

Nº 38, set/2000, p.1-6

**AVALIAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
(HPLC) DA INTERAÇÃO ATRAZINA-CARBOXIMETILCELULOSE**Adriano Meke Flores¹
Odílio Benedito Garrido de Assis²

A cromatografia é um método de análise química que tem por princípio a separação de componentes de uma mistura com base na diferença de comportamento de partição entre uma fase em estado móvel e uma fase estacionária presente em uma coluna de análise. O princípio de medida se dá pela consideração de que certos componentes em solução na fase móvel apresentam afinidade química e interajam fortemente com a fase estacionária. Estes ficam retidos por um maior período de tempo sendo assim separados dos demais compostos que passam mais rapidamente. Os grupos funcionais polares capazes de formar pontes de hidrogênio terão fortes afinidades pela superfície e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis (por ex., moléculas aromáticas) irão apresentar interação dipolo-induzido com a superfície do adsorvente e, portanto, também serão retidas, sendo que em ambos os casos o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional (Ewing, 1985). Como os componentes eluem da coluna, eles podem ser quantificados por um detector e ou coletor para futuras análises.

A condição de equilíbrio é descrita pela relação entre a distribuição de um soluto, S , entre dois solventes imiscíveis (como as fases aquosas e orgânicas):

$$S_{aq} \quad S_{org}$$

A constante para esta condição de equilíbrio é:

$$K = \frac{S_{org}}{S_{aq}}$$

¹Instituto de Química de São Carlos, IQSC-USP, 13560-970 São Carlos, SP

²Embrapa Instrumentação Agropecuária, C.P. 741, 13560-970 São Carlos, SP

CT/38, CNPDIA, set/2000, p.2

sendo $[S_{org}]$ e $[S_{aq}]$ as concentrações de soluto nas fases orgânica e aquosa, respectivamente, e a constante de equilíbrio, K , é chamada partição ou coeficiente de distribuição.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o mais novo e importante membro de uma família inteira de técnicas de separação. A HPLC utiliza instrumentos com um intervalo maior de resolução por menor tempo e operação totalmente automatizada. O Instrumental de HPLC consiste de reservatórios da fase móvel, uma bomba, um injetor, uma coluna de separação e um detector, conforme diagrama disposto na Figura 1.

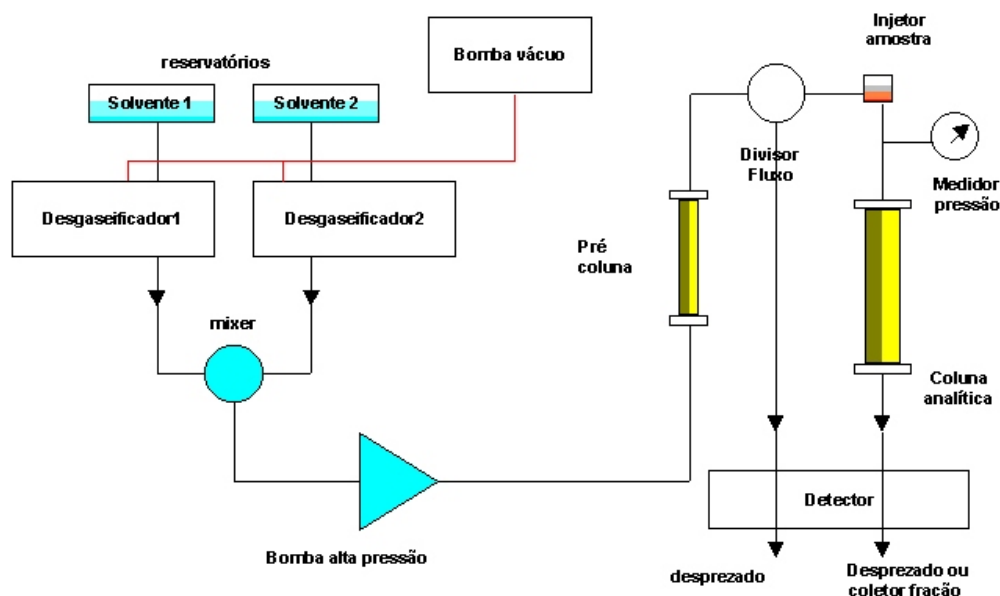


Figura 1 Esquema do sistema de cromatografia líquida de alta-eficiência (HPCL)

A HPCL é assim uma ferramenta útil nas análises de reações que ocorrem em meio aquoso e neste trabalho é empregada para avaliar se o polissacarídeo carboximetilcelulose (CMC) apresenta interação com o herbicida atrazina.

