Garrison, A. W.; Freitag, D.; Kettrup, A.; Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis as a function of pH. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 169-177, 1996.
22. Acedo-Valenzuela, M. I.; Galeano-Díaz, T.; Mora-Díez, N; Silva-Rodríguez, A.; Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 65-71, 2004.
23. Lin, C.; Liu, Y.; Yang, T., Wang, T.; Yang, C.; On-line concentration of s-triazine herbicides in micellar electrokinetic capillary chromatography using a cationic surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 916, p. 239-245, 2001.
24. Baranowska, I.; Barchan'ska, H.; Pacak, E.; Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. **Environmental Pollution**, v. 143, p.206-211, 2006.
25. Norrgran, J.; Bravo, R.; Bishop, A.M.; Retrepo, P.; Whitehead, R.D.; Needhama, L.L.; Barr, D.B.; Quantification of six herbicide metabolites in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 185 –195, 2006.
26. Abate, G.; Masini, J.C.; Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropilatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite, **J. Braz. Chem. Soc**, v. 16, n. 5, p. 936-943, 2005).
27. Nascimento, P.C.; Rohlfes, A.L.B; Bohrer, D.; Carvalho, L.M.; Pilau, E.J.; Hplc based method using sample precolumn cleanup for the determination of triazines and thiolcarbamates in hemodialysis saline solutions. **Talanta**, v.65, p. 211-216, 2005.
28. Baranowska, I.; Barchan'ska, H.; Pyrsz, A.; Distribution of pesticides and heavy metals in trophic chain. **Chemosphere**, v. 60, p. 1590-1599, 2005.

29. Melo, L.F.C.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; High – performance liquid chromatographic determination of pesticides in tomatoes using laboratory-made NH₂ and C18 solid-phase extraction materials. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, p. 75-81, 2005.
30. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 463-469, 2000.
31. Vissef, T.; Vredenburg M. J.; Hovea, G. J.; Jong, A. P. J. M.; Somsemb, G. W., Gradient elution liquid chromatography-infrared spectrometry at µg.L⁻¹ level using capillary column switching and addition of a make-up liquid: A preliminary study. **Analytica Chimica Acta**, v. 342, p. 151-158, 1997.
32. Thomas, D.H.; Beck-Westermeyer, M.; Hage, D.S.; Determination of Atrazine in water using tandem high-performance immunoaffinity chromatography and reversed-phase liquid chromatography. **Anal Chem.**, v. 66, p. 3823-3829, 1994.
33. Berg, M.; Muller, S.R.; Schwanenbach, R.P.; Simultaneous determination of triazines including Atrazine and their major metabolites Hydroxyatrazine, Desethylatrazine, and Deisopropylatrazine in natural waters. **Anal. Chem**, v. 67, p. 1860-1865, 1995.
34. Onnerfjord, 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. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 35-45, 1996.
35. Frias, S.; Sánchez, M.J.; Rodríguez, M.A.; Determination of triazine compounds in ground water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 271-278, 2004.
36. Acedo –Valenzuela, M.I.; Galeano-Díazi, T.; Díez, N.M.; Silva-Rodriguez, A.; Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 65-71, 2004.
37. Lin, C.E.; Liu, Y.C.; Yang, T.Y.; Wang, T.Z.; Yang, C.C; On-line concentration of s-triazine herbicides in micellar electrokinetic chromatography using a cationic surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 916, p. 239-245, 2001.
38. Lin, C.E.; Hsueh, C.C.; Wang, T.Z.; Chiu, T.C.; Chen, Y.C.; Migration behavior and separation of s-triazines in micellar electrokinetic capillary chromatography using a cationic surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 835, p. 197-207, 1999.
39. Carabias-Martinez, R.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Mufioz-Dominguez, A.I.; Dominguez-Alvarez, J.; Hernández-Mendez, J.; Determination of triazine herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 349-360, 1996.
40. Schmitt, Ph; Garrison, A. W.; Freitag, D.; Kettrup, A.; Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis as a function of pH. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 169-177, 1996.
41. Lin, C.E.; Wang, T.Z.; Huang, H.C.; Hsueh, C.C.; Liu, Y.C.; Capillary zone electrophoretic separation of neutral species of chloro-s-triazines in the presence of

cationic surfactant monomers. **Journal of Chromatography A**, v. 878, p. 137-145, 2000.

Capítulo 3

*INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA, MATERIAIS,
REAGENTES E SOLUÇÕES*

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

3.1.1 Equipamentos utilizados no Instituto Nacional de Tecnologia

3.1.1.1 Equipamento para Cromatografia líquida

Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu LC 10 AT, equipado com detector UV-Vis, autoinjeter, programa de controle e aquisição dos dados Class VP 6.1.

3.1.1.2 Equipamento para Cromatografia gasosa

A confirmação da estrutura química do produto de degradação foi realizada em um cromatógrafo gasoso de alta resolução modelo série 6890N acoplado a um detector seletivo de massas 5973N Hewlett-Packard (Agilent Technologies).

3.1.1.3 Espectrofotômetro UV-Vis

Para seleção do comprimento de onda de cada substância foi utilizado um espectrofotômetro da marca HACH DR 4000 com varredura de feixe simples e cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

3.1.1.4 Equipamento para Extração em fase sólida

As extrações foram realizadas com a cuba de extração da marca J.T. Baker e uma bomba da marca Fanem LTDA.

3.1.1.5 Equipamento para Extração líquido-líquido

Para realização da extração líquido-líquido foi utilizado um banho de ultra-som da marca Odontobrás modelo 2840 D.

3.1.2 Equipamento utilizado na Universidade Federal de Juiz de Fora

3.1.2.1 Eletroforese capilar

Foi utilizado um Eletroforese Capilar Agilent CE, equipado com fonte de alta tensão (± 30 KV), detector DAD (diode array), controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado, programa de controle, aquisição e tratamento de dados ChemStation 6.0.

3.2 COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Utilizou-se a coluna analítica octadecilsilano, Zorbax 300 SB-C18 150 x 4,6 mm, 5 μ m, equipada com uma coluna de guarda Zorbax 300 SB-C18 4,6 x 12,5 mm, 5 μ m e a coluna Shimpack C18 (250 x 4,6 mm 4,6 μ m) para a análise das triazinas para análise por CLAE

Para análise por CG foi utilizada coluna analítica de sílica fundida 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano, HP 5 MS (30m X 0,25 mm d.i.) revestida com um filme de 0,25 μ m.

3.3 CAPILARES

Utilizou-se capilar de sílica fundida com revestimento externo de polimida, obtido da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA), com dimensões do capilar de 75 e 50 μm de diâmetro interno (d.i.) e 375 μm de diâmetro externo (d.e.). A janela de detecção foi feita por remoção da polimida, a 40 cm do início do capilar, para um comprimento total de 48,5 cm.

3.4 CARTUCHOS PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

Para a extração de atrazina, simazina e propazina foram utilizados cartuchos de octadecilsilano, C18 (J. T. Baker), com capacidade de 3 mL.

As extrações de atrazina e derivados foram realizadas através de extração em fase sólida com cartuchos Oasis MCX (Waters) com capacidade de 3 mL. Este cartucho contém uma fase polimérica umidecível em água que possui dois modos de retenção, troca iônica e fase reversa, tornando possível então uma completa extração, já que os analitos possuem polaridades muito diferentes.

3.5 CAPELA DE FLUXO LAMINAR

Todas as manipulações com o fungo *Pleurotus ostreatus* foram realizados na capela de fluxo laminar (Veco) equipada com lâmpada germicida UV.

3.6 AUTOCLAVE

Autoclave vertical modelo 103 Fabbe-Primar.

3.7 REAGENTES E SOLVENTES

3.7.1 Padrões

Os padrões de atrazina (A, 98,4% de pureza) e simazina (S, 99,0% de pureza), deisopropilatrazina (DIA, 98,0% de pureza), desetilatrastina (DEA, 98,5% de pureza), hidroxiatrazina (HA, 96,0% de pureza), desetildeisopropilatrazina (DEDIA, 95,7% de pureza), foram obtidos de Dr. Ehrenstorfer GmbH, o padrão propazina (P, 99,3% de pureza) desetilhidroxiatrazina (DEHA, 98,7% de pureza) e deisopropilhidroxiatrazina (DIHA, 95,0% de pureza) foram obtidos de Riedel–de-Haën.

3.7.2 Reagentes utilizados para análise de atrazina, simazina e propazina por CLAE

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou espectroscópico, acetonitrila (ACN) HPLC (Tedia) e metanol (MeOH) HPLC (Vetec), Acetato de sódio (Merck), acetato de amônio (Isofar), ácido acético glacial (Hoechst Brasil), água ultra pura produzida em laboratório (H₂O), , acetato de etila HPLC (Ominisolv) e éter etílico anidro (Tedia), hidróxido de sódio (Vetec).

3.7.3 Reagentes utilizados para análise de atrazina e derivados por CLAE

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou espectroscópico, acetonitrila (ACN) HPLC (Tedia), ácido fosfórico (Vetec), hidróxido de amônio (Merck), água ultra pura produzida em laboratório (H₂O), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Merck), hidróxido de sódio (Vetec).

3.7.4 Reagentes utilizados para análise de atrazina e derivados por EC

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou espectroscópico, acetonitrila (ACN) HPLC (Tedia) e metanol (MeOH) HPLC (Vetec), Acetato, ácido clorídrico (HCl) (Vetec), água ultra pura (H₂O), Tris (hidroximetil)amino metano p.a. (Vetec).

3.7.5 Reagente utilizado para análise de atrazina e derivados por CG

Gás hélio ultra puro, foi utilizado como gás de arraste na análise por CG.

3.7.6 Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com HRP

Para a degradação de atrazina com a enzima Horseradish peroxidase (HRP) foram utilizados 2,4 diclorofenol (2,4 DCP) (Sigma), 4- aminoantipirina (4-AAP) (Merck), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Merck) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Vetec).

A enzima HRP foi gentilmente cedida pela Toyobo do Brasil.

3.7.7 Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com lacase

Para os estudos de degradação com a enzima lacase foram utilizados os reagentes 2,2'-azino-bis (ácido 3etilbenzotiazolina-6-sulfônico) diamônio-98% (ABTS) (Sigma), hidróxido de sódio (Vetec) e ácido succínico p.a. (Vetec). A enzima lacase, proveniente do fungo *Aspergillus orizae* geneticamente modificado, foi gentilmente cedida pela Novozyme.

3.7.8 Reagentes utilizados nas reações de degradação enzimática com o fungo *Pleurotus ostreatus*

Para o preparo da solução nutritiva foram utilizados: CaCl_2 p.a. (Merck), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Vetec), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck), KH_2PO_4 p.a. (Vetec), Uréia p.a. (Reagen), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p.a. (Vetec), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. (Carlo Erba), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Vetec) e CoCl_2 p.a. (Vetec).

O fungo *Pleurotus ostreatus*, mantido em ágar-aveia, foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Setor de Microbiologia Agrícola da UFLA – Universidade Federal de Lavras. O meio de cultura utilizado foi cultivado em potato dextrose agar (pda) (Merck) e aveia em flocos finos (Quaker).

3.8 SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizadas foram filtradas com um filtro de seringa com membrana de Teflon (PTFE) de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore) e os solventes foram filtrados em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore) utilizando um kit para filtração (Millipore) e uma bomba a vácuo (Fysma).

3.8.1 Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina por CLAE

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de 100 mg/L de atrazina, simazina, propazina em acetonitrila. A partir destas soluções foram preparadas soluções intermediárias de 35 mg/L e 10 mg/L. Destas soluções, preparou-se soluções de trabalho de 1 mg/L de cada composto.

Para construção das curvas analíticas foram preparadas soluções de 1, 3, 5, 8, 12 e 15 mg/L de atrazina, simazina e propazina.

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorvância dos três compostos foi realizada uma varredura de 190 a 500 nm. Os compostos foram solubilizados em acetonitrila. Soluções de atrazina, simazina e propazina foram preparadas na concentração de 0,150 $\mu\text{mol/L}$.

Para escolha da fase móvel na separação de atrazina, simazina e propazina utilizou-se solução tampão acetato de sódio 2,5 mmol/L pH 4,5.

3.8.2 Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina e derivados por CLAE

Inicialmente foram preparadas soluções concentradas de atrazina e seus produtos de degradação. A atrazina, DEA, DIA foram solubilizados em acetonitrila. DIHA, DEHA e DEDIA foram solubilizados em 20% HCl 0,1 mol/L e 80% acetonitrila, a HA foi solubilizada em 20% HCl 0,1 mol/L e 80% água ultra pura. A partir destas soluções foram preparadas soluções de trabalho.

A curva analítica para HPLC foi preparada nas concentrações de 5,0, 10,0 15,0, 20,0 e 25,0 mg/L para atrazina; 1,20, 1,60, 2,00, 2,40 e 2,80 mg/L de DIA, DEA e HA; 3,0, 6,0, 9,0, 12,0 e 15,0 mg/L de DIHA e DEDIA e 2,0, 5,0, 8,0, 11,0 e 14,0 mg/L de DEHA.

Para os cálculos de recuperação foram preparadas três soluções com o terceiro ponto da curva analítica.

Por extração em fase sólida a eluição foi realizada com uma solução de NH_4OH a 4% em acetonitrila.

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorvância dos compostos realizaram-se duas varreduras de 190 a 300 nm. Uma varredura foi realizada solubilizando os compostos em acetonitrila e outra varredura foi realizada solubilizando os compostos em tampão fosfato pH 7,28 5 mmol/L. Soluções de cada um dos compostos foram preparadas na concentração de 0,150 $\mu\text{mol/L}$.

Preparou-se uma solução tampão fosfato de sódio pH 7,28 na concentração de 5 mmol/L que foi utilizada como fase móvel.

3.8.3 Preparo de soluções utilizadas na separação de atrazina e derivados por EC

Preparou-se soluções na concentração de 10 mg/L de cada analito em ACN. Foi preparado o tampão Tris-HCl em acetonitrila e metanol.

3.8.4 Preparo de soluções para reações de degradação

3.8.4.1 Preparo de soluções para reações de degradação e determinação da atividade enzimática da HRP

Para as reações de degradação da atrazina com HRP foi utilizada solução tampão fosfato 0,2 mol/L pH 6,0 para solubilizar a enzima, a qual foi filtrada e estocada a 4°C.

Soluções de peróxido de hidrogênio 10 mmol/L, 4 aminoantipirina (4-AAP) 1,6mmol/L, 2,4-diclorofenol (2,4 DCP) 15 mmol/L e tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 também foram usadas nos ensaios com esta enzima.

3.8.4.2 Preparo de soluções para reações de degradação e determinação da atividade enzimática da lacase

Para as reações de degradação da atrazina com a enzima lacase foi utilizado tampão succinato de sódio pH 4,5 e o mediador ABTS 3 mmol/L.

3.8.4.3 Preparo de soluções para as reações de degradação com o fungo *Pleurotus ostreatus*

Para as reações de degradação da atrazina com o fungo *Pleurotus ostreatus*, foi preparada uma solução nutritiva em água destilada, com 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 g/L de KH_2PO_4 , 0,1 g/L de uréia, 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L de CaCl_2 , 5,0 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,56 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2,0 mg/L de CoCl_2 e 1,4 mg/L de ZnSO_4 .

A atrazina utilizada foi preparada em ACN na concentração de 726,20 mg/L, enquanto que a solução de DEA foi preparada em ACN na concentração de 10 mg/L.

3.9 BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

3.9.1 Preparo do meio reacional para degradação de atrazina com HRP

Como a atrazina possui baixa solubilidade em água, optou-se por utilizar meios reacionais contendo 35% de acetonitrila, conforme reportado por Ribeiro em 2007¹, que descreve como sendo esta a melhor condição para a manutenção da estabilidade da enzima HRP. As atividades remanescentes da HRP em meios contendo solvente estão apresentadas na figura 3.1.

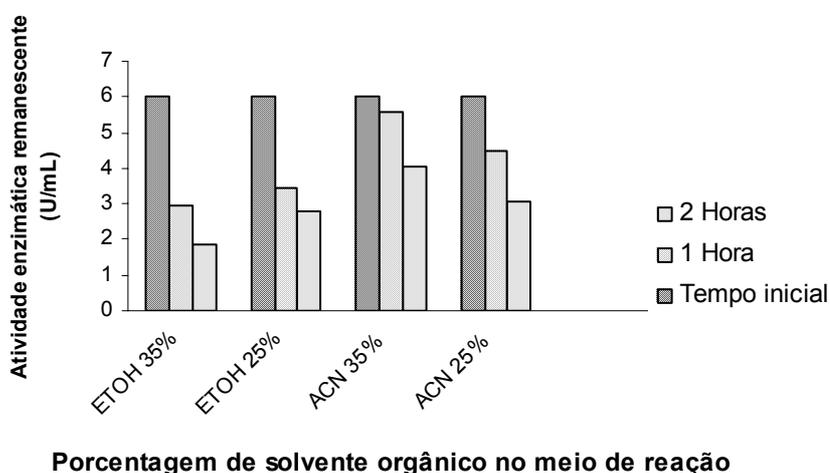


Figura 3.1 - Variação da atividade enzimática da HRP em meios contendo solvente orgânico

Meios reacionais foram testados utilizando esta proporção de solvente orgânico, peróxido de hidrogênio, atrazina 10 mg/L e tampão fosfato pH 6,0.

