

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANA CLARA FELIX VIDA

**Novas abordagens para exploração de reações químicas relativamente
lentas em sistemas de análises em fluxo. Aplicações a amostras de
relevância agronômica e ambiental**

Piracicaba

2015

ANA CLARA FELIX VIDA

Novas abordagens para exploração de reações químicas relativamente lentas em sistemas de análises em fluxo. Aplicações a amostras de relevância agronômica e ambiental

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Elias Ayres Guidetti Zagatto

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Vida, Ana Clara Felix

Novas abordagens para exploração de reações químicas relativamente lentas em sistemas de análises em fluxo. Aplicações a amostras de relevância agrônômica e ambiental / Ana Clara Felix Vida; orientador Elias Ayres Guidetti Zagatto. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

105 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Análise em fluxo contínuo 2. Catálise 3. Cromatografia líquida
4. Espectrofotometria 5. Herbicidas 6. Química Ambiental 7. Química analítica
I. Título

CDU (543.068.3 + 543.422.3)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Elias Zagatto, pela orientação, oportunidade e confiança,

Ao Programa de Pós-Graduação do CENA/USP,

À Fapesp pelo apoio financeiro,

À comissão examinadora do exame de qualificação, composta pelos professores Jose Anchieta, Marcos Kamogawa e Wanessa Melchert, pela avaliação realizada e contribuições para a minha formação,

Aos professores Boaventura Freire, Fábio Rocha, Francisco Krug, José Ferreira, Maria Fernanda Gine, por suas contribuições científicas para a minha formação,

Aos técnicos Fátima Patreze, Iolanda Ruffini, Sheila Perdigão e Valdemir Barros,

Aos colegas do laboratório,

Ao professor Joaquim Nobrega pelas análises das amostras de água,

Ao professor Valdemar Tornisielo pelas amostras de solos,

À Marilia Henyei pela revisão desta tese,

À Universidade das Ilhas Baleares pela infraestrutura concedida e apoio técnico para a realização do estágio no exterior,

Ao professor Manuel Miró pela orientação e contribuições para a minha formação, e ao seu grupo de pesquisa.

À comissão julgadora deste trabalho, composta pelos professores Ana Rita Nogueira, Emanuel Carrilho, Jose Anchieta Gomes Neto e Wanessa Melchert pela avaliação realizada e pelas sugestões para a melhoria deste documento.

Muito Obrigada!

Resumo

VIDA, A. C. F. **Novas abordagens para exploração de reações químicas relativamente lentas em sistemas de análises em fluxo.** Aplicações a amostras de relevância agrônômica e ambiental. 2015. 105 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Diferentes estratégias foram projetadas e desenvolvidas para sistemas de análises em fluxo envolvendo reações químicas relativamente lentas. O aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação permite melhorias de sensibilidade em métodos espectrofotométricos em fluxo envolvendo reações catalíticas. Uma característica inerente a esta estratégia é que, de acordo com as baixas concentrações do analito de interesse esperadas nas amostras, pode-se explorar tanto a variação do tempo quanto da temperatura de aquecimento para o desenvolvimento reacional. Esta estratégia evita a geração de bolhas de ar quando temperaturas elevadas são empregadas. O aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação em sistema de análises por injeção em fluxo foi aplicado à reação de oxidação do reagente Tiron por peróxido de hidrogênio catalisada por Co(II) para determinação espectrofotométrica de cobalto em gramíneas. O sistema apresentou boas figuras de mérito, tais como repetibilidade [d.p.r. = 0,8% para $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II), (n = 5)], limite de detecção [$0,046 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II)], frequência de amostragem (19 h^{-1}) e consumo de reagente ($330 \mu\text{g}$ de Tiron por determinação). Os dados de recuperação nas amostras de gramíneas digeridas variaram entre 97% e 113%. O aquecimento explorando o aprisionamento da zona da amostra na cubeta de detecção mostrou-se promissor para implementação de reações relativamente lentas sem a geração de bolhas de ar, e não houve liberação de bolhas mesmo sob a temperatura de 95°C . Esta estratégia foi aplicada à determinação espectrofotométrica de vanádio em águas minerais envolvendo a oxidação de *p*-anisidina por bromato catalisada por V(V) e ativada por Tiron. Sob temperatura de 95°C , boas figuras de mérito foram obtidas, tais como limite de detecção ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$), repetibilidade [d.p.r. = 2,1 % para $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (n = 10)], frequência analítica [25 h^{-1}] e consumo de reagente ($3,0 \text{ mg}$ de *p*-anisidina por determinação). Adicionalmente, foi desenvolvido um procedimento analítico em fluxo para monitoramento dos resíduos de ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis em solos, envolvendo também um processo relativamente lento. Um sistema de análises por injeção sequencial foi utilizado para as etapas de dessorção dos herbicidas com solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ CaCl_2 e concentração em fase sólida em linha, seguida da eluição dessas espécies para a separação em uma coluna monolítica C_{18} conectada a um cromatógrafo líquido por meio de uma válvula de seis vias. Os eluatos eram injetados no cromatógrafo por meio de uma alça de amostragem de $300 \mu\text{L}$ conectada à válvula. Boas figuras de mérito foram obtidas, tais como fatores de enriquecimento de 10,2 e 18,8 e limites de detecção de $0,016$ e $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ para ametrina e atrazina, respectivamente, limite de quantificação de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para ambos os herbicidas e repetibilidade estimada como 6,3% e 5,1% para $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ (n = 10) para ametrina e atrazina, respectivamente. Os dados de adição e recuperação dos herbicidas nos extratos de solos em condições de equilíbrio se situaram na faixa de 85 a 99%.

Palavras-chave: Sistemas de análises em fluxo. Reações químicas relativamente lentas. Aprisionamento da zona da amostra. Bioacessibilidade. Ensaio de dessorção em linha. Extração em fase sólida em linha.

Abstract

VIDA, A. C. F. **Novel approaches for exploiting relatively slow chemical reactions in flow analysis systems.** Applications to relevant agronomic and environmental samples. 2015. 105 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Different approaches to analytical flow systems involving relatively slow chemical reactions were developed. Zone trapping inside the reaction coil enables sensitivity improvements in flow-based spectrophotometric procedures relying on catalytic reactions. The reaction time and/or temperature can be increased for the determination of analytes present in the samples at low concentrations. Exploitation of the strategy avoids the liberation of air bubbles in the analytical path when high temperatures are involved. A flow injection system with zone trapping in the main reactor was developed for the spectrophotometric determination of cobalt in grass samples exploiting the oxidation of Tiron by bromate catalysed by Co(II). Good figures of merit such as repeatability [r.s.d. = 0.8% for $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II), (n = 5)], detection limit [$0.046 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II)], sampling frequency [19 h^{-1}] and reagent consumption (330 μg of Tiron for determination) were attained. Recovery data in grass sample digests varied within 97% e 113%. Zone trapping inside the flow-through cuvette for exploiting high temperatures was also promising for relatively slow reactions, as no liberation of air bubbles was noted even for temperatures as high as 95°C . The approach was applied to the spectrophotometric determination of vanadium in mineral water samples relying on the oxidation of *p*-anisidine by bromate catalysed by V(V) at 95°C . Good analytical figures of merit such as repeatability [r.s.d. = 2.1% for $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V), n = 10], detection limit [$0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V), sample frequency (25 h^{-1}) and reagent consumption (3.0 mg of *p*-anisidine per determination) were attained. Additionally, an analytical procedure to monitor the potentially leachable ametryn and atrazine residues in soil samples was proposed. As leaching is relatively slow, a sequential injection system was used to perform the herbicide extractions with 0.01 mol L^{-1} CaCl_2 and in-line solid phase extraction followed by elution towards a C_{18} monolithic column connected to a liquid chromatograph. To this end, the outlet of the column was connected to a 300- μL six-port valve. Regarding analytical performance, enrichment factors and detection limits were 10.2 and 18.8 and 0.016 e 0.015 mg L^{-1} for ametryn and atrazine, respectively, quantification limits were 0.05 mg L^{-1} for both herbicides and good repeatability (r.s.d. = 6.3 and 5.1 % for 0.05 mg L^{-1} of ametryn and atrazine, n = 10) were attained. Recovery data in the soil extracts under equilibrium conditions were within 85 and 99%.

Keywords: Flow analysis. Relatively slow chemical reactions. Zone trapping. Bioaccessibility. On-line desorption assays. In-line solid phase extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação catalítica de oxidação do Tiron	31
Figura 2. Acoplamento SPE – LC	38
Figura 3. Sorbente composto por material de acesso restrito para a concentração em linha de herbicidas	39
Figura 4. Configuração utilizada para o “heart cut” após a concentração para a injeção da amostra na coluna cromatográfica	40
Figura 5. Colunas de sílica monolítica e empacotada	41
Figura 6. Componentes dos sistemas com zonas coalescentes e aprisionamento da zona de amostra no reator aquecido ou na cubeta de fluxo aquecida.....	44
Figura 7. Diagrama de fluxos do sistema analítico empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação para a determinação de cobalto	50
Figura 8. Diagramas de fluxo dos sistemas com aprisionamento da zona da amostra com zonas coalescentes na bobina de reação ou na cubeta de fluxo aquecidos para a determinação de vanádio.....	54
Figura 9. Sistema automatizado para ensaios de bioacessibilidade para a determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis.....	59
Figura 10. Válvula de 6 vias ilustrando as posições de preenchimento da alça da amostra e de injeção dos compostos de interesse na coluna cromatográfica.....	60
Figura 11. Sobreposição das zonas da amostra e do reagente	65
Figura 12. Efeito da concentração de H ₂ O ₂ na reação catalisada e não catalisada por Co(II).....	67

Figura 13. Efeito da concentração de Tiron na reação catalisada e não catalisada por Co(II).....	67
Figura 14. Efeito do tempo de aprisionamento na reação não catalisada e catalisada por Co(II).....	68
Figura 15. Espécies potencialmente interferentes na reação catalisada por Co(II)	70
Figura 16. Sinais analíticos obtidos com o sistema proposto para a determinação de cobalto.....	72
Figura 17. Espectro de absorção do produto de reação.....	74
Figura 18. Influência do tempo de aprisionamento, temperatura, pH da solução descartada e concentração da <i>p</i> -anisidina	76
Figura 19. Influência das espécies interferentes na reação catalisada por V(V).....	78
Figura 20. Sinais analíticos obtidos com o sistema explorando aprisionamento no reator	80
Figura 21. Sinais analíticos obtidos com o sistema explorando aprisionamento na cubeta de detecção.....	81
Figura 22. Cromatograma referente a ametrina e atrazina.....	84
Figura 23. Recuperações referentes a 0,25 mg L ⁻¹ de atrazina e ametrina obtidas com 30,0 ou 60,0 mg dos sorbentes Plexa e Oasis	88
Figura 24. Cinética de extração da ametrina e atrazina em solos arenoso e argiloso	90
Figura 25. Cromatograma referente ao extrato de solo argiloso.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparo das soluções estoque utilizadas nos estudos de seletividade.....	48
Tabela 2. Parâmetros operacionais para a determinação de vanádio	57
Tabela 3. Dados de adição e recuperação de Co(II).....	73
Tabela 4. Comparação entre os sistemas envolvendo aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação e na cubeta de detecção.....	81
Tabela 5. Determinação de vanádio em águas minerais pelos sistemas de análises em fluxo e por ICP-MS/MS	82
Tabela 6. Estratégias de separação cromatográfica para análise de herbicidas.....	85
Tabela 7. Características analíticas.....	92
Tabela 8. Adição e recuperação das triazinas em extratos de solos	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAOS - dimetoxianilina

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FAAS – espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês *Flame Atomic Absorbtion Spectroscopy*)

FIA – análise por injeção em fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*)

GFAAS – espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)

HLB - hidrofílicas lipofílicas equilibradas (do inglês *Hydrophilic Lipophilic Balance*)

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performace Liquid Chromatography*)

ICP-MS - espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES - espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

MBTH - 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona

MeOH – metanol

MIP – polímeros molecularmente impressos (do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*)

MSC- cromatografia por multisseringa (do inglês *Multisyringe Chromatography*)

OECD – organização para a cooperação econômica e desenvolvimento

PEEK - poli-eter-eter-cetona

RAM – materiais de acesso restrito (do inglês *Restricted Access Material*)

SIA – análise por injeção sequencial (do inglês *Sequential Injection Analysis*)

SIC – cromatografia por injeção sequencial (do inglês *Sequential Injection Chromatography*)

SPE – extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)

UV – radiação ultravioleta

Vis – radiação visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Parada de fluxo	20
1.2 Aprisionamento da zona da amostra.....	21
1.3 Procedimentos analíticos com parada de fluxo ou aprisionamento da zona da amostra em reatores múltiplos	22
1.4 Estratégias para evitar a geração de bolhas de ar em sistemas de análises em fluxo com aquecimento.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Métodos catalíticos	27
2.2 Determinação de cobalto	28
2.2.1. Métodos não catalíticos	28
2.2.2 Métodos catalíticos em sistemas de análises em fluxo.....	29
2.3 Determinação catalítica de vanádio.....	32
2.4 Herbicidas	35
2.4.1. Características.....	35
2.4.2 Estudos cinéticos de bioacessibilidade de herbicidas em solos.....	36
2.4.3 Procedimentos para a concentração e separação em linha dos herbicidas	37
2.4.3.1 <i>Acoplamento da concentração em linha com a separação das triazinas por cromatografia líquida.....</i>	<i>37</i>
2.4.3.2 <i>Estratégia “heart cut”</i>	<i>39</i>
2.4.3.3 <i>Colunas para separação das triazinas</i>	<i>41</i>
2.4.3.4 <i>Ensaio de adsorção-dessorção e separação cromatográfica de herbicidas</i>	<i>42</i>
3. PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1 Equipamentos e acessórios	43
3.1.1 Determinações de Co(II) e V(V)	43
3.1.2. Determinação dos herbicidas.....	45
3.2 Reagentes e soluções	46
3.2.1 Determinação espectrofotométrica de Co(II)	46
3.2.2 Determinação espectrofotométrica de V(V).....	47
3.2.3 Avaliação da seletividade nas reações catalíticas para Co(II) e V(V).....	47
3.2.4 Determinação dos herbicidas.....	48

3.3 Procedimentos	49
3.3.1 Determinação de cobalto em gramíneas empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação	49
3.3.1.1. <i>Operação do sistema</i>	49
3.3.1.2. <i>Influência dos principais parâmetros envolvidos</i>	51
3.3.1.3 <i>Desempenho do sistema</i>	52
3.3.2 Determinação de vanádio em águas minerais empregando aprisionamento da zona da amostra no detector aquecido	53
3.3.2.1. <i>Operação do sistema</i>	53
3.3.2.2 <i>Influência dos principais parâmetros envolvidos</i>	55
3.3.2.3 <i>Desempenho do sistema</i>	56
3.3.3 Determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis em solo explorando o acoplamento SIA-LC	57
3.3.3.1 <i>Amostras de solo</i>	57
3.3.3.2 <i>Operação do sistema</i>	58
3.3.3.2.1 <i>Concentração em linha com detecção em modo “off-line”</i>	60
3.3.3.2.2 <i>Acoplamento “on-line” SPE- LC</i>	62
3.3.3.3 <i>Fator de enriquecimento</i>	64
3.3.3.4 <i>Procedimento manual para os ensaios cinéticos de bioacessibilidade</i>	64
3.3.3.5 <i>Características analíticas</i>	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Determinação de cobalto em gramíneas empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação	65
4.1.1 Influência dos principais parâmetros envolvidos	65
4.1.1.1 <i>Volumes da amostra e do reagente</i>	65
4.1.1.2 <i>Tempo de injeção</i>	66
4.1.1.3 <i>Concentrações dos reagentes</i>	66
4.1.1.4. <i>Tempo de aprisionamento</i>	68
4.1.2. Desempenho do sistema	69
4.1.2.1. <i>Avaliação do efeito de memória na bobina de reação</i>	69
4.1.2.2. <i>Avaliação da seletividade</i>	69
4.1.2.3 <i>Características analíticas</i>	71

4.2 Determinação catalítica de V(V) de águas minerais empregando a estratégia de aprisionamento com aquecimento.....	73
4.2.1 Aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação aquecida.....	74
4.2.1.1 <i>Tempo de injeção</i>	74
4.2.1.2 <i>Comprimento do reator R_{Cl}</i>	75
4.2.1.3 <i>Tempo de aprisionamento</i>	75
4.2.1.4 <i>Temperatura</i>	75
4.2.1.5 <i>pH do meio reacional</i>	76
4.2.1.6 <i>Concentrações dos reagentes</i>	77
4.2.2 Estudos de seletividade.....	78
4.2.3 Aprisionamento da zona da amostra na cubeta aquecida	79
4.2.3.1 <i>Projeto do sistema</i>	79
4.2.3.2 <i>Características analíticas</i>	79
4.2.4 Aplicação	82
4.3 Determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis em solos explorando o acoplamento SIA-LC	82
4.3.1 Seleção das colunas cromatográficas	83
4.3.2 Seleção da composição do sorbente para SPE em linha com detecção em “off-line” ...	88
4.3.3 Acoplamento SPE-LC	89
4.3.3.1 <i>Otimização do “heart cut”</i>	89
4.3.3.2 <i>Validação do procedimento analítico proposto</i>	90
4.3.3.3 <i>Características analíticas</i>	92
4.3.3.4 <i>Aplicação</i>	93
5. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

Análises químicas em sistemas de análises em fluxo (ZAGATTO et al., 2012) permitem a manipulação eficiente de soluções em ambiente fechado, evitando a contaminação das amostras, a perda de analitos e a exposição do operador a reagentes tóxicos. Nesses sistemas, há uma redução pronunciada no consumo de reagentes em comparação com os procedimentos em batelada, não sendo necessário atingir o equilíbrio químico para a determinação dos analitos de interesse. Os resultados obtidos são precisos e reproduzíveis, obtendo-se alta frequência de amostragem.

Nas análises químicas em fluxo, a amostra é introduzida em um fluido transportador que a conduz ao detector, possibilitando as determinações. A configuração mais simples dos sistemas de análises em fluxo é aquela em linha única (RUZICKA; HANSEN, 1975), em que o fluxo transportador da amostra pode ser o próprio reagente. Para a determinação dos analitos de interesse utilizando reagentes cromogênicos, essa configuração tem como característica o alto consumo de reagente e a ineficiência de mistura, pois o reagente não atinge o centro da zona de amostra de maneira eficiente. Este aspecto é mais pronunciado para grandes volumes de amostra, podendo levar à obtenção de picos duplos.

Na configuração em que o reagente é adicionado por confluência (BERGAMIN-FILHO; REIS; ZAGATTO, 1988), a amostra é injetada em um fluxo transportador inerte e cada porção da amostra recebe o reagente, obtendo-se melhor eficiência de mistura. Dessa forma, podem-se utilizar volumes grandes da amostra, com o objetivo de melhorar a sensibilidade. Como a vazão do fluxo reagente é geralmente menor do que a do fluxo transportador da amostra, essa condição representa um menor consumo de reagentes, em comparação com o sistema de análises em fluxo em linha única.

Ainda com relação à redução do consumo de reagentes, outras estratégias foram propostas, destacando-se aquelas explorando fluxo intermitente e zonas coalescentes (REIS, 1996). Na primeira, o reagente retorna ao frasco de origem durante a etapa de amostragem, possibilitando a redução do seu consumo, sendo que isso não ocorre quando o reagente é adicionado por confluência. Na segunda estratégia, alíquotas da amostra e do reagente são inseridas em fluxos transportadores inertes e a interação entre elas ocorre pela convergência entre os fluxos. A razão entre as alíquotas da amostra e do reagente é proporcional à vazão dos seus respectivos transportadores, e o reagente é consumido apenas em presença da amostra.

Em sistemas de análises em fluxo envolvendo reações químicas relativamente lentas, o aumento do tempo de residência é um recurso amplamente empregado, principalmente quando a sensibilidade é crítica. Nesse sentido, algumas estratégias, tais como diminuição de vazões, aumento do percurso analítico, aprisionamento da zona da amostra, parada de fluxos, etc, podem também ser exploradas (KOLEV; McKELVIE, 2008; ZAGATTO et al., 2012).

A parada de fluxos e o aprisionamento da zona de amostra têm sido empregados para aumentar o tempo de residência sem alterar as vazões e o percurso analítico. Essas estratégias têm tido ampla aplicação, inclusive em ensaios enzimáticos (PFEIFFER, 1992), em procedimentos envolvendo difusão gasosa (HENRIQUEZ; HORSTKOTTE; CERDA, 2013), extração líquido-líquido (ANTHEMIDIS; THEMELIS; STRATIS, 2001), em estudos cinéticos (SASAKI et al., 2012) bem como em estudos de lixiviação (BUANUAM, 2006; CHOMCHOEI, 2005).

1.1 Parada de fluxo

A parada de fluxo é uma estratégia para o aumento do tempo de residência da amostra no percurso analítico (RUZICKA; HANSEN, 1979). O período de tempo disponível para o desenvolvimento das reações é aumentado pelo desligamento da bomba, ou em outras palavras, pela parada de fluxo. Toda a zona da amostra é mantida no percurso analítico, e este aspecto é crítico em procedimentos analíticos que utilizam volumes grandes da amostra, podendo ocorrer o efeito de memória e diminuir a frequência de amostragem, devido a um maior tempo despendido com a limpeza do percurso analítico.

Sistemas de análises por injeção sequencial (SIA) explorando parada de fluxos têm sido propostos para a determinação de dois analitos utilizando o mesmo reagente e detecção espectrofotométrica. Nesse caso, explora-se a cinética diferencial (SASAKI, 2012). A parada de fluxos é uma estratégia seletiva para a reação que se desenvolve mais lentamente. O princípio foi aplicado para a determinação de anilina e de ciclohexilamina, pois ambas reagem a diferentes velocidades com o reagente 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (SAURINA; HERNÁNDEZ-CASSOU, 1999). Na primeira etapa do procedimento, a amostra era injetada para a determinação seletiva da anilina em pH 6,5 sem a parada de fluxos. Na segunda etapa, o meio reacional era ajustado a pH 10,0 e a amostra era injetada visando a determinação de ciclohexilamina, com a parada da zona da amostra na cubeta. A concentração da anilina era calculada diretamente através da curva de calibração. Na segunda etapa, a absorbância gerada era referente a ambos os analitos. Sendo assim, a concentração da ciclohexilamina era

calculada pela diferença entre as absorvâncias referentes a ambos os analitos. Os limites de detecção foram estimados como $3,8 \times 10^{-6}$ e $1,1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para anilina e ciclohexilamina, respectivamente.

Sistemas com parada de fluxos têm sido empregados em procedimentos envolvendo etapas de difusão gasosa. Como um exemplo dessa aplicação, um sistema de análises em fluxo envolvendo multisingas foi proposto para a determinação condutométrica de amônio em águas naturais (HENRIQUEZ; HORSTKOTTE; CERDÀ, 2013). A amostra era injetada e misturada com a solução alcalina no primeiro reator para se obter amônia, que é uma espécie volátil. A amônia se difundia através de uma membrana semipermeável em direção a uma solução aceptora acidificada. Após a coleta, obtinha-se novamente o íon amônio que era detectado. A parada de fluxos era feita na fase aceptora, permitindo o enriquecimento do analito e, conseqüentemente, melhorando a sensibilidade. O limite de detecção utilizando essa estratégia foi estimado como 45 µg L⁻¹ e a frequência de amostragem como 10 h⁻¹.

Ensaio de lixiviação em sistemas SIA foram propostos para a extração de fosfato (BUANUAM et al., 2006) e de metais (CHOMCHOEI et al., 2005) em solos. As soluções extratoras eram individualmente aspiradas através de uma válvula multi-portas e, após reversão do sentido do fluxo, entravam em contato com a amostra sólida contida em um cartucho conectado a uma das portas da válvula. Essa coluna continha filtros em ambas as extremidades para reter o material particulado, e permitia a passagem da solução extratora com o analito de interesse. A estratégia da parada de fluxos era aplicada no momento em que a solução extratora entrava na coluna com o objetivo de aumentar a eficiência da extração, a qual dependia do tempo de contato entre o solo e o extratante.

1.2 Aprisionamento da zona da amostra

O aprisionamento da zona da amostra é outra estratégia para aumentar o tempo de residência da amostra no percurso analítico, proporcionando uma melhora na sensibilidade nos sistemas de análises em fluxo (ZAGATTO et al., 2012). Esta estratégia foi proposta originalmente para a determinação espectrofotométrica de amônio em águas naturais (KRUG et al., 1983). A porção da amostra era aprisionada em uma bobina de reação aquecida a 38°C. A sensibilidade foi melhorada e o limite de detecção foi estimado como 5 µg L⁻¹. No entanto, este sistema foi desenvolvido sem a abordagem de zonas coalescentes, levando a um alto consumo de reagente, o qual era continuamente descartado durante o período de aprisionamento. Este aspecto justifica a proposta de desenvolvimento de sistemas

de análises em fluxo envolvendo a combinação do aprisionamento da zona da amostra com zonas coalescentes.

Com o aprisionamento da zona da amostra aliado a zonas coalescentes, uma redução pronunciada no consumo de reagentes é obtida. Nesses sistemas, as alíquotas da amostra e do reagente são inseridas em fluxos transportadores convergentes e as porções mais concentradas da zona amostra/reagente são aprisionadas no reator ou na cubeta de fluxo. Durante o período de aprisionamento, um desenvolvimento reacional mais completo é obtido, proporcionando uma melhora na sensibilidade. O percurso contendo as porções não aprisionadas da amostra é limpo rapidamente. Este aspecto é importante, principalmente para grandes volumes inseridos da amostra.

Um sistema aliando o aprisionamento da zona da amostra e extração líquido-líquido foi proposto para a determinação espectrofotométrica de paládio em materiais particulados suspensos no ar (ANTHEMIDIS; THEMELIS; STRATIS, 2001). A amostra e o reagente cromogênico fluíam em direção ao reator e, quando a porção mais concentrada da zona de amostra estava passando pelo reator, uma válvula de duas posições era acionada, aprisionando esta porção durante um período de tempo pré-determinado para o desenvolvimento da reação. Enquanto isso, o reagente e o fluxo transportador da amostra fluíam em direção ao detector. Após esse período de tempo, a válvula era acionada para sua posição original e o produto da reação era direcionado para uma bobina de extração, contendo as fases orgânica e aquosa. Após passar por essa bobina, a amostra fluía para o compartimento de separação das fases, onde a fase orgânica enriquecida era separada da fase aquosa através de uma membrana e, em seguida, detectada espectrofotometricamente. A etapa de extração líquido-líquido tornou o método mais seletivo, sem a necessidade do uso de agentes mascarantes. O limite de detecção e a velocidade analítica foram estimados como $0,007 \text{ mg L}^{-1} \text{ Pd}$ e 20 h^{-1} , respectivamente.

1.3 Procedimentos analíticos com parada de fluxo ou aprisionamento da zona da amostra em reatores múltiplos

Os procedimentos analíticos podem utilizar reatores múltiplos para melhorar a sensibilidade para reações químicas lentas e tornar as análises mais rápidas. Geralmente, esses procedimentos são desenvolvidos para a determinação de um ou dois analitos, em sistemas de análises por injeção em fluxo, por injeção sequencial ou por multicomutação.

Um sistema de análises em fluxo com multicomutação compreendendo reatores múltiplos foi proposto para a determinação espectrofotométrica de boro em plantas (TUMANG et al., 1998). Como a reação envolvida era lenta, o aumento do tempo de residência para o desenvolvimento da reação era necessário, o que foi obtido aprisionando-se as zonas da amostra em três reatores. Nesse procedimento, a amostra e os reagentes eram aspirados para o primeiro reator onde eram aprisionados e, em seguida, as amostras fluíam para o segundo e terceiro reatores. Enquanto a primeira zona da amostra fluía para a detecção, as outras duas permaneciam aprisionadas. O emprego dessa abordagem aumentou a frequência de amostragem sem perdas de sensibilidade. O limite de detecção, a frequência de amostragem e o consumo de reagentes foram estimados em $0,47 \text{ mg L}^{-1} \text{ B}$, 35 h^{-1} e $0,5 \text{ mg}$ de Azometina-H por determinação, respectivamente.

Um sistema de análises em fluxo com multicomutação envolvendo dois detectores fotométricos foi proposto para a determinação simultânea de amônio e fosfato em amostras de águas de rio (FERNANDES; REIS, 2002). A sensibilidade era crítica, já que as concentrações desses analitos nas amostras não ultrapassavam $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. As reações envolvidas para a determinação desses analitos são lentas, sendo então requerido o aumento do tempo de residência. Para tal fim, a estratégia de aprisionamento da zona de amostra foi implementada. A zona de amostra era dividida em duas porções, as quais fluíam em dois percursos analíticos, referentes às determinações de amônio e de fosfato. Cada percurso compreendia dois reatores dispostos em paralelo, e os aprisionamentos das amostras eram feitos de forma análoga ao sistema proposto para a determinação de boro. Os limites de detecção foram estimados como $7,0$ e $17,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para amônio e fosfato, respectivamente. A frequência de amostragem era de 112 h^{-1} .

Um sistema de análises químicas por injeção sequencial foi proposto para o monitoramento de amônia e fosfato em áreas costeiras (FRANK, 2006). Este sistema era operado automaticamente a bordo de um navio, sendo as amostras bombeadas a $1,20 \text{ m}$ de profundidade, filtradas em linha, e inseridas no módulo de análises. Para tanto, uma válvula multi-portas era utilizada para gerenciar as injeções da amostra e de reagentes. Este sistema era composto por dois percursos analíticos, com duas unidades de detecção por fluorescência. O percurso referente à determinação de amônio compreendia três reatores dispostos em paralelo e imersos em um banho termostatizado a 85°C , e o percurso referente à determinação de fosfato apresentava um único reator, o qual não era aquecido. Como o sub-sistema para determinação de amônio envolvia aquecimento, a geração de bolhas era inevitável. Nesse sentido, um “software” para acionamento da seringa foi desenvolvido visando acelerar a

vazão do transporte da amostra da bobina de reação até o detector, desacelerando-a em seguida para a detecção e novamente acelerando-a para a limpeza rápida das bobinas de reação e do detector. Os limites de detecção foram estimados como $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de amônia. A frequência de amostragem era de 120 h^{-1} .

A determinação automatizada dos açúcares provenientes das hidrólises enzimáticas de xilanase, amilase e protease (PFEIFFER, 1992) pode ser também mencionada. O fluxo contendo a enzima e o substrato era direcionado sucessivamente para três reatores conectados a uma válvula rotatória de seis vias, onde permaneciam aprisionados por um período de tempo pré-estabelecido. A cada 5 min, um dos reatores era conectado ao detector e os açúcares redutores confluíam com o fluxo do reagente para a derivatização adicionado em confluência, sendo a seguir detectados espectrofotometricamente. A característica mais interessante dessa inovação é que vários tempos de aprisionamento podiam ser implementados, de acordo com as velocidades das reações hidrolíticas das diferentes enzimas.