Os polissacarídeos são polímeros naturais, não tóxicos, biodegradáveis e altamente versáteis. A CMC é um produto resultante da modificação química da celulose, que constitui cerca de 50% da estrutura das árvores e encontrada comercialmente na forma de sal de sódio (entre 6,5 a 9,5% de Na em sua estrutura). A CMC tem sido objeto de estudo na Embrapa Instrumentação Agropecuária como um material alternativo para usos em bioremediação (Vieira et al, 1999. Assis, et al, 2000). Os resultados obtidos até o presente têm apresentado indicam um potencial promissor para o emprego desses materiais na remoção de resíduos químicos em meio aquoso (Flores et al., 1999, Flores et al., 2000).

Para acompanhar o processo de sorção do herbicida atrazina (ATZ) pela CMC, foi inicialmente desenvolvido uma metodologia, fazendo uso de técnicas eletroanalíticas para estimar as concentrações interagidas (Flores, 1999). Neste estudo determinou-se que a proporção "ideal", em solução, de CMC e ATZ para que se atinja uma "eficiência satisfatória" no processo é da ordem de 20:1(v/v) em 48 horas de interação (Flores, 2000, Flores et al, 2000).

CT/38, CNPDIA, set/2000, p.3

Com base nesses resultados, empregamos essa relação para acompanhar o processo pela técnica de HPLC. O objetivo central aqui é separar e quantificar as moléculas de atrazinas ligadas das não ligadas com o polissacarídeo CMC.

Para os ensaios utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta resolução da marca Shimadzu, modelo CBM-10A, com sistema de injeção automático e detector UV-Vis. A separação se efetuou em uma coluna C-18 de 200 x 4 mm de diâmetro interno, com tamanho da partícula de 10 μm . A fase móvel constituiu-se de metanol P.A. (*Merck*) e água bidestilada. As amostras do herbicida atrazina (*Ciba Geigy do Brasil*) analisadas neste trabalho, possuíam pureza de 99%. A formulação comercial adquirida no mercado apresentava uma concentração de 500 g L⁻¹ de ingrediente ativo. Soluções estoques de 30 mg L⁻¹ foram preparadas em água deionizada e metanol (concentração menor que 1% v/v). As soluções de CMC (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Campana-Filho do IQSC/USP) a 240 g mol⁻¹ de sítios ativos foram preparadas sob agitação branda pôr 24 horas.

A Figura 1 apresenta o espectro típico de absorção da ATZ em UV-Vis, onde dois picos são observados, em 260nm e 223nm, sendo este último o de máxima absorção. Este espectro é tomado como referência para definição de intervalos de comprimentos de onda para as análises posteriores no HPLC.

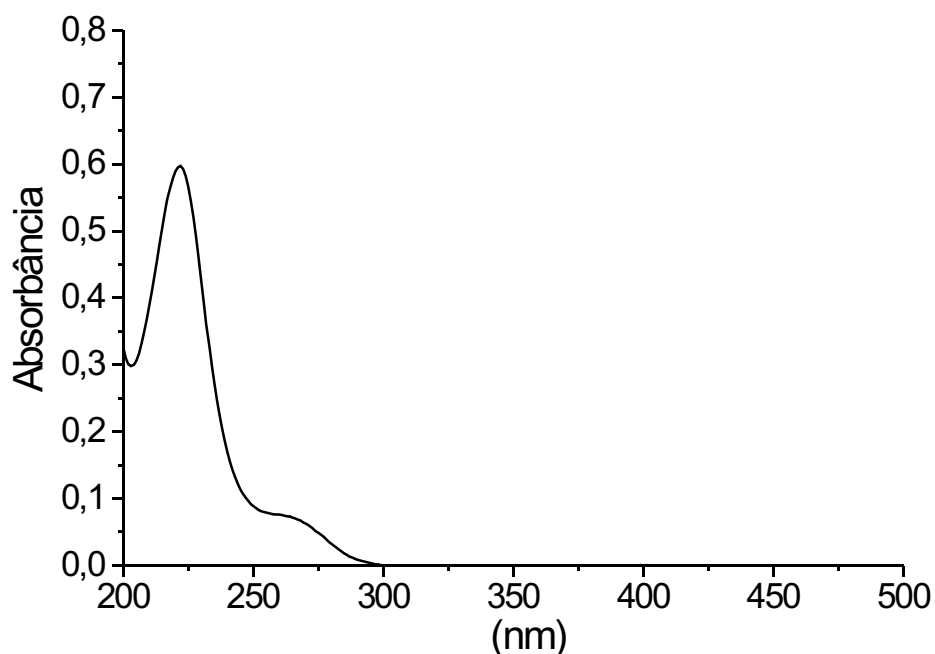


Figura. 2. Espectro de UV-Vis-NIR de ATZ 12ppm.