Todas as reações foram realizadas na presença de controle. Um dos controles continha atrazina, peróxido e tampão e o outro controle continha atrazina, enzima e tampão, sempre nas mesmas proporções da reação.

3.9.2 Preparo do meio reacional para degradação da atrazina com a enzima lacase

Foram realizados meios reacionais contendo 10 mg/L de atrazina, tampão succinato pH 4,5, ABTS e enzima lacase pura e seus respectivos controles: sem a enzima (apenas ABTS, tampão succinato e atrazina), sem o substrato atrazina (ABTS, tampão succinato e enzima) e sem o mediador ABTS (tampão succinato, atrazina e enzima).

3.9.3 Preparo do meio reacional para degradação de atrazina com *Pleurotus ostreatus*

Na capela de fluxo laminar foi adicionado, a um erlenmeyer de 50 mL, um volume adequado de solução padrão de atrazina para que em um volume final de 30 mL sua concentração final fosse de 10 mg/L. Esperou-se a completa evaporação do solvente e posteriormente adicionou-se 30 mL de solução nutritiva. Homogeneizou-se bem a solução.

A esta solução homogeneizada foram adicionados 3 discos de 6 mm do fungo *Pleurotus ostreatus* crescido em ágar.

Foram realizados dois controles da incubação: um contendo atrazina e solução nutritiva na mesma proporção da reação e outro contendo a solução nutritiva e os 3 discos de 6 mm do fungo.

As incubações foram colocadas em uma estufa a 30 °C.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro, Cristiano Porto. Estudo sobre a biooxidação do limoneno. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Instituto de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Capítulo 4

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA, SIMAZINA
E PROPAZINA POR CLAE*

4.1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho foi proposto o desenvolvimento de metodologia para separação de atrazina, simazina e propazina por cromatografia líquida de alta eficiência. Inicialmente utilizou-se a mistura de solventes MeOH/H₂O. Posteriormente, baseando-se na literatura, trocou-se a fase móvel por ACN/Tampão acetato de sódio 2,5 mmol/L pH 4,5. Através do uso de um planejamento de misturas investigou-se qual a melhor proporção da fase móvel a ser otimizada para a separação das triazinas.

É importante lembrar que o uso prolongado de fase móvel composta de tampão tende a diminuir o tempo de vida útil de uma coluna analítica. Portanto no intuito de viabilizar a otimização, dois experimentos foram realizados contendo a mesma proporção de ACN como solvente orgânico no modo isocrático. Um experimento empregou a solução tampão e o outro água para compor a fase móvel, sendo os resultados comparados em relação à resolução dos picos.

4.2 OBJETIVO

Desenvolver e otimizar metodologia analítica por meio de cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de atrazina, simazina e propazina.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Seleção do comprimento de onda de máxima absorvância dos analitos.

Um estudo espectrofotométrico na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) foi realizado no intuito de selecionar o mais adequado comprimento de onda de detecção, levando-se em consideração a melhor resposta de sinal para os diferentes pesticidas investigados.

A Figura 4.1 apresenta o espectro de varredura UV-Vis dos herbicidas atrazina, simazina e propazina. O comprimento de onda selecionado para a análise foi o de máxima absorvância para todos os analitos. Portanto o valor utilizado foi o de 221 nm

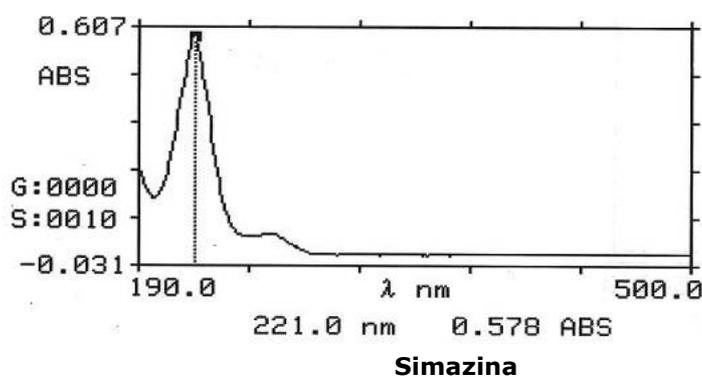
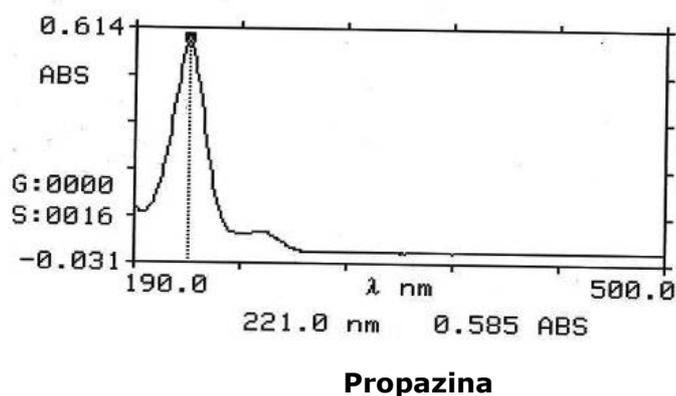
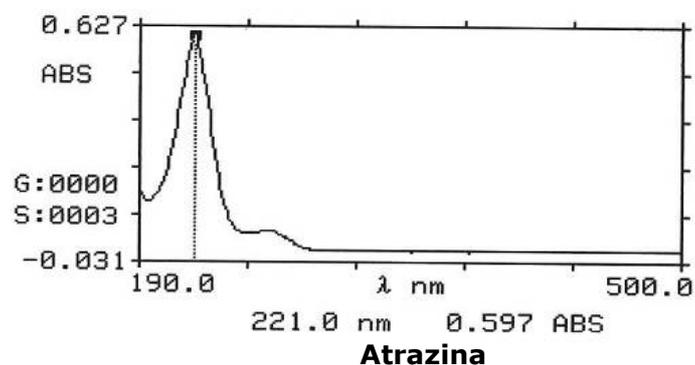


Figura 4.1 - Espectros de absorção UV-Vis da atrazina, simazina e propazina solubilizadas em ACN na concentração 0,150 $\mu\text{mol/L}$.

4.3.2 Extração

Foram realizadas extrações líquido-líquido, com acetato de etila e éter etílico e extração em fase sólida com cartucho octadecilsilano (C18) das triazinas do meio reacional contendo triazina, peróxido de hidrogênio, tampão fosfato 0,2 mol/L pH 6,0 e enzima, para posterior comparação.

Para efetuar a extração líquido-líquido das triazinas do meio reacional, foram realizadas três adições consecutivas de 1 mL de acetato de etila ou éter etílico, levando-os ao banho de ultra-som por 10, 5 e 5 minutos respectivamente. Os extratos obtidos após a extração foram analisados por CLAE.

Para a extração de atrazina, simazina e propazina com cartuchos C18, o condicionamento foi realizado com metanol e acetato de etila.

A extração de atrazina, simazina e propazina com cartucho (C18) mostrou-se eficaz na literatura, pois foram obtidos bons resultados de recuperação¹.

Todos os extratos foram analisados por CLAE. Como é possível que haja alguma interferência na análise devido ao solvente de extração (eluente), foi realizada a concentração dos extratos, com N₂, e posteriormente a ressuspensão dos analitos com acetonitrila. A Figura 4.2 apresenta um fluxograma com as etapas seguidas no estudo de extração.

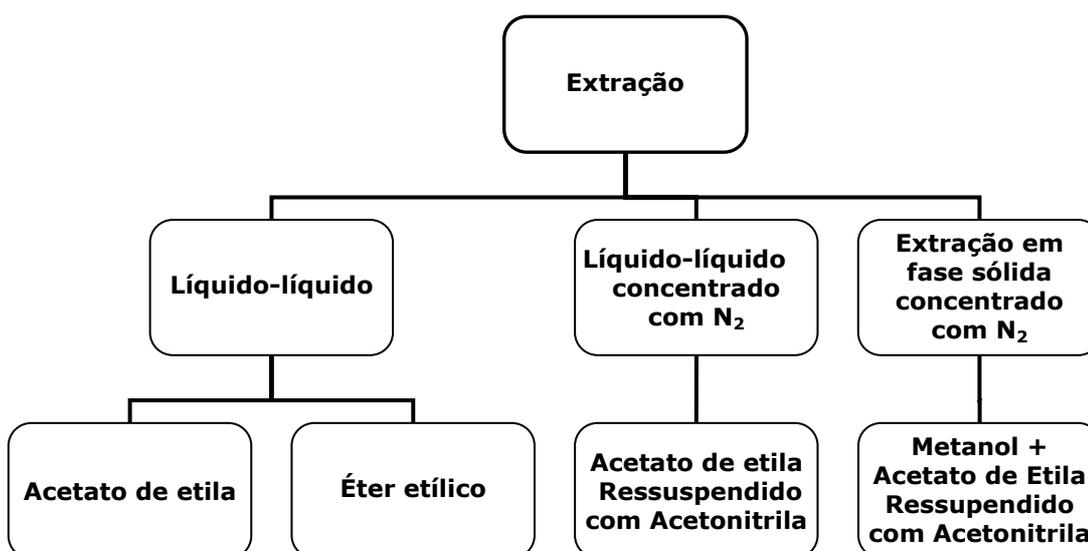


Figura 4.2- Fluxograma dos testes de extração realizados para as s-triazinas.

Na extração líquido-líquido, optou-se por utilizar apenas o acetato de etila como solvente de extração. Apesar de o éter etílico não absorver na região do ultravioleta estudada, este possui uma alta pressão de vapor, ou seja, volatiliza rapidamente, o que dificulta seu manuseio principalmente em pequenas quantidades, considerando também a sua toxicidade.

Como o acetato de etila absorve na região UV estudada, podendo interferir na identificação de novos picos, resolveu-se então realizar uma etapa de concentração com N₂ e ressuspensão com acetonitrila. Para a extração com cartucho C18 o mesmo procedimento foi realizado.

A recuperação para cada condição de extração realizada foi calculada e o melhor resultado foi obtido para extração líquido-líquido. A recuperação de cada composto está descrita na tabela 4.1.

A recuperação é a porcentagem calculada que expressa a quantidade de analito recuperada em uma matriz fortificada após um procedimento de extração. Pode ser determinada pela equação 1.

$$R = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100\% \quad (\text{equação 1})$$

Tabela 4.1- Recuperações obtidas das s-triazinas nas diferentes condições de extração.

Extração líquido-líquido			
	Atrazina	Simazina	Propazina
Recuperação(%)	82	69	86

4.3.3 Otimização de metodologia por CLAE para a análise de atrazina, simazina e propazina.

4.3.3.1 Estudos preliminares

Alguns trabalhos descritos na literatura utilizam metanol ou acetonitrila como solvente orgânico constituinte da fase móvel²⁻⁴. Em função disto realizou-se estudos preliminares com o intuito de promover a separação de uma mistura de padrões contendo atrazina, simazina e propazina utilizando-se como fase móvel MeOH/H₂O (60/40% v/v). A figura 4.3 apresenta o perfil de separação dos três compostos analisados.

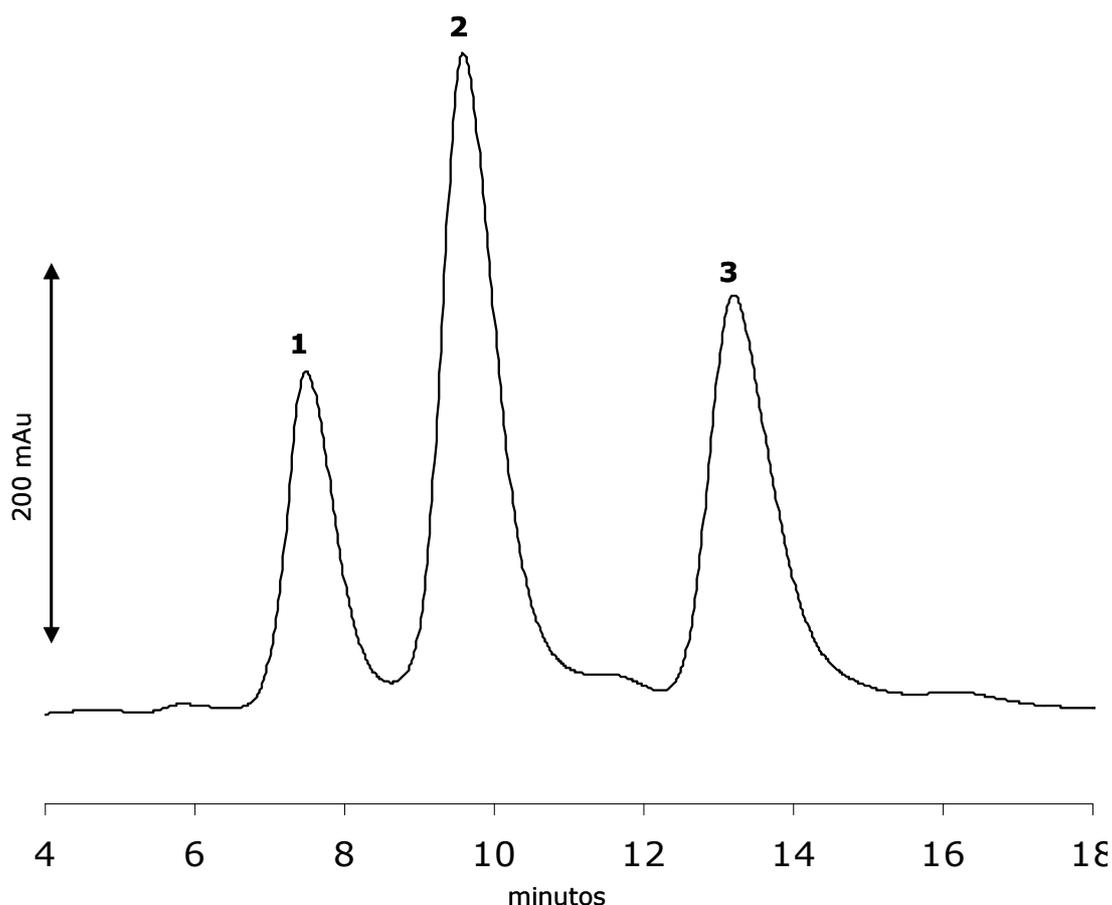


Figura 4.3 – Separação de uma mistura de padrões de simazina (1), atrazina (2) e propazina (3) por CLAE utilizando como fase móvel MeOH/H₂O 60/40 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção 20 µL, coluna Zorbax 300SB C18 e detecção em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 33,3 mg/L. Experimento 1.

Entretanto os resultados obtidos não foram considerados satisfatórios, pois observa-se instabilidade na linha base, picos largos e com baixa simetria e resolução entre o par simazina e propazina menor que 1,5.

Uma vez que o uso de MeOH como constituinte da fase móvel não foi satisfatório, um novo estudo foi proposto usando ACN como fase móvel. No entanto para escolher uma proporção de partida da acetonitrila que tivesse uma força de eluição próxima ao metanol, utilizou-se um nomógrafo como orientação, que é uma tabela comparativa de forças de eluição para diferentes solventes. A Figura 4.4 apresenta um nomógrafo e suas respectivas forças de eluição para a acetonitrila e metanol, quando estes estão dissolvidos em determinada proporção de água.

A fase móvel escolhida para comparação da separação de triazinas com MeOH/H₂O foi a fase móvel ACN/Tampão acetato de sódio 2,5 mmol/L pH 4,5. Este tampão foi escolhido devido a grandes quantidades de trabalhos descritos na literatura que o utilizam por tornar os picos dos analitos mais simétricos. Portanto como o valor da força de eluição de cada solvente é apresentada de acordo com a sua proporção em H₂O, o valor encontrado da força de eluição para acetonitrila é um valor aproximado.

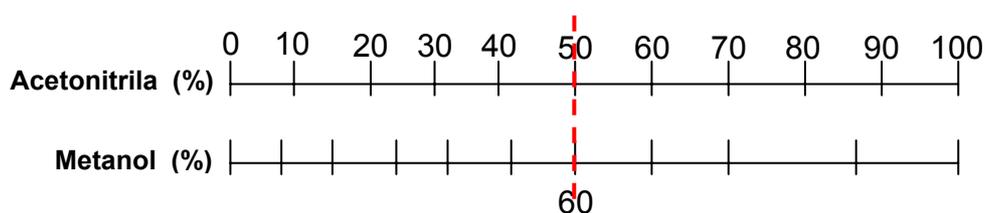


Figura 4.4 - Nomógrafo para modo reverso de eluição, com a comparação da força de eluição dos dois solventes utilizados, ACN e MeOH.

Em virtude da força de eluição, a porcentagem de acetonitrila escolhida para iniciar os testes foi de ACN/Tampão acetato 50/50 (v/v). Um planejamento de mistura foi realizado com o intuito de selecionar a fase móvel com a melhor resposta para a separação dos analitos. A Tabela 4.2 apresenta o planejamento realizado.

Tabela 4.2 - Planejamento de mistura utilizado no estudo para a separação de uma mistura de atrazina, simazina e propazina.