Como acima mencionado, a estratégia de aprisionamento da zona da amostra em sistemas de análises por injeção em fluxo foi inicialmente proposta para a determinação de amônio em águas naturais. A proposta central desse trabalho de tese foi justamente propor a estratégia de aprisionamento com zonas coalescentes, visando tanto reduzir o consumo de reagente, quanto à melhoria de sensibilidade em procedimentos analíticos que envolvem reações relativamente lentas. As vantagens conferidas por essa proposta foram inicialmente demonstradas na determinação do nitrito pela reação de Griess modificada, em comparação com a estratégia de parada do fluxo na cubeta de detecção (VIDA et al., 2011). Grandes volumes da amostra puderam ser injetados, visando melhorar a sensibilidade sem, no entanto, diminuir a frequência de amostragem, uma vez que a limpeza do percurso analítico era feita durante o intervalo de tempo do desenvolvimento reacional.

1.4 Estratégias para evitar a geração de bolhas de ar em sistemas de análises em fluxo com aquecimento

A presença de bolhas de ar no percurso analítico é inerente aos sistemas de análises em fluxo segmentado e monossegmentado, pois é uma estratégia utilizada para a melhoria de sensibilidade devido à diminuição da dispersão da zona da amostra e melhoria das condições de mistura. As bolhas de ar geralmente são descartadas como fluxo de saída de um desborbulhador, o qual é posicionado imediatamente antes do detector (PASQUINI; OLIVEIRA, 1985).

Nos sistemas não segmentados de análises em fluxo, a presença de bolhas é indesejável, pois afeta a detecção. A fase gasosa pode se originar nas seguintes situações: falta de vedação nos conectores (REIS et al., 1994), entrada de ar no percurso analítico durante a troca de amostras, presença de gases dissolvidos nas soluções envolvidas e aquecimento do ambiente reacional.

Para se evitar a formação de bolhas durante o processamento da zona de amostra, o aumento de pressão no sistema pode ser utilizado. Para isto, adiciona-se uma bobina restritora após o detector, geralmente constituída de tubulação longa e fina. Com este recurso, altas temperaturas (até 140°C) foram empregadas (HIRAI; YOZA; OHASHI, 1980) utilizando uma bobina restritora de 10 m de comprimento com 0,3 mm de diâmetro interno sem causar a liberação de bolhas de ar. Na determinação de sulfato em águas naturais (KONDO; MIYAT; TOEI, 1982), as bolhas no percurso analítico também foram evitadas utilizando-se uma bobina restritora de 10 m de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno. Entretanto, para os sistemas de análises em fluxo que exploram aquecimento por meio de imersão dos reatores em banhos termostáticos, esta bobina pode não ser eficiente, uma vez que a pressão gerada pode ser alta a ponto de romper as conexões. Dessa forma, a implementação de um sistema pressurizado e isento da presença de bolhas em sistemas em fluxos é de grande valia para o seu aprimoramento.

O aprisionamento da zona da amostra na cubeta de detecção aquecida (VIDA; ZAGATTO, 2014) é uma estratégia promissora para a pressurização nos sistemas em fluxo, não originando bolhas de ar. A amostra e o reagente são inseridos em fluxos transportadores convergentes e as zonas estabelecidas coalescem após o ponto de confluência, sendo a seguir mantidas sob condições estáticas no detector. O detector é removido do percurso analítico, aprisionando parte da zona de amostra durante um intervalo de tempo pré-definido para promover um maior desenvolvimento racional, resultando em melhoria da sensibilidade. Durante o período de aprisionamento, altas temperaturas são conseguidas, resultando em um aumento pronunciado da pressão hidrodinâmica, sem formação de bolhas.

Em função das vantagens conferidas pela estratégia de aprisionamento da zona da amostra com zonas coalescentes, a primeira parte do presente trabalho (item 3.3.1) teve como objetivo desenvolver um sistema de análises por injeção em fluxo com aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação e com zonas coalescentes para a determinação de cobalto em gramíneas utilizando a reação catalítica de oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio.

Cobalto é um micronutriente essencial para a síntese da vitamina B₁₂ e requerido pelos organismos para o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (KOZYRAKI; CASES, 2013). Este elemento não é essencial às plantas, mas é essencial ao gado e, na sua deficiência, há redução na produção de leite. Portanto, a determinação do teor de cobalto em gramíneas é um indicativo da necessidade de se adicionar cobalto em fertilizantes e/ou na ração animal (PLAVNIKA; SKLAN, 1996).

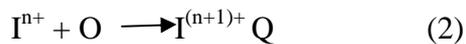
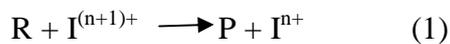
Na segunda parte do trabalho (item 3.3.2), o objetivo foi propor um sistema de análises por injeção em fluxo com aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação ou na cubeta de detecção para a determinação de vanádio em águas minerais. A necessidade de determinar vanádio em amostras de água para consumo humano se deve principalmente à sua importância associada à redução dos níveis de glicose no sangue em portadores de diabetes, e este aspecto vem sendo investigado para elucidar como esse processo ocorre (WILLSKY et al., 2011; HALEVAS, 2015). Alguns estudos relatam esse efeito benéfico à saúde humana com o consumo de águas contendo aproximadamente 65 µg L⁻¹ de vanádio (KITTA et al., 2003). Dessa forma, se justifica o desenvolvimento de procedimentos analíticos envolvendo reações catalíticas para a determinação de vanádio a concentrações de µg L⁻¹ em águas de consumo humano. A melhoria da sensibilidade para a determinação de V(V) foi conseguida aliando-se o aumento do tempo de aprisionamento da zona da amostra ao aumento da temperatura até 95°C, sem a geração de bolhas de ar.

Na terceira parte do trabalho (item 3.3.3), um procedimento analítico em fluxo foi proposto para ensaios de dessorção dos herbicidas atrazina e ametrina presentes nas amostras de solos em condições ambientalmente simuladas. Esses herbicidas têm sido aplicados em culturas de cana-de-açúcar e de milho para o controle de pragas. A presente proposta se fundamentou no conceito de bioacessibilidade (ROSENDE; MIRO, 2013), em que a extração não exaustiva foi empregada para se determinar a concentração máxima de cada herbicida disponível a ser assimilada pela biota ou, em outras palavras, a máxima concentração dos herbicidas potencialmente lixiviáveis (FEDOTOV et al., 2012). Nesse sentido, tendo em vista o tema central reações químicas relativamente lentas, a cinética de extração desses herbicidas em amostras de solos foi investigada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos catalíticos

Métodos catalíticos têm sido bastante empregados para determinação de analitos a concentrações de ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$ porque são bastante sensíveis. Em geral, espectrofotometria UV-Vis, fluorimetria ou quimiluminescência têm sido empregadas como técnicas de detecção. As reações catalíticas em geral, são reações de oxidação e redução; normalmente um íon metálico é o catalisador e o seu estado de oxidação muda de forma cíclica, conforme as equações abaixo (KAWASHIMA; NAKANO, 1992):



onde: R = redutor, I = íon catalisador, P = produto, O = oxidante, Q = produto, n = número de oxidação.

A oxidação de R a P (Eq. 1) é lenta, sendo o produto P mais rapidamente formado na presença do catalisador $\text{I}^{(n+1)+}$, o qual é reduzido ao estado de oxidação I^{n+} . Quando I^{n+} é novamente oxidado a $\text{I}^{(n+1)+}$ (Eq. 2), a reação 1 é novamente catalisada por $\text{I}^{(n+1)+}$. Dessa forma, a concentração do catalisador é mantida constante, em função da regeneração de $\text{I}^{(n+1)+}$ pelo oxidante. Nessas reações, baixas concentrações do catalisador, na ordem de ng L^{-1} , conseguem converter R em P. Como a concentração do catalisador é proporcional à taxa de formação do produto, pode-se determinar a sua concentração. Os catalisadores são comumente metais, tais como Fe(II e III), Mn(II), Cu(II), Co(II), V(IV e V), Cr(III), Se(IV), etc. Os redutores podem ser um composto orgânico ou inorgânico e os oxidantes comumente utilizados são peróxido de hidrogênio, clorato, bromato, periodato, oxigênio, persulfato, etc.

Ativadores têm sido amplamente empregados para melhorar a seletividade dos métodos catalíticos, tornando-as mais específicas a determinados metais, mas não catalisam a reação. Esses ativadores podem favorecer a interação do catalisador com o substrato, atuar na regeneração do catalisador ou atuar indiretamente no processo catalítico. Os compostos citrato, tartarato, EDTA e Tiron são ativadores comumente empregados.

2.2 Determinação de cobalto

2.2.1 Métodos não catalíticos

Os métodos oficiais para a determinação de cobalto envolvem ICP-MS, ICP-OES, FAAS e GFAAS, cujos limites de detecção foram estimados em $7 \mu\text{g L}^{-1}$; $0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ e $1 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (KEITH, 1996). Em amostras de interesse agrônômico e/ou ambiental, tais como águas naturais, extratos de solos, tecidos vegetais, cobalto se apresenta em baixas concentrações, na ordem de ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$. Os procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo envolvem então a pré-concentração desse analito, geralmente em mini-colunas, e a detecção por uma das técnicas acima mencionadas.

Nesse sentido, um procedimento analítico envolvendo sistema de análises por injeção em fluxo foi desenvolvido para a determinação de cobalto em águas de torneira com detecção em GFAAS (BENKHEDDA et al., 2000). Nesse procedimento, 5,0 mL da amostra eram injetados no fluxo transportador e o cobalto era concentrado em linha em um reator enovelado com um reagente complexante imobilizado, e eluído com 55 μL de metanol puro, promovendo melhoria na sensibilidade. O limite de detecção foi estimado em $5 \text{ ng L}^{-1} \text{ Co}$ e a frequência analítica foi de 17 h^{-1} .

Nessa mesma vertente, outro procedimento para análise de águas naturais envolveu um sistema de análises em fluxo em linha única com etapa de pré-concentração em mini-coluna de hidroxiquinolina imobilizada e detecção em FAAS (KARADAŞ; KARA, 2013). Inicialmente, a mini-coluna era condicionada com uma solução tampão. A seguir, 10 mL da amostra eram bombeados para a concentração em linha de cobalto, e este era eluído com HNO_3 e direcionado ao nebulizador do FAAS. O limite de detecção foi estimado de $0,70 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Co}$.

Um procedimento de análises por injeção em fluxo com detecção por ICP-MS foi desenvolvido para a determinação de cobalto em águas naturais (TRUJILLO et al., 2012). Uma alíquota de 2,1 mL da amostra era injetada no sistema e o cobalto era concentrado em linha explorando-se mini-coluna com a resina quelante de sulfofenil. A seguir, 1,4 mL de ácido nítrico eram empregados para eluir o analito em direção ao nebulizador. O limite de detecção foi estimado como $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e o sistema analisava 5 amostras por hora.

Os procedimentos analíticos para a determinação espectrofotométrica de cobalto envolvem tanto reações catalíticas quanto não catalíticas. Os métodos não catalíticos se baseiam na complexação do cobalto com um reagente cromogênico que absorve em um determinado comprimento de onda característico.

Como exemplo dessa vertente, um sistema de análises por injeção em fluxo em linha única foi desenvolvido para a determinação espectrofotométrica de cobalto em águas naturais (ANDAC et al., 2001). Nesse procedimento, 10 μL da amostra eram injetadas em um fluxo transportador composto pelo reagente cromogênico e concentrada em uma mini-coluna catiônica. Após eluição, o complexo colorido era monitorado a 640 nm. O limite de detecção foi estimado em 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a frequência de amostragem foi de 60 h^{-1} .

2.2.2 Métodos catalíticos em sistemas de análises em fluxo

Geralmente, os métodos catalíticos descritos na literatura para a determinação do cobalto envolvem a oxidação dos reagentes *e.g.* violeta de pirocatecol, ácido protocatecuico, fenilenodiamina, luminol, ácido gálico e Tiron. Para tanto, o peróxido de hidrogênio é o oxidante comumente empregado.

Um sistema de análises por injeção em fluxo envolvendo a oxidação de violeta de pirocatecol por peróxido de hidrogênio catalisada por Co(II) em meio alcalino foi proposto por Deguchi, Higashi e Sanemasa (1986). A amostra era injetada em um fluxo transportador e direcionada até a bobina de reação imersa em banho termostaticado a 33°C onde se misturava com os reagentes adicionados por confluência. O produto colorido era detectado espectrofotometricamente a 585 nm. O sistema determinava 60 amostras por hora, na faixa de concentrações de Co(II) entre 1,0 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Um procedimento analítico foi desenvolvido para a determinação de cobalto em águas naturais envolvendo a concentração em linha em uma coluna de quinolinol, seguida pela separação dos interferentes por uma resina catiônica (YAMANE; WATANABE; MOTTOLA, 1988). Um volume de 50 mL de amostra era utilizado na etapa de concentração. Co(II) era eluído da coluna com 200 μL do eluente, passava pela resina para a separação dos interferentes, e catalisava a oxidação do ácido protocatecuico por peróxido de hidrogênio em meio alcalino. A absorvância dessa reação era monitorada espectrofotometricamente a 480 nm. O limite de detecção foi estimado de $5,0 \times 10^{-3}$ ng mL^{-1} e cada análise despendia 35 min.

Um sistema de análises em fluxo foi empregado para a determinação de Co(II) em águas naturais empregando a reação catalítica da oxidação *p*-fenilenodiamina por peróxido de hidrogênio na presença de Tiron como ativador em meio alcalino (MALAHOFF; KOLOTYRKINA; SHPIGUN, 1996). Nesse procedimento, a amostra era injetada no fluxo transportador, recebia os reagentes por confluência, e fluía através de uma bobina de reação imersa em banho termostático a 30°C. A detecção era feita espectrofotometricamente a 554 nm. O limite de detecção foi estimado de 1,0 ng L⁻¹ e o sistema determinava 50 amostras por hora.

Um procedimento envolvendo sistema de análises por injeção em fluxo foi desenvolvido para a determinação de Co(II) envolvendo um método quimioluminescente, baseado na ação catalítica de Co(II) na oxidação do luminol por periodato de potássio (LIN et al., 1993). Os reagentes eram adicionados por confluência e fluíam para a cubeta de fluxo, que era um tubo transparente em um formato espiral posicionada próxima da fotomultiplicadora, possibilitando a medida da intensidade da luz emitida pela reação. O limite de detecção foi estimado como 0,01 ng mL⁻¹ e a frequência de amostragem foi de 70 h⁻¹.

Outros procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo envolvendo concentração em linha, reações quimioluminescentes catalizadas por Co(II), e utilizando a fotomultiplicadora como detector foram recentemente revistos (WORSFOLD et al., 2013). Como um exemplo dessa vertente, a pré-concentração do Co(II) era feita em coluna com quinolinol imobilizado em gel de sílica e eluído com HCl diluído em direção à bobina de reação aquecida a 60°C, onde ocorria a mistura dos reagentes ácido gálico e o peróxido de hidrogênio adicionados por confluência. O limite de detecção foi estimado em 0,62 ng L⁻¹ e o sistema determinava 7 amostras por hora (HIRATA et al., 1996).

Um procedimento analítico para a determinação de Co(II) foi desenvolvido em sistema de análises por injeção em fluxo e se baseava na oxidação dos reagentes 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e *N*-etil-*N*-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina (DAOS) por peróxido de hidrogênio catalisada por Co(II) (FUJIMOTO et al., 1999). O reagente Tiron era utilizado como ativador dessa reação, devido à formação do complexo ativador-metal-substrato. Nesse procedimento, a amostra era injetada no fluxo transportador, confluiu com os reagentes, era direcionada para a bobina de reação de 7 m termostaticada a 70 °C, sendo em seguida, resfriada a 25°C em uma segunda bobina de 1,5 m também termostaticada, para posterior detecção espectrofotométrica a 525 nm. O limite de detecção foi estimado de 5 pg mL⁻¹ e a frequência de amostragem era de 30 amostras por hora.

Cobalto está presente na composição da cobalamina (vitamina B₁₂) e procedimentos analíticos em fluxo determinam o cobalto relacionando-o diretamente com a concentração da cobalamina presente na amostra. Como exemplo disso, um procedimento analítico em fluxo utilizava uma plataforma miniaturizada para a determinação do Co(II) (LOK et al., 2012). A reação quimiluminescente envolvia a reação luminol-peróxido catalisada por Co(II) em meio alcalino. Nesse sistema, multisseringas eram utilizadas para propelir as amostras e os reagentes para os microcanais integrados em um “microchip”, permitindo a mistura dos reagentes. O cobalto complexado na vitamina B₁₂ não catalisava a reação. Para que a reação ocorresse, a cobalamina era acidificada em linha, liberando Co(II). A seguir, NaOH era adicionada para tornar o meio reacional alcalino. Essa mistura era conduzida ao microreator, juntamente com o luminol e o peróxido. A cela de detecção era composta por microcanais em espiral e a intensidade da luz emitida pela reação era detectada por uma fotomultiplicadora. O limite de detecção foi de 0,368 pg mL⁻¹.

Outro procedimento automatizado em sistema de análise em fluxo com multisseringa foi desenvolvido para a determinação de cobalto na vitamina B₁₂ (CHAPARRO et al., 2015). A oxidação da alizarina por peróxido de hidrogênio catalizada por Co(II) gerava o produto por descolorimetria, ocorrendo em meio alcalino e aquecido a 67°C. A detecção espectrofotométrica era feita a 465 nm, empregando uma célula de longo (1,0 m) caminho óptico. O limite de detecção foi de 0,3 µg L⁻¹ e o sistema analisava 30 amostras por hora.

Oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio

Esta oxidação é catalisada por Co(II) em meio alcalino, originando o radical semiquinona, o qual apresenta absorção máxima na faixa de 400 a 450 nm (OTTO; WERNER, 1983). Esta reação é tanto catalisada por Co(II) quanto por Mn(II), sendo esquematizada abaixo:

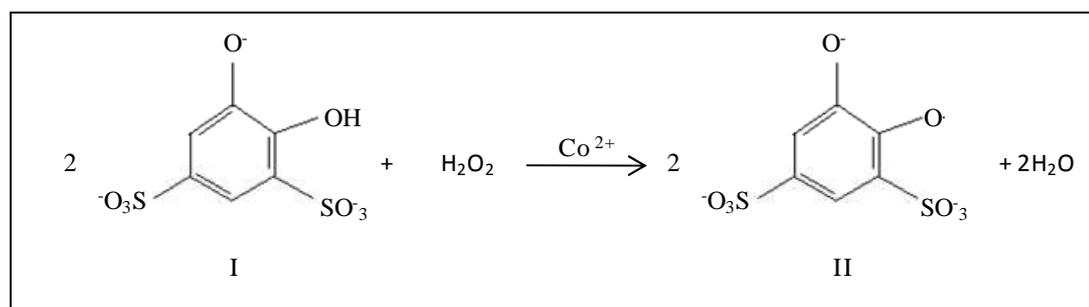


Figura 1 - Reação catalítica de oxidação do Tiron (I), gerando o radical semiquinona (II)
Fonte: Otto e Werner (1983).

Um procedimento analítico para a determinação de cobalto envolvendo a oxidação do Tiron por peróxido de hidrogênio foi desenvolvido por Isshiki e Nakayama (1987) que empregaram o sistema de análises em fluxo segmentado. As vantagens desses sistemas é que a dispersão da zona da amostra é minimizada e o tempo de residência é longo, características que melhoram a sensibilidade para métodos explorando reações lentas. Nesse procedimento, a amostra era inserida em um fluxo transportador tamponado alcalino e fluía em direção ao primeiro reator, onde se misturava com peróxido e Tiron. Após esse reator, um fluxo segmentado de ar era adicionado em direção ao segundo reator de 12 m, termostaticado a 30°C, juntamente com a mistura da amostra e dos reagentes. O ar era retirado do percurso analítico por um desborbulhador posicionado na entrada da cubeta de fluxo. A faixa de concentrações analisada era de 0,003 – 5,0 ng mL⁻¹ e a frequência de amostragem era de 40 amostras por hora.

Um procedimento analítico utilizando o sistema de análises por injeção em fluxo foi desenvolvido por NOGUEIRA e colaboradores (1998) para a determinação de Co(II) em fezes de bovinos e equinos. A amostra era injetada em fluxo transportador e os reagentes eram bombeados até um ponto de confluência, onde ocorria a primeira mistura e fluíam para a bobina de reação de 150 cm. O sinal transiente era monitorado espectrofotometricamente a 416 nm. O limite de detecção foi estimado em 0,2 µg L⁻¹ e o sistema analisava 65 amostras por hora.

2.3 Determinação catalítica de vanádio

Os métodos catalíticos para a determinação do vanádio, em geral contemplam os estados de oxidação (IV) e (V) e utilizam bromato ou H₂O₂ como agente oxidante de reagentes orgânicos (PYRZYŃSKA, 2005). Procedimentos analíticos envolvendo reações catalíticas para essa determinação têm sido desenvolvidos em batelada e em fluxo (KOLEV; McKELVIE, 2008), atingindo baixos limites de detecção sem a necessidade de etapas de pré-concentração.

Com relação a procedimentos clássicos, foi proposta a determinação de V(V) baseada na oxidação de diaminonaftaleno por bromato em meio ácido sob temperatura ambiente, catalizada pelo V(V), tendo Tiron como ativador (GAO et al., 2002). O produto da reação era determinado espectrofluorimetricamente ($\lambda_{ex} = 356$ nm, $\lambda_{em} = 439$ nm), após 5,0 min a partir do início da reação. O método mostrou-se bastante sensível, com limite de detecção de 0,0088 µg L⁻¹.

Outro procedimento analítico em batelada envolvia um método catalítico seletivo para a determinação de V(IV) na presença de V(V) (SAFAVI et al., 2000). A espécie V(IV) catalisava a reação de oxidação do azul de anilina em meio ácido a 30°C. A descoloração do reagente na presença de V(IV) era espectrofotometricamente monitorada a 591 nm após 5,0 min a partir do início da reação. O procedimento proposto apresentou boa recuperação de V(IV) mesmo na presença de V(V), na faixa de 93-101%, com o limite de detecção de 0,002 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Um procedimento analítico utilizando o sistema de análises por injeção em fluxo para a determinação de V(V) em águas naturais tinha como etapa inicial a concentração/separação do analito seguida por sua determinação catalítica com detecção fotométrica do produto colorido a 430 nm (YAMANE; OSADA; SUZUKI, 1998). Inicialmente, 1,0 mL da amostra era injetado e V(V) era adsorvido em uma coluna Sephadex 25 (70 x 4,0 mm) e posteriormente eluído com 0,5 mL de 0,010 mol L⁻¹. O V(V) eluído interagiu com ácido cromotrópico e bromato, ambos adicionados por confluência. Esta mistura e a reação catalítica ocorriam na bobina de reação de 20 m imersa em um banho termostaticamente controlado a 35°C. Para evitar a formação de bolhas de ar no detector, uma bobina restritora (10 m, 0,5 mm i.d.) era adicionada ao sistema na saída da cela de fluxo. As interferências de Fe(III) e Cu(II) foram suprimidas com a separação eficiente de V(V) dessas espécies pela coluna. O limite de detecção foi estimado em 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Em outro procedimento analítico utilizando o sistema de análises por injeção em fluxo para a determinação de V(V) (SHIOBARA et al., 1999), uma alíquota de 287 μL da amostra contendo V(V) era injetada em um fluxo transportador por uma válvula de seis vias. Os reagentes sulfopropil-tetrametilbenzidina e bromato eram adicionados ao sistema por confluência. A oxidação do sulfopropil-tetrametilbenzidina por bromato era catalizada pelo V(V) na bobina de reação de 5,0 m imersa em um banho termostaticamente controlado a 60°C. O ácido sulfosalicílico também era adicionado ao sistema por confluência como ativador da reação. O produto colorido formado fluía para outra bobina de 1,0 m imersa em outro banho termostaticamente controlado a 25°C, sendo resfriado e determinado espectrofotometricamente a 460 nm. O limite de detecção foi determinado como sendo 0,01 ng mL^{-1} , e o sistema analisava 15 amostras por hora.

A determinação automatizada de vanádio em águas salinas por quimiluminescência foi também proposta (WASEEM; YAQOUB; NABI, 2010). Nesse procedimento, uma alíquota da amostra de 300 μL era injetada em um fluxo transportador, passando por uma coluna redutora de zinco. O método envolvia a redução de ambos V(V) e V(IV) a V(III), e esta

espécie catalisava a oxidação do formaldeído por permanganato de potássio em meio ácido, sendo a intensidade da luz emitida detectada por uma fotomultiplicadora com uma cela de fluxo em espiral. O limite de detecção foi determinado como sendo $8,0 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e o sistema analisava 100 amostras por hora.

Outro procedimento analítico por injeção em fluxo foi desenvolvido para esta determinação (KEYVANFARD; ABEDI, 2011), o qual se baseava na oxidação do reagente verde de malaquita pelo bromato, catalisada por V(V) em meio micelar e ácido. Nesse procedimento, uma alíquota da amostra de 200 μL contendo V(V) era injetada por uma válvula de 6 vias e se misturava com os reagentes verde de malaquita e bromato adicionados por confluência em uma bobina de reação de 10 m. O meio micelar favorecia o desenvolvimento da reação, pelo aumento da taxa de colisões entre os reagentes e o catalisador. O limite de detecção foi estimado em $5,2 \text{ ng mL}^{-1}$ e o sistema analisava 20 amostras por hora.

Um procedimento analítico utilizando multisseringas era acoplado a uma plataforma microfluídica para a determinação de V(V) pela oxidação de óxido gálico com bromato e catalisada por V(V) a 40°C (ABOUHIAT et al., 2014). As medidas das intensidades das absorvâncias eram feitas espectrofotometricamente a 384 nm. Esta plataforma integrava todos os componentes presentes nos sistemas de análises em fluxo, tais como pontos de confluência, bobinas de reação e cela de detecção de 3 cm de caminho óptico e estava sob uma câmara termostaticada para o controle da temperatura. A cubeta de fluxo era colocada na saída da bobina e conectada a cabos de fibra óptica para a transmissão da luz da fonte de radiação até o detector. A propulsão das soluções era feita utilizando três seringas, sendo que uma alíquota de 80 μL da amostra no fluxo transportador se misturava com os reagentes na bobina de reação. O limite de detecção e a frequência analítica foram estimados em $0,24 \mu\text{g L}^{-1}$ e 30 h^{-1} .

A estratégia “stopped-in-loop” proposta em sistema de análise em fluxo foi eficientemente empregada para a determinação de V(V) em amostras de águas minerais (TESHIMA et al., 2009). Esse procedimento se baseia na reação catalítica de oxidação de *p*-anisidina pelo bromato em meio ácido e aquecido, e o produto colorido era determinado espectrofotometricamente a 510 nm. O intervalo de tempo para o desenvolvimento reacional utilizado era de 3 min e, com isso, possibilitou-se que a faixa $0,1 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de V(V) fosse quantificada.

O desenvolvimento de procedimentos analíticos envolvendo o aprisionamento na cela de detecção aquecida é interessante no que diz respeito a melhorias de sensibilidade para reações catalíticas sem a geração de bolhas. Como demonstração da viabilidade desta nova

proposta, foi selecionada a determinação catalítica de V(V) em águas minerais utilizando a reação catalítica acima descrita.

2.4 Herbicidas

2.4.1 Características

Triazinas se constituem em uma classe de herbicidas e têm sido aplicadas no solo para o controle de pragas agrícolas, podendo contaminar os ambientes aquáticos. Esses herbicidas são tóxicos às plantas devido à inibição da fotossíntese e podem afetar a saúde humana através das dietas alimentares (SILVA et al., 2013).

Dentre as triazinas, a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) e a ametrina (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-triazina) têm sido utilizadas para o controle de pragas em várias culturas, tais como milho e cana-de-açúcar (SILVA et al., 2013). A dose de campo recomendada para esses herbicidas se situa na faixa de 1,0 e 3,25 kg ha⁻¹ (AMADORI et al., 2013).

A atrazina é classificada como medianamente tóxica e tem sido associada à contaminação de águas subterrâneas e de organismos não alvo devido à sua toxicidade, persistência, mobilidade e acúmulo no ambiente (COMBER, 1999). Os estudos relacionados à persistência desse herbicida no ambiente se referem à determinação da sua concentração empregando a extração exaustiva em amostras de solos agrícolas. Como exemplo dessa vertente, um estudo realizado em campo para a determinação da concentração residual da atrazina (TANDON; SINGH, 2015), a dose de 2,0 kg ha⁻¹ foi aplicada em solo argiloso, na faixa de profundidade de 0 – 15 cm. Com o método de extração exaustiva, verificou-se que a concentração residual após 100 dias de aplicação era de 0,075 µg g⁻¹, sendo o tempo de meia vida desse herbicida de 16,4 dias. Após 160 dias de aplicação desse herbicida, não foram observados resíduos nas amostras dos solos analisadas.

A ametrina é classificada como moderadamente tóxica (HURLEY; HILL; WHITING, 1998), sendo altamente persistente e bioacumulada no ambiente, causando impactos significativos no ecossistema. Nesse sentido, um estudo para a determinação residual desse herbicida utilizando extração exaustiva foi realizado sob condições de campo (VIVIAN et al., 2007). Com a aplicação de 200 L ha⁻¹ de ametrina em solo argiloso na profundidade 0 – 20 cm verificou-se a presença de resíduos após 198 dias de aplicação desse herbicida, o que significa que ele é considerado altamente persistente no ambiente. A máxima concentração

residual, após 18 dias de aplicação era equivalente a $0,35 \text{ mg kg}^{-1}$ e a quantidade mínima era de $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ após 198 dias de aplicação.

Os processos afetando a persistência da ametrina e atrazina nos solos incluem a fotodegradação (XU; CHU; GRAHAM, 2014), a biodegradação (WACKETT et al., 2002), a adsorção e a dessorção (BAILEY; WHITE, 1970). O processo de adsorção (SCHMIDT; SALTON; SCORZA-JÚNIOR, 2015) dos herbicidas no solo é definido como a retenção desses compostos nas partículas do solo, não estando disponíveis em solução. Com isso, não se dissipam pela superfície do solo para serem biodegradados e também não se lixiviam. A retenção dos herbicidas no solo é influenciada pelo pH, área superficial, teor de matéria orgânica, presença de outras espécies, tamanho das partículas e porosidade (MUDHOO; GARG, 2011). O processo de dessorção também se refere à bioacessibilidade, o que significa que esses compostos estão presentes em solução e são potencialmente lixiviáveis (SCHMIDT; SALTON; SCORZA-JUNIOR, 2015).