Para validação do intervalo de ensaio, levantou-se uma curva de calibração do HPLC, para diversas concentrações de ATZ em solução para o comprimento de onda de 223 nm (Figura 3). A resposta é bastante satisfatória, permitindo estabelecer um comportamento de proporcionalidade entre a concentração injetada e a resposta analítica em uma relação linear. Obteve-se uma composição ótima da fase móvel como MeOH:H₂O (70:30), em fluxo de 1 mL/min, proporcionando uma melhor resposta.

CT/38, CNPDIA, set/2000, p.4

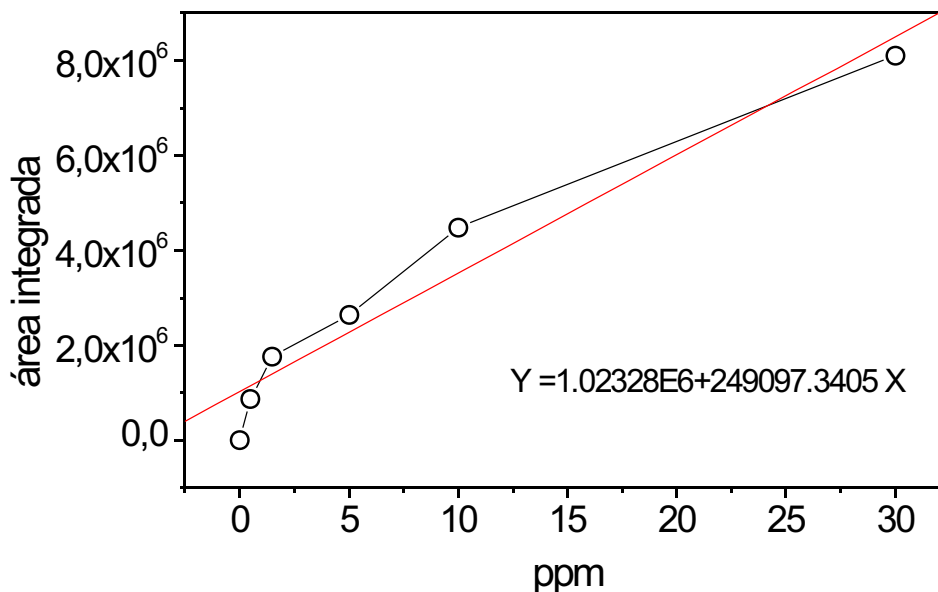


Figura. 3. Curva de Calibração para ATZ, medida em HPLC.

Duas concentrações de ATZ, 12 ppm e 1,5 ppm, foram analisadas para uma relação de interação de 1:20 em CMC, no tempo zero e após 48 horas. A Figura 4 mostra cromatograma correspondente a solução de ATZ 12 ppm (x 20 CMC). Espectro similar foi obtido para a concentração de 1,5 ppm onde as intensidades de picos apresentam-se reduzidas.