Experimento	Fase móvel ACN/Tampão 50/50 (v/v)	MeOH/H ₂ O 60/40 (v/v)
1	0%	100%
2	100%	0%
3	50%	50%
4	67%	33%
5	84%	16%
6	33%	67%
7	16%	84%

A figura 4.5 apresenta uma separação de atrazina, simazina e propazina com a fase móvel ACN/Tampão 50/50 (v/v).

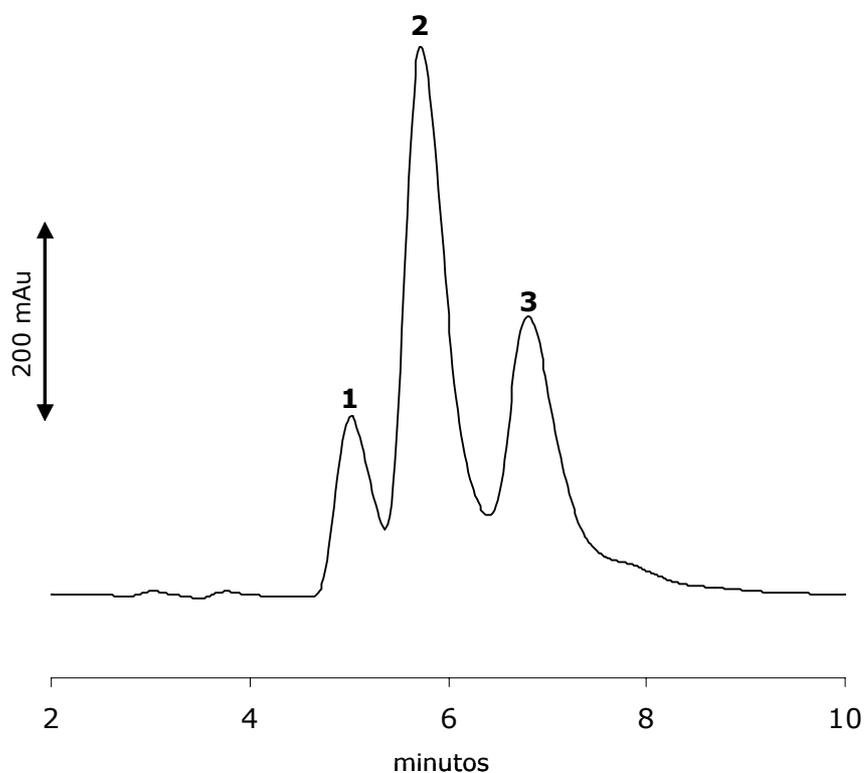


Figura 4.5 - Separação de uma mistura de padrões de simazina (1), atrazina (2) e propazina (3) por CLAE utilizando como fase móvel ACN/Tampão 50/50 (v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL, coluna C18 e detecção em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 33,3 mg/L. Experimento 2.

As figuras 4.3, 4.5 e 4.6 apresentam os cromatogramas com as misturas de fase móvel do planejamento realizado. Como pode ser observado, a fase móvel que apresenta maior influência na separação é ACN/Tampão. Isto pode ser observado, pois com o aumento da proporção de ACN/Tampão a variação dos perfis dos analitos é bem significativa, já com o aumento da proporção da mistura MeOH/H₂O não há muita alteração no perfil do cromatogramas. Um outro motivo que levou a escolha da fase móvel ACN/Tampão foi o tempo de análise, pode-se observar que quanto maior a proporção de MeOH/H₂O maior o tempo de análise. A Tabela 4.3 apresenta as proporções de fase móveis utilizadas na figura 4.6.

Tabela 4.3- Fases móveis utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina em um planejamento de experimentos.

Experimento	Fase móvel
A	16% ACN/Tampão/ 84% MeOH/H ₂ O
B	33% ACN/Tampão/ 67% MeOH/H ₂ O
C	50% ACN/Tampão/ 50% MeOH/H ₂ O
D	67% ACN/Tampão/ 33% MeOH/H ₂ O
E	84% ACN/Tampão/ 16% MeOH/H ₂ O

Portanto a fase móvel escolhida para os estudos subseqüentes foi ACN/Tampão.

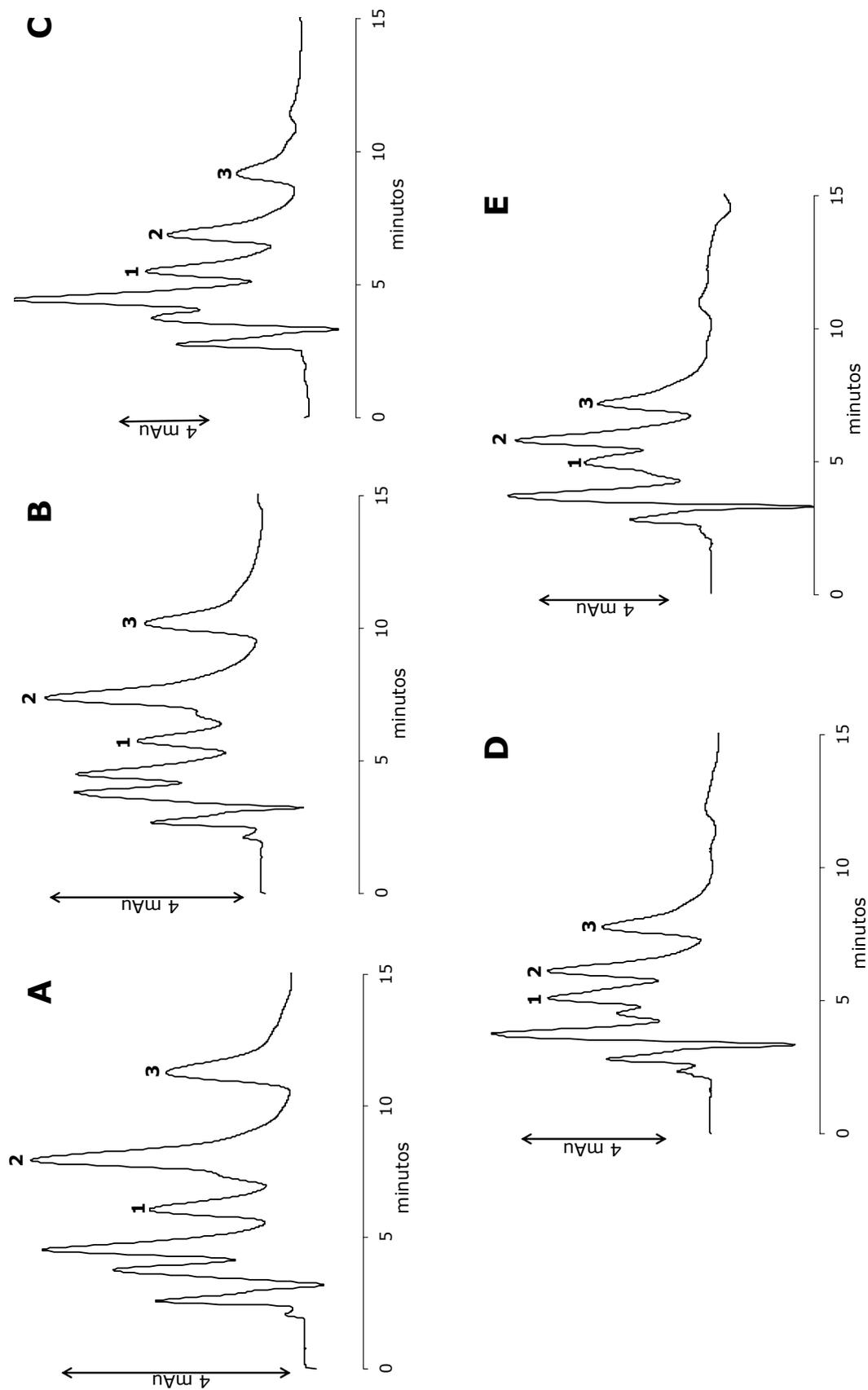


Figura 4.6 - Cromatogramas de misturas de padrões de Simazina (1), Atrazina (2) e Propazina (3) por CLAE utilizando como fase estacionária coluna C18, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, detecção em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 3,3 mg/L. As fases móveis utilizadas estão descritas na tabela 4.3.

4.3.3.2 Otimização da fase móvel

Uma vez que os estudos preliminares apontaram a mistura ACN/Tampão como a mais adequada para a separação de simazina, atrazina e propazina, um novo estudo levando em consideração a variação da proporção ACN/Tampão acetato de sódio pH 4,5, 2,5 mmol/L foi realizado.

As proporções investigadas variaram entre ACN/Tampão 70/30 (v/v) até ACN/Tampão 30/70 (v/v), conforme descrito na tabela 4.4. Os cromatogramas da figura 4.7 ilustram o perfil de separação das s-triazinas estudadas.

Como pode ser observado o aumento da proporção em tampão na fase móvel aumenta a sua polaridade e favorece a separação.

A ordem de eluição pode ser explicada pela variação da polaridade dos analitos, ou seja, compostos mais polares, possuem menor afinidade pela fase estacionária C18, saindo com tempos de retenção menores. Com isto, podemos concluir que dos três compostos analisados até o momento, a ordem decrescente de polaridade é a seguinte: **simazina > atrazina > propazina**. Essa afirmação pode ser também confirmada por uma análise da estrutura química de cada substância. Compostos com maior número de ramificações metil, possuem polaridades menores, um exemplo disto é quando se compara a propazina e a simazina. Uma observação que deve ser feita em relação a estas substâncias é o seu pKa, a simazina possui pKa igual a 1,65; atrazina pKa 1,68 e propazina pKa 1,85; todos abaixo de 2. Assim, no pH da fase móvel (4,5), todas as substâncias estão neutras.

Tabela 4.4 apresenta as fases móveis utilizadas na otimização da separação de atrazina, simazina e propazina, ilustrada na figura 4.7.

Tabela 4.4 - Fases móveis utilizadas na separação de atrazina, simazina e propazina em uma otimização da separação com a fase móvel ACN/Tampão.

Experimento	Fase móvel
A	30/70 (v/v) ACN/Tampão
B	35/65 (v/v) ACN/Tampão
C	40/60 (v/v) ACN/Tampão
D	45/55 (v/v) ACN/Tampão
E	65/35 (v/v) ACN/Tampão
F	70/30 (v/v) ACN/Tampão

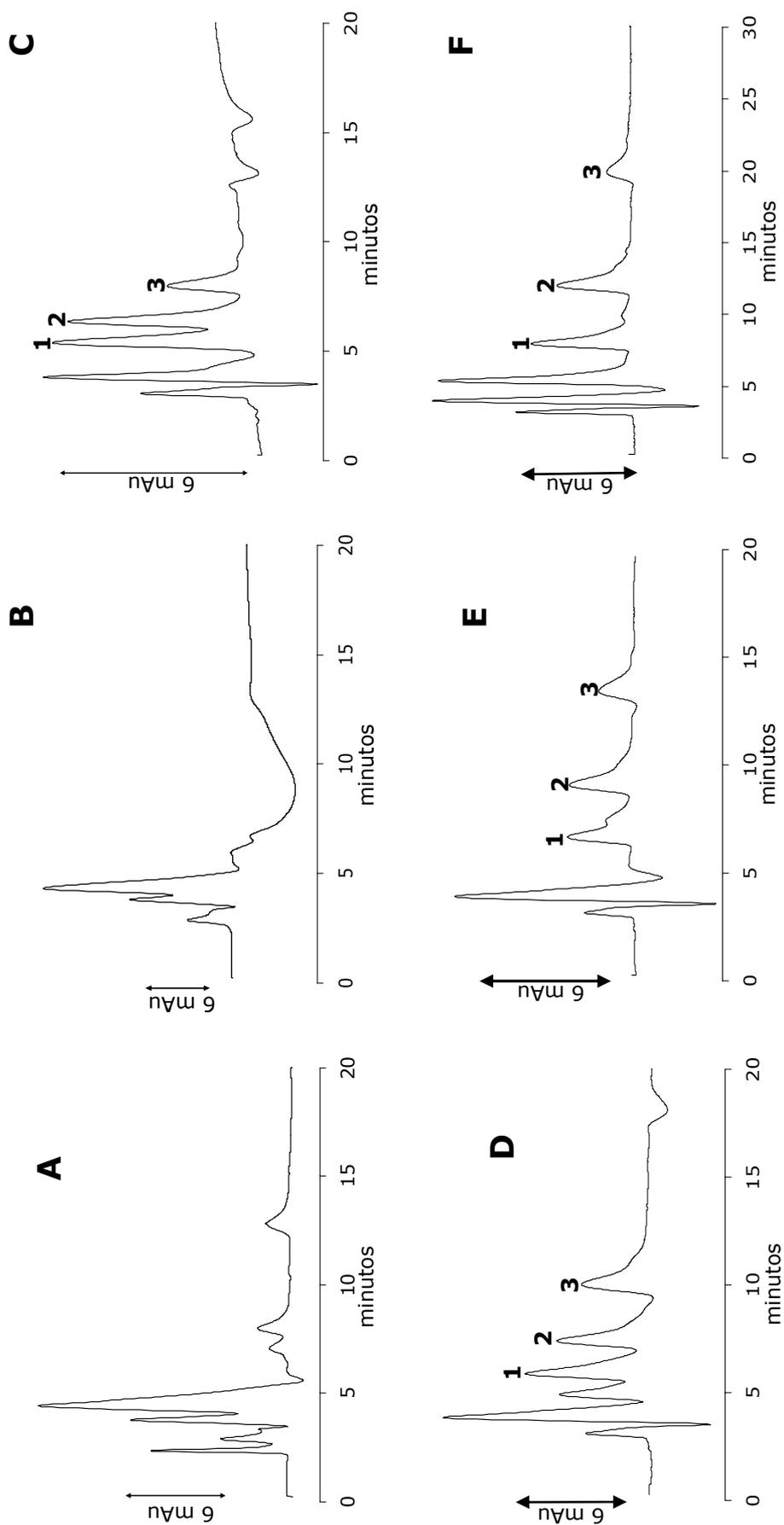


Figura 4.7 - Cromatogramas de misturas de padrões de Simazina (1), Atrazina (2) e Propazina (3) com diferentes proporções de fase móvel ACN/Tampão, utilizando como fase estacionária coluna C18, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detecção em 221 nm. Os analitos foram preparados na concentração de 3,3 mg/L. As proporções de fase móvel utilizadas encontram-se na tabela 4.4..

Para a escolha da fase móvel mais eficiente na separação, foi realizado o cálculo da resolução. O valor ideal para se ter de resolução entre os pares de picos adjacentes é acima de 1,5, pois ocorre uma boa separação. A Tabela 4.5 apresenta o valor da resolução para os pares adjacentes de analitos nas fases móveis estudadas.

Tabela 4.5 - Cálculo da resolução entre os picos adjacentes para as diferentes fases móveis testadas para misturas de 1mg/L com fluxo de 1 mL/min, coluna C18 e detecção em 221 nm..

Fase móvel	Resolução		Resolução	
	Simazina	Atrazina	Atrazina	Propazina
30:70 (v/v) ACN:Tampão	1,614		2,796	
35:65 (v/v) ACN:Tampão	0,882		1,101	
40:60 (v/v) ACN:Tampão	0,798		0,945	
45:55 (v/v) ACN:Tampão	0,785		1,143	

Com os cálculos da resolução a melhor fase móvel a ser utilizada para a separação e quantificação da simazina, atrazina e propazina é a fase móvel ACN/Tampão 30/70 v/v, já que dentre as proporções testadas foi à única que apresentou resolução acima de 1,5 para os três analitos estudados.

4.3.3.3 Mudança de solvente aquoso

Após determinar a proporção de cada solvente na fase móvel, resolveu-se testar a troca do solvente aquoso tampão acetato de sódio pH 4,5 2,5 mmol/L, para a água ultra pura, visto que o uso de sais durante prolongado tempo, diminui o tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

A Tabela 4.6 apresenta a comparação das resoluções entre os picos adjacentes utilizando as fases móveis ACN/H₂O e ACN/Tampão acetato.

Tabela 4.6-Resolução dos pares adjacentes com fase móvel ACN/H₂O e ACN/Tampão para misturas de 1mg/L, utilizando coluna C18 e fluxo de 1 mL/min e detecção em 221 nm.

Fase móvel	Resolução		Resolução	
	Simazina	Atrazina	Atrazina	Propazina
30/70 (v/v) ACN:Tampão	1,61			2,80
30/70 (v/v) ACN:H ₂ O	1,91			2,03

Como a separação entre atrazina e simazina utilizando ACN/H₂O 30/70 (v/v) apresentou uma resolução maior, que em ACN/Tampão, e o uso de H₂O é melhor para a coluna analítica, esta fase móvel foi escolhida.

4.3.3.4 Avaliação da separação cromatográfica

A tabela 4.7 apresenta os valores de t_R , k' , R e α para a separação da mistura de atrazina, simazina e propazina, utilizando a coluna Zorbax C18 300SB, ACN:H₂O 30:70 (v/v), fluxo 1 mL/min e detecção em 221 e 230 nm.

Tabela 4.7- Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação das triazinas nas melhores condições cromatográficas.