2.4.2 Estudos cinéticos de bioacessibilidade de herbicidas em solos

Bioacessibilidade é definida como “a máxima fração potencialmente disponível das espécies alvo para a biota em condições ambientais simuladas” (ROSENDE; MIRÓ, 2013). Nesse sentido, há um grande interesse no desenvolvimento de metodologias para ensaios de extração para o acesso dos contaminantes orgânicos disponíveis no ambiente (FEDOTOV et al., 2012).

Normalmente, os métodos de extração dos herbicidas em solos empregam a extração exaustiva (VILLAVERDE et al., 2013), a qual envolve a determinação da concentração total do contaminante, não necessariamente reflete a concentração potencialmente disponível a ser assimilada no ambiente. É necessário considerar que, ao entrar em contato com a matriz do solo, os herbicidas são permeáveis aos seus poros e podem se ligar de forma irreversível aos seus componentes, tornando-se menos disponíveis para a degradação microbiana ou assimilação pelas plantas. Dessa forma, a fração bioacessível de um herbicida no solo pode decair ao longo do tempo, em função dos processos de biodegradação, fotodegradação e lixiviação. Vale ressaltar que os fatores que afetam todos esses processos incluem as características de composição dos solos (*e.g.* teor de carbono orgânico, porcentagem de argila, textura do solo e pH), pluviosidade, temperatura e luminosidade.

Nesse sentido, a extração não exaustiva dos contaminantes orgânicos de forma a monitorar a sua disponibilidade a serem assimilados no ambiente, é realizada com soluções

salinas diluídas, dentre elas $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Ca(NO}_3)_2$, $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{OAc}$ ou $1,0 \text{ mol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Tais estudos são de principal relevância para correlacionar os contaminantes potencialmente disponíveis no ambiente com os estudos dos mecanismos de assimilação desses contaminantes pelos organismos vivos (FEDOTOV et al., 2012).

Para os estudos de adsorção e dessorção de contaminantes orgânicos em solos geralmente empregam métodos de extração em batelada, conforme a OECD 106 (Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento). Esse mesmo procedimento é utilizado para os estudos de adsorção e dessorção de triazinas e metabólitos no solo (MERSIE; SEYBOLD, 1996; ABATE et al., 2004). Inicialmente, a mistura contendo o solo, os herbicidas e a solução extratante ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de CaCl_2) é agitada em mesa agitadora durante 24h para que haja a adsorção desses compostos no solo. Após esse período, a parte sólida é separada do sobrenadante por 15 min de centrifugação, sendo então coletado, filtrado e analisado por HPLC. Para os estudos de dessorção, o material sólido remanescente é considerado. Para tanto, a solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ é adicionada a esse material e essa mistura novamente é mantida sob agitação por 24 h.

Os métodos clássicos para os estudos de adsorção dos herbicidas no solo utilizam intervalos de tempo muito longos (*e.g.* 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 e 24h) para a adsorção (ABATE et al., 2004). Para a avaliação da dessorção, as análises dos extratos são feitas após 24h de contato entre a solução de CaCl_2 , a amostra de solo e os herbicidas (ABATE et al., 2004; JABLONOWSKI et al., 2008).

Os procedimentos para os ensaios de dessorção empregam tempos de extração predefinidos sem um estudo cinético prévio (FEDOTOV et al., 2012), sendo este de fundamental importância para ajustar o tempo da análise, dependendo da cinética que pode ser rápida, lenta ou muito lenta. Dessa forma, é importante que os procedimentos analíticos incluam um estudo cinético prévio de dessorção dos herbicidas do solo para o monitoramento desses contaminantes potencialmente lixiviáveis no ambiente, de acordo com o conceito de bioacessibilidade. Isto justifica a proposta de um procedimento analítico em fluxo que envolva as etapas de extração, concentração e separação dos herbicidas atrazina e ametrina presentes nas amostras de solos.

2.4.3 Procedimentos para a concentração e separação em linha dos herbicidas

2.4.3.1 Acoplamento da concentração em linha com a separação das triazinas por cromatografia líquida

Os protocolos para a SPE tradicional (BECEIRO-GONZÁLEZ et al., 2014) requerem grandes volumes de solvente para o condicionamento e um longo tempo para a secagem do cartucho, seja através de um sistema a vácuo ou por um fluxo de nitrogênio líquido. Após a eluição, o extrato orgânico é seco pela evaporação com o fluxo de nitrogênio, o volume é reconstituído com o solvente e o composto dissolvido é então injetado no cromatógrafo. Todo esse processo torna os procedimentos mais demorados e laboriosos.

O acoplamento SPE-LC (HYÖTYLÄINEN, 2007) comumente envolve o uso de válvulas multiportas e uma ou mais bombas para transferir o extrato para o cromatógrafo (Figura 2). Nesse caso, o procedimento analítico para a determinação dos compostos de interesse integra tanto o processo de pré-concentração quanto a separação desses compostos, encurtando a etapa do preparo da amostra, e tornando as análises mais rápidas e sem contaminação, pois todo o procedimento ocorre em um sistema fechado.

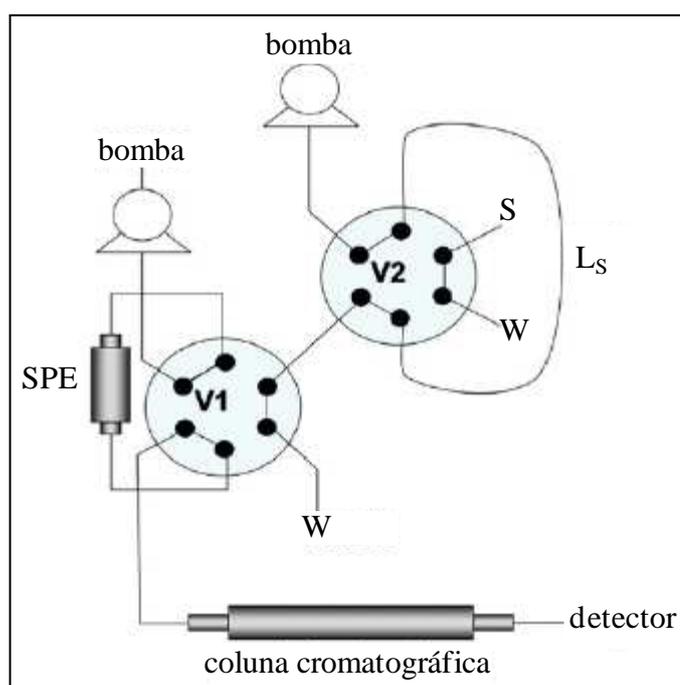


Figura 2 - Acoplamento SPE - LC. S = amostra; W = descarte; V1 e V2 = válvulas de 6 vias; SPE = extração em fase sólida; L_s = alça de amostragem. Adaptada de Hyotylainen (2007).

A hifenção SPE em linha (HYÖTYLÄINEN, 2007) com LC tem sido utilizada para as separações dos compostos pela maior frequência de amostragem e reprodutibilidade dos dados. Em comparação com a detecção “off-line”, todo o volume do extrato é injetado em LC. Tipicamente a SPE é feita em minicolunas com dimensões entre (10–20mm

× 1,0 – 4,6 mm d.i.), ao passo que o sistema SPE miniaturizado utiliza minicolunas (10–40 mm x 50 µm – 1mm d.i.). Em ambas as situações, tanto a etapa de concentração quanto a de “cleanup” do sorbente ocorrem, sendo que o mesmo sorbente pode ser reutilizado para várias amostras.

Os sorbentes utilizados para SPE (ZARPON et al., 2006) comumente são os de fase reversa C₁₈, materiais de troca iônica, imunosorbentes, materiais de acesso restrito (RAM) e polímeros molecularmente impressos (MIP). RAM têm como característica principal, a seletividade, excluindo as macromoléculas na etapa da pré-concentração (Figura 3).

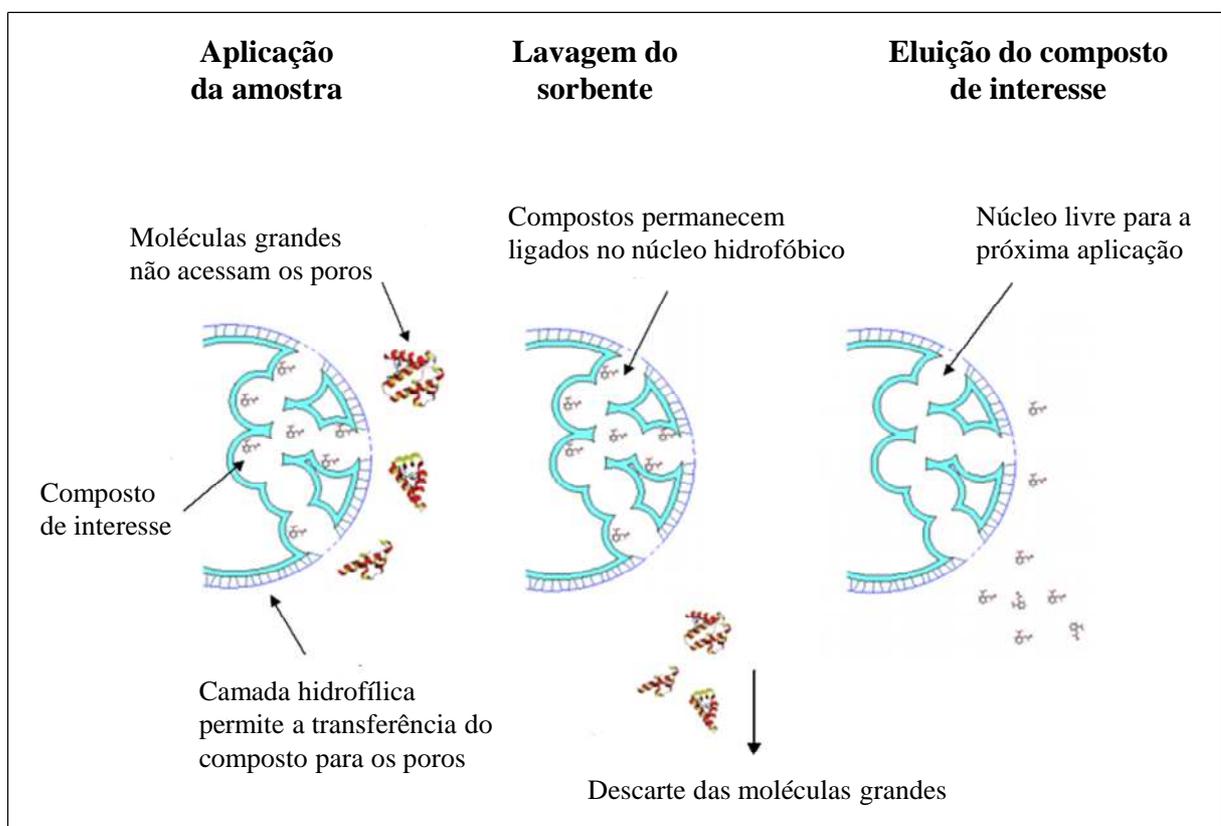


Figura 3 - Sorbente composto por material de acesso restrito para a concentração em linha de herbicidas. Adaptada de Agilent (2011).

2.4.3.2 Estratégia “heart cut”

Em amostras com matrizes complexas, quando o “cleanup” é laborioso, consumindo muito tempo para o preparo dessas amostras na etapa prévia às separações cromatográficas, utiliza-se a estratégia “heart cut” (ERNL, 1981), análoga à “zone sampling” (REIS et al., 1981). Nessa estratégia, a amostra pode ser cortada em sua porção frontal (“front cut”), central (“heart cut”) ou final (“end cut”), selecionando uma parte da amostra contendo as

espécies de interesse a serem separadas em LC. Isso pode ser conseguido com a técnica denominada “column switching” com a utilização de duas válvulas de 6 vias, sendo que cada válvula contém uma coluna conectada. A amostra é injetada na primeira coluna, e a porção contendo as espécies de interesse é selecionada para a segunda coluna, onde ocorre a separação dos compostos correspondentes. A porção que permaneceu na primeira coluna é descartada. Na primeira coluna, há a tendência de maior sobreposição de picos, devido a um maior número de espécies presentes, sendo este efeito atenuado na segunda coluna, devido ao corte realizado.

“Heart cut” é frequentemente utilizado para tornar o procedimento mais seletivo, sendo realizado após a etapa de concentração em linha (OLIFEROVA et al., 2005), conforme se observa na Figura 4. Nesse caso, esses sistemas também compreendem duas válvulas, sendo que na primeira, uma coluna é conectada para a etapa de concentração e “cleanup”. A segunda contém a alça de amostragem por onde a fase móvel é bombeada, injetando os compostos de interesse na coluna cromatográfica.

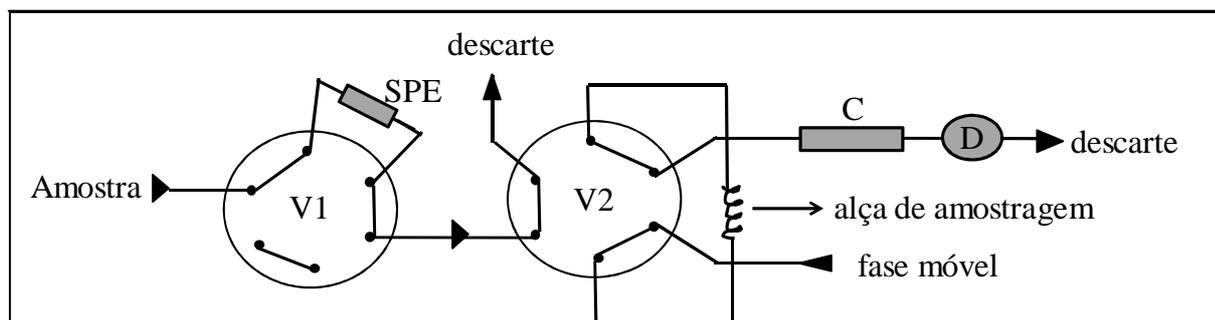


Figura 4 - Configuração utilizada para o “heart cut” após a concentração para a injeção da amostra na coluna cromatográfica. V1 e V2 = válvulas de 6 vias. SPE = coluna de extração em fase sólida. C = coluna cromatográfica. D = detector.

Essa estratégia assemelha-se àquela de aprisionamento da zona da amostra, no sentido de que a porção central, mais concentrada da zona da amostra é injetada no cromatógrafo. Nesse sentido, a porção mais concentrada dos compostos de interesse é selecionada de acordo com o volume do eluente contendo esses compostos a serem injetados na coluna. No entanto, o “heart cut” não é utilizado para a melhoria de sensibilidade, pois não envolve nenhum tipo de desenvolvimento reacional, tal como ocorre nos procedimentos propostos para a determinação de Co(II) (item 3.3.1) e V(V) (item 3.3.2).

2.4.3.3 Colunas para separação das triazinas

As colunas para separação de triazinas em geral são empacotadas (do inglês “packed”) ou monolíticas. As colunas monolíticas possuem alta porosidade (Figura 5), sendo mais permeáveis do que as empacotadas, que são menos porosas (IKEGAMI; TANAKA, 2004). As partículas das colunas empacotadas em geral são caracterizadas por tamanho do poro na faixa de 6 até 30 nm, enquanto que as colunas monolíticas apresentam mesoporos de aproximadamente 10 nm e macroporos de 10 μm de diâmetro (SILVA et al., 2004). Conseqüentemente, menor pressão é requerida para a separação desses compostos.

A separação dos compostos sob alta pressão é inerente às colunas empacotadas. Sendo assim, baixas vazões são empregadas para compensar esse efeito, o que aumenta o tempo de análise. Devido à alta permeabilidade das colunas monolíticas, vazões mais elevadas podem ser empregadas, reduzindo o tempo requerido para separação dos compostos de interesse.

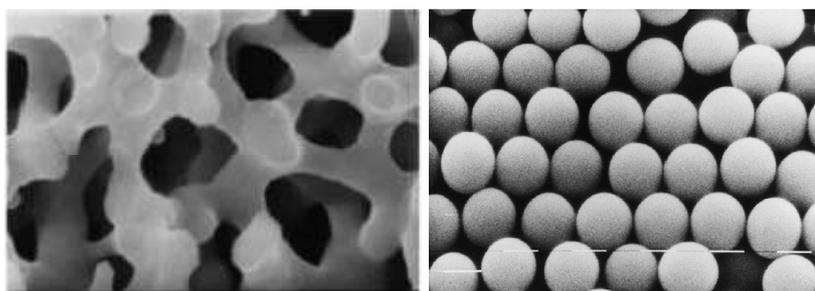


Figura 5 - Colunas de sílica monolítica (esquerda) ilustrando os poros, e empacotada (direita). Adaptada de Ikegami e Tanaka (2004, esquerda) e de Unger, Skudas e Schulte (2008, direita).

Tanto as colunas empacotadas quanto as colunas monolíticas podem ter a fase estacionária reversa com a adição de grupos orgânicos apolares, tais como octil (C_8) ou octadecil (C_{18}) ligados diretamente ao átomo de silício. Beale e colaboradores (2010) relataram que a eficiência de separação em LC também pode ser obtida com colunas monolíticas de fase reversa C_{18} em comparação com as colunas empacotadas de fase reversa, tendo como vantagem, menores tempos de retenção. Altas vazões podem ser utilizadas, tornando as análises mais rápidas. Nesse sentido vários procedimentos empregando colunas monolíticas com fase estacionária C_{18} foram propostos no Brasil para a determinação das triazinas e dos seus metabólitos (SANTOS; INFANTE; MASINI, 2009; INFANTE; URIO; MASINI, 2011; URIO; INFANTE; MASINI, 2013; URIO; MASINI, 2015).

Como a fase estacionária reversa é menos polar, a separação dos compostos utiliza a fase móvel mais polar, ao contrário do que ocorre na utilização da fase estacionária normal. As principais vantagens da exploração da fase estacionária reversa é a utilização de solventes orgânicos menos tóxicos, rapidez nas análises e boa repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos (TONHI et al., 2002).

2.4.3.4 *Ensaio de adsorção-dessorção e separação cromatográfica de herbicidas*

Conforme acima mencionado, a literatura relata que os estudos de adsorção e dessorção das triazinas e metabólitos em solos (MERSIE; SEYBOLD, 1996; ABATE et al., 2004) envolvem procedimentos em batelada, os quais empregam intervalos de tempo muito longos, desconsiderando a cinética de adsorção/extração para cada composto. Além disso, para a separação dos herbicidas e seus metabólitos, a eluição por gradiente é comumente utilizada, resultando em longos tempos de eluição para cada corrida completa, e.g. 18 min (ABATE et al., 2004) e 30 min (BECEIRO-GONZÁLEZ, 2014). Dessa forma, os intervalos de tempo utilizados tanto para o preparo da amostra quanto para a separação desses compostos são longos e o procedimento completo, laborioso.

A automatização desses processos é interessante porque torna as análises mais rápidas, e permite que os processos requeridos ocorram em ambiente fechado, diminuindo a interferência do operador e evitando contaminações. Um melhor controle do tempo é obtido, e com isso maior repetibilidade é alcançada. Nesse sentido, os sistemas de análises em fluxo (CLAVIJO et al., 2015) apresentam a vantagem de integrar tanto o processo de preparo da amostra quanto a separação dos herbicidas utilizando colunas cromatográficas, com as vantagens de simples operação, baixo custo e baixa geração de resíduos.

Nos sistemas SIA (RUZICKA; MARSHALL, 1990), a solução transportadora, a amostra e os reagentes são aspirados sequencialmente e fluem através de tubos conectados perifericamente a uma válvula multiportas para a bobina coletora, a qual é conectada à porção central da válvula. A seguir, o sentido do fluxo é invertido, permitindo que a mistura entre as soluções aspiradas ocorra e conflua para outros compartimentos, tais como bobina de reação, minicolunas contendo o sorbente apropriado para a concentração em linha dos compostos de interesse, detector, etc.

A determinação dos herbicidas potencialmente lixiviáveis em solos utilizando o sistema SIA afigura-se como promissora para o acoplamento com LC visando à separação desses compostos. Com isso, é possível realizar o monitoramento desse processo ao longo do tempo a partir do instante de aplicação dos herbicidas em campo. Ainda, é possível integrar uma minicoluna contendo o sorbente apropriado para a concentração dos herbicidas e “cleanup” em linha, com eluição direta para a coluna cromatográfica em LC para a separação desses compostos. Nesse caso, uma válvula de injeção de 6 vias é utilizada como uma interface e o volume do eluato injetado é definido pela alça de amostragem conectada a essa válvula.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e acessórios

3.1.1 Determinações de Co(II) e V(V)

Um espectrofotômetro multicanal modelo USB 2000 UV-Vis (Ocean Optics, Flórida, Estados Unidos) conectado a um microcomputador era utilizado para a detecção dos sinais. A fonte de radiação era uma lâmpada tungstênio-halogênio e os cabos de fibra óptica foram utilizados para o transporte da radiação da lâmpada para a cubeta de fluxo Hellma modelo 178-OS, apresentando caminho óptico = 10 mm e volume interno = 80 μ L. A aquisição dos dados era realizada com o “software” fornecido pelo próprio fabricante.

Um injetor-comutador construído em acrílico e uma bomba peristáltica de oito canais (Ismatec-IPC, Wertheim, Alemanha) eram utilizados. As alças de amostragem e os reatores eram construídos com tubos de polietileno com diâmetro interno de 0,8 mm; conectores de PEEK também eram utilizados.

A bobina de reação (Figura 6a) era confeccionada com um tubo de polietileno de 200 cm de comprimento enrolado em uma haste de alumínio imersa em um banho termostático (Figura 6b) em forma cilíndrica (i.d. = 7 cm; altura = 10 cm) preenchido com glicerina. A cubeta de fluxo (Figura 6c) era conectada a um bloco de alumínio termostatizado (Figura 6d) para que a reação catalítica se desenvolvesse em meio aquecido. Este era construído na forma de um bloco de 6 cm de altura; 4 cm de largura e 6 cm de comprimento, com um encaixe interno da mesma medida para a cubeta de fluxo e com dois orifícios para conexão de fibras ópticas para a transmissão de luz para o detector, uma resistência tipo cartucho de Alta Carga Dennex 1/4” de 100W, 220V e um termostato digital Full Gauge

modelo TIC-17RGTi. Para se evitarem perdas de calor, o bloco de alumínio era recoberto por cortiça.

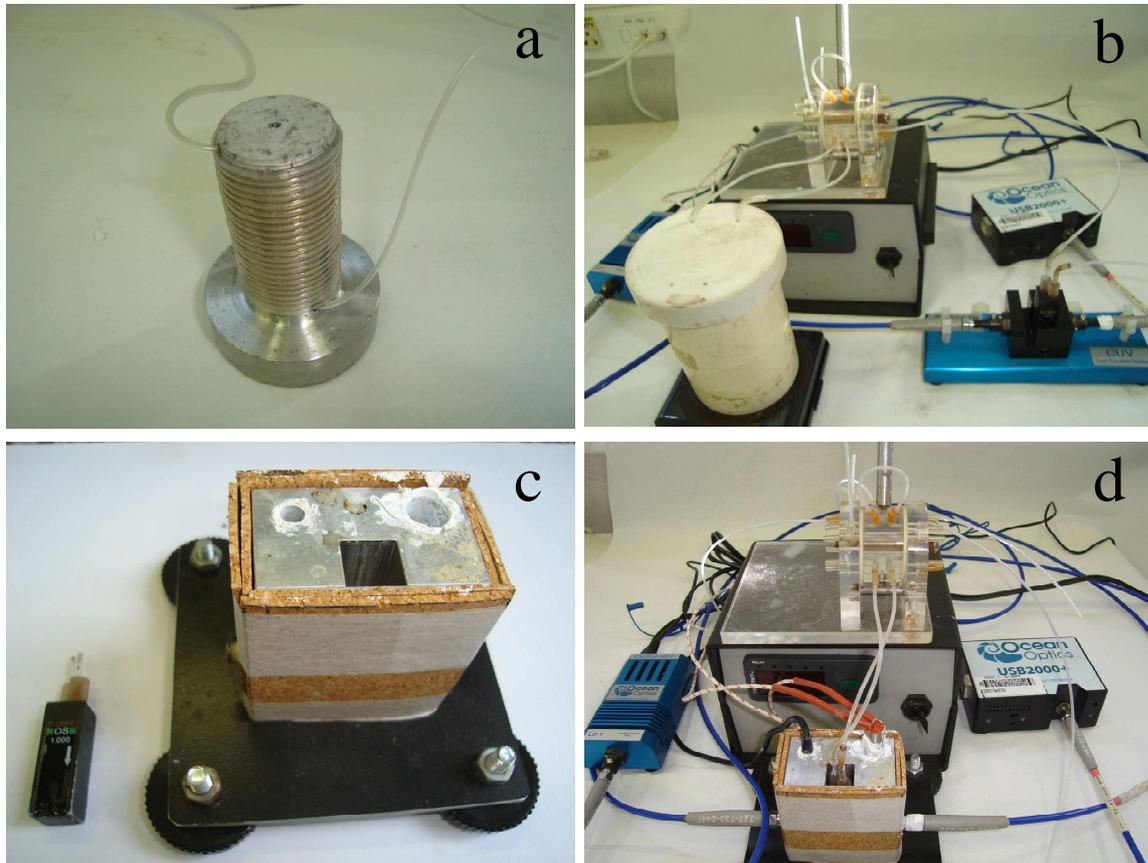


Figura 6 - Componentes dos sistemas com zonas coalescentes e o aprisionamento da zona de amostra no reator aquecido (a, b) ou na cubeta de fluxo aquecida (c, d). A bobina de reação (a) era de 200 cm de comprimento e enrolada em uma haste de alumínio aquecida a 80°C, sendo inserido em um banho termostático preenchido com glicerina (b). A cubeta de fluxo (c) era inserida em um bloco de alumínio aquecido a 95°C, o qual continha orifícios para inserção do sensor de temperatura, da resistência e das fibras ópticas (d).

3.1.2. Determinação dos herbicidas

O sistema SIA (FIALab Instruments, Bellevue, Washington) era composto por uma bomba de êmbolo de uma seringa de vidro com capacidade de 5,0 mL para aspiração e propulsão das soluções. A seringa continha uma válvula de três vias para a aspiração e dispensa da solução transportadora, e esse conjunto era conectado a uma bobina coletora de polietileno (5,0 mL volume; 1,5 mm d.i.). Essa bobina era conectada à porção central da válvula seletora de oito portas.

Para a separação dos herbicidas, um cromatógrafo líquido (Waters Technologies, Mildford MA) era utilizado, o qual compreendia um desgaseificador a vácuo, uma bomba de alta pressão, um termostato e um detector UV/Vis com arranjo de fotodiodos (modelo 2996, Milford MA, USA). A aquisição dos dados era feita com o “software” fornecido pelo próprio fabricante.

Filtros de Nylon (13 mm de diâmetro, poros de 0,45 μm , Fluoropore, Millipore) eram utilizados para a aspiração dos extratos das amostras de solo contendo os herbicidas.

Uma ponteira de 10 mL de polipropileno translúcido, conectada à válvula seletora do SIA, era utilizada como reator para a mistura do extrato contendo os herbicidas e o padrão interno.

Tubos de polietileno de diâmetro interno de 0,8 mm conectados à válvula seletora eram utilizados para a aspiração das soluções e das amostras.

Um agitador magnético (Agimatic-N, Selecta, Barcelona, Espanha) era utilizado para a homogeneização das amostras de solo e a solução extratora de herbicidas acondicionadas e um recipiente de vidro escuro de 60 mL de capacidade.

Para a concentração em linha dos herbicidas, foram utilizados o sorbente Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced, Waters, Mildford MA), composto pelo co-polímero de divinilbenzeno vinil pirrolidona e o sorbente apolar Plexa, composto pelo polímero divinilbenzeno (Agilent Bond Elut Plexa, Waters, Mildford MA).

Cada sorbente era acondicionado individualmente em uma mini-coluna confeccionada para SPE. Esta coluna era feita cortando-se uma seringa descartável nas dimensões de 8,0 x 4,6 mm d.i. Para reter o sorbente em condições estáticas, as saídas da mini-coluna eram delimitadas por duas fritas de 10 μm (Mo Bi Tec, Göttingen, Alemanha). Um adaptador com o mesmo diâmetro dessa mini-coluna era conectado a esse aparato e um conector de rosca conectava esse adaptador à entrada do tubo de polietileno. Todo esse conjunto era conectado à válvula seletora do sistema SIA.

Para os ensaios de separação das triazinas, a pré-coluna C₁₈ de fase reversa (Kromosil C₁₈, 5 µm, 5,0 × 4,6 mm, Scharlab, Barcelona, Espanha) era acoplada a cada uma das colunas testadas:

- Coluna monolítica de sílica de fase reversa C₁₈ (100 x 4,6 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, EUA), com mesoporos de 13 nm e macroporos de 2 µm.

- Coluna empacotada de sílica híbrida de fase reversa (150 x 3,9 mm, poros de 3,5 µm) (X- Terra, Waters Corporation, Milford MA). A cada três grupos silanóis, um grupo era substituído por um grupo metil.

- Coluna empacotada de sílica de fase reversa C₁₈ (150 × 4,6 mm) (Kromosil 100 C₁₈, 3,5 µm, Scharlab, Barcelona, Espanha).

O sistema SIA era hifenado com o cromatógrafo líquido por meio da válvula de 6 portas (Valco Instruments Company Inc.), a qual era fixada em um módulo da Crison (Alella, Espanha). A alça de amostragem de 300 µL era conectada à valvula de injeção e era composta do polímero PEEK (150 cm comprimento; 0,5 mm d.i.).

Tanto o SIA quanto o módulo da Crison eram controlados pelo “software” CocoSoft (COCOVI-SOLBERG; MIRÓ, 2015), e a transmissão de comandos do microcomputador para ambos os instrumentos era realizada via USB. O cromatógrafo e o sistema SIA funcionavam automaticamente e de forma integrada, através de um mecanismo “feedback”. A vazão da fase móvel, o controle da temperatura da coluna de separação e a aquisição dos espectros eram feitos utilizando o “software” do próprio cromatógrafo.

3.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e com água desionizada (condutância específica < 0,1 µS cm⁻¹) obtida em sistema Milli-Q (Synthesis A10, Millipore, Billerica, MA).

3.2.1 Determinação espectrofotométrica de Co(II)

A solução-padrão estoque (10,00 mg L⁻¹ Co(II)) era preparada dissolvendo-se 23,85 mg CoSO₄.7H₂O em 400 ml de água, adicionando-se 5 mL de uma solução de 0,01 mol L⁻¹ HNO₃ e completado-se o volume até 500 mL com água. As soluções-padrão de trabalho eram preparadas em 0,25 mol L⁻¹ HClO₄, na faixa de concentrações entre 0,0 e 1,0 µg L⁻¹ Co(II).