Triazina	t'_R	k'	R	α	N/m
Simazina ¹	2,61	1,74	1,91 ($R_{1,2}$)	1,84 ($\alpha_{1,2}$)	$1,4 \times 10^4$
Atrazina ²	4,80	3,20	2,03 ($R_{2,3}$)	1,86 ($\alpha_{2,3}$)	$0,9 \times 10^4$
Propazina ³	8,94	5,96			$1,1 \times 10^4$

$t_M = 1,50$ min.

N/m = números de patros teóricos por metro

O t_M foi determinado através da observação do primeiro pico encontrado no cromatograma.

Os valores encontrados para k' , R e α estão de acordo com os valores encontrados para a literatura como ideais. Isso demonstra que há eficiência aceitável para a separação dos três compostos.

4.3.4 Avaliação da metodologia

Apesar da metodologia analítica não ter sido validada, algumas figuras de mérito para validação foram avaliados: curva analítica, sensibilidade, limites de detecção, limite de quantificação e recuperação.

4.3.4.1 Curva analítica

A reta que melhor se ajusta à distribuição dos pontos para obtenção das relações entre duas ou mais variáveis é expressa por $y = f(x)$. Para a avaliação da falta de ajuste do modelo a análise dos resíduos é fundamental. Logo, o procedimento usual para avaliação do modelo começa pela análise dos desvios das observações em relação à média global.

Supondo-se que a relação entre x e y é uma reta, o modelo que descreve esta relação é:

$$y = b_1x + b_0 \quad \text{(equação 2)}$$

Onde:

y = resposta medida (sinal)

x = concentração

b_1 = inclinação da curva analítica (coeficiente angular)

b_0 = interseção com o eixo y , quando $x = 0$ (coeficiente linear)

Para quantificar a qualidade do ajuste das retas e verificar se os modelos são lineares, calculam-se os coeficientes de determinação ou de explicação das retas (R^2).

O coeficiente de determinação (R^2) é o quadrado do coeficiente de correlação (r), que é a medida do grau de associação entre as variáveis x e y e também da proximidade dos dados a uma reta. R^2 é chamado de variação percentual explicada pelo modelo, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y .

Os gráficos de resíduos também devem ser construídos para verificar se suas distribuições são aleatórias. Este gráfico é obtido plotando-se no eixo x os valores das concentrações reais adicionadas, e no eixo y os valores dos resíduos, que é a diferença entre os valores encontrados e os valores calculados (pelo modelo) de concentração de cada analito.

Um importante fator que deve ser calculado é a existência ou não da falta de ajuste do modelo. Isto é calculado através do teste F. Só faz sentido utilizar o modelo se ele se mostrar capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio da *Análise de Variância*. Se o modelo estiver bem ajustado, a média quadrática devida à falta de ajuste reflete apenas os erros aleatórios, portanto deve ser aplicado o teste F que relaciona as variâncias dos resíduos e das medidas encontradas⁵.

A figura 4.8 apresenta as curvas analíticas com seus respectivos resíduos e os modelos de cada composto. Como pode ser observado, nem todos os modelos apresentados são lineares.

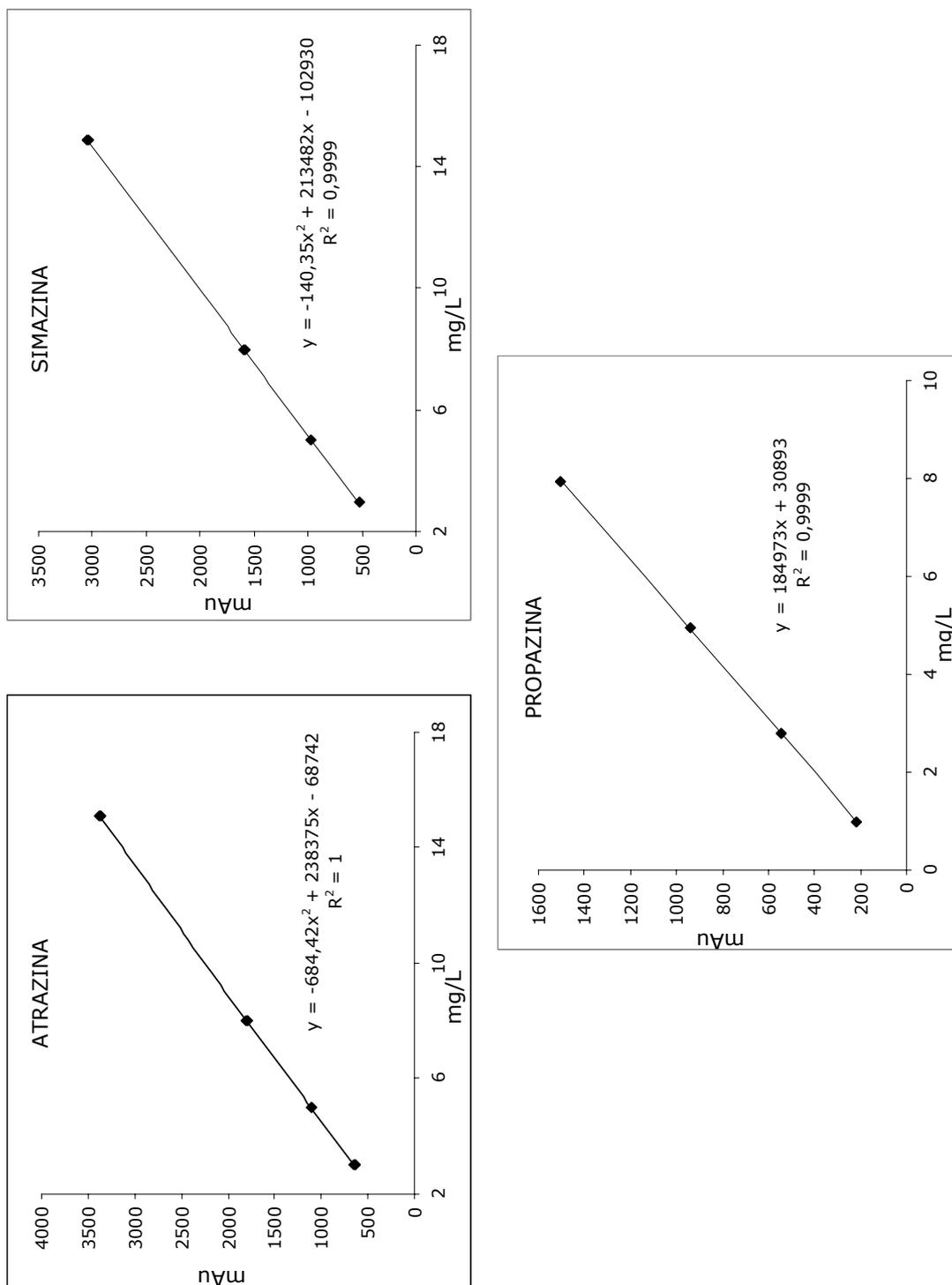


Figura 4.8 – Curvas analíticas para atrazina, simazina e propazina.

Como pode ser observado, todos os compostos apresentam modelos com $R^2 > 0,999$. O teste F para verificação da falta de ajuste foi calculado, e seus valores encontram-se na tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores calculados para o teste F.

Triazina	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$
Atrazina	3,00	3,71
Simazina	3,77	6,95
Propazina	4,98	6,59

Com estes valores é possível afirmar que os compostos não possuem falta de ajuste, e, portanto o modelo apresentado representa bem à reta..

4.3.4.2 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

É a menor concentração de analito presente na matriz que pode ser detectada, independentemente do ruído, nas condições de ensaio. Pode ser calculada através da relação sinal/ruído, conforme a equação 3.

$$LOD = \frac{3xS_bxC_s}{H_{máx} - H_{min}} \quad \text{(equação 3)}$$

Onde:

S_b = desvio padrão da linha base;

C_s = a concentração do analito;

$H_{máx}$ = altura máxima do pico

H_{min} = altura da linha base.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Pode ser calculado da mesma maneira que o limite de detecção, porém utilizando a relação 10:1 através da equação 4.

$$LOQ = \frac{10xS_bxC_s}{H_{m\acute{a}x} - H_{m\acute{i}n}} \quad \text{(equação 4)}$$

Onde:

S_b = desvio padrão da linha base;

C_s = a concentração do analito;

$H_{m\acute{a}x}$ = altura máxima do pico

$H_{m\acute{i}n}$ = altura da linha base.

A Tabela 4.9 apresenta os valores de LOD e LOQ obtidos em padrões de atrazina, simazina e propazina.

Tabela 4.9 – Valores de LOD e LOQ para simazina, atrazina e propazina.

Triazinas	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Atrazina	4,80	16,0
Simazina	7,53	25,1
Propazina	8,53	28,4

Os valores de LOD e LOQ encontrados apesar de serem baixos não compreendem o valor de limite máximo permitido segundo a CONAMA para atrazina e simazina (2 µg/L) em água doce. Para análise de amostras de água seria necessária então uma etapa de pré-concentração da amostra.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que foi possível desenvolver um método rápido, simples e eficiente, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para análise simultânea de atrazina, simazina e propazina.

As condições cromatográficas foram otimizadas através do estudo da melhor composição de fase móvel. A fase móvel ACN/H₂O 30/70 (v/v) foi a que permitiu a melhor separação cromatográfica, avaliada através da análise dos parâmetros cromatográficos k' , α e R .

O comprimento de onda utilizado na determinação foi de 221 nm, pois permitiu uma boa sensibilidade para as triazinas estudadas.

As recuperações obtidas para atrazina e propazina estavam em conformidade com a faixa de recuperação aceitável para amostras ambientais que é de 80-110%, segundo a norma EC/2002/657^o, porém a simazina não se comportou como os outros herbicidas, apresentando uma recuperação de 69%.

REFERÊNCIAS

1. 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. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 463-469, 2000.
2. Baranowska, I.; Barchan´ska, H.; Pacak, E.; Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. **Environmental Pollution**, v. 143, p. 206-211, 2006.
3. Katsumata, H.; Kaneco, S.; Suzuki, T.; Ohta, K.; Determination of atrazine and simazine in water samples by high performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, n. 2, p. 214-219, 2006.
4. Abate, G.; Masini, J.C.; Sorption of Atrazine, Propazine, Deethylatrazine, Deisopropilatrazine and Hydroxyatrazine onto Organovermiculite. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 16, n 5, p. 936-943, 2005.
5. Pimentel, M. F.; Neto, B. B.; Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química nova**, v. 19, n. 3, 1996.
6. Norma EC/2002/657. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu>>. Acesso em 03 abr. 2009.

Capítulo 5

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA
E DERIVADOS POR CLAE*

5.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo foi proposto o desenvolvimento de uma nova metodologia para separação de atrazina e derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram realizados testes com a coluna Zorbax utilizada no capítulo 4, porém não foi obtido resultado satisfatório, tendo em vista este acontecimento, uma coluna com um comprimento maior e mesma fase estacionária foi utilizada na separação.

Devido a grande diferença de polaridade dos compostos analisados, foi utilizado o cartucho de extração Oasis MCX no pré-tratamento das amostras.

Nesta separação foi utilizado um gradiente de eluição com a fase móvel contendo ACN e Tampão fosfato de sódio 5 mmol/L pH 7,2. Apesar do tempo de análise elevado (70 min), esta metodologia permite a quantificação da atrazina e seus produtos de degradação. A relevância no desenvolvimento deste método é a identificação dos produtos de degradação de atrazina que podem estar presentes em águas, solos ou até biocombustíveis.

5.2 OBJETIVO

- Desenvolver metodologia analítica por meio de cromatografia líquida de alta eficiência para a análise de atrazina e derivados.
- Otimizar metodologia de extração em fase sólida para análise de atrazina e derivados.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Seleção do comprimento de onda de máxima absorvância para análise de atrazina e derivados.

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorvância dos compostos foram realizadas duas varreduras de 190 a 300 nm. Uma varredura foi realizada solubilizando os compostos em acetonitrila e outra varredura foi realizada solubilizando os compostos em tampão fosfato 5 mmol/L pH 7,28.

Como a determinação de atrazina e derivados é mais complexa que separação de atrazina, simazina e propazina, pois possui compostos com polaridades muito diferentes, foi necessário utilizar eluição por gradiente. Como os solventes para eluição escolhidos foram acetonitrila e tampão fosfato de sódio 5mmol/L pH 7,2; a determinação do comprimento de onda de máxima absorvância também foi determinada nestes solventes.

As figura 5.1 e 5.2 apresentam os espectros UV-Vis de cada composto.

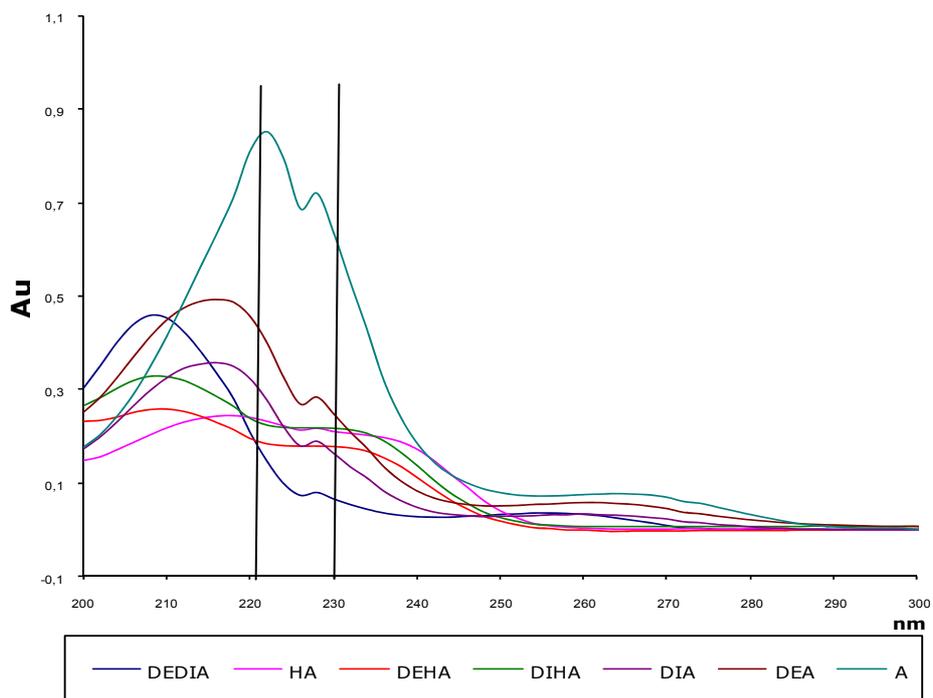


Figura 5.1- Espectros na região do UV dos padrões de atrazina e derivados. As varreduras foram realizadas com 0,150 µmol/L de cada padrão solubilizados em tampão fosfato de sódio.

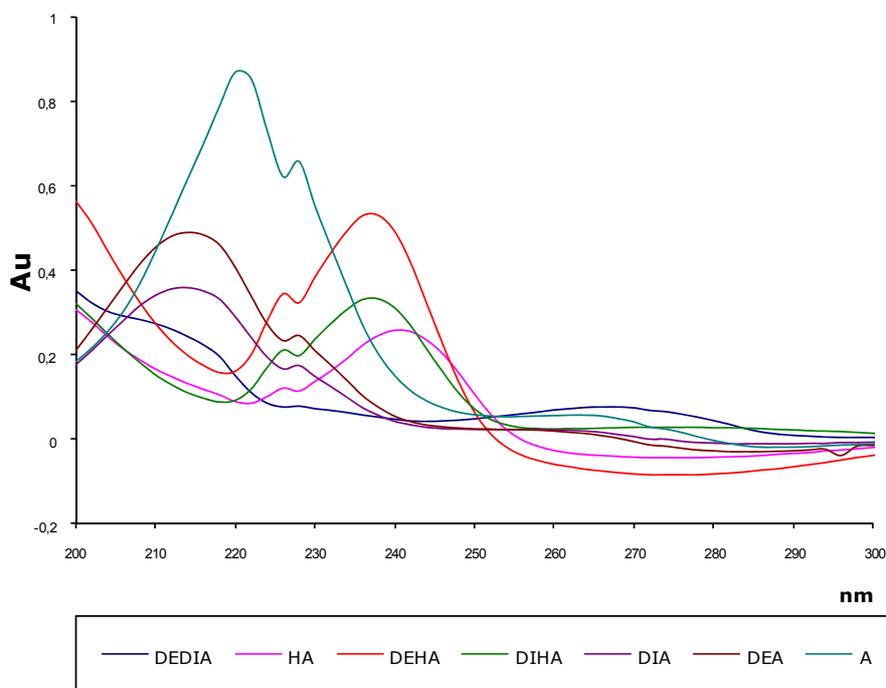


Figura 5.2- Espectros na região do UV dos padrões de atrazina e derivados. As varreduras foram realizadas com 0,150 µmol/L de cada padrão solubilizados em acetonitrila.

De acordo com os resultados apresentados nas figuras 5.1 e 5.2, os comprimentos de onda 221 e 230 foram selecionados para as análises por CLAE e EC.