A solução $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ de Tiron (dihidroxibenzeno dissulfonato dissódico, $M = 332,22$) era diariamente preparada, dissolvendo-se $0,166 \text{ g}$ do reagente em 100 mL de água.

A solução $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $M = 446,06$) era diariamente preparada, dissolvendo-se $8,92 \text{ g}$ do reagente em 100 mL de água.

A solução $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ peróxido de hidrogênio (30% v/v) era diariamente preparada, dissolvendo-se $100 \mu\text{L}$ do reagente em 200 mL de água.

A solução $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH era preparada diluindo-se $8,0 \text{ g}$ do reagente em 100 mL de água.

As amostras de gramíneas eram digeridas com os ácidos nítrico e perclórico, pesando-se $0,5 \text{ g}$ da massa seca e moída, adicionando-se $5,0 \text{ ml}$ de HNO_3 e $1,3 \text{ ml}$ de HClO_4 e completando-se o volume com água a 50 ml . A acidez média das amostras era de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 (KRUG et al., 1977).

3.2.2 Determinação espectrofotométrica de V(V)

A solução-padrão estoque [1000 mg L^{-1} V(V)] era preparada pesando-se $0,8925 \text{ g}$ V_2O_5 , dissolvendo em 20 mL de solução 50% (v/v) HCl e completando-se o volume para 500 mL com água. As soluções-padrão de trabalho eram preparadas em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 , na faixa de concentrações entre $0,0$ a $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V).

A solução estoque, $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ de *p*-anisidina, era preparada dissolvendo $6,16 \text{ g}$ do reagente ($M = 123,16$) em 200 mL de uma solução $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ HCl. A solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de *p*-anisidina era diariamente preparada a partir da solução estoque, sendo tamponada com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ glicina (pH 2,5). O pH da solução era ajustado com solução 10 mol L^{-1} NaOH. A solução mascarante, $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ NH_4F era preparada dissolvendo $0,55 \text{ g}$ NH_4F em 50 mL de água. A solução oxidante, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ bromato, era diariamente preparada dissolvendo-se $0,418 \text{ g}$ KBrO_3 em 50 mL de água. A solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Tiron era diariamente preparada dissolvendo $1,66 \text{ g}$ de Tiron em 50 mL de água.

As amostras de água mineral foram adquiridas em mercado local.

3.2.3 Avaliação da seletividade nas reações catalíticas para Co(II) e V(V)

As soluções estoque, 1000 mg L^{-1} I (I = espécie química potencialmente interferente) eram preparadas individualmente para cada I, pesando-se a massa do composto envolvido,

diluindo-se em aproximadamente 400 mL de água, adicionando-se uma alíquota de solução ácida e completando-se o volume para 500 mL com água, conforme indicado na Tabela 1. A solução estoque de Ti(IV), feita a partir de $(\text{NH}_4)_2\text{TiF}_6$, foi adquirida na Sigma-Aldrich.

Tabela 1 - Preparo das soluções estoque utilizadas nos estudos de seletividade. I = espécie química potencialmente interferente.

I	Composto Utilizado	Massa (g)	Volume adicionado de solução ácida
Mg(II)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (M = 246,5)	5,07	10 mL (50% v/v) HNO_3
Al(III)	$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M = 241,43)	4,47	10 mL (50% v/v) HNO_3
V(V)	V_2O_5 (M = 181,88)	0,89	20 mL (50% v/v) HCl
Ni(II)	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M = 262,85)	2,24	10 mL (50% v/v) HNO_3
Mn(II)	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M = 169,02)	1,54	10 mL (50% v/v) HNO_3
Cu(II)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (M = 249,69)	1,97	10 mL (50% v/v) HNO_3
Ca(II)	CaCO_3 (M = 100,09)	1,25	10 mL (50% v/v) HNO_3
Fe(III)	Fe_2O_3 (M = 159,69)	0,72	20 mL (50% v/v) HClO_4
Cr(VI)	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (M = 294,18)	1,41	10 mL (50% v/v) HNO_3
Co(II)	CoSO_4 (M = 154,99)	1,31	10 mL (50% v/v) HNO_3
Pb(II)	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (M = 331,2)	0,80	10 mL (50% v/v) HNO_3
Si(IV)	Na_2SiO_3 (M = 122,06)	2,18	10 mL (50% v/v) HNO_3
Zn(II)	ZnO (M = 81,37)	0,62	10 mL (50% v/v) HNO_3

3.2.4 Determinação dos herbicidas

Os padrões da atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina), ametrina (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-triazina) e prometon (2,4-bis (isopropilamina)-6-metoxi-s-triazina), o qual era utilizado como padrão interno, foram obtidos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

As soluções-padrão estoque de 500 mg L^{-1} das triazinas foram preparadas dissolvendo-se 5,0 mg de cada composto individual em metanol puro. Todas as soluções eram

mantidas no escuro a 4°C e diluídas em 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂ (Sigma-Aldrich, M = 110,98) até as concentrações desejadas para a preparação de soluções-padrão de trabalho.

Os solventes metanol (≥ 99,9%) e acetonitrila (≥ 99,9%) utilizados em HPLC e ácido acético (≥ 99,7%) foram obtidos pela Sigma-Aldrich.

A fase móvel 40,0:59,6:0,4 (v/v/v) acetonitrila/água/ácido acético era preparada em balão volumétrico de 1L, adicionando-se 400 mL de acetonitrila e 4,0 mL de ácido acético e completando-se o volume com água. A fase móvel era filtrada com filtro de nylon de 0,45 μm.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Determinação de cobalto em gramíneas empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação

3.3.1.1. Operação do sistema

A Figura 7 representa o diagrama do sistema de análises em fluxo na configuração com aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação. Uma solução 0,25 mol L⁻¹ HClO₄ a 3,0 mL min⁻¹, e água a 0,6 mL min⁻¹ foram empregadas como fluxos transportadores da amostra e do reagente (C_S e C_{R1}). Como reagentes, foram empregadas as soluções R₁ – R₄, fluindo a 0,6 mL min⁻¹, de composição 0,005 mol L⁻¹ de Tiron; 0,2 mol L⁻¹ Na₄P₂O₇; 0,005 mol L⁻¹ H₂O₂ e 0,5 mol L⁻¹ NaOH, respectivamente. As alças para amostra e reagente, L_S e L_{R1}, eram de 70 e 40 cm, e os comprimentos dos reatores R_{C1} e R_{C2} eram de 50 e 100 cm. A bobina de reação (R_{C1}) era conectada à porção central do injetor.

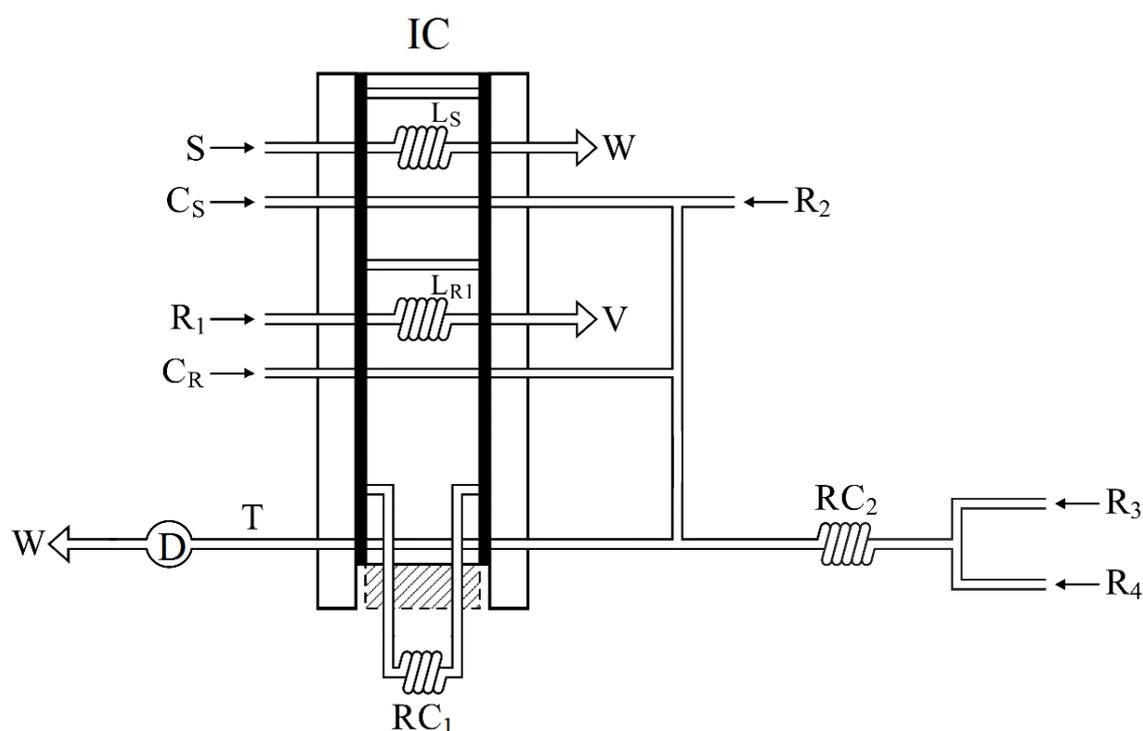


Figura 7 - Diagrama de fluxos do sistema analítico empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação para a determinação de cobalto. IC = injetor-comutador; L_S e L_{R1} = alças de amostragem (70 e 40 cm, *ca.* 350 e 200 μL); C_S e C_{R1} = fluxos transportadores (3,0 e 0,6 mL min^{-1}); R_1 , R_2 , R_3 e R_4 = Tiron, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, H_2O_2 e NaOH (0,6 mL min^{-1}); RC_1 e RC_2 = reatores (50 e 100 cm); T = linha de transmissão (15 cm); W = descarte; D = detector; área tracejada = posição alternativa do IC.

Quando o injetor-comutador permanecia na condição especificada (posição de aprisionamento), as soluções da amostra e do Tiron preenchiam as suas alças correspondentes e a bobina de reação RC_2 era deslocada para fora do percurso analítico. Na posição de injeção, as alíquotas da amostra e do reagente eram inseridas em seus fluxos transportadores e direcionadas à bobina de reação, a qual era inserida no percurso analítico. Nesta posição, os tubos de L_S e L_{R1} eram retirados dos frascos da amostra e do reagente, para que não houvesse desperdícios. Imediatamente após a injeção da amostra, o reagente R_2 era adicionado por confluência, para mascaramento dos interferentes. As zonas da amostra e do reagente confluíam e os outros reagentes (R_3 e R_4) anteriormente misturados eram acrescentados. A oxidação de Tiron por peróxido de hidrogênio em meio alcalino ocorria na bobina de reação RC_1 , originando o radical colorido semiquinona (OTTO; WERNER, 1983) detectado espectrofotometricamente a 426 nm.

Quando a porção mais concentrada da amostra atingia o reator principal, o injetor era deslocado novamente para a posição especificada na Figura 7. A porção da amostra era aprisionada e as alças L_S e L_{R1} eram novamente preenchidas. É importante ressaltar que o preenchimento das alças L_S e L_{R1} era feito poucos segundos antes de terminar o período de aprisionamento da zona da amostra, para que não ocorressem desperdícios. Após o período de aprisionamento pré-selecionado, o injetor era deslocado novamente, inserindo a próxima amostra e o Tiron nos fluxos transportadores correspondentes, e reinsertando a bobina de reação R_{C2} no percurso analítico. No instante da injeção, os tubos de L_S e L_{R1} eram novamente retirados dos frascos da amostra e do reagente. A porção da amostra aprisionada no reator era liberada e percorria a linha de transmissão T (15 cm) até o detector.

3.3.1.2. *Influência dos principais parâmetros envolvidos*

Volumes da amostra e do reagente

Como o sistema empregava zonas coalescentes, era importante garantir a sobreposição das porções mais concentradas das zonas da amostra e do reagente na bobina de reação R_{C1} . Para tanto, a abordagem "dye approach" (RUZICKA; HANSEN, 1988) foi utilizada para selecionar os volumes da amostra e reagente injetados, e também determinar o tempo de injeção em que a absorbância do pico registrado era máxima.

Os volumes inseridos da amostra e reagente foram investigados entre 250 – 900 μL ($50 < L_S < 180$ cm) e 50 – 350 μL ($10 < L_{R1} < 70$ cm), respectivamente. O comprimento da bobina de reação R_{C1} (50 cm) foi selecionado tão curto quanto possível para minimizar a dispersão da zona da amostra e longo o suficiente para permitir condições suficientes de mistura.

Tempo de injeção

O tempo de injeção é definido como sendo o tempo decorrido ao mover o injetor da posição de amostragem para a posição de injeção até que a porção central da zona da amostra atingisse a bobina de reação. Para a determinação desse parâmetro em tempo real, a bobina de reação R_{C1} foi substituída pela cubeta de detecção. As soluções de verde bromocresol (BCG) a 50 mg L^{-1} e de 0,01 mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ foram utilizadas para simular a amostra e o reagente R_1 . Neste ensaio, a solução transportadora era uma solução 0,01 mol L^{-1} $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e o comprimento de onda utilizado era de 612 nm.

Concentrações dos reagentes

Os efeitos das concentrações dos reagentes (bem como do tempo de aprisionamento da zona da amostra e da seletividade do método) foram estudados injetando-se um volume de 350 μL da solução-padrão 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co(II) preparada em 0,01 mol L^{-1} HNO_3 e 200 μL do reagente Tiron, no sistema de aprisionamento com as dimensões descritas na Figura 7.

A influência da concentração do oxidante H_2O_2 foi estudada na faixa 0,0005 - 0,01 mol L^{-1} , fixando-se as concentrações de Tiron e NaOH em 0,01 e 0,5 mol L^{-1} , respectivamente. A concentração de Tiron foi estudada na faixa de 0,001 - 0,01 mol L^{-1} , com a concentração fixa de 0,005 mol L^{-1} H_2O_2 . A influência da concentração de NaOH foi avaliada na faixa de 0,1 - 4,0 mol L^{-1} , fixando-se as concentrações de Tiron e H_2O_2 em 0,005 mol L^{-1} .

Tempo de aprisionamento

O tempo de aprisionamento da zona da amostra foi estudado de 0,0 a 6,0 min, e as concentrações dos reagentes utilizadas foram de 0,005, 0,5 e 0,005 mol L^{-1} de Tiron, NaOH e H_2O_2 , respectivamente.

3.3.1.3 Desempenho do sistema

Avaliação do efeito de memória na bobina de reação

Os experimentos com a solução de BCG também foram conduzidos para verificar a ocorrência do efeito de memória devido à sobreposição de zonas na bobina de reação. O tempo de limpeza da bobina de reação $\text{R}_{\text{C}2}$ foi visualmente estimado para verificar se era mais curto do que o tempo de injeção da amostra seguinte.

Para a comprovação de que esse efeito não era observado, três réplicas do branco foram injetadas no sistema, seguidas de três réplicas da solução-padrão 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co(II) e, novamente, por mais três réplicas do branco. Para esse experimento, o tempo de injeção era de 11 s e o tempo de aprisionamento, de 3,0 min para cada amostra injetada.

Avaliação da seletividade

Neste experimento, inseriram-se soluções contendo as espécies químicas potencialmente interferentes (Tabela 1), preparadas nas faixas das concentrações de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 100 mg L^{-1} Fe(III), Mn(II), Cu(II), Zn(II), Mg(II), Ca(II), Ni(II), V(V) e Cr(VI).

Para cada interferente, a maior concentração testada manifestou uma variação maior que 10% na altura do pico registrado em relação à solução-padrão de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II).

Características analíticas

Após projeto e dimensionamento do sistema, o mesmo foi aplicado às determinações de cobalto em gramíneas, e as principais figuras de mérito analítico foram estimadas (ZAGATTO et al., 2012). Experimentos envolvendo adição/recuperação do analito foram conduzidos para obtenção das porcentagens de recuperação, um indicador de exatidão analítica.

3.3.2 Determinação de vanádio em águas minerais empregando aprisionamento da zona da amostra no detector aquecido

3.3.2.1. Operação do sistema

Inicialmente, dimensionou-se o sistema com o aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação (Figura 8a) para os experimentos de otimização das condições reacionais, considerando os principais parâmetros, tais como volume de amostra injetado, tempo de injeção da amostra, tempo de aprisionamento, temperatura, pH e concentrações dos reagentes.

O comprimento de R_{C1} foi selecionado em 50 cm para se evitar a sobreposição de zonas de amostragem em R_{C3} , minimizando efeito de memória. O comprimento do reator R_{C2} (100 cm) não era crítico, pois estava fora do percurso analítico. O comprimento da linha de transmissão T foi mantido como o mais curto possível (15 cm). A bobina restritora P de 150 cm, d. i. 0,5 mm era utilizada para aumentar a pressão interna no sistema, possibilitando o desenvolvimento da reação a uma temperatura constante de 80°C sem a liberação de bolhas.

Na situação especificada na Figura 8, a amostra e o reagente *p*-anisidina (R_1) eram aspiradas para preencher as suas respectivas alças e R_{C3} era mantido fora do percurso analítico. Quando o injetor-comutador (IC) era acionado, os volumes injetados da amostra e de R_1 confluíam e a zona complexa era transportada para o reator R_{C3} . O reagente R_2 era adicionado à amostra para mascarar as interferências, e os reagentes bromato (R_3) e Tiron (R_4) eram adicionados por confluência, promovendo a oxidação da *p*-anisidina catalisada por V(V). Esta ocorria em R_{C3} , originando o radical *N*-(4-etoxifenil)-quinoneimina (TESHIMA; OHNO; SAKAI, 2007) monitorado espectrofotometricamente a 503 nm.

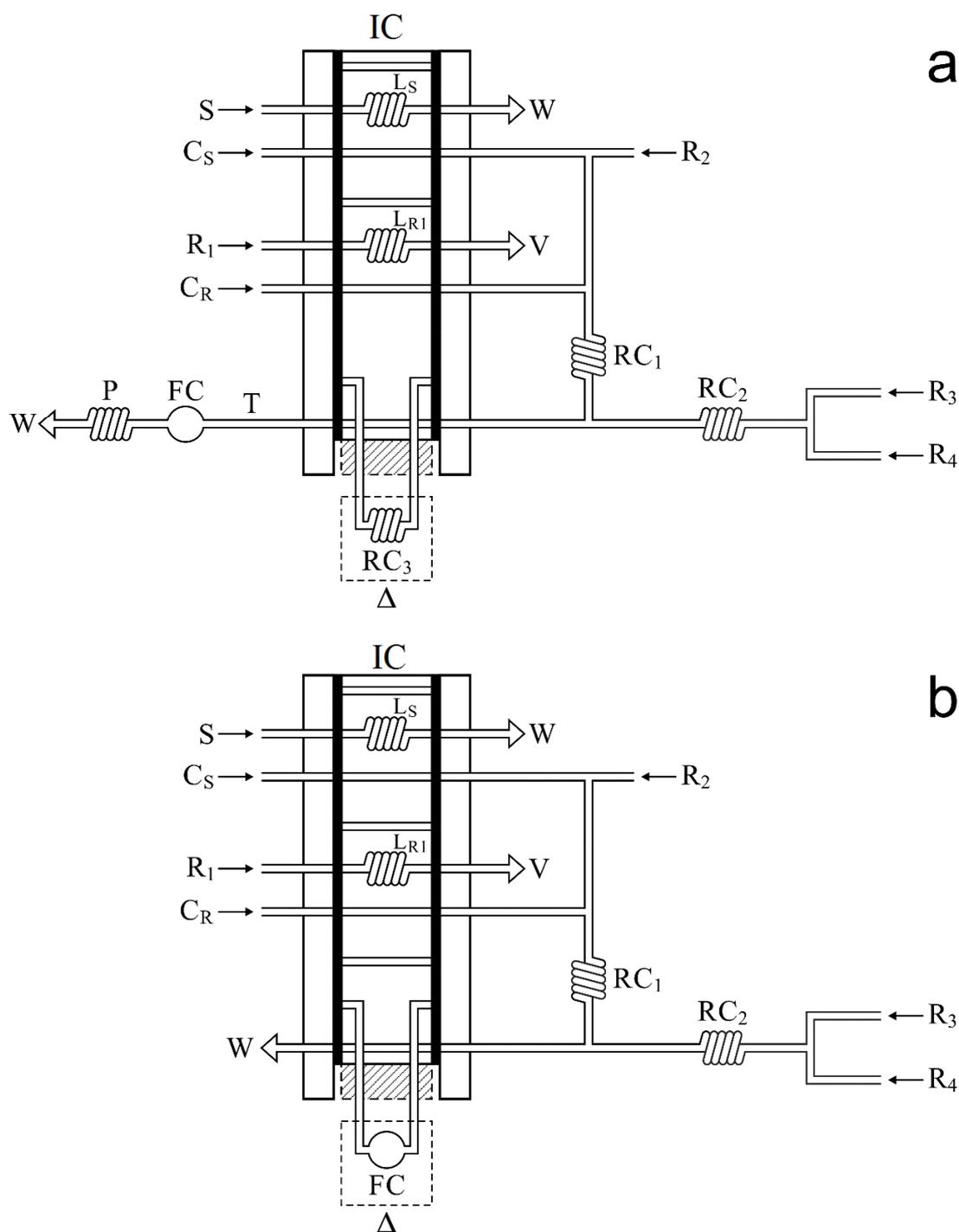


Figura 8 - Diagramas dos sistemas em fluxo com aprisionamento da zona da amostra com zonas coalescentes na bobina de reação (a) ou na cubeta de fluxo (b) aquecidos para a determinação de vanádio. IC = injetor-comutador; L_S e L_{R1} = alças de amostragem (150 e 50 cm, ca. 750 e 250 μL); C_S e C_{R1} = fluxos transportadores 0,01 mol L^{-1} HNO_3 e água, respectivamente (3,0 e 0,75 mL min^{-1}); R_1 , R_2 , R_3 e R_4 = *p*-anisidina, mascarante, bromato e Tiron (0,4, 0,3, 0,4 e 0,4 mL min^{-1}); RC_1 e RC_2 = reatores (50 e 100 cm); RC_3 = bobina de reação (200 cm); T = linha de transmissão (15 cm); FC = cubeta de fluxo (80 μL); P = bobina restritora (0,5 mm d.i., 150 cm); W = descarte; área tracejada = posição alternativa do IC.

Quando a porção mais concentrada da zona da amostra fluía em R_{C3} , IC era deslocado para a posição especificada na Figura 8a, aprisionando essa porção sob condições de aquecimento. Após um período pré-selecionado, IC era novamente deslocado, e a porção aquecida contendo o produto da reação era reinserida no percurso analítico e fluía até o detector através da linha de transmissão T. O reator restritor P (d.i. = 0,5 mm, comprimento = 150 cm) era colocado na saída da cubeta de fluxo para aumentar a pressão interna do sistema, reduzindo assim a formação de bolhas. A passagem do produto da reação pela cubeta resultava em um sinal transiente e a altura do pico registrado era proporcional à concentração de V(V) na amostra.

A viabilidade do aprisionamento da zona da amostra na cubeta de fluxo foi demonstrada empregando-se o sistema da Figura 8b. O reator R_{C3} foi substituído pela cubeta e a bobina restritora (P) foi removida, pois não era mais necessária devido à pressão interna gerada pelo aprisionamento da zona da amostra na cubeta. Com isso, a complexidade do sistema foi reduzida.

Similarmente ao sistema da Figura 8a, quando a porção mais concentrada da zona da amostra fluía através da cubeta, IC era deslocado, aprisionando esta porção sob condições de aquecimento (Figura 8b). Durante o período de aprisionamento, o aumento contínuo da absorbância era monitorado e a absorbância registrada ao final desse período era proporcional à concentração de V(V) na amostra. Posteriormente, IC era novamente deslocado e o produto da reação era descartado.

3.3.2.2 Influência dos principais parâmetros envolvidos

A influência dos principais parâmetros envolvidos na determinação de V(V) foi investigada injetando-se 750 μL da solução-padrão 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}\text{V(V)}$ preparada em 0,01 mol L^{-1} HNO_3 e 250 μL de solução 0,08 mol L^{-1} de *p*-anisidina. As concentrações dos reagentes eram de 0,1 e 0,05 mol L^{-1} para Tiron e bromato, respectivamente, e a temperatura foi fixada em 80°C. Com exceção dos experimentos para o estudo do efeito do tempo de injeção, os demais estudos foram feitos com o tempo de injeção fixado em 25 s. Todos os experimentos foram desenvolvidos com o tempo de aprisionamento de 2,0 min, exceto o experimento envolvendo esse estudo.

Tempo de injeção

O tempo de injeção foi avaliado entre 5,0 e 55,0 s, sendo que a contagem do tempo era cronometrada a cada 5,0 s.

Comprimento do reator tubular R_{CI}

Para se evitar o efeito de memória durante os experimentos referentes à determinação de V(V), o reator R_{CI} foi adicionado previamente à bobina de reação (ou cubeta) (Figura 8). Para tanto, diferentes comprimentos deste reator (0, 25, 50, 100 e 150 cm) foram testados.

Tempo de aprisionamento

Os experimentos para o estudo do efeito de aprisionamento foram realizados com o aprisionamento na bobina de reação e o intervalo de tempo avaliado era de 1,0 – 6,0 min.

Temperatura

O intervalo da temperatura foi estudado entre de 25 – 95°C e as intensidades das absorvâncias medidas eram registradas a cada 5°C.

pH

O ajuste do pH da solução de 0,1 mol L⁻¹ glicina era feito pipetando-se a solução de 10 mol L⁻¹ NaOH. A faixa de pH estudada foi de 1,5 a 3,5.

Concentrações de p-anisidina, bromato e Tiron

Os intervalos das concentrações avaliados foram 0,025 – 0,2 mol L⁻¹ Tiron, 0,01 – 0,2 mol L⁻¹ de p-anisidina e 0,01 – 0,1 mol L⁻¹ de bromato.

3.3.2.3. Desempenho do sistema

Avaliação da seletividade

Após os experimentos de otimização, a seletividade do método catalítico foi avaliada injetando-se soluções 5,0 µg L⁻¹ V(V) contendo um dos potenciais interferentes Fe(III), Mn(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II), Al(III), Pb(II), Ti(IV) e Si(IV) que podem estar presentes nas amostras de águas minerais (REHMAN et al., 2011). Para cada espécie interferente, a maior concentração testada foi aquela que causou um desvio > 10% na altura do pico registrado em relação à solução-padrão de 5,0 µg L⁻¹ V(V).

Validação do procedimento analítico proposto

Após a otimização do sistema e a avaliação da seletividade do método proposto, a determinação de V(V) em águas minerais foi realizada empregando-se o sistema de aprisionamento da zona de amostra na cubeta de detecção (Figura 8b). Para a validação do sistema proposto, as determinações de V(V) em amostras de águas minerais foram também realizadas utilizando ICP-MS/MS (Agilent 8800, Tóquio, Japão), cujas condições estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais para a determinação de vanádio

Parâmetro	ICP-MS/MS
Potência (kW)	1,55
Vazão do gás argônio do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás argônio auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Número de replicatas	3,0
Vazão de O ₂ introduzido no sistema (L min ⁻¹)	0,5
Temperatura da câmara de nebulização (°C)	2,0
Fluxo do gás argônio de nebulização (L min ⁻¹)	1,05
Câmara de nebulização	Tipo Scott
Nebulizador	Concêntrico
Razões m/z selecionadas em Q ₁	⁵¹ V ⁺
Razões m/z selecionadas em Q ₃	⁵¹ V ¹⁶ O ⁺

3.3.3 Determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis em solo explorando o acoplamento SIA-LC

3.3.3.1 Amostras de solo

Coleta

As amostras de solo foram coletadas na área rural no município de Piracicaba, São Paulo, Brazil. Esses solos não possuem histórico de aplicação de herbicidas. Amostras de 1,0 kg dos solos classificados como arenoso e argiloso foram coletadas na faixa de profundidade de 0-20 cm.

Caracterização

Após a coleta das amostras, os solos foram secos em estufa a uma temperatura de 45°C, homogêneos, peneirados (malha = 2,0 mm) e, a seguir, físico-quimicamente analisados. O valor do pH de 3,8 era determinado para ambos os solos com a solução de 0,01 mol L⁻¹ de CaCl₂ (ISO 10390). O teor de carbono total era determinado por titulometria (SILVA, 1999) e era de 0,8% e 2,1% para os solos arenoso e argiloso, respectivamente. A classificação dos solos era determinada por granulometria (DIETRICH, 2005), sendo que o solo arenoso continha 92,0% de areia (0,05 – 2,0 mm), 2,0% de silte (2-50 µm), e 6,0% de argila (<2 µm), enquanto que o solo argiloso continha 26,0% de areia, 9,0% de silte e 65,0% de argila.

Fortificação das amostras

Ametrina e atrazina foram adicionados a 50,0 g de solo, de forma a se obter uma concentração final de 5,0 mg kg⁻¹ (AMADORI et al., 2013) de acordo com a dose de campo recomendada. As concentrações das triazinas bioacessíveis eram determinadas após quatro semanas, a partir da fortificação das amostras. Para tanto, uma solução com volume de 25 mL era preparada adicionando-se os padrões ametrina e atrazina a 10,0 mg L⁻¹ e 12,5 mg do sal NaN₃. A adição do sal era necessária para se evitar a biodegradação das triazinas. Essa solução era adicionada para cobrir completamente as partículas do solo e gentilmente misturada até a completa homogeneização. As amostras de solos fortificadas eram secas à temperatura ambiente no escuro por quatro semanas previamente aos ensaios de bioacessibilidade.

Para esses ensaios, 2,0 g dos solos fortificados eram pesados em um frasco escuro de 60,0 mL de capacidade, o qual permanecia tapado com papel alumínio. A extração era feita com 50,0 mL de uma solução 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂ de acordo com as normas da OECD 106 (OECD, 2000).

3.3.3.2 Operação do sistema

O recipiente contendo a amostra de solo e a solução extratora era mantido sob agitação magnética durante todo o experimento (Figura 9). O extrato de solo era aspirado através de um filtro conectado ao tubo de polietileno fixo na porta 3 da válvula seletora. O extrato aspirado fluía para a bobina coletora e, então, era dispensado para a porta 8 onde a pipeta de 10 mL estava conectada para a mistura dos herbicidas com o padrão interno.

Na sequência, o extrato era aspirado para a bobina coletora e dispensado para a porta 2, onde estava conectada a minicoluna contendo 30 mg do sorbente para a concentração em linha e “clean up”. As outras portas da válvula seletora eram utilizadas para aspiração de ar (porta 1), metanol (porta 4), prometon (porta 5), e propulsão dos resíduos em direção ao lixo (porta 7). O funcionamento da válvula da seringa compreendia duas posições, sendo que na posição IN, a seringa aspirava a solução transportadora. A posição OUT da válvula era utilizada tanto para aspirar a amostra e os reagentes para a bobina coletora quanto para dispensá-los da bobina para outros compartimentos.