5.3.2 Desenvolvimento de metodologia para determinação de atrazina e derivados por CLAE

Para a determinação de atrazina e derivados por CLAE, foi testado inicialmente a mesma coluna analítica que foi utilizada na separação de atrazina, simazina e propazina, a coluna Zorbax 300 SB. Como estes compostos possuem características muito diferentes entre si, foi testado um gradiente de eluição e não uma eluição no modo isocrático.

O primeiro gradiente de eluição testado para a separação de atrazina e derivados foi um gradiente de eluição linear com tampão fosfato 5 mmol/L pH 7,2 por 60 min de 2-90% de ACN com fluxo de 1 mL/min encontrado na literatura na separação de atrazina e alguns produtos de degradação¹. A figura 5.3 apresenta o cromatograma de uma mistura de atrazina e derivados. Como pode ser observado, não se pode afirmar nada a respeito da separação dos compostos.

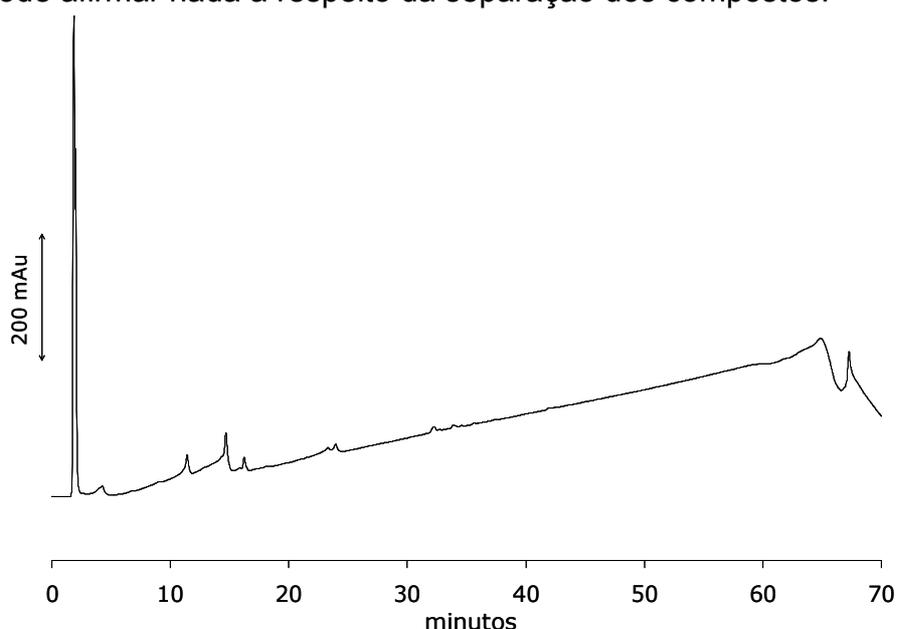


Figura 5.3 - Cromatograma da separação de uma mistura de atrazina e derivados por CLAE utilizando a coluna Zorbax 300SB com gradiente de eluição linear 2-90% de ACN.

Buscou-se na literatura outros gradientes de eluição que realizassem a separação de atrazina e derivados. Para esta mistura de padrões proposta em nosso trabalho nenhum artigo de separação por CLAE foi encontrado.

Encontrou-se um trabalho que realizava a separação de DIA, DEA, HA, e atrazina utilizando uma coluna C8 e como fase móvel ACN/H₂O (pH 7), neste trabalho os autores utilizaram um gradiente de eluição iniciando com 85% de tampão². Em virtude deste trabalho, resolveu-se iniciar a separação com 90% de tampão na fase móvel. Não foi obtido nenhum resultado satisfatório. A partir daí foi-se aumentando a porcentagem inicial de tampão até que chegasse a 100% de tampão na fase móvel como proporção inicial. Um gradiente linear foi testado de 100% a 30% de tampão em 60 minutos com 10 minutos de estabilização a fase móvel inicial, totalizando em uma corrida de 70 minutos. Este gradiente não apresentou uma boa separação, porém pode-se observar alguns picos. Outros testes com fase móvel segmentada foram testadas até que se chegasse ao gradiente de eluição que separasse todas as triazinas. A tabela 5.1 apresenta o gradiente de eluição utilizado na separação.

Tabela 5.1 - Gradiente de eluição para separação de atrazina e derivados com a coluna shimpack, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL/min e detecção a 221 nm.

Tempo (minutos)	Acetonitrila (%)	Tampão fosfato de sódio (%)
0 - 15	0 - 10	100 - 90
15 - 45	10 - 70	90 - 30
45 - 60	70 - 0	30 - 100
60 - 70	0	100

A figura 5.4 apresenta a separação de atrazina e derivados através do método gradiente descrito na tabela 5.1.

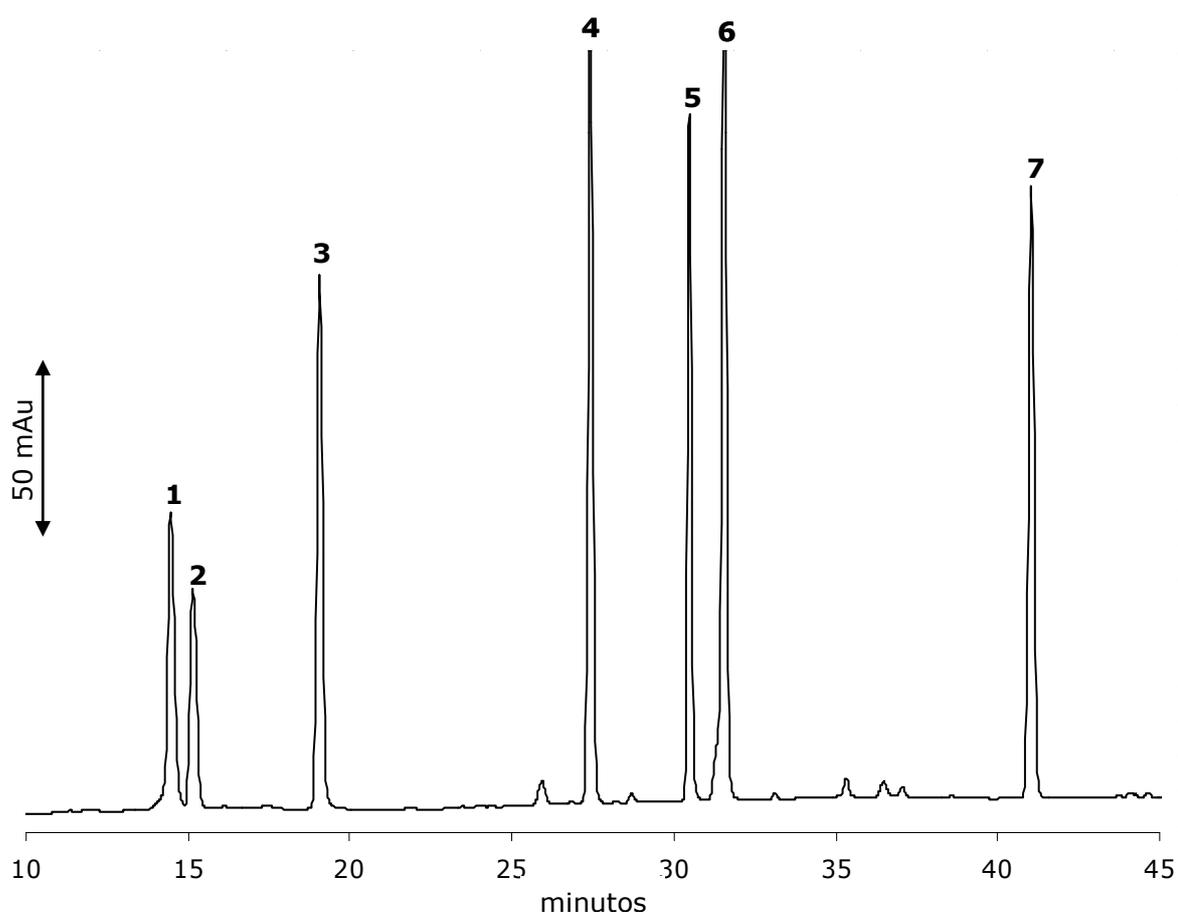


Figura 5.4 - Cromatograma de uma mistura de padrões de atrazina e derivados utilizando a coluna Shimpack, volume de injeção de 20 μ L, fluxo de 1 mL/min, detecção a 221 nm com as condições de eluição da tabela 5.1. Onde 1- DIHA; 2-DEDIA; 3-DEHA; 4-DIA; 5-HA; 6-DEA e 7-atrazina na concentração de 30 mg/L cada analito.

Estudos demonstram que o uso de tampão não influencia na ordem de eluição, pois os compostos só estarão protonados em $\text{pH} < 1,5$, porém proporciona uma melhora na simetria dos picos. A ordem de eluição está diretamente relacionada à polaridade dos compostos. No início da separação os compostos mais polares eluem com maior facilidade, devido ao fato de se iniciar a análise com uma alta proporção do solvente mais polar. Conforme a polaridade é diminuída com o aumento da proporção de ACN, os outros compostos são eluídos.

O efeito indutivo $-I$ mais forte do íon OH^- na posição 2 que o íon Cl^- , gera um aumento na densidade de carga no anel da triazina, em particular no átomo N das posições 1 e 3, fazendo com que a espécie fique mais polar e com menor afinidade pela fase estacionária. Porém os radicais C_2H_5 e C_3H_5 possuem efeito indutivo $+I$, doando carga para estabilizar o anel. Portanto a ordem de eluição não pode ser

explicada somente pelo substituinte do anel na posição 2 mas sim por todos os radicais existentes.

5.3.3 Extração em fase sólida

Como os compostos possuem polaridades e características muito diferentes, procurou-se na literatura um modo de extraí-los de um meio aquoso sem precisar passar por várias etapas. Neste contexto, avaliou-se a extração em fase sólida utilizando o cartucho Oasis MCX, que foi descrito pelo fabricante como excelente cartucho para a extração e recuperação dos analitos propostos.

Este cartucho possui dois mecanismos de retenção, o primeiro por troca iônica, ou seja, retendo compostos ionizados e o segundo por adsorção, já que possui uma fase reversa (C18) que atrai compostos menos polares.

As etapas de condicionamento e eluição do cartucho estão descritas no esquema da figura 5.5. Antes de iniciar a etapa de extração, a amostra foi acidificada com ácido clorídrico (pH~1,5). Como pode ser observado, inicialmente condiciona-se o cartucho com acetonitrila e água, posteriormente passa-se a amostra pelo cartucho. Condiciona-se com ácido e posteriormente com acetonitrila este eluato é chamado de solvente de condicionamento. Para a eluição, passa-se acetonitrila com 4% (v/v%) de hidróxido de amônio, este eluato é chamado de solvente de extração.

Por este cartucho ser de troca iônica, é necessário a adição de HCl após a adição da amostra para ativar os sítios que por ventura não estejam ligados a nenhum dos analitos. Já a segunda adição de ACN é para a retirada de qualquer resíduo da amostra que tem ficado adsorvido no cartucho e evitar uma interferência na análise por CLAE.

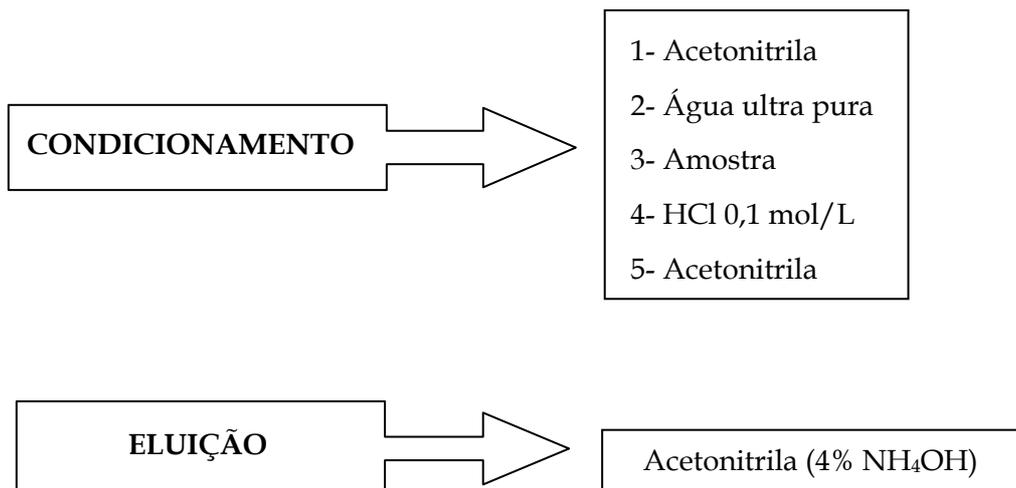


Figura 5.5 - Procedimento de extração em fase sólida utilizando o cartucho Oasis MCX.

O procedimento de extração foi realizado conforme descrito pelo fabricante do cartucho. A única modificação implementada foi a troca do solvente orgânico de metanol para acetonitrila. Essa modificação foi realizada em virtude de se utilizar acetonitrila como solvente dos padrões.

Foi observado que quando as triazinas foram extraídas juntas, os padrões hidroxilados (DIHA, DEHA, HA) eram retidos completamente enquanto os outros padrões não possuíam este mesmo perfil. Isto provavelmente ocorre devido ao fato de ter sido adicionado a amostra antes de ser introduzida no cartucho, ácido clorídrico suficiente para diminuir o pH tornando o meio. Como os compostos que não são hidroxilados possuem um pKa muito baixo, eles podem não estar totalmente protonados e portanto sofrem apenas a ação de adsorção e não de troca iônica no cartucho de extração. Portanto ao extrair todos os compostos juntos, foi necessário que todos estivessem em concentrações muito baixas, para que fossem retidos completamente.

Quando as triazinas foram extraídas separadamente a concentração de extração era maior.

A recuperação dos analitos foi calculada com valores de concentração dos analitos do terceiro ponto da curva analítica após serem passados pelo cartucho de extração. Como pode ser observado na figura 5.6 o cartucho de extração permite o cálculo de recuperação para cinco compostos, já que os dois primeiros picos coeluem e não é possível calcular a recuperação.

O cromatograma da figura 5.6 apresenta o perfil de eluição dos compostos no solvente de extração, ou seja, no eluato e no solvente de condicionamento, todos solventes utilizados para condicionar o cartucho (ACN, H₂O, HCl, amostra). Como pode ser observado, ocorre a passagem de padrão de atrazina pelo cartucho quando a extração é realizada com uma mistura de todos os padrões em uma concentração elevada.

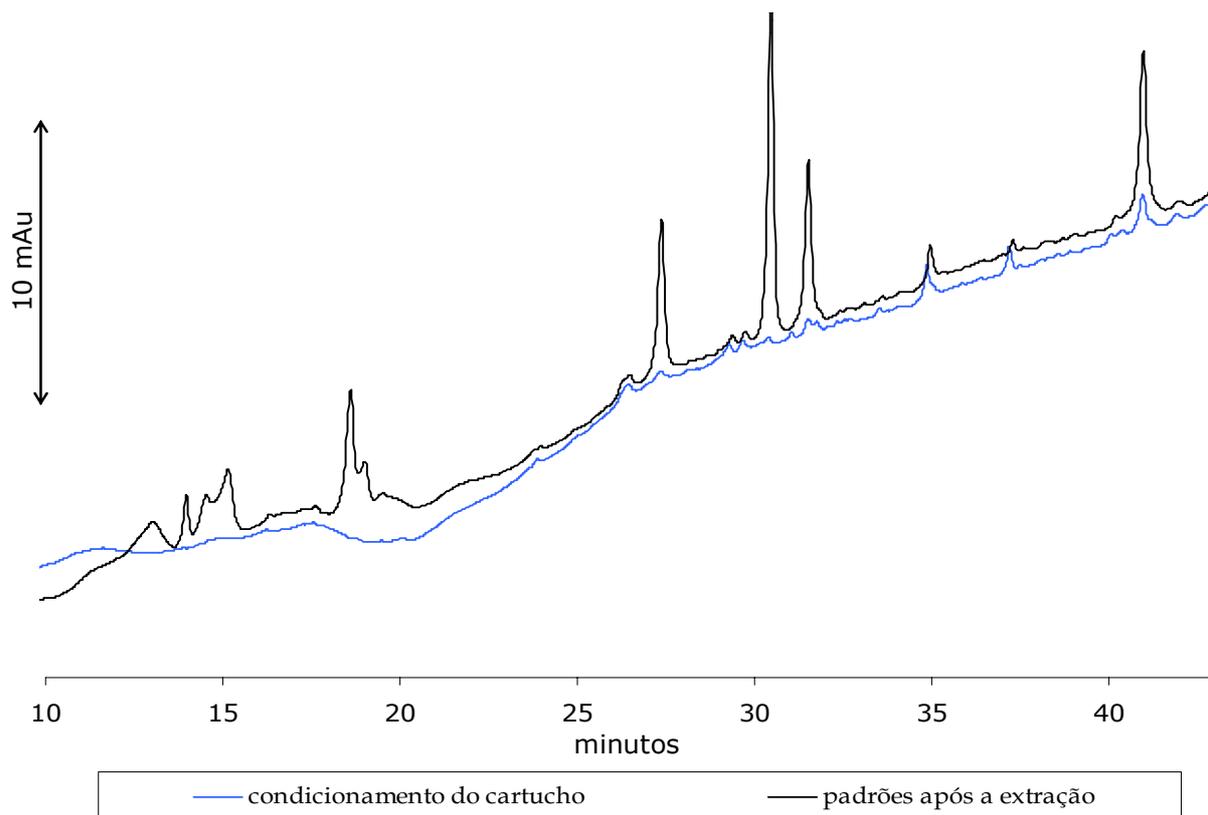


Figura 5.6 - Cromatograma de uma mistura de atrazina e derivados com os solventes de condicionamento e o solvente de eluição com os padrões.