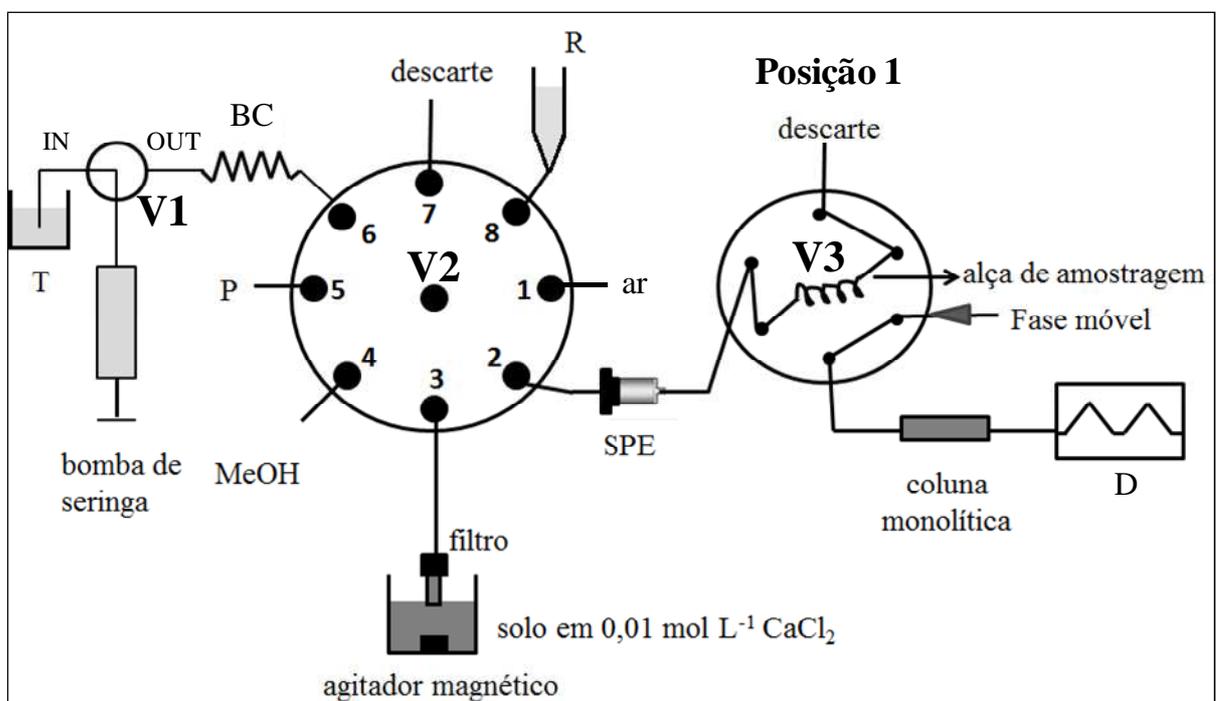


Figura 9 - Sistema automatizado para ensaios de bioacessibilidade para a determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis. V1 = válvula da seringa, V2 = válvula seletora de 8 portas, V3 = válvula de 6 vias para a injeção dos herbicidas para a coluna cromatográfica. Posição IN da V1 = aspiração da solução transportadora para o preenchimento da seringa. Posição OUT = direcionamento da solução transportadora para a bobina coletora (BC). SPE = concentração em fase sólida. MeOH = metanol a 99%. P = prometon (padrão interno). Fase móvel = 40,0:59,6:0,4 (v/v/v) acetonitrila/água/ácido acético. Alça da amostra = 300 μ L. R = recipiente de 10 mL a mistura do padrão interno com os herbicidas. D = detector UV (220 nm).

A saída da minicoluna para concentração em linha era conectada à válvula de 6 portas por um tubo de polietileno. Essa válvula operava em duas posições: (Figura 10). Na posição 1, a alça de amostragem era preenchida com os herbicidas eluídos da minicoluna. Na posição 2, o eluato era bombeado para a coluna de separação. A bomba do cromatógrafo e

a coluna cromatográfica eram conectadas à válvula, propulsionando a fase móvel através dessa válvula para a coluna, em ambas as posições.

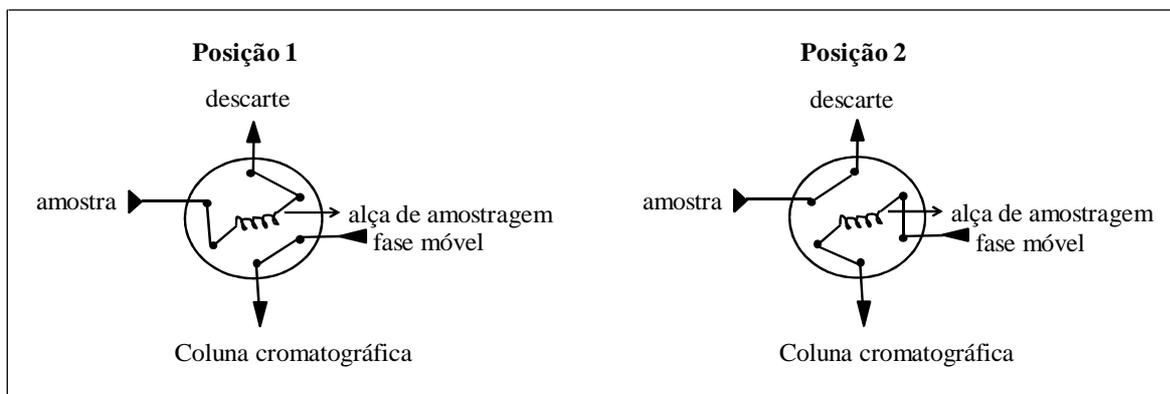


Figura 10 - Válvula de 6 vias ilustrando as posições de preenchimento (1) da alça da amostra e de injeção (2) dos compostos de interesse na coluna cromatográfica. Alça de amostragem = 300 μ L.

Os herbicidas eram separados por eluição isocrática empregando-se a fase móvel de composição de 40,0:59,6:0,4 (v/v/v) acetonitrila/água/ácido acético a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} . A coluna era pré-condicionada 60 min antes do início dos experimentos e a temperatura da coluna era mantida constante a 24°C.

O comprimento de onda utilizado para quantificar os herbicidas dos extratos dos solos foi o de 220 nm, que apresentava máximo coeficiente de absorvidade molar e consequentemente, resultava em máxima sensibilidade. Os espectros de absorção dos herbicidas eram monitorados no comprimento de onda na faixa de 200 – 400 nm e a identificação desses compostos era feita com base na comparação do formato dos espectros e dos tempos de retenção das soluções-padrão. A quantificação dos herbicidas era feita através da curva de calibração tendo prometon como o padrão interno: as áreas de picos referentes à ametrina e atrazina eram divididas pela área do pico referente a prometon.

3.3.3.2.1 Concentração em linha com detecção em modo “off-line”

Com o objetivo de selecionar o sorbente mais adequado para a concentração em linha dos herbicidas, foram realizados experimentos preliminares com detecção em modo off-line.

Para tanto, as frações eluídas da mini-coluna eram coletadas em frascos escuros e injetadas no cromatógrafo líquido para a separação e quantificação das triazinas. Esse procedimento também foi utilizado para os estudos cinéticos da extração dos herbicidas com a solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$.

Após esses estudos, o procedimento em fluxo automatizado contemplava os ensaios de extração, concentração, separação e determinação das triazinas em um único sistema, com o acoplamento do sistema SIA com a cromatografia líquida.

Preenchimento dos tubos da amostra e dos reagentes

Antes das etapas de concentração e eluição dos herbicidas, os tubos eram preenchidos com metanol 99% e com a solução-padrão de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ da ametrina e da atrazina. O metanol 99% era utilizado para evitar a geração de bolhas no sistema. A solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ era utilizada como fluxo transportador. A bobina coletora era limpa para eliminar possíveis resíduos antes da SPE. Neste sentido, a seringa aspirava $5,0 \text{ mL}$ da solução transportadora (posição IN) a $100 \mu\text{L s}^{-1}$ para a bobina coletora e todo o volume era dispensado para o lixo (porta 7, posição OUT), esvaziando a seringa. Para preencher os tubos com metanol (porta 4, posição OUT) e a solução-padrão (porta 3, posição OUT), $300 \mu\text{L}$ eram aspirados para a bobina coletora, a $80 \mu\text{L s}^{-1}$. A seguir, a bobina coletora era limpa quando a seringa (posição IN) aspirava $3,0 \text{ mL}$ a $100 \mu\text{L s}^{-1}$ e dispensava todo esse volume para o lixo (porta 7, posição OUT).

SPE em linha

Para a realização da SPE das soluções-padrão dos herbicidas, o sorbente era inicialmente limpo. Para tanto, a seringa (posição IN) aspirava $400 \mu\text{L}$ da solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ a $100 \mu\text{L s}^{-1}$, seguida pela aspiração de $600 \mu\text{L}$ de metanol 99% (porta 4, posição OUT) a $80 \mu\text{L s}^{-1}$ para a bobina coletora. O volume de $1,0 \text{ mL}$ coletado na bobina era dispensado para a SPE (porta 2, posição OUT). O volume de $5,0 \text{ mL}$ da solução contendo os padrões de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ das triazinas em $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ era aspirado através do tubo sem o filtro (porta 3, posição OUT) a $50 \mu\text{L s}^{-1}$ para a bobina e dispensado a $17 \mu\text{L s}^{-1}$ para a SPE (porta 2, posição OUT). Após esse processo, a seringa (posição IN) aspirava $600 \mu\text{L}$ da solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ e dispensava esse volume para a SPE (porta 2, posição OUT) a $20 \mu\text{L s}^{-1}$. Para secar o sorbente, $1,5 \text{ mL}$ de ar era aspirado (porta 1, posição OUT) a $50 \mu\text{L s}^{-1}$ para a bobina coletora e dispensado para a minicoluna (porta 2, posição OUT) a $17 \mu\text{L s}^{-1}$.

Eluição das triazinas e análises em cromatografia líquida

A eluição das triazinas era feita em quatro frações, cujo intuito era selecionar a fração mais concentrada de acordo com a porcentagem da massa recuperada com o menor volume de eluente para realizar o “heart cut” no sistema SIA-LC. Inicialmente, 150 μL de ar eram aspirados (porta 1, posição OUT) a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$ para a bobina coletora para evitar a dispersão do metanol. Em seguida, 125 μL de metanol 99% eram aspirados (porta 4, posição OUT) para a bobina a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$. A primeira fração era coletada após a eluição quando 275 μL de metanol e ar eram dispensados na minicoluna (porta 2, posição OUT) a 17 $\mu\text{L s}^{-1}$. Para a eluição completa da fração, 500 μL de ar eram aspirados (porta 1, posição OUT) a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$ e 500 μL eram dispensados (porta 2, posição OUT) a 17 $\mu\text{L s}^{-1}$. As três frações remanescentes eram eluídas empregando-se o mesmo procedimento. Para a análise e quantificação das triazinas, 40 de 125 μL dos eluatos eram injetados em LC.

3.3.3.2.2 Acoplamento “on-line” SPE-LC

Preenchimento dos tubos e limpeza da minicoluna para SPE

Inicialmente, os tubos da amostra e do reagente do SIA eram preenchidos e a minicoluna de SPE era limpa antes do procedimento de extração. O procedimento completo era feito a uma vazão de 5,0 mL min^{-1} . Para tanto, a seringa (posição IN) aspirava 2,0 mL da solução 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 e dispensava 1,0 mL dessa solução para umedecer o filtro (porta 3, posição OUT) que estava fora do recipiente contendo a amostra de solo com a solução extratora. Este volume foi selecionado de forma a exceder o volume interno do filtro (650 μL). Um volume de 3,5 mL de metanol 99% era então aspirado (porta 4, posição OUT) para a bobina coletora e, em seguida, 200 μL de prometon (porta 5, posição OUT) eram aspirados para a bobina. Para a limpeza da bobina e da mini-coluna, todo o volume remanescente na seringa era dispensado (porta 2, posição OUT) para descarte.

Extração das triazinas das amostras de solos

No início desse procedimento, 2,0 g de solo fortificado com ametrina e atrazina e 50 mL da solução 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 estavam contidos no recipiente escuro (volume de 60 mL) e mantidos sob agitação magnética. Os passos seguintes eram realizados a uma vazão de 5,0 mL min^{-1} . Inicialmente, a seringa aspirava 1,0 mL da solução 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 (posição IN). O filtro era introduzido no recipiente para a extração. Simultaneamente, um volume de 2,0 mL do extrato bruto era aspirado (porta 3, posição OUT) através do filtro para

a bobina coletora. O intervalo de tempo decorrido desde o início desse procedimento até a aspiração completa do primeiro extrato era de 1 min e 36s. Em seguida, um volume de 1,0 mL do extrato era dispensado para o recipiente (porta 8, posição OUT) para ser misturado com o prometon. A seringa era então esvaziada, dispensando 2,0 mL do volume remanescente através do filtro (porta 3, posição OUT). Este passo era realizado para não obstruir o filtro, bem como para manter o volume constante de 50,0 mL da solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$. Em seguida, o volume de 2,0 mL de ar era aspirado (porta 1, posição OUT) e $100 \mu\text{L}$ de $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de prometon (porta 5, posição OUT) eram aspirados para a bobina coletora. A seringa era esvaziada, dispensando 2,1 mL (porta 8, posição OUT) a $50,0 \text{ mL min}^{-1}$, misturando as triazinas com o padrão interno no recipiente externo.

Para a etapa SPE e limpeza da minicoluna, inicialmente a seringa aspirava 1,0 mL de solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ (posição IN) a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de 1,1 mL do extrato e do prometon eram aspirados desde o recipiente externo (porta 8, posição OUT) para a bobina coletora. A seringa era esvaziada, dispensando o volume de 2,1 mL para a minicoluna de SPE (porta 2, posição OUT) a $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. Este volume era dispensado para o descarte da válvula de injeção.

Eluição, “heart cut” e separação dos herbicidas

A seringa aspirava 1,0 mL da solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ (posição IN) a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$, e, posteriormente, 2,0 mL de metanol 99% (porta 4, posição OUT) eram aspirados para a bobina coletora. Para a eluição das triazinas e “heart cut”, $450 \mu\text{L}$ de metanol eram dispensados para a minicoluna de SPE (porta 2, posição OUT), preenchendo a alça da amostra de $300 \mu\text{L}$ com as triazinas (válvula de injeção na posição 1) com o eluato. Com a mudança da posição da válvula para a posição 2, $300 \mu\text{L}$ da amostra eram injetados no cromatógrafo líquido. Após esse processo, a seringa era esvaziada a $5,0 \text{ mL min}^{-1}$, limpando o sorbente para a concentração do próximo extrato de solo. O tempo total despendido para a separação cromatográfica era de 6,0 min. Quando o tempo de separação era de 2,0 min, o próximo extrato de solo era aspirado para a próxima concentração, o que significa que o funcionamento do sistema era contínuo. Vale ressaltar que, quando a amostra era injetada na coluna cromatográfica, a separação da amostra anterior já tinha sido completada.

3.3.3.3 Fator de enriquecimento

Os cálculos dos fatores de enriquecimento para ametrina e atrazina foram feitos pela relação entre os coeficientes angulares da curva de calibração da injeção das soluções-padrão com a etapa de concentração no SIA acoplado a LC e da curva de calibração após injeção das soluções-padrão diretamente em LC sem a etapa de concentração em linha.

Para esse experimento, 40 μL das soluções-padrão (0,25 – 0,5 – 1,0 e 3,0 mg L^{-1} preparadas em MeOH 99%) eram injetadas diretamente em LC. E, para o sistema SIA-LC, a curva de calibração das soluções-padrão era 0,01 – 0,025 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,3 mg L^{-1} .

3.3.3.4 Procedimento manual para os ensaios cinéticos de bioacessibilidade

Os testes preliminares para monitorar a cinética de extração dos herbicidas nos solos foram realizados manualmente. Nesse sentido, o mesmo filtro utilizado no sistema SIA era encaixado na extremidade de uma seringa descartável de 10 mL, sendo que 2,0 mL do extrato eram aspirados pela seringa e, em seguida, 1,0 mL do extrato era devolvido para o frasco sob agitação para não obstruir o filtro. O volume de 1,0 mL remanescente na seringa era coletado em um frasco escuro para ser concentrado em linha. Para manter a concentração das triazinas constante durante os intervalos de tempo do estudo cinético, o volume de 1,0 mL da solução 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 era adicionado ao recipiente a cada aspiração. Dessa forma, o volume total de 50,0 mL de 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 era mantido constante durante todo o estudo. Neste procedimento manual, o mesmo filtro era utilizado em todo o processo e era substituído para cada réplica para se evitar o efeito de memória, do mesmo modo como era proposto para o sistema automatizado. A segunda fração de 125 μL eluída pela minicoluna da SPE era coletada em frascos escuros e o volume de 40 μL do eluato era injetado no cromatógrafo líquido. De acordo com esses testes preliminares, os intervalos de tempo foram definidos para o monitoramento da cinética de extração utilizando SIA-LC.

3.3.3.5 Características analíticas

O sistema proposto foi aplicado para os ensaios de dessorção dos herbicidas ametrina e atrazina em amostras de solos, e as características analíticas foram estimadas (ZAGATTO et al, 2012). Para a validação do procedimento analítico proposto, experimentos de adição/recuperação foram realizados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de cobalto em gramíneas empregando aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação

4.1.1 Influência dos principais parâmetros envolvidos

4.1.1.1 Volumes da amostra e do reagente

Os experimentos envolvendo a solução verde de bromocresol demonstraram que a variação do volume injetado de amostra de 250 a 350 μL resultou em um aumento significativo da absorbância registrada. Quando volumes da amostra acima de 350 μL eram injetados, a absorbância pouco variou, pois 95% da absorbância máxima já teriam sido atingidos. Dessa forma, o volume injetado da amostra foi selecionado de 350 μL , correspondendo a uma alça de amostragem de 70 cm. A injeção da solução BCG via L_S ou L_{R1} permitiu que a sobreposição entre as zonas mais concentradas da amostra e do reagente fosse obtida com um volume de reagente de 200 μL , o que corresponde a uma alça L_{R1} de comprimento igual a 40 cm (Figura 11).

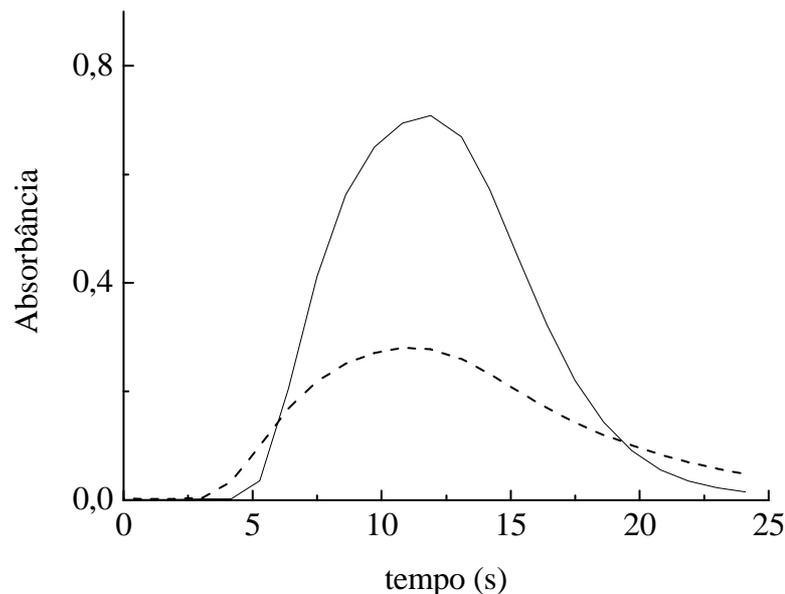


Figura 11 - Sobreposição das zonas da amostra e do reagente. A figura se refere ao sistema de análises em fluxo sem aprisionamento, especificado na Fig. 7. A solução 50,0 mg L^{-1} BCG era injetada via L_S (—) ou L_{R1} (- -). O injetor não era comutado após a injeção da amostra ou do reagente.

4.1.1.2 Tempo de injeção

O tempo de injeção é aqui considerado como sendo o intervalo de tempo decorrido ao mover o injetor da posição de amostragem para a posição de injeção até que a zona da amostra atinja a bobina de reação. Nos experimentos realizados para seleção deste tempo, a bobina de reação foi substituída pela cubeta de detecção, de forma que a absorvância medida fosse monitorada em tempo real. O tempo de injeção era cronometrado até que a máxima absorvância fosse atingida. Isto ocorreu para um tempo de 11 s, valor selecionado no presente trabalho.

O emprego de injetor-comutador manualmente operado não prejudicou o desempenho do sistema, pois tanto a zona da amostra quanto a do reagente eram suficientemente largas. A precisão do tempo de injeção seria necessária, caso essas zonas fossem mais estreitas e, neste caso, um controle rígido da temporização seria necessário, o que implicaria no emprego de um injetor-comutador temporizado.

4.1.1.3 Concentrações dos reagentes

A reação catalítica para a determinação de Co(II), tem o reagente Tiron como substrato para a oxidação por H_2O_2 e é catalisada pelo Co(II) em meio alcalino (item 2.2.2). O radical colorido, semiquinona, provém do Tiron e absorvância medida é proporcional à concentração de Co(II) no meio reacional e, conseqüentemente, na amostra.

A velocidade da reação é influenciada pelas concentrações dos reagentes (OTTO; WERNER, 1983). De acordo com a literatura, na oxidação de Tiron por H_2O_2 catalisada pelo Co(II), a concentração do radical semiquinona aumenta continuamente com o aumento da concentração de H_2O_2 , desde que esta concentração seja igual ou inferior à concentração de Tiron. Quando a concentração de H_2O_2 supera a do Tiron, o radical colorido formado é oxidado a um produto incolor pelo peróxido em excesso, causando um decréscimo na absorvância registrada.

Os experimentos envolvendo variações nas concentrações dos reagentes revelaram que a absorvância registrada aumentou proporcionalmente ao incremento da concentração de H_2O_2 em toda a faixa de concentração considerada (Figura 12), devido ao excesso de Tiron utilizado. Houve um aumento mais pronunciado na absorvância para a concentração de $0,005 \text{ mol L}^{-1} H_2O_2$. Dessa forma essa concentração foi selecionada.

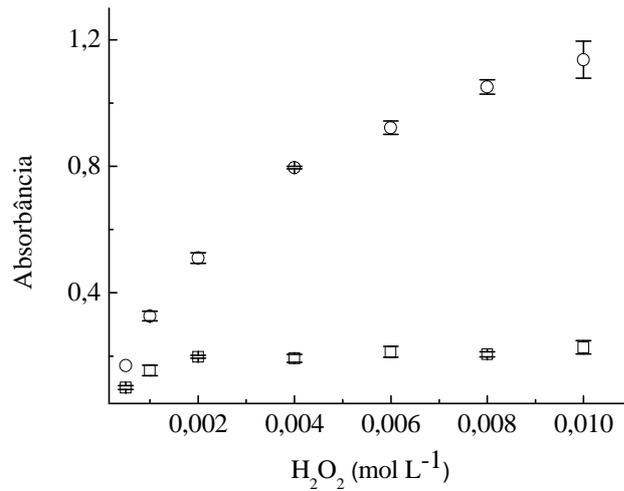


Figura 12 - Efeito da concentração de H₂O₂ na reação catalisada (○) e não catalisada (□) por Co(II). A figura se refere à solução-padrão de 1,0 μg L⁻¹ Co(II).

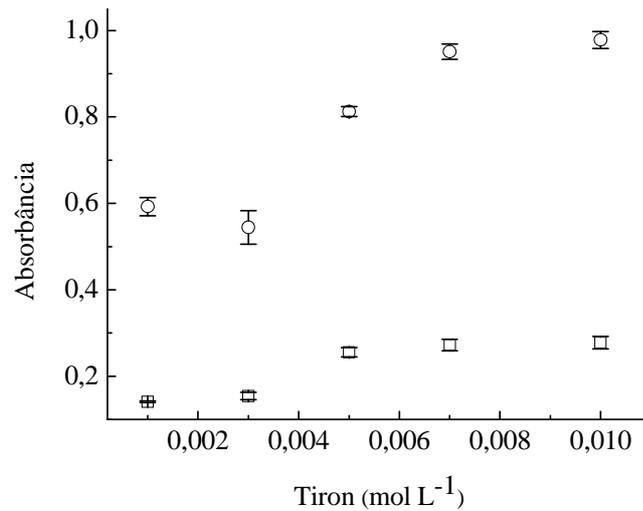


Figura 13 - Efeito da concentração de Tiron (mol L⁻¹) na reação catalisada (○) e não catalisada (□) por Co(II). A figura se refere à solução padrão de 1,0 μg L⁻¹ Co(II).

A influência da concentração de Tiron é especificada na Figura 13. A estequiometria dessa reação se dá na proporção 2:1 de Tiron e H₂O₂, e os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. As análises destes resultados permitem concluir que a utilização de 0,005 mol L⁻¹ de Tiron é suficiente para garantir a sensibilidade do sistema proposto para a determinação de Co(II) em amostras de gramíneas. Como as concentrações de 0,005 mol L⁻¹ de Tiron e de peróxido foram suficientes para garantir a sensibilidade analítica requerida, essas concentrações foram selecionadas.

A alcalinidade é um parâmetro importante na reação em questão, devido ao ganho de sensibilidade quando a concentração de NaOH era aumentada em até $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Acima desse valor, entretanto, uma perda em sensibilidade foi observada, devido às condições menos favoráveis para o progresso da reação catalítica. Além disso, o efeito “Schlieren” foi observado devido à geração dos gradientes de índice de refração formados quando altas concentrações de NaOH confluíam com o transportador de composição distinta. Dessa forma, a concentração $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH foi selecionada para o reagente R_4 .

4.1.1.4 Tempo de aprisionamento

Relativamente ao período de tempo durante o qual a zona de amostra foi aprisionada (1,0 – 6,0 min), observou-se que o sinal analítico aumentou significativamente com o aumento deste parâmetro (Figura 14). Como compromisso entre sensibilidade e frequência de amostragem, este tempo foi selecionado como 3,0 min para a determinação de Co(II) em amostras de gramíneas.

Uma característica importante é que a sensibilidade analítica pode ser ajustada redimensionando-se este parâmetro, dependendo da concentração esperada do analito.

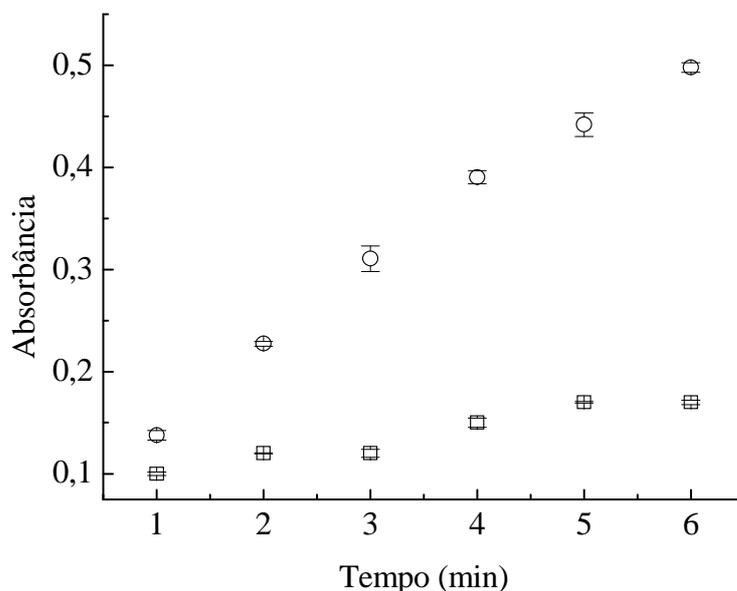


Figura 14 - Efeito do tempo de aprisionamento na reação não catalisada (□) e catalisada (○) por Co(II). A figura se refere à solução-padrão $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II).

4.1.2. Desempenho do sistema

4.1.2.1. Avaliação do efeito de memória na bobina de reação

Em sistemas de análises em fluxo, o efeito de memória (VICENTE et al., 2001) ocorre quando o percurso analítico não é completamente limpo, contaminando a amostra posterior. Em sistemas explorando aprisionamento de zonas na bobina de reação, efeito de memória pode também ocorrer quando a distância entre o ponto de injeção e a bobina de reação não é suficientemente longa, e a zona de amostra estabelecida se sobrepõe à zona anterior recém-liberada da bobina de aprisionamento.

Os experimentos envolvendo solução BCG permitiram verificar que o percurso analítico era completamente limpo antes da injeção da amostra seguinte, pois a bobina de reação era completamente limpa em menos de 11s. Ainda, a soma das vazões dos fluxos dos transportadores e dos reagentes ($5,4 \text{ ml min}^{-1}$) era alta o suficiente para uma limpeza eficiente da bobina de reação.

Para a comprovação de que o efeito de memória realmente não ocorria, três repetições do branco foram analisadas, seguidas por três repetições da solução-padrão de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II), e novamente por mais três repetições do branco. Os sinais analíticos referentes às replicas da primeira solução-padrão foram iguais entre si e os sinais analíticos referentes às soluções-branco também foram iguais entre si, não sofrendo, portanto, efeito mensurável de memória.

Uma característica intrínseca do sistema proposto é que durante o período de aprisionamento da porção mais concentrada da zona da amostra na bobina de reação, o percurso analítico é completamente limpo, pois a porção remanescente é continuamente descartada, evitando, portanto, o efeito de memória.

4.1.2.2 Avaliação da seletividade

Para avaliar a seletividade do procedimento proposto, cada solução contendo uma das possíveis espécies interferentes foram injetadas, e agentes mascarantes não foram inicialmente empregados. As espécies Ca(II) e Fe(III) presentes em concentrações iguais ou maiores que 10 mg L^{-1} se constituíram como os principais interferentes na determinação de Co(II), conforme se depreende da Figura 15.

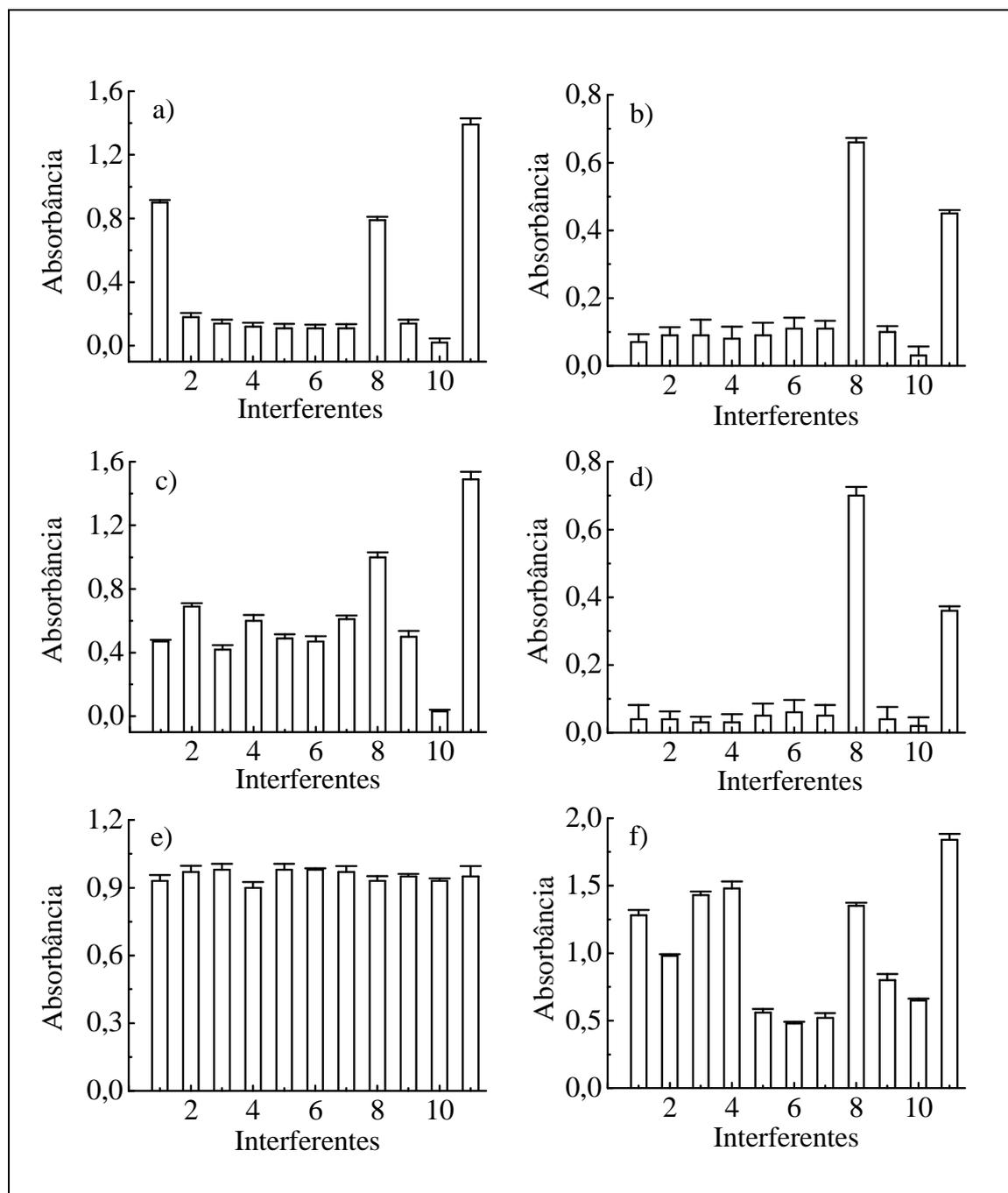


Figura 15 - Espécies potencialmente interferentes na determinação de Co(II). 1 = $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II), 2 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Zn(II), 3 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Mg(II), 4 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Al(III), 5 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ V(V), 6 = $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ Cr(VI), 7 = $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ Ni(II), 8 = $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ Mn(II), 9 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Cu(II), 10 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Ca(II), 11 = $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ Fe(III). Em a = as soluções com os interferentes não continham $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II). Em b – f = as soluções continham cada interferente + $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II). Agentes mascarantes dicionados em confluência: a = sem mascarante, b = citrato de amônio, c = tartarato de sódio e potássio, d = trietilonamina, e = pirofosfato de sódio, f = oxalato de potássio. Barras acima das colunas do histograma = incertezas, estimadas após três repetições.

Para suprimir essas interferências, diferentes soluções mascarantes (0,2 mol L⁻¹ de pirofosfato de sódio, 0,01 mol L⁻¹ de trietanolamina, 0,01 mol L⁻¹ de citrato de amônio, 0,01 mol L⁻¹ de tartarato de sódio e potássio, 0,2 mol L⁻¹ de oxalato de sódio e 0,1 mol L⁻¹ de ácido ascórbico) foram sucessivamente adicionadas como R₂ (Figura 7).

As adições de citrato, tartarato ou trietanolamina não foram efetivas para suprimir as interferências (Figura 15). Além disso, as adições das correspondentes soluções levaram a uma queda na sensibilidade, por complexarem Co(II). A adição de oxalato foi menos efetiva, não reduzindo as interferências. A adição de ácido ascórbico não é recomendada: embora a interferência de Fe(III) fosse suprimida, os sinais analíticos sofreram uma redução pronunciada. De fato, esta é espécie potencialmente redutora, diminuindo tanto a concentração de Fe(III) [conversão a Fe(II)] como a concentração de H₂O₂ [conversão a H₂O] prejudicando a oxidação de Tiron. Pirofosfato foi efetivo na redução das interferências, tornando o procedimento mais seletivo.

4.1.2.3 Características analíticas

O registro dos sinais analíticos para o sistema de aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação está representado na Figura 16. Os sinais analíticos correspondentes à solução do branco refletiam o desenvolvimento da reação não catalítica. Os demais sinais refletiam a oxidação do Tiron pelo peróxido catalisada pelo Co(II). A curva analítica para o sistema com aprisionamento era:

$$A = 0,088 + 0,63 [\text{Co}] \quad (r = 0,998; n = 6)$$

Onde, A = absorvância registrada; [Co] = concentração de Co(II) em µg L⁻¹; coeficiente linear em A L µg⁻¹

O sistema de aprisionamento da zona da amostra com zonas coalescentes permitiu que o consumo do reagente R₁ fosse limitado ao volume da alça L_{R1}, sendo que apenas 330 µg de Tiron eram consumidos por determinação. Durante os períodos de aprisionamento, (situação especificada na Figura 7), as alças do reagente e da amostra eram mantidas fora dos frascos para que não houvesse desperdícios (item 3.3.1.1). O reagente não foi reutilizado, pois o mesmo era preparado diariamente para não aumentar a absorvância do branco e, dessa forma, não deteriorar o limite de detecção.

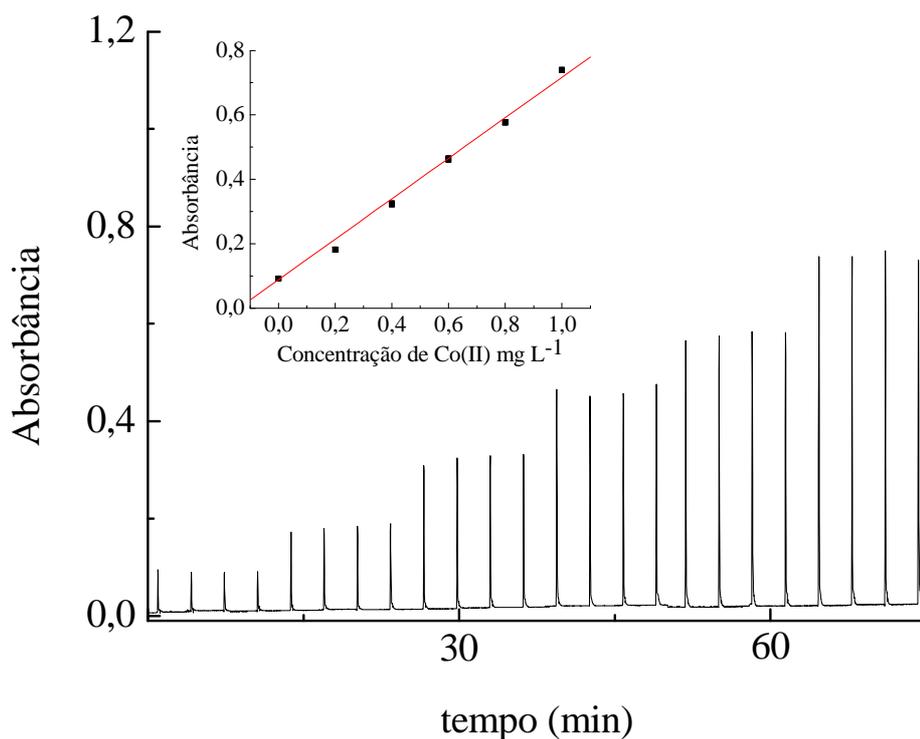


Figura 16 - Sinais analíticos obtidos com o sistema proposto para a determinação de cobalto. Condições experimentais: 0,005 mol L⁻¹ de Tiron; 0,005 mol L⁻¹ H₂O₂ e 0,5 mol L⁻¹ NaOH. Os picos se referem a 0,0; 0,20; 0,40; 0,60; 0,80 e 1,0 µg L⁻¹ Co(II).

Resultados repetitivos foram sempre obtidos, pois o desvio-padrão relativo dos mesmos foi estimado como 0,8% processando-se cinco injeções consecutivas de uma solução 0,6 µg L⁻¹ Co(II). A frequência de amostragem foi de 19 h⁻¹, os limites de detecção e quantificação foram estimados em 0,046 µg L⁻¹ Co(II) e 0,15 µg L⁻¹ Co(II), baseando-se nos critérios 3S_b/m e 10S_b/m, respectivamente, sendo S_b o desvio padrão do branco e m é o coeficiente angular (SKOOG et al., 2006).

O sistema analítico proposto foi aplicado à determinação de Co(II) em gramíneas. Para os ensaios de adição e recuperação, a solução 3,0 µg L⁻¹ Co(II) era adicionada a 5,0 mL das amostras digeridas e o volume completado a 10 mL com uma solução 0,25 mol L⁻¹ HClO₄. Os dados de recuperação variaram entre 97% e 113% (Tabela 3), demonstrando a potencialidade do procedimento proposto para a determinação de cobalto em gramíneas.

Tabela 3 - Dados de adição e recuperação de Co(II). Os dados se referem às concentrações das amostras digeridas, antes e após a adição padrão de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II). Incertezas entre parênteses expressas em %, estimadas após 3 repetições.

Amostra	sem adição	com adição	% recuperação
1	0,12 (5,6)	0,48 (2,7)	113
2	1,03 (2,4)	1,29 (4,8)	97
3	0,88 (2,1)	1,23 (2,8)	104
4	1,09 (0,2)	1,47 (3,1)	105
5	1,30 (4,9)	1,66 (3,0)	104
6	1,25 (6,3)	1,75 (6,1)	112

4.2 Determinação catalítica de V(V) de águas minerais empregando a estratégia de aprisionamento com aquecimento

A oxidação do reagente *p*-anisidina por bromato é considerada lenta (TESHIMA et al., 2009). Em presença de V(V), ocorre a formação do complexo entre V(V) e *p*-anisidina, ocorrendo uma transferência do elétron para V(V), convertendo essa espécie para V(IV). O V(IV) é regenerado ciclicamente a V(V) pelo bromato, reiniciando a reação catalítica. O radical *N*-(4-etoxifenil)-quinoneimina colorido origina-se da *p*-anisidina após a reação oxidativa, e a taxa da sua formação é proporcional à concentração de V(V) presente no meio reacional.

O espectro de absorção do radical *N*-(4-etoxifenil)-quinoneimina (Figura 17) foi obtido injetando-se $750 \mu\text{L}$ da solução-padrão $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V) no sistema representado na Figura 8a, sem o reagente mascarante por 25 s, até atingir a bobina de reação aquecida a 80°C . Nesse instante, o injetor foi deslocado para a posição de amostragem, aprisionando a zona de amostra na bobina durante 3 min. Após esse período, o injetor era novamente deslocado para a posição de injeção, e o espectro do produto era registrado durante a passagem da zona colorida pelo detector. O comprimento de onda referente à máxima absorção foi o de 503 nm,

o qual foi selecionado. Nota-se que a banda de absorção é relativamente larga (Figura 17) e este aspecto é positivo no que se refere á robustez do procedimento.

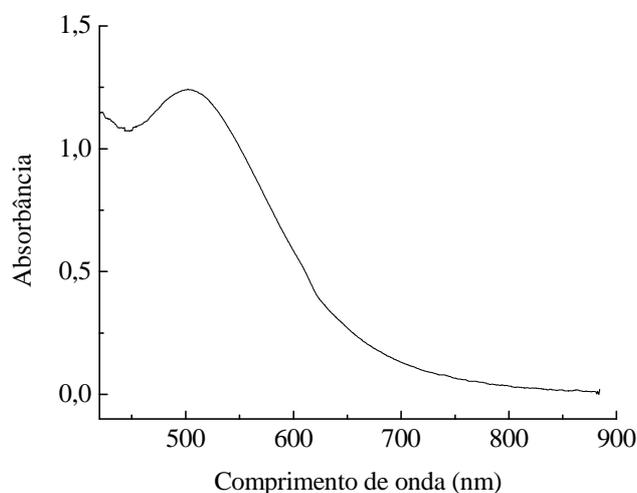


Figura 17 - Espectro de absorção do produto de reação. A figura se refere a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V); $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de *p*-anisidina tamponado com glicina (pH 2,5); $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Tiron; $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ bromato; temperatura = 80°C ; tempo de injeção = 25 s; tempo de reação = 3,0 min.

4.2.1 Aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação aquecida

Investigações referentes a esta estratégia de aprisionamento foram conduzidas empregando-se o sistema de análises em fluxo da Figura 8a, e a influência dos principais parâmetros envolvidos é discutida a seguir.

4.2.1.1 Tempo de injeção

Os resultados experimentais indicaram que a máxima absorbância era observada quando o injetor-comutador permanecia de 20,0 a 35,0 s na posição de injeção da amostra e do reagente. Essa faixa larga de tempos de injeção em que máxima sensibilidade era obtida se deve à utilização das zonas largas da amostra e do reagente. É sabido que a temporização realizada por um injetor manual não é estritamente precisa como a realizada por um injetor temporizado. No entanto, quando se utilizam zonas largas da amostra e do reagente, o desempenho do sistema não é prejudicado pela temporização no modo manual.

Para a comprovação de que a repetibilidade das determinações de V(V) não era afetada por essa característica, foram feitas 10 injeções da solução-padrão $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V), obtendo-se um desvio padrão relativo das medidas de 0,8%. A injeção de zonas mais estreitas da amostra e do reagente implicaria necessariamente na utilização de um injetor temporizado

para que a temporização ocorresse de forma mais precisa. Para as determinações de V(V) em águas minerais, o tempo de injeção de 25 s foi selecionado.

4.2.1.2 Comprimento do reator R_{C1}

Entre duas amostragens consecutivas pode ocorrer a sobreposição de zonas, se o percurso analítico entre o ponto de injeção da amostra e a bobina de reação (ou cubeta) não for suficientemente longo, originando o efeito de memória. Para minimizar este efeito, o reator R_{C1} foi adicionado previamente à bobina de reação (ou cubeta) (Figura 8). Diferentes comprimentos deste reator (10 - 150 cm) foram testados, não sendo observado o efeito de memória para reatores com comprimentos maiores do que 50 cm, sendo este comprimento selecionado. Quando reatores de 100 e 150 cm foram utilizados, houve um decréscimo na absorvância registrada, pois a dispersão da zona da amostra era maior em decorrência do percurso analítico ser mais longo.

4.2.1.3 Tempo de aprisionamento

Os resultados referentes à influência do tempo de aprisionamento da amostra e do reagente *p*-anisidina no reator principal são apresentados na Figura 18a. Verificou-se que a absorvância medida aumentou significativamente com o aumento deste parâmetro. Como compromisso entre sensibilidade, frequência analítica e concentrações de V(V) esperada nas amostras de águas minerais, este parâmetro foi selecionado como 2,0 min. Uma característica importante é que a sensibilidade pode ser ajustada em função deste parâmetro, o que se constitui em aspecto positivo para a aplicabilidade do procedimento proposto a outras matrizes.

4.2.1.4 Temperatura

Para temperaturas do banho termostático menores do que 40°C (Figura 18b), o desenvolvimento da reação era negligível, independentemente da presença ou não do catalisador. O aumento da temperatura acima de 60°C levou à geração de bolhas, distorcendo os sinais analíticos. Para eliminar este problema, a bobina restritora (150 cm de comprimento e 0,5 mm d.i.) era adicionada ao sistema na saída da cubeta de detecção. Este reator aumentava a pressão do sistema, inibindo a formação de bolhas com o aumento da temperatura. Dessa forma, foi possível avaliar o efeito da temperatura entre 25 e 90°C. No entanto, observou-se a formação de pequenas bolhas no sistema quando a temperatura era

maior do que 80 °C. Esta temperatura foi então selecionada para a realização dos experimentos no sistema com o aprisionamento da zona da amostra na bobina reacional.

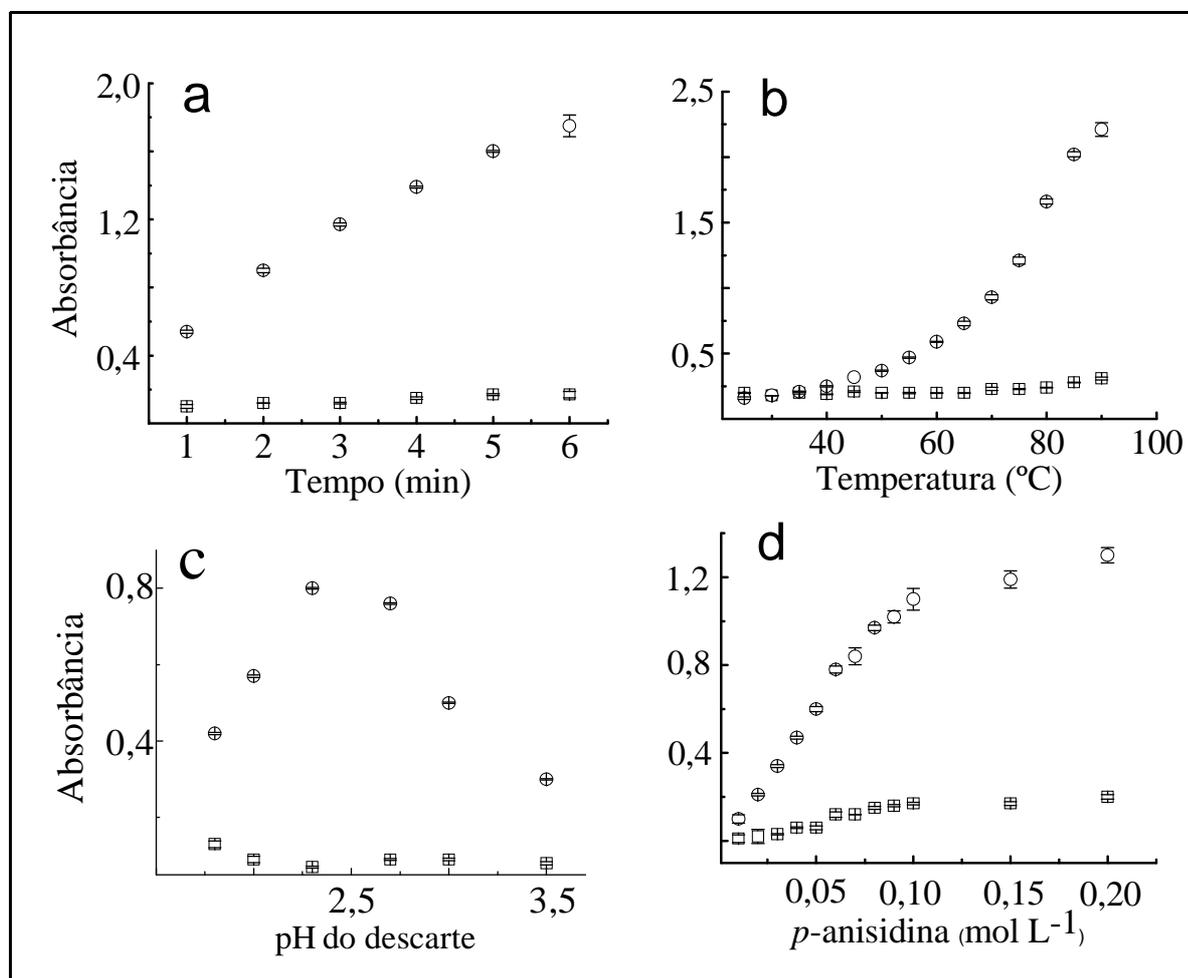


Figura 18 - Influência do tempo de aprisionamento, temperatura, pH da solução descartada e concentração da *p*-anisidina. A figura se refere ao sistema de análises em fluxo da Figura 8a com reator aquecido a 80°C. As letras (a), (c) e (d) se referem ao branco e a solução padrão de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ V(V), e a letra (b) se refere à solução-padrão de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ V(V).

4.2.1.5 pH do meio reacional

O efeito do pH (Figura 18c) no desenvolvimento da reação catalítica foi estudado medindo-se os pHs na solução descartada (W – Figura 8). Estes valores são similares aos valores de pH da solução fluindo pela bobina reacional, pois o meio reacional era tamponado. Como a absorbância foi relativamente constante para $2,3 < \text{pH} < 2,7$, o pH da solução-tampão de glicina foi ajustado para 2,5, obtendo-se o pH de 2,7 na solução descartada. Estes resultados condizem com aqueles apresentados por Teshima al. (2009), os quais demonstram que o desenvolvimento da reação catalítica é favorecido na faixa de pH entre 2,7 e 3,0.

4.2.1.6 Concentrações dos reagentes

P-anisidina

O efeito da concentração deste reagente foi avaliado incrementando-se esta concentração entre 0,01 e 0,2 mol L⁻¹, e a resposta da reação catalítica aumentou significativamente até a concentração de 0,1 mol L⁻¹, ao passo que a reação não catalisada teve uma leve resposta (Figura 18d). Isso porque a intensidade da absorbância medida é devida a formação do radical colorido *N*-(4-etoxifenil)-quinoneimina, proveniente da *p*-anisidina, e é proporcional à concentração desse reagente. Assim, a concentração 0,1 mol L⁻¹ de *p*-anisidina foi selecionada para a determinação de V(V) em amostras de águas minerais. Estes resultados condizem com a literatura (TESHIMA et al., 2009) que consideraram a faixa de concentração de 0,04 – 0,09 mol L⁻¹, e relataram que a sensibilidade máxima para essa reação era obtida quando 0,08 mol L⁻¹ de *p*-anisidina foi utilizada.

Bromato

O efeito da concentração de bromato foi analisado na faixa de 0,01 a 0,1 mol L⁻¹. Os resultados foram análogos aos verificados com a variação da concentração de *p*-anisidina, ou seja, a resposta da reação catalítica aumentou significativamente com o aumento da concentração do reagente até 0,05 mol L⁻¹, o que demonstra que a lei de ação das massas alterando a cinética reacional é o principal aspecto envolvido. Este efeito é menos efetivo em relação à reação não-catalisada, uma vez que a oxidação da *p*-anisidina por bromato na ausência de V(V) é lenta. Desta forma, a concentração de 0,05 mol L⁻¹ foi selecionada. Estes resultados também são condizentes com trabalho anterior (TESHIMA et al., 2009).

Tiron

O uso de ativadores em reações catalíticas leva em geral a uma melhoria na sensibilidade e/ou seletividade dos métodos. Alguns ativadores têm sido reportados para as reações catalisadas por vanádio: oxina, ácidos oxálico, cítrico e sulfosalicílico, tartarato e Tiron (BONTCHEV, 1972). O efeito da concentração do Tiron na resposta da reação catalítica foi avaliado na faixa de 0,025 a 0,2 mol L⁻¹, sendo que a sensibilidade máxima foi atingida quando a concentração de Tiron foi de 0,1 mol L⁻¹. Esses resultados são condizentes com relatos de Teshima et al. (2009) que verificaram máxima sensibilidade quando a concentração 0,15 mol L⁻¹ de Tiron era utilizada. Dessa forma, a concentração de 0,1 mol L⁻¹ de Tiron foi selecionada para a determinação de V(V) em amostras de águas minerais.

4.2.2 Estudos de seletividade

As concentrações das espécies interferentes em potencial foram preparadas com a solução-padrão $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V) em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ HNO_3 (Tabela 1). Fe(III) e Ni(II) em concentrações acima de $2,5$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, se manifestaram como os principais interferentes químicos (Figura 19). Para tornar o método mais seletivo, diferentes agentes mascarantes, tais como tartarato, citrato, tioacetamida, trietanolamina, tiocianato, pirofosfato, oxalato e fluoreto a diferentes concentrações ($0,003 - 0,3 \text{ mol L}^{-1}$) foram testadas como reagente R_2 (Figura 8a). O reagente mascarante era adicionado em confluência no ponto de amostragem, onde ocorria a complexação das espécies interferentes presentes na amostra com o mascarante, impedindo que essas espécies fluíssem até a bobina de reação (ou cubeta de detecção). Considerando o efeito de diluição causado pela alta vazão dos fluxos transportadores da amostra e do reagente ($3,7 \text{ mL min}^{-1}$), a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ NH_4F foi selecionada, pois suprimiu essas interferências.

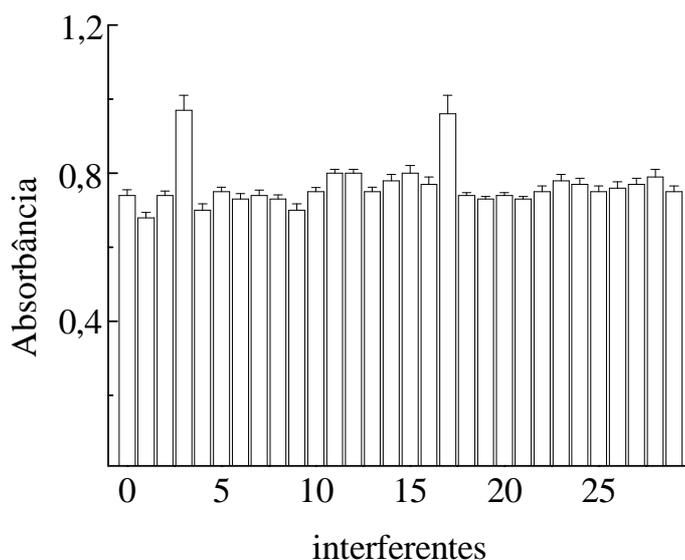


Figura 19 - Espécies interferentes na reação catalisada por V(V). A figura se refere ao sistema da Figura 8a sem adição de mascarante. 0 = $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ V(V); 1–3 = 25, 250, 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Fe(III); 4 = $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Co(II); 5–6 = 50, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu(II), 7–10 = 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ Al(III); 11–12 = 50, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn(II); 13–14 = 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr(VI); 15–17 = 10, 100, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ni(II); 18–19 = 10, 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II); 20–21 = 25, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ Ti(IV); 22–25 = 10, 100, 1000, 10 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ Mn(II); 26–29 = 10, 100, 1000, 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$ Si(IV).

4.2.3 Aprisionamento da zona da amostra na cubeta aquecida

4.2.3.1 Projeto do sistema

Após o estudo dos principais parâmetros analíticos, o sistema de análises em fluxo da Figura 8a foi modificado para que o aprisionamento da zona da amostra ocorresse na cubeta aquecida, resultando no sistema apresentado na Figura 8b. A bobina restritora (P) foi removida, uma vez que essa configuração não permitia a geração de bolhas com o aumento da temperatura. Este aspecto benéfico se deve ao aprisionamento da zona de amostra em um ambiente estanque, o que dificultava a liberação de bolhas de ar, possibilitando que a temperatura do sistema pudesse ser elevada até 95°C. Esse sistema foi utilizado para a determinação de V(V) em águas minerais.

4.2.3.2 Características analíticas

Efeito Schlieren

Em sistemas de análises em fluxo, o efeito Schlieren (ZAGATTO et al., 2012) se caracteriza como o espalhamento da radiação devido ao gradiente dos índices de refração quando a amostra é inserida em um fluxo transportador de diferente composição. Ou então, quando as condições de mistura entre os reagentes são ineficientes, levando à presença de pequenas lentes e espelhos líquidos que causam o espalhamento da radiação. Nessas condições, os sinais analíticos registrados são distorcidos, deteriorando o limite de detecção.

Nos procedimentos analíticos que empregam o aquecimento na bobina reacional pode ocorrer o Schlieren térmico, devido à formação de lentes e espelhos líquidos causada pelos diferentes índices de refração devidos a diferenças de temperatura entre o meio reacional aquecido e a cubeta de detecção, a qual se encontra na temperatura ambiente.

Com relação ao sistema de aprisionamento na bobina, o efeito Schlieren devido aos gradientes de concentrações presentes na bobina de reação era atenuado, pois durante o período de aprisionamento, havia o efeito de difusão na solução, eliminando as pequenas lentes líquidas e as interfaces especulares formadas que causariam o espalhamento da radiação. Os sinais analíticos correspondentes ao branco (Figura 20) apresentaram distorções nas alturas máximas dos picos registrados devido ao Schlieren térmico, porque a zona da amostra na temperatura ambiente era aprisionada no reator principal a 80°C e fluía em direção ao detector, que estava sob temperatura ambiente.

No sistema com aprisionamento da zona da amostra na cubeta, o efeito Schlieren devido às condições ineficientes de mistura era atenuado, pois a amostra e os reagentes eram previamente misturados no reator R_{C1} . O efeito Schlieren devido ao gradiente de concentração presente na zona da amostra era menos pronunciado, pois somente a porção central da zona amostra/reagente era aprisionada na cubeta. O Schlieren térmico foi observado como picos negativos (Figura 21). Isso porque a zona da amostra que estava sob temperatura ambiente fluía para a cubeta aquecida e aí permanecia por um período determinado onde a absorvância era monitorada em tempo real. O aquecimento na cela de detecção aliada à estratégia de aprisionamento garantiu que o desenvolvimento da reação catalítica e as medidas das absorvâncias se processassem na mesma temperatura, evitando distorções nos sinais analíticos registrados.