Este resultado demonstra que a etapa de extração é uma das mais importantes, já que as quantidades encontradas nas amostras não são elevadas.

5.3.4 Avaliação da separação cromatográfica

Assim como no capítulo 4, para avaliar a separação cromatográfica, alguns parâmetros, como tempo de retenção ajustado (t'_R), fator de retenção (k), resolução

(R) e retenção relativa (α) foram empregados. Eles foram calculados a partir de valores extraídos dos cromatogramas.

A tabela 5.2 apresenta os valores de t_R , k' , R e α para a separação da mistura de atrazina e derivados no terceiro ponto da curva analítica, utilizando as condições cromatográficas da tabela 5.1 com a coluna Shimpack C18, com um fluxo de 1 mL/min.

Tabela 5.2- Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de atrazina e derivados utilizando a coluna shimpack C18 (250 x 4,6 mm, 4,6 μ m), com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, detecção de 221 nm, e condições de eluição da tabela 5.1.

Triazina	t'_R	K'	R	α	N/m
DIHA ¹	11,22	3,56	0,67 ($R_{1,2}$)	1,06 ($\alpha_{1,2}$)	$1,1 \times 10^5$
DEDIA ²	11,90	3,78	3,75 ($R_{2,3}$)	1,32 ($\alpha_{2,3}$)	$2,6 \times 10^5$
DEHA ³	15,68	4,98	9,05 ($R_{3,4}$)	1,54 ($\alpha_{3,4}$)	$1,2 \times 10^5$
DIA ⁴	24,10	7,65	4,25 ($R_{4,5}$)	1,13 ($\alpha_{4,5}$)	$9,8 \times 10^5$
HA ⁵	27,20	8,63	1,53 ($R_{5,6}$)	1,04 ($\alpha_{5,6}$)	$7,0 \times 10^5$
DEA ⁶	28,25	8,97	11,49 ($R_{6,7}$)	1,34 ($\alpha_{6,7}$)	$5,5 \times 10^5$
A ⁷	37,73	11,98			$2,6 \times 10^5$

$t_M = 3,150$ min.

$N/m =$ números de patros teóricos por metro.

Os valores encontrados para avaliar a eficiência da separação cromatográfica foram satisfatórios, uma vez que estão quase todos em concordância com os valores encontrados na literatura como valores ideais.

Os valores dos fatores de retenção obtidos encontram-se na faixa de $1 < k' < 20$, os compostos não foram fracamente retidos ou demasiadamente retidos na coluna.

Para retenção relativa apenas um composto não se encontra dentro do valor desejado para uma excelente separação, o composto HA possui o valor de 1,04.

A resolução dos compostos foi calculada, e pode-se observar que apenas os dois primeiros compostos eluídos não estão bem separados, pois possuem um valor de resolução de 0,67, já os compostos HA e DEA que possuíram um valor abaixo do esperado para α , possui um valor de 1,53 na resolução.

5.3.5 Avaliação da metodologia

5.3.5.1 Curva analítica

A figura 5.7 apresenta as curvas analíticas e os modelos ajustados de cada composto. Como pode ser observado, nem todos os modelos apresentados são lineares.

Como pode ser observado para dois compostos (DIHA e DEDIA) os modelos não são lineares e sim quadráticos. Os gráficos de resíduos demonstram que todos os compostos apresentam homocedasticidade, ou seja, apresentam uma distribuição aleatória e não tendenciosa dos valores dos resíduos, que são a diferença entre os valores encontrados e os valores calculados (pelo modelo) de concentração de cada analito.

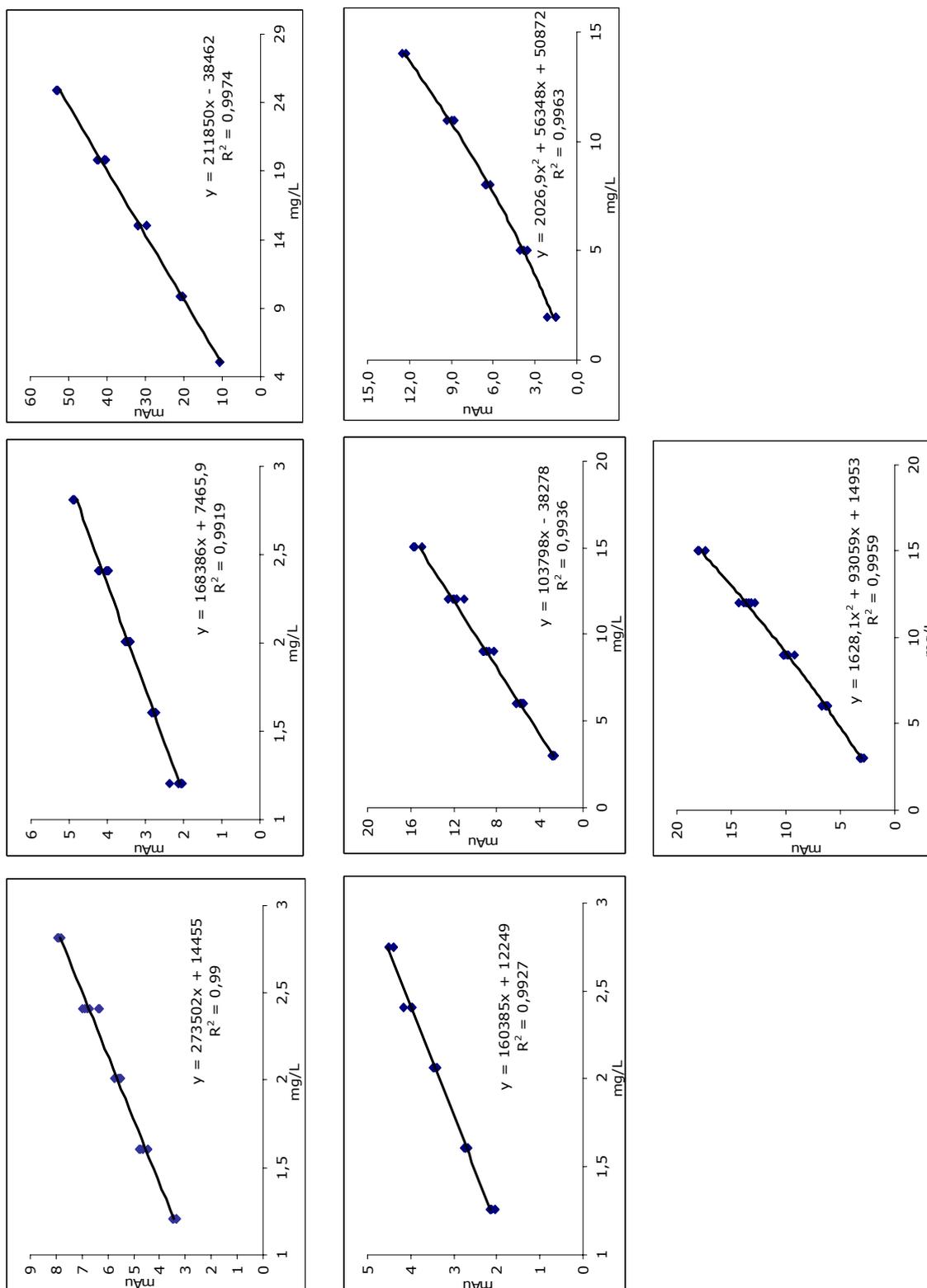


Figura 5.7 - Curvas analíticas de padrões de atrazina e seus produtos de degradação sem extração utilizando a coluna Shimpack, volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1 mL/min, detecção a 221 nm com as condições de eluição da tabela 5.1

O teste F para os compostos com modelos lineares, portanto dois graus de liberdade, apresentam como $F_{\text{tabelado } 3,9} = 3,86$, já para os compostos que apresentam modelos quadráticos o valor de $F_{\text{tabelado } 2,9} = 4,26$. Os valores de $F_{\text{calculado}}$ para cada composto está descrito na tabela 5.3.

Tabela 5.3- Valores de F para as curvas analíticas de atrazina e derivados.

Composto	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}
DEDIA	1,94	3,86
DIA	2,14	3,86
HA	0,55	3,86
DEA	1,31	3,86
A	0,65	3,86
DIHA	1,00	4,26
DEHA	0,91	4,26

Os valores de F estão todos abaixo dos valores tabelados, portanto não há evidências de falta de ajuste para nenhum dos modelos descritos no intervalo de confiança de 95%.

Nenhum dos modelos apresentam $R^2 > 0,999$, porém os gráficos de resíduos e o teste F para falta de ajuste através de análise de variância comprovam que os modelos ajustados descrevem bem a curva analítica.

5.3.5.2 Limite de detecção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ)

O cálculo do limite de detecção e limite de quantificação foi realizado de acordo com as equações descritas no capítulo 4 ítem 4.3.4.2.

A tabela 5.4 apresenta os valores de LOD e LOQ calculados para a atrazina e seus produtos de degradação.

Tabela 5.4 – Valores calculados para LOD e LOQ dos padrões de atrazina e derivados.

Triazinas	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
DIHA	287	956
DEDIA	270	901
DEHA	274	914
DIA	85	283
HA	44	146
DEA	89	298
A	86	285

Os valores calculados para os limites de detecção e quantificação são elevados tendo em vistas que as amostras que contem este herbicidas são amostras ambientais. Para a atrazina o valor máximo permite para água doce é 2 $\mu\text{g/L}$, ou seja, 43 vezes menor que o limite de detecção encontrado. Para que seja possível uma análise de uma amostra real, seria necessária uma etapa de pré-concentração.

5.3.5.3 Recuperação

Pelos cromatogramas obtidos após a extração, não é possível observar os dois primeiros picos (DIHA e DEDIA), o terceiro pico apresenta-se alargado. A tabela 5.5 apresenta os valores obtidos para recuperação.

Tabela 5.5 – Valores calculados de recuperação após a extração da atrazina e derivados com cartucho Oasis MCX.

Triazina	Recuperação (%)
DIHA	-
DEDIA	-
DEHA	-
DIA	91
HA	99
DEA	90
A	82

Os valores obtidos coincidem com o observado na figura 5.6. Os três primeiros picos não apresentam um perfil desejado, não sendo possível portanto calcular a recuperação. Os outros compostos apresentam recuperação dentro do limite para recuperação de amostras ambientais segundo a norma EC/2002/657³ que varia de 80 a 110%.

5.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram que foi possível desenvolver um método eficiente utilizando cromatografia líquida de rápida eficiência em fase reversa para análise simultânea de atrazina e DEA, DIA, HA, DEDIA, DEHA e DIHA.

As condições cromatográficas foram baseadas em estudos encontrados na literatura, e as melhores condições determinadas no presente estudo foi uma fase móvel contendo ACN/Tampão fosfato pH 7,2 5 mmol/L. Foi utilizado um gradiente segmentado devido a diferença de polaridade dos compostos. A separação cromatográfica foi avaliada através da análise dos parâmetros cromatográficos k' , α e R .

A extração foi realizada com um cartucho de modo misto, pois possui dois modos de retenção o que permite a extração de todos os compostos. Apesar de todos os compostos serem extraídos nem todos os compostos podem ser quantificados. A DIHA, DEDIA e DEHA não possuem um bom perfil de eluição após a extração, não sendo possível calcular a recuperação.

REFERÊNCIAS

1. Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero –Hernandez, E.; Sánchez-San Román, F. J.; Flores, M. G. P.; Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters; **Journal of chromatography A**, v. 950, p. 157-166, 2002.
2. Berg, M.; Muller, S.R.; Schwanenbach, R.P.; Simultaneous determination of triazines including Atrazine and their major metabolites Hydroxyatrazine, Desethylatrazine, and Deisopropylatrazine in natural waters, **Anal. Chem.**, v. 67, p. 1860-1865, 1995.
3. Norma EC/2002/657. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu>>. Acesso em: 03 abr. 2009.

Capítulo 6

*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA
E DERIVADOS POR EC*

6.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo foi proposto o desenvolvimento de uma nova metodologia para separação de atrazina e derivados por eletroforese capilar. Foi utilizada a eletroforese capilar em meio não aquoso, já que os pKas do compostos analisados são muito baixos e próximos. Um sistema de eletrólito simples foi utilizado, com a mistura de dois solventes orgânicos, apresentado um curto tempo de análise (~ 9 min). A relevância em se desenvolver o método é utilizá-lo como *screening* em reações de degradação da atrazina, em conjunto com a análise por CLAE, tendo em vista que esta é uma técnica que possui um longo tempo de análise.

A figura 6.1 apresenta as estruturas e os valores de pkas das triazinas estudadas.

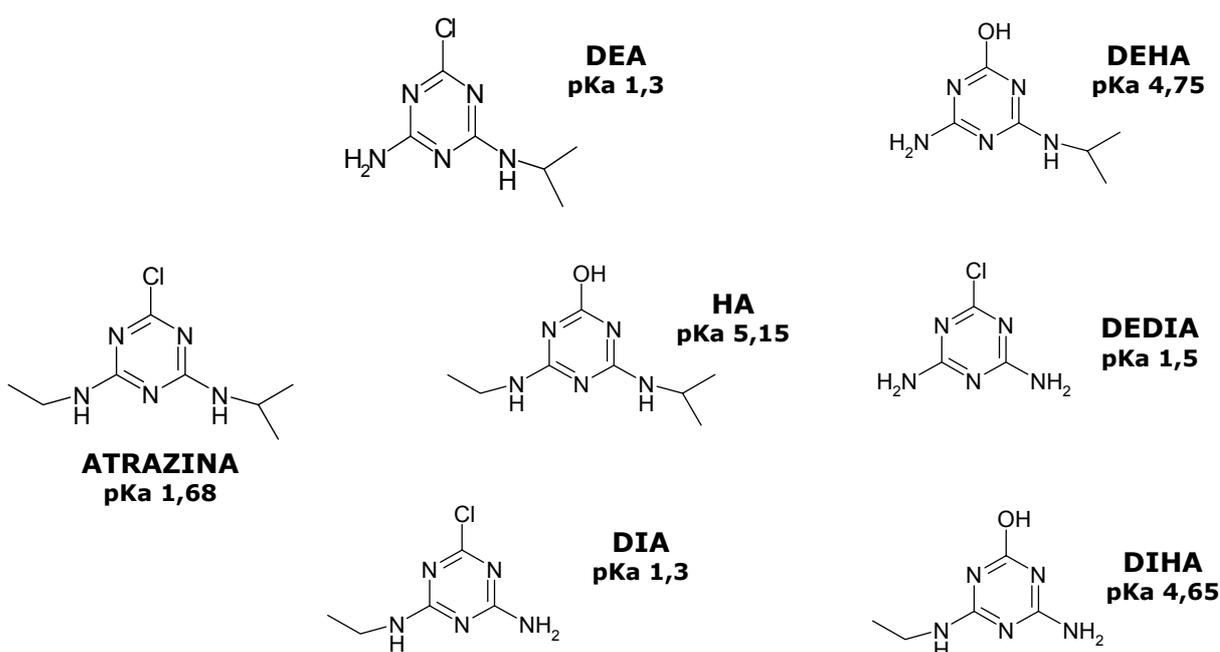


Figura 6.1 - Principais produtos de degradação da atrazina e seus respectivos pKa

6.2 OBJETIVO

- Desenvolver metodologia analítica por meio de eletroforese capilar para a determinação de atrazina e derivados.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Desenvolvimento de metodologia para determinação de atrazina e derivados por EC

O fato dos compostos possuírem valores de pKa muito baixos, foram decisivos na escolha do eletrólito de corrida. Na literatura foram encontrados alguns trabalhos que realizavam a separação de atrazina e alguns derivados por MEKC¹⁻⁶. Nestes trabalhos, não era realizada a separação dos compostos propostos em nosso trabalho. Um trabalho encontrado descrevia o uso de NACE na separação de compostos com baixo pKa⁷. Resolveu-se então testar o tampão Tris-HCl, que é um tampão simples e muito utilizado em eletroforese capilar, pois possui um pH ~ 8 em uma mistura de solventes orgânicos na separação. Neste artigo, os autores discutem que há mudança nas características ácido-base dos compostos, formando espécies protonadas que são suscetíveis a migração quando submetidas a um campo elétrico.

Os solventes orgânicos utilizados na separação foram MeOH e ACN, já que os compostos são solúveis nestes dois solventes. A tabela 6.1 apresenta as proporções dos solventes utilizadas para a solubilização do tampão Tris-HCl na separação de atrazina e derivados por EC.

Tabela 6.1- Porcentagem de solvente orgânico utilizado em cada experimento.

Experimento	Acetonitrila (%)	Metanol (%)
1	100	0
2	75	25
3	50	50
4	25	75
5	0	100

O primeiro experimento apresentado não foi realizado, pois a ACN não solubilizou o tampão Tris-HCl. Em todos os outros experimentos solubilizou-se primeiro o tampão em MeOH e posteriormente adicionou-se a ACN.