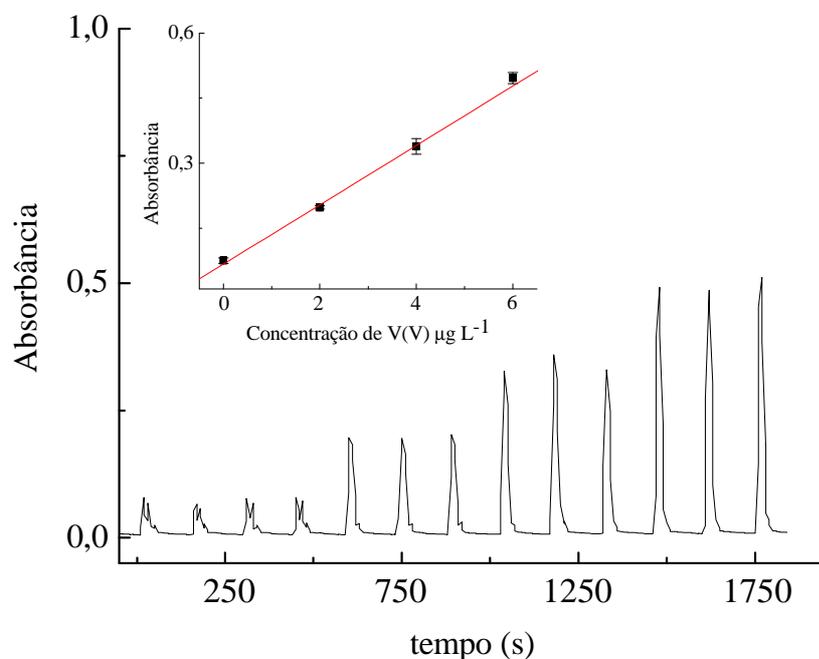


Figura 20 - Sinais analíticos obtidos com o sistema explorando aprisionamento no reator. Da esquerda para a direita: sinais analíticos em triplicata referentes às soluções padrão 0,0; 2,0; 4,0 e 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ V(V).

Figuras de mérito

As principais figuras de mérito do sistema proposto tais como sensibilidade, repetitividade, limite de detecção e frequência de amostragem foram comparadas com o sistema em que o aprisionamento ocorria na bobina de reação, e os resultados constam da Tabela 4. O sistema proposto com zonas coalescentes permitiu uma redução no consumo do reagente R_1 , para apenas 3,0 mg de *p*-anisidina por determinação.

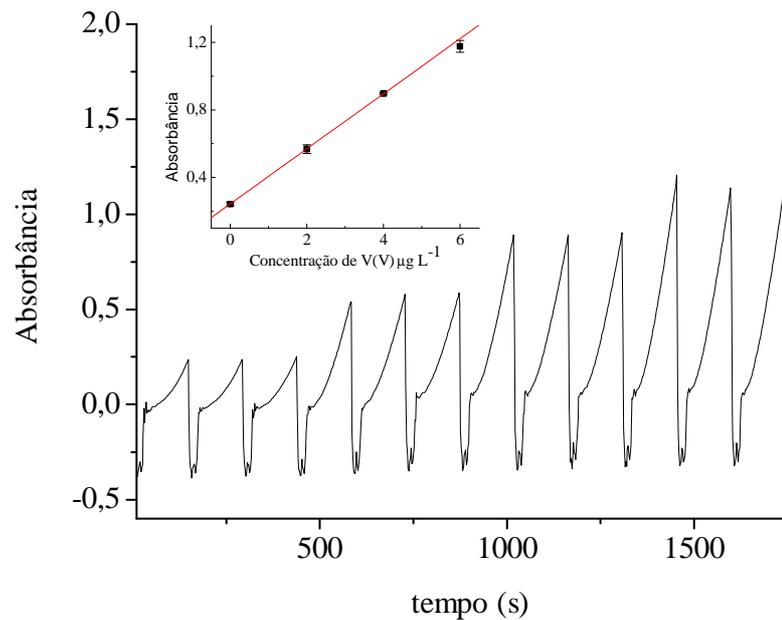


Figura 21 - Sinais analíticos obtidos com o sistema explorando aprisionamento na cubeta de fluxo. Para detalhes, V. legenda da figura 20.

Tabela 4 - Comparação entre os sistemas envolvendo aprisionamento da zona da amostra na bobina de reação e na cubeta de fluxo

	bobina de reação	cubeta de detecção
Frequência de amostragem (h ⁻¹)	24	25
Precisão (%) para 5,0 µg L ⁻¹ (n = 10)	0,8	2,1
Limite de detecção (µg L ⁻¹)	0,23	0,1
Limite de quantificação (µg L ⁻¹)	0,77	0,33
Curva analítica	$A = 0,0665 + 0,070 [V(V)]$	$A = 0,2403 + 0,151 [V(V)]$
Volume aprisionado (µL)	1000	80
T (°C)	80	95

O limite de detecção do sistema de aprisionamento na cubeta de detecção era menor do que aquele referente ao sistema com aprisionamento na bobina de reação, devido à maior temperatura utilizada para o desenvolvimento da reação. No entanto, brancos mais altos foram observados. Isso porque, no sistema de aprisionamento na bobina de reação, havia o efeito de

dispersão para a reação não catalítica devido ao comprimento da bobina (200 cm) e a linha de transmissão (15 cm), sendo que esses percursos eram ausentes no sistema de aprisionamento na cela de detecção.

4.2.4 Aplicação

O sistema com aprisionamento na cubeta foi aplicado à determinação de V(V) em águas minerais e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5. Para comprovação da exatidão analítica associada a esse sistema, o teste-*t* pareado foi aplicado para a comparação entre as médias dos resultados obtidos com o procedimento proposto e com ICP-MS/MS. O valor *t* experimental foi determinado como 0,4, menor do que o valor *t* a 95% de confiança para sete graus de liberdade (2,36). Comprovou-se então que não houve diferenças significativas entre os dois procedimentos.

Tabela 5 - Determinação de vanádio em águas minerais pelos sistemas de análises em fluxo na cubeta de fluxo e por ICP-MS/MS. Dados em $\mu\text{g L}^{-1}$

Amostra	Cubeta	ICP-MS/MS
1 ^a	2,14 ± 0,06	2,12 ± 0,02
2	3,00 ± 0,03	3,03 ± 0,01
3	2,51 ± 0,09	2,89 ± 0,02
4 ^b	5,73 ± 0,24	5,59 ± 0,01
5 ^b	4,35 ± 0,18	4,13 ± 0,04
6	1,72 ± 0,02	1,69 ± 0,04
7	1,66 ± 0,02	1,38 ± 0,02
*	3,65 ± 0,03	3,73 ± 0,17

^a Amostra previamente diluída 100 vezes com água deionizada e 0,1% HNO₃.

^b Amostra previamente diluída 20 vezes com água deionizada e 0,1% HNO₃.

* SRM 1643e Trace Elements in Water NIST diluído 10 vezes com água deionizada e 0,1% HNO₃, valor certificado: $37,86 \pm 0,59 \mu\text{g L}^{-1}$ V.

4.3 Determinação dos herbicidas ametrina e atrazina potencialmente lixiviáveis em solos explorando o acoplamento SIA-LC

4.3.1 Seleção das colunas cromatográficas

Três colunas cromatográficas de fase reversa C₁₈ [coluna monolítica (1), empacotada (2), empacotada X-Terra (3)] foram testadas para selecionar a que proporcionava a melhor separação das triazinas, sem sobreposição de picos e com o menor tempo de retenção. Para avaliar o desempenho das colunas, 40 µL de soluções 100 µg L⁻¹ de ametrina, atrazina ou prometon, preparadas em metanol eram injetados. A fase móvel (40:60 v/v acetonitrila/água) fluía a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, e a eluição era isocrática.

Os critérios para a seleção da coluna foram os tempos de retenção e a eficiência de separação para ambos os analitos, com um menor tempo de separação proporcionado. Para cada coluna investigada, as triazinas eram individualmente injetadas e identificadas pelo espectro e tempo de retenção (t_R) e, então, injetadas em uma mesma solução para verificar se os picos eram completamente separados.

Para a coluna (1), os tempos de retenção de 5,2, 5,9 e 8,0 min, foram obtidos para atrazina, prometon e ametrina, respectivamente. As três triazinas eram completamente separadas com o tempo de separação de 9,0 min. Para a coluna (2), os picos do prometon e atrazina não eram completamente separados e os valores t_R eram de 5,9, 6,2 e 9,2 min para prometon, atrazina e ametrina, respectivamente, com o tempo de separação de 10,0 min. Em relação à coluna (3), os valores t_R eram ainda mais longos (5,7, 11,2 e 11,6 min para atrazina, prometon e ametrina) com o tempo de separação de 13 min. Além disso, os picos referentes a prometon e ametrina não eram completamente separados.

As triazinas eram totalmente separadas na coluna monolítica com menores tempos de retenção e, portanto, um menor tempo de separação era requerido. No entanto, as bandas eram muito largas, pois esses compostos eram dissolvidos em metanol e a fase móvel era composta por 40,0:60,0 (v/v) acetonitrila/água. Para melhor eficiência na separação, 0,4% (v/v) de ácido acético foi adicionado à fase móvel, agora 40,0:59,6:0,4 (v/v/v) acetonitrila/água/ácido acético, tornando a fase estacionária menos polar. Como consequência, t_R e o tempo de separação foram mais curtos em relação às condições prévias sem a adição de ácido acético. Além disso, a ordem de eluição das triazinas foi alterada, tempos de retenção de 2,5, 3,5 e 4,5 min sendo notados para prometon, ametrina e atrazina, respectivamente, com tempo de separação de 5,0 min (Figura 22).

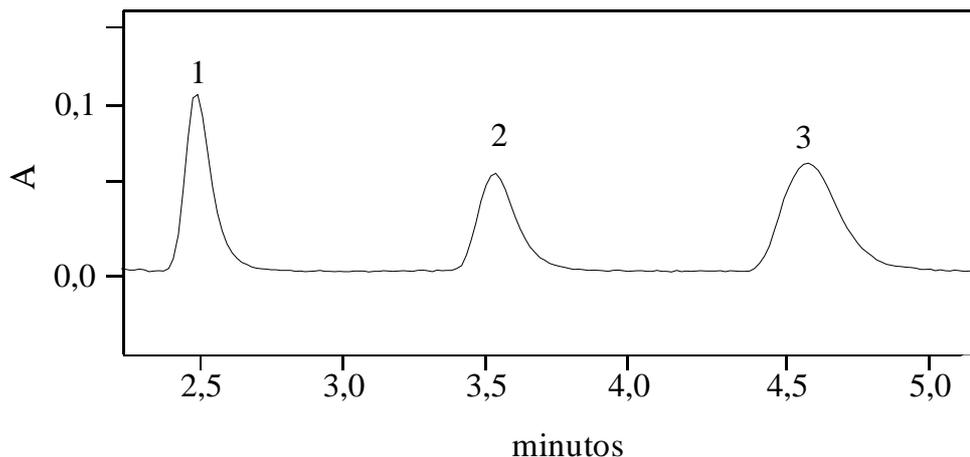


Figura 22 - Cromatograma referente a ametrina e atrazina. 1= 0,25 mg L⁻¹ prometon (padrão interno), 2 = 0,1 mg L⁻¹ ametrina, 3 = 0,1 mg L⁻¹ atrazina, após SPE (detecção em modo “off-line”, volume injetado = 40 µL). A = absorvância.

Quando a determinação e quantificação de um maior número de triazinas e metabólitos é desejável, melhor eficiência de separação pode ser conseguida em colunas maiores (100 – 150 mm), monolíticas ou particuladas acopladas com HPLC (Tabela 6). Geralmente, a pré-concentração de herbicidas de interesse é feita em batelada e, em seguida, esses compostos são injetados e separados em HPLC. Conforme mencionado anteriormente, esse processo é laborioso, com maior consumo de solventes. Visando tornar esse processo mais rápido, sem contaminação e/ou perda dos analitos, a pré-concentração pode ser eficientemente realizada em linha, obtendo-se baixos limites de detecção.

A separação desses compostos pode ser feita em sistemas de análises em fluxo, tais como análise por injeção em fluxo com multisseringa ou por injeção sequencial (Tabela 6). Nesses sistemas, colunas mais curtas (25 ou 50 mm), monolíticas ou de núcleo fundido, têm sido utilizadas e boa eficiência de separação é obtida quando se almeja separar um menor número de compostos. Ainda com relação a esses sistemas, celas de longo caminho óptico podem ser utilizadas quando se almeja menores limites de detecção.

O interessante da presente proposta foi aliar a eficiência do processo de pré-concentração em linha utilizando o SIA com a eficiência de separação proporcionada por uma coluna monolítica de 10 cm acoplada a HPLC, para avaliar a dessorção da ametrina e atrazina em amostras de solos. Apesar de o procedimento proposto poder empregar maiores vazões visando maior frequência de amostragem, a vazão não foi aumentada, considerando-se a complexidade da matriz do extrato de solo.

Tabela 6 - Estratégias de separação cromatográfica para análise de herbicidas. AT: atrazina; AM: ametrina; PROP: propazina, SIM: simazina, MT: metabólitos

Herbicida	coluna	tempo de retenção (min)	eluição	pre-concentração	LD	volume de amostra (μL)	vazão (mL min^{-1})	Detecção (UV-Vis)	sistema	ref.
AT, MT	particulada 150 x 4,6 mm, 3,5 μm	9,83 (AT)	gradiente	-	0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	20	1,2	$\lambda = 220 \text{ nm}$	HPLC	Abate et al., 2004
AT, PROP,MT	particulada 150 x 4,6 mm, 3,5 μm	4,14 (AT)	isocrática	-	0,5mg L^{-1} (AT)	20	1,0	$\lambda = 220 \text{ nm}$	HPLC	Abate, Masini, 2005
AT, PROP, MT	particulada 150 x 4,6 mm, 3,5 μm	4,19 (AT)	isocrática	SPE em batelada	1,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	20	1,0	$\lambda = 220 \text{ nm}$	HPLC	Zarpon et al., 2006
AT, SIM, PROP	monolítica (25 x 4,6 mm)	0,87 (AT)	isocrática	-	10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	200	2,4	$\lambda = 223 \text{ nm}$ caminho óptico = 40 mm	SIC	Santos et al., 2009
AT, SIM, hexazinona	monolítica 50 x 4,6 mm	1,77 (AT)	isocrática	-	0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	500	3,0	$\lambda = 220 \text{ nm}$	HPLC	Beale et al., 2010
AT, SIM, PROP, MT	particulada 150 x 4,6 mm, 3,5 μm	14,1 (AT)	gradiente	SPE em linha	0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	1000	1,0	$\lambda = 220 \text{ nm}$	HPLC	Boonjob et al., 2010

Continua

										Conclusão
Herbicida	coluna	tempo de retenção (min)	eluição	pre-concentração	LD	volume de amostra (μL)	vazão (mL min^{-1})	Deteção (UV-Vis)	sistema	ref.
AT, dicamba, 2,4-D	monolítica 25 x 4,6 mm	7,5 (AT)	isocrática	SPE em linha	22,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	3000	0,8	$\lambda = 210 \text{ nm}$ caminho óptico = 10 mm	MSC	Chávez-Moreno et al., 2012
AT, SIM, PROP, MT	monolítica 25 x 4,6 mm	5,7 (AT)	gradiente	-	9,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	400	1,8	$\lambda = 223 \text{ nm}$ caminho óptico = 4 cm	SIC	Urio et al., 2013
AM, AT e outros 7 herbicidas	particulada 150 x 4,6 mm, 5,0 μm	12,0 (AT) 17,0 (AM)	gradiente	SPE em batelada	0,011 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT) 0,013 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AM)	20	1,0	$\lambda = 222,7 \text{ nm}$	HPLC	Beceiro-González et al., 2014
AT, SIM, MT	monolítica 50 x 4,6 mm	3,6 (AT)	gradiente	-	24,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	200	2,1	$\lambda = 223 \text{ e } 238 \text{ nm}$ caminho óptico = 4 cm	SIC	Urio, Masini, 2015
AT, SIM, MT	particulada 30 x 4,6 mm núcleo fundido, 2,7 μm	12,8 (AT)	gradiente	-	25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (AT)	80	0,48	$\lambda = 223 \text{ e } 238 \text{ nm}$ caminho óptico = 4 cm	SIC	Urio, Masini, 2015

AM, AT	monolítica 100 x 4,6 mm	3,8 (AM) 4,8 (AT)	isocrática	SPE em linha	0,016 mg L ⁻¹ (AM) 0,015 mg L ⁻¹ (AT)	1000	1,0	$\lambda = 220 \text{ nm}$	SIA- HPLC	Proposto
--------	-------------------------------	----------------------	------------	-----------------	--	------	-----	----------------------------	--------------	----------

4.3.2 Seleção da composição do sorbente para SPE em linha com detecção “off-line”

Os experimentos para selecionar a fração eluída mais concentrada das triazinas com um menor volume de eluente foram realizados conforme descrito no item 3.3.3.2.1, sendo que cada fração de 125 μ L do eluato coletado era analisada por cromatografia líquida. Para tanto, dois sorbentes, Oasis HLB e Plexa (30,0 e 60,0 mg) foram testados, e os resultados são apresentados na Figura 23. É importante enfatizar que as quatro frações eram eluídas sequencialmente, para que o sorbente fosse completamente limpo, evitando-se assim o efeito de memória entre as réplicas.

Para ambas as massas, a segunda fração era a mais concentrada independentemente do sorbente empregado. Para 30 mg, obtiveram-se maiores recuperações para o sorbente Plexa, (71% para ametrina e 62% para atrazina), enquanto que para o sorbente Oasis, recuperações de 57% e 52% foram determinadas para ametrina e atrazina, respectivamente. A repetibilidade para o sorbente Plexa também era superior.

A obtenção de resultados mais favoráveis para Plexa (AGILENT, 2011) é justificada pela sua composição, pois este sorbente é um polímero que possui superfície hidroxilada polar e o centro com poros apolares. A superfície hidrofílica possibilita a transferência do analito para o núcleo do sorbente, impedindo que moléculas grandes, como proteínas, ácidos nucleicos e substância húmicas não atinjam o núcleo, sendo então descartadas na etapa de lavagem. Já o sorbente Oasis (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2002) possui o centro mais polar devido à presença de grupos hidrofílicos, retendo mais os compostos polares do que o sorbente Plexa. Para a massa de 60 mg, esse aspecto é ainda mais crítico, comprometendo a reprodutibilidade sendo, portanto, necessário um maior volume de eluente. Consequentemente, a eficiência da pré-concentração é reduzida devido ao efeito de diluição do eluato.

Deve-se salientar que a segunda fração deveria ser repetitiva para as três réplicas, pois continha a porção mais concentrada das triazinas a ser selecionada para o “heart cut”. Dessa forma, o sorbente Plexa (30,0 mg) se mostrou como o mais apropriado para a concentração das triazinas, resultando em melhor repetibilidade entre as réplicas.

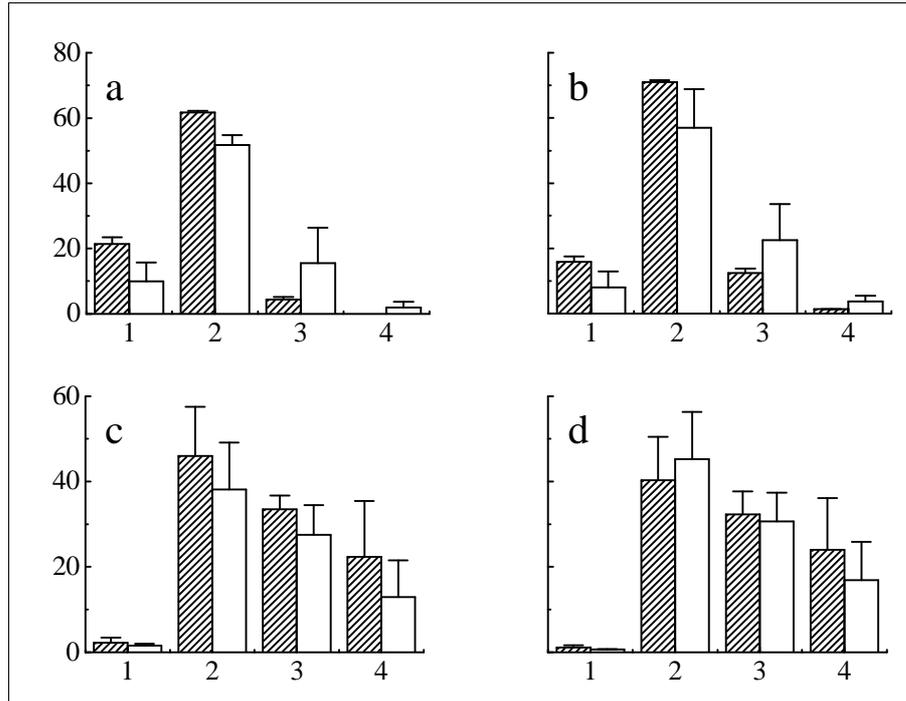


Figura 23 – Recuperações (em %) referentes a $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de atrazina (a, c) e ametryn (b, d) obtidas com $30,0 \text{ mg}$ (a, b) e $60,0 \text{ mg}$ (c, d) dos sorbentes (▨) Plexa e (□) Oasis. Os números 1 – 4 correspondem às frações sequencialmente eluídas.

4.3.3 Acoplamento SPE-LC

4.3.3.1 Otimização do “heart cut”

Os experimentos envolvendo o aumento do volume injetado em LC foram realizados com o objetivo de avaliar se ocorreria o alargamento de bandas quando grandes volumes das soluções-padrão eram injetados. Para esta finalidade, esse estudo envolveu a variação do volume da amostra na faixa de $20\text{-}300 \mu\text{L}$ e a avaliação dos cromatogramas obtidos, injetando-se a solução de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ das triazinas em metanol diretamente no cromatógrafo, sem a etapa de pré-concentração. Análise dos resultados revelou que, mesmo para o maior volume injetado, as triazinas eram completamente separadas sem alteração da ordem de eluição.

Para a otimização do “heart cut”, foram considerados tanto o volume da alça de amostragem ($300 \mu\text{L}$) bem como o volume morto da minicoluna da SPE até a alça de amostragem. Nesse sentido, o efeito do aumento volume do “heart cut” foi observado na faixa de $300 - 600 \mu\text{L}$. Quando o volume era aumentado para $450 \mu\text{L}$, as áreas dos picos registrados eram máximas, e correspondiam ao dobro para a ametryn e ao triplo para a atrazina relativamente ao volume de $300 \mu\text{L}$.

4.3.3.2 Validação do procedimento analítico proposto

Estudos preliminares utilizando o sistema SIA foram realizados para verificar se ocorria a obstrução do filtro quando 1,0 mL do extrato era aspirado do recipiente contendo 2,0 g de solo e 50,0 mL de solução $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$. Para tanto, 1,0 mL dos extratos de solos era coletado após ser aspirados pelo filtro em microtubos de 1,5 mL de capacidade. A seguir, os microtubos eram pesados e as massas dos extratos eram obtidas subtraindo-se as massas dos tubos cheios pelas massas desses mesmos tubos vazios. As aspirações consecutivas de 10 extratos, para os dois solos, utilizando um único filtro para cada tipo de solo resultaram em d.p.r. $< 1\%$, indicando que o filtro não era obstruído e os volumes aspirados eram constantes.

Para validação do procedimento proposto para o monitoramento dos herbicidas potencialmente lixiviáveis, testes de adição e recuperação foram realizados nas condições de equilíbrio, nas quais as máximas concentrações dos herbicidas extraídos eram alcançadas.

No procedimento manual para os estudos cinéticos preliminares, os extratos do solo eram aspirados a cada 20 min até 1,0 h e, após esse período, a cada hora até 6 h para as três réplicas dos solos arenoso e argiloso. Um único filtro era utilizado em cada teste cinético e substituído para cada réplica, de forma a que não houvesse contaminação cruzada. Em todos os intervalos, as concentrações de ametrina e atrazina nos extratos eram as mesmas e nenhuma variação devida à cinética de extração foi observada. Dessa forma, menores intervalos de tempo (1, 3, 5, 10, 30 e 60 min) foram selecionados para os ensaios de bioacessibilidade em ambos os solos. Verificou-se que a máxima concentração dos herbicidas nos extratos era atingida para 10 min.

Para a validação do sistema proposto, o procedimento descrito no item 3.3.3.2.2 foi utilizado. O primeiro extrato era aspirado pelo filtro após 1,5 min de agitação e os extratos seguintes eram aspirados a cada 10 min desde o início do ensaio de bioacessibilidade, o que significa que a aspiração de amostra seguinte era feita concomitantemente com a separação da amostra anterior. O tempo utilizado na etapa da pré-concentração de 1,0 mL do extrato contendo os herbicidas era de 1 min, e o tempo decorrido entre a aspiração do metanol para a bobina coletora e a eluição dos herbicidas da mini-coluna era de 40 s.

Relativamente às cinéticas de extração dos solos arenoso e argiloso (Figura 24), máxima concentração das triazinas desorvidas em solução de $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ já era obtida nos primeiros 10 min para ambos os solos. As porcentagens extraídas em relação à concentração fortificada inicial de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$, para a ametrina foram de 1,4% para ambos os solos, enquanto que, para atrazina eram de 1,0% para o solo argiloso e 1,2% para o arenoso,

respectivamente, após 4 semanas de fortificação. Estes resultados indicam que as triazinas são potencialmente lixiviáveis e se movem para o solo em solução após a aplicação de pesticidas em um curto intervalo de tempo.

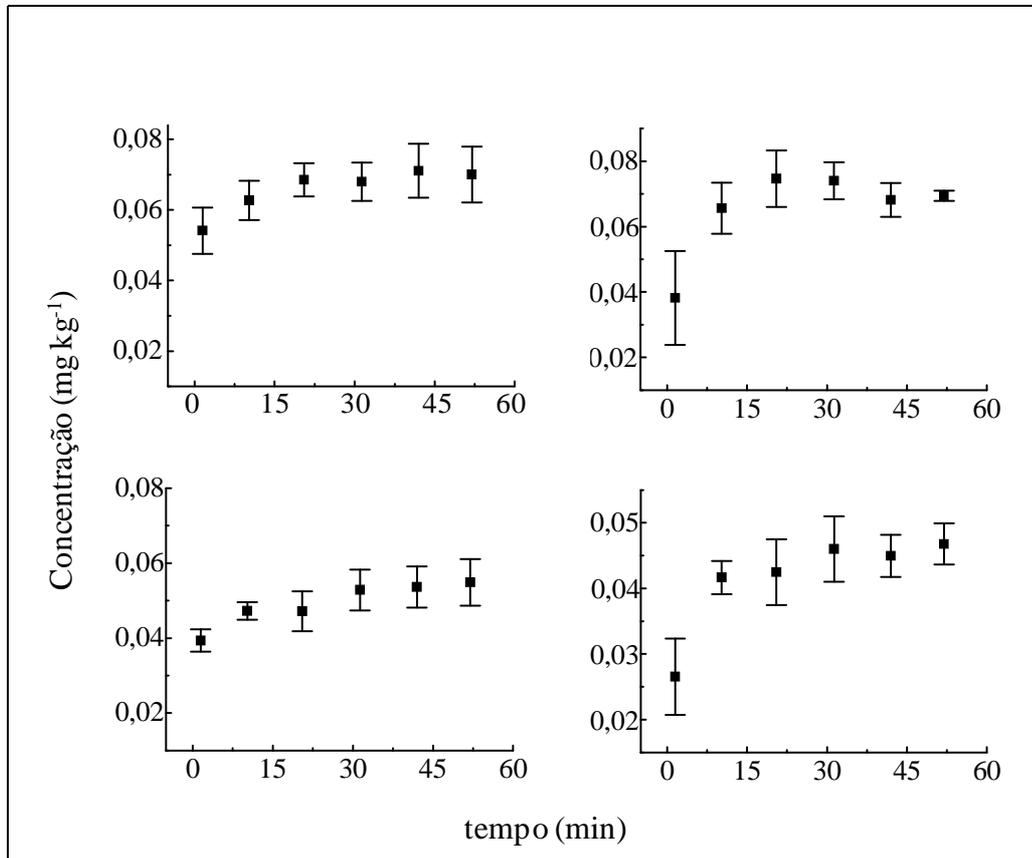


Figura 24 - Cinética de extração de ametryn (acima) e atrazina (abaixo) em solo arenoso (esquerda) e em solo argiloso (direita)

Após 50 min de agitação, a concentração extraída da ametryn era de $0,070 \pm 0,005$ mg kg⁻¹ em solo argiloso e $0,070 \pm 0,010$ mg kg⁻¹ em solo arenoso, e para a atrazina, a concentração extraída era de $0,050 \pm 0,003$ mg kg⁻¹ em solo argiloso e $0,060 \pm 0,010$ mg kg⁻¹ em solo arenoso. Neste tempo de agitação, as condições de equilíbrio eram atingidas, o procedimento analítico proposto foi validado com a adição e recuperação diretamente nas amostras de solo sob agitação.

Dentre as propriedades do solo (textura, teor de argila, matéria orgânica e permeabilidade), o teor de carbono orgânico é o fator que mais influencia a adsorção e mobilidade dos herbicidas no solo (FENOLL et al., 2014). Dessa forma, solos com baixo teor de carbono orgânico apresentam baixa capacidade para retardar a mobilidade de herbicidas,

sugerindo, então, que esses compostos são mais facilmente lixiviáveis (MUDHOO; GARG, 2011).

4.3.3.3 Características analíticas

No procedimento analítico proposto, foram observadas perdas parciais das triazinas pré-concentradas devido ao efeito “heart cut”. Esses aspectos foram confirmados calculando-se os fatores de enriquecimento (10,2 e 18,8 para ametrina e atrazina, V. Tabela 7). A perda de massa da ametrina foi maior em relação à atrazina, devido ao “cleanup” do sorbente com $0,01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ antes da etapa de eluição desse herbicida da minicoluna. Essa perda provavelmente se explica devido à maior solubilidade da ametrina em água (1850 mg L^{-1}) (EPA, 2005) em comparação à atrazina (33 mg L^{-1}) (EPA, 2006).

Para separação e quantificação das triazinas em LC, estratégias de pré-concentração ou injeção de maiores volumes das amostras (Tabela 6) têm sido utilizadas para melhoria de sensibilidade, obtendo-se, portanto, menores limites de detecção. Entretanto, a eficiência da etapa de pré-concentração em linha foi em parte perdida devido ao “heart-cut”, obtendo-se limites de detecção de $0,016$ e $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ para ametrina e atrazina, respectivamente (Tabela 7). Oliferova e colaboradores (2005) relataram o uso de SPE em linha e posterior “heart cut” para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e obtiveram limites de detecção menores, em ng L^{-1} , devido ao maior volume da amostra pré-concentrada (20 mL).

No presente trabalho, a pré-concentração de 1,0 mL da amostra era suficiente para se detectar as concentrações bioacessíveis/lixiviáveis dos herbicidas, após 4 semanas desde a fortificação dos solos na concentração de $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$. É importante destacar que o objetivo principal dessa proposta é o monitoramento em tempo real dos ensaios de bioacessibilidade das triazinas, considerando a cinética de dessorção desses compostos. As etapas de aspiração dos extratos pelo filtro, pré-concentração e separação dos herbicidas na coluna cromatográfica eram realizadas em curto intervalo de tempo, o que tornou possível a determinação das triazinas dessorvidas a cada 10 min. Dessa forma, foi possível determinar as concentrações máximas dessorvidas da ametrina e atrazina para os ensaios de adição e recuperação para validar o procedimento proposto.