A figura 6.2 apresenta os eletroferogramas de uma mistura de atrazina e seus derivados. Como pode ser observado, os experimentos 2, 4 e 5 apresentam muito ruído na linha base.

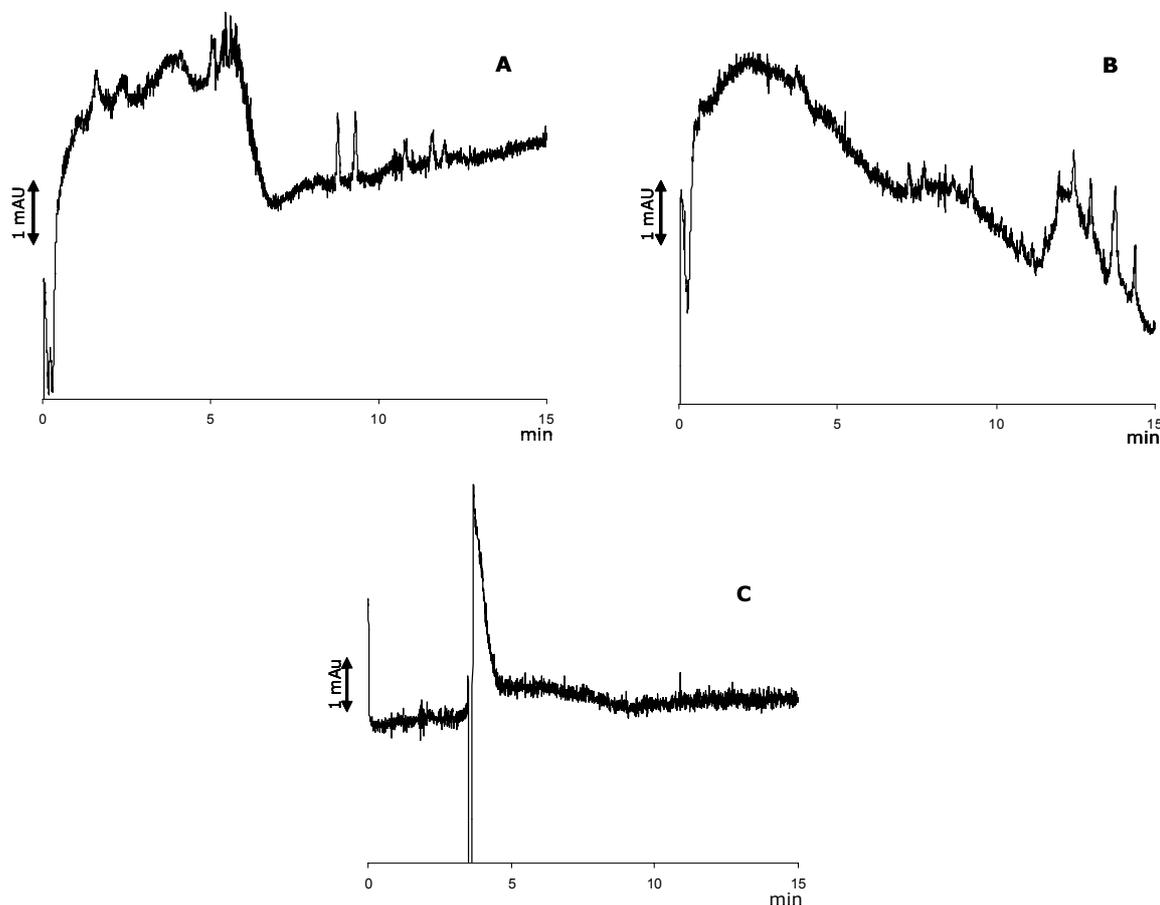


Figura 6.2- Eletroferogramas da mistura de: atrazina e derivados. Utilizando eletrólito: 100 mmol/L tampão Tris/HCl em ACN/MeOH (A) 0/100 (B) 25/75 e (C) 75/25 % (v/v), com comprimento total do capilar: 48,5 cm (comprimento efetivo: 40 cm), \varnothing i: 75 μ m, 25 °C, + 20 kV, 50mbar / 1s e detecção em 221 nm.

Os resultados para o experimento 3 (50/50 % (v/v) de ACN/MeOH) foram os melhores resultados obtidos pois apesar da coeluição de algumas triazinas, é o que possui o menor ruído na linha base. A figura 6.3 apresenta a separação de atrazina e derivados com este eletrólito. Nestas condições, só é possível visualizar 5 picos, isso ocorre devido a coeluição de três picos (HA + DEHA + DEDIA). Esta coeluição

impossibilita a quantificação dos três compostos, porém permite supor a existência de um dos três picos na análise.

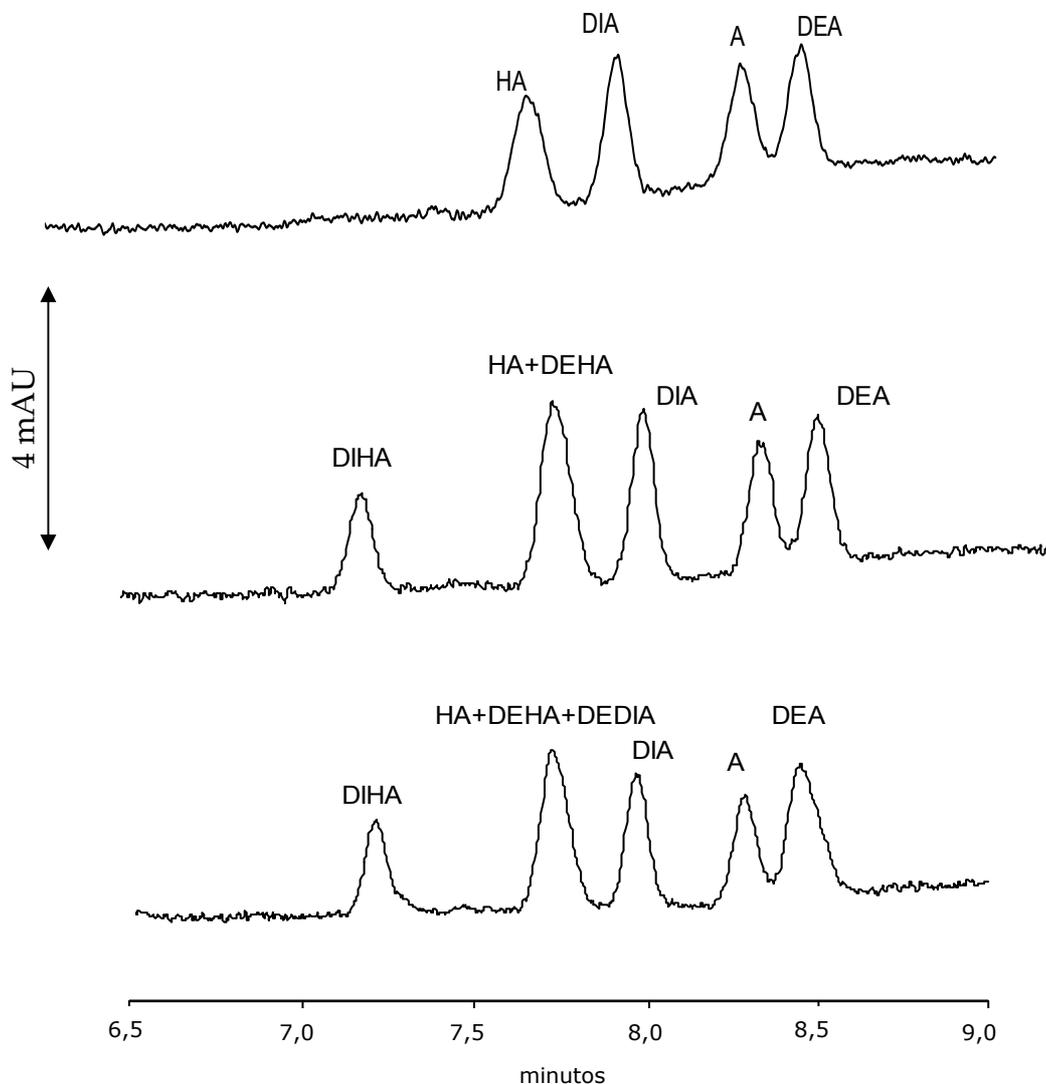


Figura 6.3- Eletroferogramas da mistura de padrões: (A) HA, DIA, A e DEA; (B) DIHA, HA, DEHA, DIA, A e DEA e (C) DIHA, HA, DEHA, DEDIA, DIA, A e DEA. Utilizando eletrólito: 100 mmol/L tampão Tris/HCl em ACN/MeOH 50/50, comprimento total do capilar: 48,5 cm (comprimento efetivo: 40 cm), d.i: 75 μ m, 25 $^{\circ}$ C, + 20 kV, 50mbar / 1s e detecção em 221 nm.

Apesar da coeluição dos picos, a probabilidade de se encontrar em amostras reais todos os compostos juntos é muito pequena. Os compostos geralmente encontrados nas degradações da atrazina são os compostos DEA, DIA e HA. Para estes compostos a metodologia desenvolvida se comporta bem, pois não há coeluição.

Uma grande vantagem da análise de atrazina e derivados por EC é que a técnica permite a análise em um curto intervalo de tempo.

6.4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo mostraram é necessário uma otimização da metodologia desenvolvida para a análise de atrazina e derivados por EC, pois existe a coeluição de três compostos.

Mesmo havendo coeluição a análise por EC pode ser utilizada como um *screening* das reações de degradação de atrazina, para análise por CLAE, devido ao curto de tempo de análise e ao simples eletrólito utilizado.

REFERÊNCIAS

1. Frias, S.; Sánchez, M.J.; Rodríguez, M.A.; Determination of triazine compounds in ground water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 503, p. 271-278, 2004.
2. Acedo –Valenzuela, M.I.; Galeano-Dfazi, T.; Díez, N.M.; Silva-Rodriguez, A.; Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 65-71, 2004.
3. Lin, C.E.; Liu, Y.C.; Yang, T.Y.; Wang, T.Z.; Yang, C.C.; On-line concentration of s-triazine herbicides in micellar electrokinetic chromatography using a cationic surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 916, p. 239-245, 2001.
4. Lin, C.E.; Hsueh, C.C.; Wang, T.Z.; Chiu, T.C.; Chen, Y.C.; Migration behavior and separation of s-triazines in micellar electrokinetic capillary chromatography using a cationic surfactant. **Journal of Chromatography A**, v. 835, p. 197-207, 1999.
5. Carabias-Martinez, R.; Rodriguez-Gonzalo, E.; Mufioz-Dominguez, A.I.; Dominguez-Alvarez, J.; Hernández-Mendez, J.; Determination of triazine herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 349-360, 1996.
6. Zhang, S. H.; Yang, Y.Y.; Han, D. D.; Wang, C.; Zhou, X.; Zang, X.H.; Wnang, Z.; Determination of triazinas hetrbicide residues in water samples by on-line sweeping concentration in micelar electrokinetic chromatography. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, p. 1487-1490, 2008.
7. Carabias-Martínéz, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Dominguez-Álvares, J.; Hernández-Méndez, J.; Determination of Triazine herbicides in natural waters by solidphase extraction and non-aqueous capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 869, p. 451-461, 2000.

Capítulo 7

BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

7.1 INTRODUÇÃO

A degradação da atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, foi avaliada através da extração do produto de degradação formado, DEA e a análise destes compostos por CLAE e a confirmação foi realizada mediante a utilização de CG-MS.

As enzimas HRP e lacase foram testadas na biodegradação da atrazina, porém não foram obtidos resultados satisfatórios.

A relevância no desenvolvimento deste método de biodegradação é a aplicação em amostras reais, como água e solo e posterior identificação e quantificação.

7.2 OBJETIVO

- Desenvolver metodologia para degradação de atrazina utilizando enzimas ou microrganismos.
- Utilizar metodologia desenvolvida para extração e análise por CLAE para análise das reações de degradação da atrazina.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Reações de degradação da atrazina com a enzima HRP

Vários meios reacionais foram testados para a degradação da atrazina com a enzima HRP, porém nenhum experimento apresentou resultados satisfatórios.

A atividade enzimática de HRP foi determinada sempre antes de cada experimento e foi determinada através da reação de oxidação do 2,4 DCP na presença da 4AAP que resulta na formação do composto corado antipirilquinonimina. As reações foram realizadas em condições de velocidade inicial e acompanhadas a 510 nm por 90 segundos. A concentração do produto antipirilquinonimina foi calculada através do seu coeficiente de extinção molar a 510 nm $\epsilon = 18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática correspondeu a formação de $1 \mu\text{mol}$ do produto por minuto. A concentração da enzima foi expressa em U/mL. As soluções de 2,4 DCP, 4-AAP, peróxido de hidrogênio e tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0 foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Ferreira-Leitão¹.

Foi encontrado na literatura um trabalho de 1991, no qual os autores, após adição de cloreto no meio reacional, mostram a degradação do herbicida atrazina com a enzima HRP². Esta metodologia utilizou extração líquido-líquido e cromatografia em camada delgada como técnica analítica de separação. De acordo com os autores, um produto mais polar dealquilado foi formado durante o processo de degradação. Eles afirmam que sem a adição de um haleto a degradação não ocorre.

Buscando-se resultados similares, foi realizado um experimento, no qual as condições reacionais descritas no trabalho acima foram reproduzidas. No entanto, utilizou-se 0,2 mmol/L de atrazina (solubilizada em metanol e em acetonitrila) e 10 U/mL de HRP, uma vez que a atividade da enzima e o solvente utilizado para solubilizar o padrão não foram descritos.

Os resultados obtidos após o tempo descrito pelos autores foram insatisfatórios, visto que não foi observado nenhum produto por cromatografia em camada delgada e nem por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Tempos

maiores de reação, em condições similares às anteriores, também foram testados sem sucesso.

Como não foram obtidos resultados satisfatórios, resolveu-se testar então as reações com a enzima lacase.

7.3.2 Reações de degradação da atrazina com a enzima lacase

A atividade enzimática de lacase foi medida sempre antes de cada experimento e foi determinada através da reação de oxidação do ABTS, que resulta na formação de um composto esverdeado. As reações foram realizadas em condições de velocidade inicial e acompanhadas a 420 nm por 90 segundos. A concentração do produto foi calculada através do seu coeficiente de extinção molar a 420 nm $\epsilon = 18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática correspondeu a formação de $1 \mu\text{mol}$ do produto por minuto. A concentração da enzima foi expressa em U/mL.

Como não foi obtido nenhum resultado satisfatório na degradação de atrazina com a HRP, utilizou-se então a enzima lacase.

Novamente nenhum resultado satisfatório foi obtido, pois nenhum produto de degradação da atrazina foi identificado.

7.3.3 Degradação da atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus*

Alguns trabalhos apresentados na literatura descrevem a degradação da atrazina por fungos da podridão branca². Dentre estes fungos os mais utilizados são: *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus pulmonaris*^{3,4,5}.

Em 1994, pesquisadores descreveram a degradação de atrazina por *Phanerochaete chrysosporium*, a qual produziu quatro metabólitos identificados como HA, DEA, DIA e DEHA. Esta degradação foi realizada por fermentação submersa de modo estático em um período de 16 dias. A caracterização das

enzimas que participaram do processo de degradação, no entanto, não foi realizada⁶.

Já na degradação da atrazina com o fungo *Pleurotus pulmonaris* por fermentação submersa sob agitação, não só os metabólitos foram identificados (DEA, DIA, DEDIA e desetilteisopropilhidroxiatrazina), como a caracterização das enzimas que participaram deste processo foi realizada. Esta caracterização foi possível graças à adição de manganês no meio de cultura, o qual favoreceu a transformação de atrazina, além de ser responsável pelo aumento da atividade das oxidases e das peroxidases^{7,8}.

Em um outro trabalho, pesquisadores estudaram a degradação de atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus* por fermentação submersa de modo estático. Eles avaliaram a porcentagem remanescente de atrazina no meio reacional após 42 dias de incubação. Entretanto, o metabólito formado não foi identificado nem a caracterização da enzima responsável pela degradação descrita³.

Em nosso trabalho, no qual a degradação da atrazina foi realizada com o *Pleurotus ostreatus* por cultivo de modo estático, a ação do fungo foi observada a partir do quinto dia de cultivo, pois o meio encontrava-se esbranquiçado devido à presença do micélio.

Na capela de fluxo laminar foi realizado o procedimento de extração e posteriormente o extrato (no próprio solvente de eluição (ACN (4% NH₄OH) foi analisado no cromatógrafo líquido com a metodologia descrita na capítulo 5. O extrato do cultivo após 5 dias de reação apresentou um pico no mesmo tempo de retenção do metabólito desetilatrazina. Nos dois controles realizados não houve a presença deste pico.

Após 10 dias de cultivo, o mesmo procedimento para análise por CLAE foi realizado. Foi obtido o mesmo perfil de eluição para a reação com cinco dias, porém foi observado um aumento na área referente a desetilatrazina, formada pela reação de degradação.

Comportamento semelhante foi obtido após 15 dias de reação, indicando a formação gradativa deste derivado.