Tabela 7 - Características analíticas

Herbicida	Ametrina	Atrazina
Tempo de retenção (min)	3,8	4,8
Equação da curva de calibração ^a	$Y = 0,016 + 2,53 X$	$Y = 0,009 + 5,30 X$
Coefficiente de correlação (n = 7)	0,9971	0,9993
Faixa linear (mg L ⁻¹)	0,01 – 0,30	0,01 – 0,30
Fator de enriquecimento	10,2	18,8
Desvio padrão relativo ^b	6,3	5,1
Limite de detecção ^c (mg L ⁻¹)	0,016	0,015
Limite de quantificação ^c (mg L ⁻¹)	0,054	0,050

a) Y: áreas dos picos referentes aos herbicidas divididos pela área do pico referente a 0,25 mg L⁻¹ do padrão interno; X = concentração do herbicida.

b) Estimado após 10 injeções consecutivas das soluções-padrão (0,05 mg L⁻¹ herbicidas)

c) Calculados de acordo com: $LD = 3,3 S_b / m$ and $LQ = 10 S_b / m$, respectivamente, onde: S_b = desvios-padrão de 10 medidas das áreas dos brancos; m = coeficiente angular das curvas de calibração (SKOOG et al., 2006).

4.3.3.4 Aplicação

A identificação das triazinas após a extração dos solos era feita considerando-se os tempos de retenção e os espectros com os dos padrões. Os cromatogramas dos extratos dos dois tipos de solos eram similares e não indicaram a presença de outros compostos (Figura 27).

A investigação prévia de possíveis espécies interferentes apresentando os mesmos tempos de retenção das triazinas foi conduzida empregando-se o procedimento analítico proposto. A análise dos brancos dos dois tipos de solos revelou a presença de possíveis interferentes com o mesmo tempo de retenção da ametrina, visto que os solos não apresentam histórico de aplicação desses herbicidas. Dessa forma, os resultados anteriormente apresentados das concentrações extraídas de ametrina em ambos os solos foram corrigidos considerando essa interferência, de forma que as áreas dos picos da ametrina e do interferente obtidas dos solos contaminados foram subtraídas das áreas dos picos do interferente dos brancos de ambos os solos.

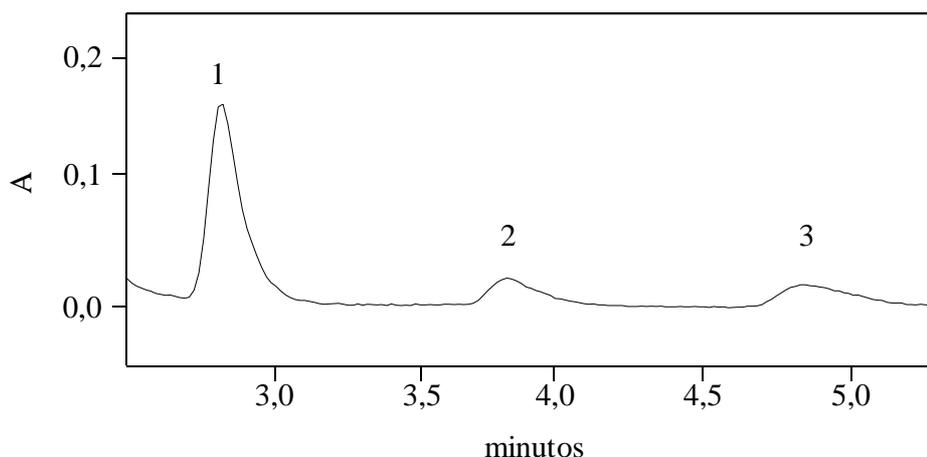


Figura 25 - Cromatograma referente ao extrato de solo argiloso. 1 = prometon (padrão interno), 2 = ametrina, 3 = atrazina. Volume injetado = 300 μ L.

Os ensaios de adição e recuperação foram realizados após 50 min de extração, nas condições de equilíbrio, com as adições de 0,1, 0,2 e 0,3 mg kg^{-1} das soluções-padrão da ametrina e da atrazina preparadas em 0,01 mol L^{-1} CaCl_2 diretamente no recipiente contendo o solo sob agitação. Esses experimentos foram realizados em duplicata para cada solo (Tabela 8). As recuperações da ametrina se situaram na faixa de 85 a 96%, ao passo que da atrazina era de 87 - 99%, em ambos os solos. Estes resultados indicam ausência do efeito de matriz e confirmam que o procedimento proposto é aplicável à determinação de resíduos destes herbicidas potencialmente lixiviáveis nas amostras de diferentes solos agrícolas.

Tabela 8 - Adição e recuperação das triazinas em extratos de solos

Solo	Herbicida	Valor inicial (mg kg^{-1})	Adição (mg kg^{-1})			Média (%)
			0,1	0,2	0,3	
Arenoso 1	Ametrina	0,07	0,166	0,218	0,287	85,3 \pm 10,9
Arenoso 2	Ametrina	0,06	0,135	0,243	0,341	90,9 \pm 5,7
Arenoso 1	Atrazina	0,06	0,155	0,219	0,292	87,4 \pm 8,2
Arenoso 2	Atrazina	0,05	0,168	0,236	0,32	99,2 \pm 11,0
Argiloso 1	Ametrina	0,065	0,155	0,247	0,315	91,1 \pm 4,2
Argiloso 2	Ametrina	0,07	0,168	0,255	0,353	96,1 \pm 2,2
Argiloso 1	Atrazina	0,05	0,128	0,233	0,296	87,7 \pm 4,6
Argiloso 2	Atrazina	0,046	0,135	0,214	0,334	92,2 \pm 4,7

5. CONCLUSÕES

A proposta de um procedimento analítico com aprisionamento da zona da amostra mostra-se favorável para reações lentas, obtendo-se baixos limites de detecção, devido ao maior tempo de residência proporcionado, sem a necessidade de se alterarem vazões ou comprimento do percurso analítico. A principal vantagem conferida por essa estratégia é que tanto o desenvolvimento da reação quanto a limpeza do percurso analítico ocorrem simultaneamente e de forma independente, devido à compartimentalização intrínseca dessa configuração.

A estratégia proposta envolvendo aquecimento na cubeta de fluxo em sistemas de análises em fluxo é promissora, principalmente quando a sensibilidade é crítica e o método envolve reações que são aceleradas com o aumento da temperatura. Bolhas gasosas não são geradas no sistema, pois o aprisionamento da zona da amostra ocorre em ambiente fechado, aumentando a pressão interna do mesmo. A implementação dessa inovação resulta em um módulo de análises mais simples e permite que ele seja aplicado a qualquer procedimento analítico em fluxo que exija aquecimento.

O monitoramento rápido dos herbicidas ametrina e atrazina bioacessíveis/lixiviáveis em amostras de solo é eficientemente realizado em sistema de análises em fluxo envolvendo SPE - LC em linha, levando-se em consideração a cinética de extração desses compostos. As características inerentes ao sistema de análises por injeção sequencial permitiram o gerenciamento automatizado das soluções sem contaminação e/ou exposição do operador. A separação das triazinas com eluição isocrática em coluna monolítica é rápida, e este aspecto se constitui em uma característica favorável adicional para a determinação dos herbicidas potencialmente lixiviáveis em solos.

REFERÊNCIAS

- ABATE, G.; MASINI, J. C. Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 936-943, 2005.
- ABATE, G.; PENTEADO, J. C.; CUZZI, J. D.; VITTI, G. C.; LICHTIG, J.; MASINI, J. C. Influence of humic acid on adsorption and desorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto a clay-rich soil sample. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 52, n. 22, p. 6747–6754, 2004.
- ABOUIHAT, F. Z.; HENRÍQUEZ, C.; PALACIO, E.; YOUSFI, F.; CERDÀ, V. Automatic integrated system for catalytic spectrophotometric determination of vanadium in water samples. **Analytical Methods**, London, v. 6, p. 9142–9151, 2014.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **Bond Elut Plexa and Polymeric SPE Selection Guide**. Santa Clara, CA, 2011. Disponível em: http://www.grupobiomaster.com/documentos/59908589en-bond-elut-plexa-y-spe-polimerico_1367610811.pdf. Acesso em: 04 ago. 2015.
- AMADORI, M. F.; CORDEIRO, G. A.; REBOUÇAS, C. C.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T.; ABATE, G. Extraction method for the determination of atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in agricultural soil using factorial design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 483-491, 2013.
- ANDAC, M.; ASAN, A.; ISILDAK, I.; CESUR, H. Flow-injection spectrophotometric determination of cobalt(II) at low $\mu\text{g I}^{-1}$ levels with 4-benzylpiperidinedithiocarbamate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 434, n. 1, p. 143–147, 2001.
- ANTHEMIDIS, A. N.; THEMELIS, D. G.; STRATIS, J. A. Stopped-flow injection liquid–liquid extraction spectrophotometric determination of palladium in airborne particulate matter and automobile catalysts. **Talanta**, London, v. 54, n. 1, p. 37–43, 2001.
- BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. **Residue reviews**. The triazine herbicides. Heidelberg: Springer Science & Business Media, 1970. 413 p.
- BEALE, D. J.; KASERZON, S. L.; PORTER, N. A.; RODDICK, F. A.; CARPENTER, P. D. Detection of s-triazine pesticides in natural waters by modified large-volume direct injection HPLC. **Talanta**, London, v. 82, n. 2, p. 668–674, 2010.
- BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; GONZÁLEZ-CASTRO, M. J.; POUISO-BLANCO, R.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. A simple method for simultaneous determination of nine triazines in drinking water. **Green Chemistry Letters and Reviews**, London, v. 7, n. 3, p. 271–277, 2014.

BENKHEDDA, K.; INFANTE, H. G.; IVANOVA, E.; ADAMS, F. Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of cobalt in biological samples and natural waters using a flow injection system with on-line preconcentration by ion-pair adsorption in a knotted reactor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 368, n. 2-3, p. 288–292, 2000.

BERGAMIN-FILHO, H.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. A new device for improving sensitivity and stabilization in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 427-431, 1978.

BONTCHEV, P. R. Catalytic reactions. Part II: Activation. **Talanta**, London, v. 19, n. 5, p. 675-685, 1972.

BOONJOB, W.; YU, Y.; MIRÓ, M.; SEGUNDO, M. A.; WANG, J.; CERDÀ, V. Online hyphenation of multimodal microsolid phase extraction involving renewable molecularly imprinted and reversed-phase sorbents to liquid chromatography for automatic multiresidue assays. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 7, p. 3052–3060, 2010.

BUANUAM, J.; MIRÓ, M.; HANSEN, E. H.; SHIOWATANA, J. On-line dynamic fractionation and automatic determination of inorganic phosphorus in environmental solid substrates exploiting sequential injection microcolumn extraction and flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, n. 2, p. 224–231, 2006.

CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; HERRERO-HERNANDEZ, E.; ROMAN, F. J. S.; FLORES, M. G. P. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 950, p. 157–166, 2002.

CASTAÑÓN-FERNÁNDEZ, J.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; COSTA-GARCIA, A. Kinetic determination of acid phosphatase activity by double injection flow analysis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 413, n. 1-2, p. 103–108, 2000.

CHAPARRO, L.; FERRER, L.; LEAL, L.; CERDÀ, V. A multisyringe flow-based system for kinetic–catalytic determination of cobalt(II). **Talanta**, London, v. 133, p. 94–99, 2015.

CHÁVEZ-MORENO, C. A.; GUZMÁN-MAR, J. L.; HINOJOSA-REYES, L.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; FERRER, L.; CERDÀ, V. Applicability of multisyringe chromatography coupled to on-line solid-phase extraction to the simultaneous determination of dicamba, 2,4-D, and atrazine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 403, n. 9, p. 2705–2714, 2012.

CHOMCHOEI, R.; MIRÓ, M.; HANSEN, E. H.; SHIOWATANA, J. Sequential injection system incorporating a micro-extraction column for automatic fractionation of metal ions in solid samples. Comparison of the extraction profiles when employing uni-, bi-, and multi-directional flow plus stopped-flow sequential extraction modes. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 536, n. 1-2, p. 183–190, 2005.

CLAVIJO, S.; AVIVAR, J.; SUÁREZ, R.; CERDÀ, V. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques. Analytical strategies for coupling separation and flow-injection Techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 67, p. 26–33, 2015.

COCOVI-SOLBERG, D. J.; MIRÓ, M. CocoSoft: educational software for automation in the analytical chemistry laboratory. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 407, p. 6227-6233, 2015.

COMBER, S. D. W. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. **Pest Management Science**, Sussex, v. 55, n. 7, p. 696-702, 1999.

DEGUCHI, T.; HIGASHI, A.; SANEMASA, I. Flow injection analysis of cobalt(II) by catalytic oxidations of stilbazo and pyrocatechol violet. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 295-300, 1986.

DIETRICH, H. **Standard operating procedure**: Procedure for determining soil particle size using the hydrometer method. Sacramento, CA: Environmental Monitoring Branch, California Department of Pesticide Regulation, 2005. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/sops/meth004.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2015.

EPA. **Registration Eligibility Decision (RED) for Ametryn**. Washington, DC, 2005. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/ametryn_red.pdf. Acesso em: 04 ago. 2015.

EPA. **Decision Documents for Atrazine**. Washington, DC, 2006. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/atrazine_combined_docs.pdf. Acesso em: 04 ago. 2015.

ERNL, F.; KELLER, H. P.; MORIN, C.; SCHMITT, M. Application of column switching in high-performance liquid chromatography to on-line sample preparation for complex separations. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 204, p. 65-76, 1981.

FEDOTOV, P. S.; KÖRDEL, W.; MIRÓ, M.; PEIJNENBURG, W. J. G. M. ; R. WENNRICH; HUANG, P. Extraction and fractionation methods for exposure assessment of trace metals, metalloids, and hazardous organic compounds in terrestrial environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 42, n. 11, p.1117–1171, 2012.

FENOLL, J.; VELA, N.; NAVARRO, G.; PÉREZ-LUCAS, G.; NAVARRO, S. Assessment of agro-industrial and composted organic wastes for reducing the potential leaching of triazine herbicide residues through the soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 493, p. 124–132, 2014.

FERNANDES, R. N.; REIS, B. F. Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water. **Talanta**, London, v. 58, n. 4, p. 729-737, 2002.

FRANK, C.; SCHROEDER, F.; EBINGHAUS, R.; RUCK, W. A fast sequential injection analysis system for the simultaneous determination of ammonia and phosphate. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 154, n. 1-2, p. 31–38, 2006.

FUJIMOTO, T.; TESHIMA, N.; KURIHARA, M.; NAKANO, S.; KAWASHIMA, T. Catalytic determination of cobalt at sub-nanogram levels using the oxidative coupling of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone with N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline by manual and flow-injection methods. **Talanta**, London, v. 49, n. 5, p. 1091–1098, 1999.

GAO, J.; ZHANG, X.; YANG, W.; KANG, J. Highly sensitive spectrofluorimetric kinetic determination of ultratrace amounts of vanadium(V) based on the oxidation of 1,8-diaminonaphthalene by bromate. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 159–165, 2002.

HALEVAS, E.; TSAVE, O.; YAVROPOULOU, M.P.; HATZIDIMITRIOU, A.; YOVOS, J.G.; PSYCHARIS, V.; GABRIEL, C.; SALIFOGLOU, A. Design, synthesis and characterization of novel binary V(V)-Schiff base materials linked with insulin-mimetic vanadium-induced differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes. Structure–function correlations at the molecular level. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 147, p. 99–115, 2015.

HENRIQUEZ, C.; HORSTKOTTE, B.; CERDA, V. Conductometric determination of ammonium by a multisyringe flow injection system applying gas diffusion. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 93, n. 12, p. 1236–1252, 2013.

HIRAI, Y.; YOZA, N.; OHASHI, S. Flow injection analysis of inorganic polyphosphates. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 115, p. 269–277, 1980.

HIRATA, S.; HASHIMOTO, Y.; AIHARA, M.; MALLIKA, G. V. On-line column preconcentration for the determination of cobalt in sea water by flow-injection chemiluminescence detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 355, n. 5-6, p. 676–679, 1996.

HOEVEN, R. A. M.; HOFTE, A. J. P.; FRENAY, M.; IRTH, H.; TJADEN, U. R.; GREEF, J.; RUDOLPHI, A.; BOOS, K. S.; VARGA, G. M.; EDHOLM, L. E. Liquid chromatography-mass spectrometry with on-line solid-phase extraction by a restricted-access C₁₈ precolumn for direct plasma and urine injection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 762, n. 1-2, p. 193–200, 1997.

HURLEY, P. M.; HILL, R. N.; WHITING, R. J. Mode of carcinogenic action of pesticides including thyroid follicular cell tumors in rodents. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 106, p. 437–445, 1998.

HYÖTYLÄINEN, T. Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1153, n. 1-2, p. 14–28, 2007.

IKEGAMI, T.; TANAKA, N. Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 8, p. 527–533, 2004.

INFANTE, C. M. C.; URIO, R. P.; MASINI, J. C. Improving the detectability of sequential injection chromatography (SIC): determination of triazines by exploiting liquid core waveguide (LCW) detection. **Analytical Letters**, New York, v. 44, p. 503–513, 2011.

ISO. **ISO 10390:2005**: Soil quality - Determination of pH. Geneva, 2015. Disponível em: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=40879. Acessado em: 04 ago. 2015.

ISSHIKI, K.; NAKAYAMA, E. Determination of ultratrace amounts of cobalt by catalysis of the tiron-hydrogen peroxide reaction with an improved continuous-flow analysis system. **Talanta**, London, v. 34, n. 2, p. 277-281, 1987.

JABLONOWSKI, N. D.; MODLER, J.; SCHAEFFER, A.; BURAUDEL, P. Bioaccessibility of environmentally aged ¹⁴C-atrazine residues in an agriculturally used soil and its particle-size aggregates. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 42, n. 16, p. 5904–5910, 2008.

KARADAŞ, C.; KARA, D. On-line preconcentration and determination of trace elements in waters and reference cereal materials by flow injection – FAAS using newly synthesized 8-hydroxy-2-quinoline carboxaldehyde functionalized Amberlite XAD-4. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 32, n. 2-3, p. 90–98, 2013.

KAWASHIMA, T.; NAKANO, S. Flow-injection analysis of trace elements by use of catalytic reactions. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 261, n. 1-2, p. 167-182, 1992.

KEITH, L. H. **Compilation of EPA's sampling and analysis methods**. 2. ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1996. 1696 p.

KEYVANFARD, M.; ABEDI, N. Flow-injection spectrophotometric determination of vanadium with malachite green oxalate by bromate in acidic and micellar medium. **Rare Metals**, Heidelberg, v. 30, n. 3, p. 216-221, 2011.

KITTA, T.; YAMADA, S.; ASAKAWA, T.; ISHIHARA, K.; WATANABE, N.; ISHIYAMA, H.; WATANABE, Y.; YAKURI, O. Effects of natural vanadium contained mt. fuji underground water on human hyperglycemia. **Pharmacometrics**, Tokyo, v. 64, n. 5-6, p. 77-84, 2003.

KOLEV, S. D.; McKELVIE, I. D. **Comprehensive analytical chemistry**. Advances in flow injection analysis and related techniques. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. 777 p.

KONDO, O.; MIYATA, H.; TOEI, K. Determination of sulfate in river water by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 134 p. 353-358, 1982.

KOZYRAKI, R.; CASES, O. Vitamin B₁₂ absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. **Biochimie**, Paris, v. 95, n. 5, p. 1002-1007, 2013.

KRUG, F. J.; BERGAMIN-FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; JOERGENSEN, S. S. Rapid determination of sulphate in natural waters and plant digests by continuous flow injection turbidimetry. **The Analyst**, London, v. 102, p. 503–508, 1977.

KRUG, F. J.; REIS, B. F.; GINE, M. F.; FERREIRA, J. R.; JACINTHO, A. O.; ZAGATTO, E. A. G. Zone trapping in flow injection analysis. Spectrophotometric determination of low levels of ammonium ion in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 151, p. 39-48, 1983.

KRUG, F. J.; BERGAMIN-FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G. Commutation in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 179, p. 103-118, 1986.

LIN, Q.; GUIRATIM, A.; EKOBAR, R.; ROSA, F. F. Flow-injection chemiluminescence determination of cobalt(II) and manganese(II). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 283, p. 379-385, 1993.

LOK, K. S.; MUTTALIB, S. Z. A.; LEE, P. P. F.; KWOK, Y. C.; NGUYEN, N. T. Rapid determination of vitamin B₁₂ concentration with a chemiluminescence lab on a chip. **Lab on a Chip**, London, v. 12, p. 2353–2361, 2012.

MALAHOFF, A.; KOLOTYRKINA, I. Y.; SHPIGUN, L. K. Shipboard determination of dissolved cobalt in sea-water using flow injection with catalytic spectrophotometric detection. **The Analyst**, London, v. 121, p. 1037-1041, 1996.

MERSIE, W.; SEYBOLD, C. Adsorption and desorption of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine, and hydroxyatrazine on levy wetland soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 44, n. 7, p. 1925-1929, 1996.

MUDHOO, A.; GARG, V. K. Sorption, transport and transformation of atrazine in soils, minerals and composts: A review. **Pedosphere**, Beijing, v. 21, n.1, p. 11–25, 2011.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; BATISTA, L. A. R.; ARRUDA, M. A. Z.; MIYAZAWA, M. Catalytic determination of cobalt by flow injection spectrophotometry: application in animal faeces analysis using hydrochloric acid as extracting solution. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 74, n.1, p. 79-84, 1998.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**. Test 106: Adsorption - Desorption using a Batch Equilibrium Method. Paris, 2000. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9710601e.pdf?expires=1443193911&id=id&accname=guest&checksum=C861FB474705360B246B8C9D0A9A08E2>. Acesso em: 04 ago. 2015.

OLIFEROVA, L.; STATKUS, M.; TSYSSIN, G.; SHPIGUN, O.; ZOLOTOV, Y. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 538, n.1-2, p. 35-40, 2005.

OTTO, M.; WERNER, G. Mechanistic studies for modelling the metal ion-catalyzed tiron-hydrogen peroxide indicator reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 147, p. 255, 1983.

PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W. A. Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia and phosphorus. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 57, n. 13, p. 2575-2579, 1985.

PLAVNIKA, I.; SKLAN, D. Nutritional effects of expansion and short time extrusion on feeds for broilers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3-4, p. 247-271, 1996.

PFEIFFER, H. F.; WALDHOFF, H.; WORSFOLD, P. J.; WHITESIDE, I. R. C. Automated flow-injection procedures for the determination of hydrolytic enzymes in bioreactor preparations. **Chromatographia**, New York, v. 33, n. 1-2, p. 49-52, 1992.

PYRZYŃSKA, K. Recent developments in spectrophotometric methods for determination of vanadium. **Microchimica Acta**, Heidelberg, v. 149, n. 3-4, p. 159-164, 2005.

REHMAN, A.; YAQOOB, M.; WASEEM, A.; NABI, A. Determination of subnanomolar concentrations of vanadium in environmental water samples using flow injection with luminol chemiluminescence detection. **Luminescence**, Chichester, v. 26, p. 403-409, 2011.

REIS, B. F. Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 51-58, 1996.

REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN-FILHO, H.; PESSEDA, L. C. R. Zone sampling processes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 123, p. 221-228, 1981.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 293, n. 1-2, p. 129-138, 1994.

ROSENDE, M.; MIRO, M. Recent trends in automatic dynamic leaching tests for assessing bioaccessible forms of trace elements in solid substrates. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 45, p. 67-78, 2013.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analyses, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 78, p. 145-157, 1975.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Stopped flow and merging zones. A new approach to enzymatic assays by flow injection analysis, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 207-224, 1979.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. **Flow injection analysis**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 497 p.

RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 329-343, 1990.

SAFAVI, A.; NEZHAD, M. R. H.; SHAMS, E. Highly selective and sensitive kinetic spectrophotometric determination of vanadium(IV) in the presence of vanadium(V). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 409, n. 1-2, p. 283-289, 2000.

SASAKI, M. K.; VICENTE, S.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Differential reaction-rate methods in flow analysis. **The Open Analytical Chemistry Journal**, Beijing, v. 6, p. 28-38, 2012.

SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S. Flow-injection and stopped-flow completely continuous flow spectrophotometric determinations of aniline and cyclohexylamine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 396, n. 2-3, p. 151–159, 1999.

SCHUMACHER, B. A. **Methods for the determination of total organic carbon (toc) in soils and sediments**. Washington, DC: Ecological Risk Assessment Support Center, Office of Research and Development, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf>. Acessado em 14 ago. 2015.

SHIOBARA, T.; TESHIMA, N.; KURIHARA, M.; NAKANO, S.; KAWASHIMA, T. Catalytic flow injection determination of vanadium by oxidation of N-(3-sulfopropyl)-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine using bromate. **Talanta**, London, v. 49, n. 5, p. 1083–1089, 1999.

SANTOS, L. B. O.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of a sequential injection chromatography (SIC) method for determination of simazine, atrazine, and propazine. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 32, n. 4, p. 494-500, 2009.

SCHMIDT, T. D.; SALTON, J. C.; SCORZA-JUNIOR, R. P. Sorção e dessorção de tiametoxam e atrazina em solo sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 19, n. 6, p. 613–618, 2015.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SILVA, C. R.; GOMES, T. F.; ANDRADE, G. C. R. M.; MONTEIRO, S. H.; DIAS, A. C. R.; ZAGATTO, E. A. G.; TORNIZIELLO, V. L. Banana peel as an adsorbent for removing atrazine and ametryne from waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 61, n. 10, p. 2358-2363, 2013.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006. 999 p.

TANDON, S.; SINGH, A. Field dissipation kinetics of atrazine in soil and post-harvest residues in winter maize crop under subtropical conditions. **Chemistry and Ecology**, Abingdon, v. 31, n. 3, p. 273–284, 2015.

TESHIMA, N.; OHNO, S.; SAKAI, T. Stopped-in-loop flow analysis of trace vanadium in water. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 23, n. 1, p.1-2, 2007.

TESHIMA, N.; KUNO, M.; UEDA, M.; UEDA, H.; OHNO, S.; SAKAI, T. Automated stopped-in-dual-loop flow analysis system for catalytic determination of vanadium in drinking water. **Talanta**, London, v. 79, n. 2, p. 517–522, 2009.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

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–fr) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

TRUJILLO, I. S.; ALONSO, E. V.; TORRES, A. G.; PAVÓN, J. M. C. Development of a solid phase extraction method for the multielement determination of trace metals in natural waters including sea-water by FI-ICP-MS. **Microchemical Journal**, New York, v. 101, n. 1, p. 87–94, 2012.

TUMANG, C. A.; LUCA, G. C.; FERNANDES, R. N.; REIS, B. F.; KRUG, F. J. Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 374, n. 1, p. 53–59, 1998.

UNGER, K. K.; SKUDAS, R.; SCHULTE, M. M. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1184, n. 1–2, p. 393–415, 2008.

URIO, R. P.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Online sequential-injection chromatography with stepwise gradient elution: a tool for studying the simultaneous adsorption of herbicides on soil and soil components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 61, p. 7909–7915, 2013.

URIO, R. P.; MASINI, J. C. Evaluation of sequential injection chromatography for reversed phase separation of triazine herbicides exploiting monolithic and core–shell columns. **Talanta**, London, v. 13, p. 528–534, 2015.

VICENTE, S.; BORGES, E. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Exploitation of tandem streams for carry-over compensation in flow analysis: I. Turbidimetric determination of potassium in fertilizers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 438, n. 1–2, p. 3–9, 2001.

VIDA, A. C. F.; SASAKI, M. K.; GOMES, T. F.; SILVA, C. R.; FERES, M. A.; ZAGATTO, E. A. G. Zone trapping/merging zones in flow analysis: A novel approach for rapid assays involving relatively slow chemical reactions. **Talanta**, London, v. 85, n. 1, p. 259–263, 2011.

VIDA, A. C. F.; ZAGATTO, E. A. G. Exploiting zone trapping to avoid liberation of air bubbles in flow-based analytical procedures requiring heating. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 30, n. 8, p. 833 - 838, 2014.

VILLAVERDE, J.; RUBIO-BELLIDO, M.; BAQUERO, R. P.; MADRID, F.; MORILLO, E. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based extraction for diuron bioaccessibility in an artificially contaminated soil. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, London, v. 93, n. 15, p. 1620–1627, 2013.

VIVIAN, R.; QUEIROZ, M. E. L. R.; JAKELAITIS, A.; GUIMARÃES, A. A.; REIS, M. R.; CARNEIRO, P. M.; SILVA, A. A. Persistência e lixiviação de ametryn e trifloxysulfuron-sodium em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 111-124, 2007.

WACKETT, L. P.; SADOWSKY, M. J.; MARTINEZ, B.; SHAPIR, N. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 1, p. 39–45, 2002.

WASEEM, A.; YAQOUB, M.; NABI, A. Flow-Injection determination of vanadium in seawater samples with acidic potassium permanganate chemiluminescence. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 26, n. 3, p. 355-360, 2010.

WILLSKY, G. R.; CHI, L. H.; GODZALA, M.; KOSTYNIAK, P. J.; SMEE, J. J.; TRUJILLO, A. M.; ALFANO, J. A.; DING, W.; HU, Z.; CRANS, D. C. Anti-diabetic effects of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 255, n. 19-20, p. 2258-2269, 2011.

WORSFOLD, P. J.; CLOUGH, R.; LOHAN, M. C.; MONBET, P.; ELLIS, P. S.; QUÉTEL, C. R.; FLOOR, G. H.; McKELVIE, I. D. Flow injection analysis as a tool for enhancing oceanographic nutrient measurements - A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 803, p. 15–40, 2013.

XU, L. J.; CHU, W.; GRAHAM, N. Atrazine degradation using chemical-free process of USUV: Analysis of the micro-heterogeneous environments and the degradation mechanisms. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 275, p. 166–174, 2014.

YAMANE, T.; WATANABE, K.; MOTTOLA, H. A. Continuous-flow system for the determination of cobalt in sea and river water: in-line preconcentration/separation coupled with catalytic determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 207, n. 1, p. 331-336, 1988.

YAMANE, T.; OSADA, Y.; SUZUKI, M. Continuous flow system for the determination of trace vanadium in natural waters utilizing in-line preconcentration/separation coupled with catalytic photometric detection. **Talanta**, London, v. 45, n. 3, p. 583–589, 1998.

ZAGATTO, E. A. G.; OLIVEIRA, C. C.; TOWNSHEND, A.; WORSFOLD, P. J. **Flow analysis with spectrophotometric and luminometric detection**. 1. ed. Massachusetts: Elsevier, 2012. 471 p.

ZARPON, L.; ABATE, G.; SANTOS, L. B. O.; MASINI, J. C. Montmorillonite as an adsorbent for extraction and concentration of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 579, n. 1, p. 81–87, 2006.