A figura 7.1 apresenta o perfil de eluição da atrazina e do composto formado após a degradação em 5, 10 e 15 dias com seus respectivos controles. No extrato obtido no 15º dia, foi adicionado, padrão de desetilatrazina, e como pode ser observado na figura há um aumento na área do pico formado após a degradação,

indicando a presença de desetilatrazina. Apesar de não ter sido feita a quantificação do produto formado, foi possível observar o aumento na área do pico do mesmo ao longo do tempo.

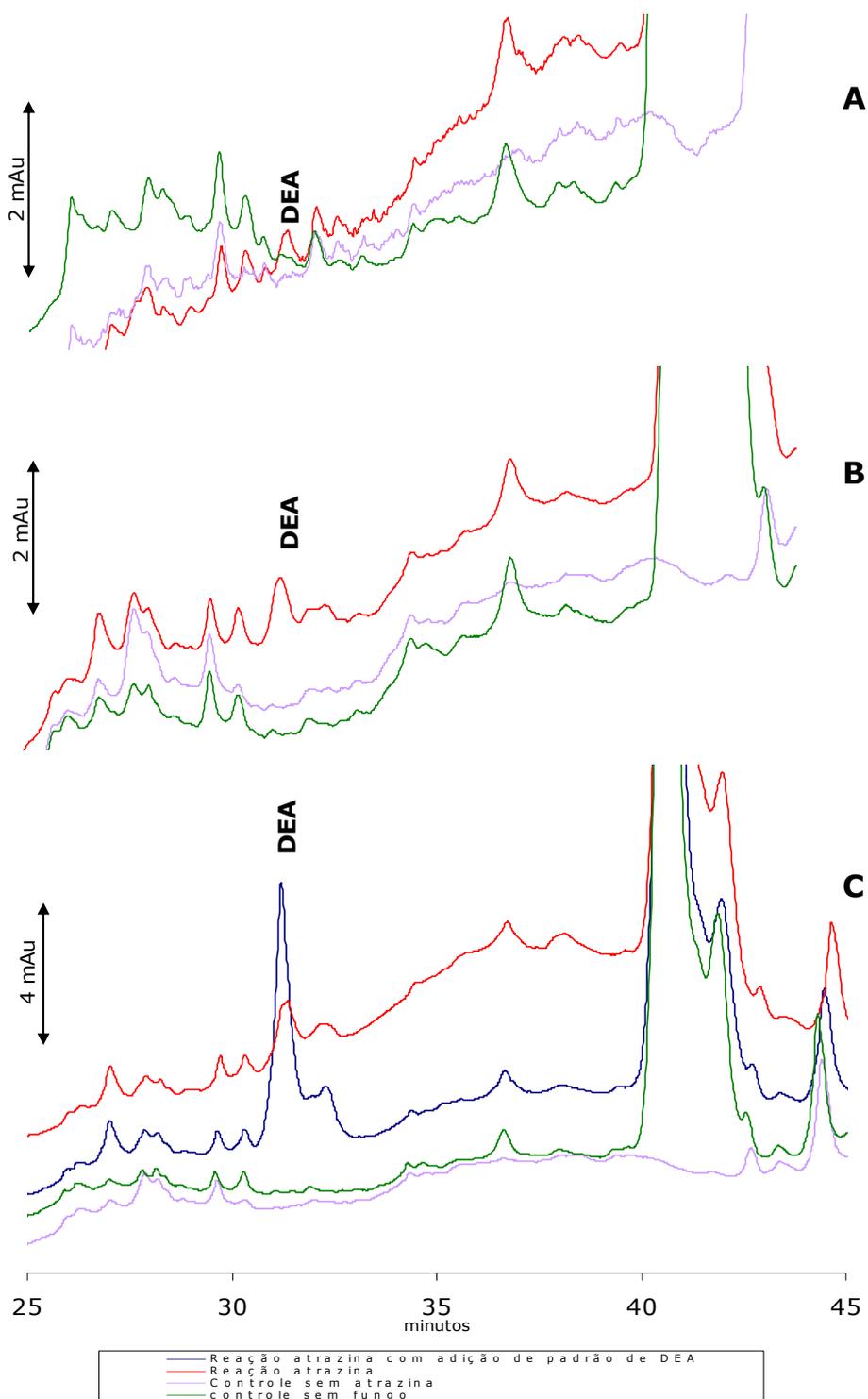


Figura 7.1 - Cromatogramas com a degradação da atrazina e formação de DEA. As condições da análise estão na tabela 5.1, foi utilizada a coluna Shimpack C18, um volume de injeção de 20 μ L e detecção em 221 nm. (A) 5 dias de incubação, (B) 10 dias de incubação e (C) 15 dias de incubação.

A figura 7.2 apresenta o crescimento do fungo no meio contendo atrazina. Como pode ser observado o crescimento do fungo se dá na superfície. Portanto quanto maior a superfície de contato entre atrazina e o fungo maior será a degradação.



Figura 7.2 - Foto do cultivo realizado após cinco dias de incubação.

Para confirmar que o metabólito gerado após as reações com o fungo foi a desetilatrazina, fez-se a análise do extrato por CG-MS.

7.4 ANÁLISE DO EXTRATO DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA POR CG-MS

A análise do extrato obtido foi realizada no Laboratório de Química Analítica e Metrologia Química, na Divisão de Química Analítica do Instituto Nacional de Tecnologia.

Os resultados obtidos por CG-MS comprovam que há a formação de um pico no mesmo tempo de retenção do padrão, e pode-se dizer que esta resposta

corresponde a DEA, pois os fragmentos principais formados são os mesmos no espectrômetro de massas. Isto também pode ser comprovado, pois na literatura foram encontrados trabalhos que descrevem que o íon molecular da desestilatrazina é 172 m/z^{9,10}.

7.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA COM *PLEUROTUS OSTREATUS*.

É bem descrito na literatura que o fungo *Pleurotus ostreatus* produz enzimas como lacase e manganês peroxidase, mas não possui atividade para lignina peroxidase¹¹.

Por isso, embora testes prévios tenham demonstrado que a enzima lacase comercial não degrada atrazina nas condições estudadas, experimentos para a atividade desta enzima no meio reacional (fungo, solução nutritiva e atrazina) e no controle (fungo e solução nutritiva) foram realizados.

Os resultados da atividade nos dois meios foram equivalentes, ou seja, muito próximos. Isto indica que a atividade da lacase não diminui com a presença de atrazina no meio.

7.6 CONCLUSÃO

Portanto, pode-se concluir que a utilização do fungo *Pleurotus ostreatus* na degradação da atrazina mostrou-se bastante interessante, visto que ocorre a formação de um de seus metabólitos principais.

Embora não se saiba se uma única enzima ou um complexo enzimático são os responsáveis pela degradação da atrazina, sabe-se que a lacase comercial proveniente do fungo *Aspergillus oryzae* não é a capaz de degradar a atrazina. Os métodos de extração e cromatografia líquida se mostraram bastante confiáveis, visto a extensa complexidade da matriz.

Embora os testes realizados tenham sido qualitativos, pode-se perceber que com apenas 15 dias de reação já houve a formação de quantidades significativas do metabólito uma vez que a detecção por espectrometria de massas não é tão sensível.

A análise das reações por CG-MS confirmou a presença do metabólito DEA.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira-Leitão, V. S.; **Oxidação de corantes fenotiazínicos por peroxidases de *Armoracia rusticana* e de *Phanerochaete chrysosporium***. 2003. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química.
2. Stiborova, M.; Nachazelova, I.; Anzenbacher, P.; Metabolism of xenobiotics in plants Horseradish peroxidase catalyses N-dealkylation of the S-triazine herbicide, atrazine; **Biologia**, v. 46, p. 331-336, 1991.
3. Bending, G. D.; Friloux, M., Walker, A.; Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential; **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 59-63, 2002.
4. Mandenbaum, R.; Sadowsky, M. J.; Wackett, L. P.; **Microbial degradation of s-triazine herbicides**, Triazine Herbicides, Ed. Elsevier, Cap. 22, p. 301-328, 2008.
5. Pointing, S. B.; Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 57, p. 20-33, 2001.
6. Mougín, C.; Laugero, C.; Asther M.; dubroca, J.; Frasse, P.; Asther, M.; Biotransformation of the herbicide atrazine by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 2, p. 705-708, 1994.
7. Masaphy, .; Levanon, D.; Vaya, J.; Henis, Y; Isolation and characterization of novel atrazina metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonaris*, 2-Chloro-4-ethylamino-6-(1-hydroxyisopropil)amino-1,3,5-triazine. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4342-4346, 1993.
8. Masaphy.; Levanon, D.; Henis, Y; Manganese-enhanced biotransformation of atrazina by the white rot fungus *Pleurotus pulmonaris* and its correlation with oxidation activity. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p.3587-3593, 1996.
9. Bruzzoniti, M. C.; Sarzanini, C.; Constantino, G.; Fungi, M.; Determination of herbicides by Solid phase extraction gás chromatography-mass spectrometry in drinking Waters. **Analytica chimica acta**, v. 578, p. 241-249, 2006.
10. Balduini, L.; Matoga, M.; Cavalli, E.; Seilles, E.; Riethmuller, D.; Thomassim, M.; Guillaume, Y. C.; Triazinic herbicide determination by gás chromatography-mass spectrometry in breast Milk. **Journal of Chromatography B**, v. 794, p. 389-395, 2003.
11. T.; Honda, Y; Ha, H. ; Watanabe, T.; Kuwahara, M.; Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isozyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **J. Wood Sci**, v. 46, p. 230-233, 2000.

Capítulo 8

*CONSIDERAÇÕES FINAIS
E TRABALHOS FUTUROS*

8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi inicialmente desenvolvida uma metodologia por CLAE para a determinação de atrazina, simazina e propazina em reações de degradação enzimática. Três metodologias de extração foram testadas e a que apresentou melhores resultados foi a extração líquido-líquido. A fase móvel otimizada consistiu de ACN/H₂O 30/70 (v/v%) de modo isocrático e tempo de análise é de 25 minutos.

Esta metodologia não se mostrou eficaz para a separação de atrazina e derivados, portanto uma nova metodologia foi desenvolvida. Esta nova metodologia consistiu de uma coluna C18 e uma fase móvel (ACN/Tampão fosfato) com eluição por gradiente. O tempo de análise é elevado (70 minutos), porém uma completa separação dos compostos é realizada. A metodologia desenvolvida é promissora para a análise de atrazina e seus produtos de degradação em ensaios de biodegradação.

Foi utilizada extração em fase sólida com um cartucho de extração Oasis MCX, que apresentou recuperação acima de 80% para quatro analitos.

Uma metodologia por EC foi desenvolvida para análise de atrazina e derivados. Os resultados preliminares obtidos mostram a coeluição de três compostos e a separação dos outros quatro compostos em um curto tempo de análise (9 minutos).

As duas metodologias desenvolvidas para análise de atrazina e derivados podem ser utilizadas de forma complementar. A metodologia desenvolvida por EC pode ser utilizada como um *screening*, pois pode indicar quais os possíveis compostos podem estar sendo formados em um curto intervalo de tempo, além de não utilizar grandes quantidades de solventes. Já a metodologia desenvolvida por CLAE pode ser aplicada na identificação parcial e quantificação dos compostos formados.

A degradação de atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus* foi realizada, apresentando como produto principal de degradação o composto DEA. Sendo o produto detectado por CLAE e confirmado por CG-MS. Não foi realizado nenhum estudo quantitativo de degradação.

8.2 TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Otimização da metodologia desenvolvida por HPLC para determinação de atrazina e derivados.
- ✓ Otimização da extração em fase sólida para determinação por HPLC para atrazina e derivados.
- ✓ Otimização da metodologia desenvolvida por CE para análise de atrazina e derivados.
- ✓ Otimização das condições de cultivo para degradação da atrazina pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.
- ✓ Determinação da atividade das enzimas (lacase, manganês peroxidase) nos cultivos do fungo *Pleurotus ostreatus* na presença de atrazina.

Anexo A

Curriculum vitae

CURRICULUM VITAE

MANOELA RUCHIGA BALESTEROS

Solteira, brasileira, 27 anos

E-mail: manolaruchiga@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

Mestrado em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. (03/2007-04/2009) – *Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.*

Graduação em Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Juiz de Fora. (2001-2006)

Experiência profissional

Bolsa de Desenvolvimento Tecnológico Industrial (DTI/CNPq) na Divisão de Meio Ambiente do Instituto Nacional de Tecnologia. (2006 – Dias atuais)

Título do Projeto: Degradação enzimática de resíduos de herbicidas.

Iniciação Científica em Química Analítica.(2004 – 2005)

Título do projeto :Determinação de ácidos graxos livres em azeite de oliva por eletroforese capilar.

Formação complementar

Cursos

- ✓ *Cromatografia Líquida com detecção UV, Fluorescência e MS. Fundamentos e aplicações na indústria e análise ambiental.* Instituto nacional de Tecnologia, 4 h (2009).
- ✓ *Fluorescência e Difractometria de Raio-X. Fundamentos e aplicações na aplicações na caracterização de materiais.* Instituto Nacional de Tecnologia, 4h, (2009).
- ✓ *Segurança no Laboratório.* Instituto Nacional de Tecnologia, 4h (2009).
- ✓ *Sistema de preparação de amostras com tecnologia de microondas. Fundamentos e aplicações.* Instituto Nacional de Tecnologia, 4h (2009).
- ✓ *Cromatografia de íons. Fundamentos, características e aplicações.* Instituto Nacional de Tecnologia, 4h (2009).
- ✓ *Avaliação do desenvolvimento científico e tecnológico do etanol combustível.* Instituto Nacional de Tecnologia, 2h (2009).
- ✓ *Treinamento de segurança aplicável a laboratório.* Instituto Nacional de Tecnologia, 16h (2008).
- ✓ *Microalga para a produção de biocombustíveis.* Instituto Nacional de Tecnologia, 2h (2008).
- ✓ *Avaliação de risco da exposição humana ao pesticida na dieta.* Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, 16h (2008).

- ✓ *Biodiesel: desafios atuais da produção e uso.* Instituto Nacional de Tecnologia, 2h (2008).
- ✓ *Seminário de monitoramento de poluentes orgânicos persistentes (POP's) no Brasil.* Instituto Nacional de Tecnologia, 16h (2008).
- ✓ *Avaliação de toxicidade em efluentes,* Universidade Federal do Rio de Janeiro, 4h (2007).
- ✓ *Impacto de Poluentes e Contaminantes Orgânicos no Meio Ambiente e na Saúde e Metodologias Analíticas de Identificação e Quantificação,* Instituto Nacional de Tecnologia, 80h (2007).
- ✓ *Nanotecnologia no combate a tuberculose.* Instituto Nacional de Tecnologia, 2h (2007).
- ✓ *Impactos de desenvolvimento sobre o meio ambiente e a saúde.* Instituto Nacional de Tecnologia, 2h (2007).
- ✓ *Introdução à cromatografia gasosa,* Instituto Nacional de Tecnologia, 12h (2007).
- ✓ *Estatística para laboratórios e ensaio de calibração.* Rede de tecnologia do Rio de Janeiro, 24h (2007).
- ✓ *I Seminário - Aplicações analíticas para o segmento ambiental.* PerkinElmer 16h (2006).
- ✓ *Biocatálise no desenvolvimento de tecnologias limpas,* Universidade Federal de Juiz de Fora, 6h (2004).

- ✓ *Capacitação profissional em análise de macroelementos e microelementos por espectrometria de absorção atômica e espectrometria UV/Visível*, Embrapa Gado de Leite, 4h (2003).
- ✓ *A Qualidade de medições em química analítica*, Universidade Federal de Juiz de Fora, 8h (2003)

Monitorias

- ✓ Monitoria nas disciplinas Química analítica Qualitativa, Química analítica Quantitativa e Química analítica II (2003/2004).

Participações em congressos

- ✓ *Avaliação da transformação enzimática de s-triazinas utilizando horseradish peroxidase por clae*. 14° Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, PB, 2007.
- ✓ *Determinação de acidez em azeite de oliva por eletroforese capilar*. 14° Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, PB, 2007.
- ✓ *Análise Simultânea de Losartan associado a diuréticos por eletroforese capilar*. 13° Encontro Nacional de Química Analítica, Niterói, RJ, 2005.
- ✓ *Determinação de ácidos graxos livres em azeite de oliva por eletroforese capilar*. 11° Latin American Capillary Electrophoresis, Guarujá, 2005.

Idiomas

Inglês: leitura boa, conversação e escrita básica.(Em curso)

Espanhol: Compreensão escrita e oral básica.

Informática

Conhecimento dos aplicativos do Windows, domínio de Word, Power Point e Internet, boa usuária de Origin e Excel.

Informações adicionais

Artigos

- ✓ BALESTEROS, M. R. ; FARIA, A.F ; OLIVEIRA, M. A. L. . Determination of losartan associated with chlorthalidone or hydrochlorothiazide in capsules by capillary zone electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 554-558, 2007.

- ✓ BALESTEROS, M. R. ; TAVARES, M. F. M. ; POLACHINI, F.C. ; RIBEIRO, S. J. L. ; MESSADDEQ, Y. ; OLIVEIRA, M. A. L. . Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3731-3736, 2007.