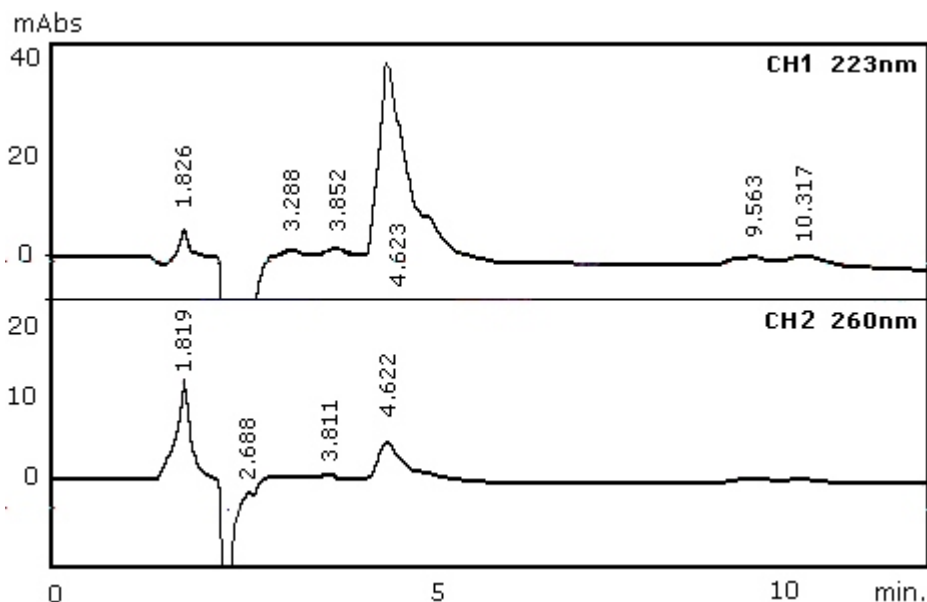


Figura. 4. Cromatograma correspondente a solução de ATZ 12 ppm, amostra inicial.

Pelos cromatogramas nota-se que o pico de maior intensidade aparece para o tempo de aproximadamente 4,6 minutos, o qual corresponde ao sinal da ATZ para o comprimento de onda de 223nm, justamente no intervalo em que a ATZ

CT/38, CNPDIA, set/2000, p.5

absorve com uma maior intensidade no UV-Vis. Os demais picos são inerentes ao padrão do herbicida utilizado, ou seja, de impurezas e demais compostos presentes na solução de ATZ comercial (*Ciba Geigy do Brasil*). Ao analisarmos esse pico, tem-se uma diferença no valor da integração da área em relação à amostra inicial e final. Em 12 ppm temos uma redução de 6,5% e em 1,5 ppm temos 3,1%. Em caráter de testes, em algumas amostras foram medidos tempos de até 40 minutos, porém nenhum outro pico foi encontrado. Deve-se ressaltar que o pico analisado refere-se exclusivamente a absorção da ATZ, sendo assim possível confirmar o estabelecimento de uma interação entre a CMC e a ATZ.

O processo de interação da CMC com demais compostos orgânicos é dependente das concentrações e das características químicas da mistura, como pH, grau de oxidação, protonações estabelecidas ou formação de radicais livres etc. Os polissacarídeos em solução apresentam características polieletrólitas, ou seja assumem cargas específicas que favorecem interações do tipo fraca. Não temos a preocupação neste trabalho em estabelecer mecanismos de interação entre os compostos envolvidos, apenas o de avaliar se a CMC apresenta interações em graus que possa ser explorada tecnologicamente. Contudo, um possível modelo de interação pode ser entendido por meio de ligações de hidrogênio, com base nos resultados de Sinesi & Tessini (1982), conforme esquema representado na Figura 5.

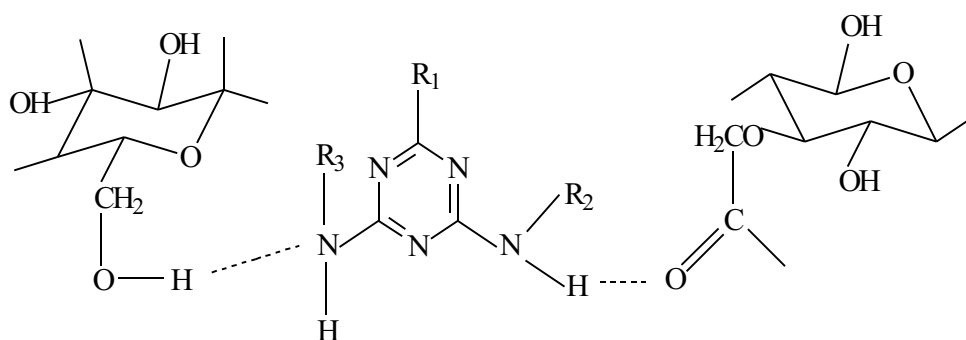


Figura. 5. Modelo de adsorção de *s*-triazinas com CMC por ligações de hidrogênio.

Os resultados obtidos por procedimentos analíticos como a HPLC indicam reações dessa natureza. É importante notar que os resultados obtidos mostram que a interação CMC-ATZ não segue uma proporcionalidade com respeito à concentração de ATZ adicionada em solução. Este efeito deve-se ao grau de liberdade das moléculas, uma vez que a proporção de CMC foi mantida, menos sítios ativos ficam disponíveis para interações com o aumento da proporção de ATZ. Estudos posteriores podem confirmar tais especulações.

O resultado gerado por cromatografia embora sendo preliminar tem sido, contudo, confirmado através da medida de espectro em UV-Vis-NIR (faixa de 200 a 800 nm) para a mesma amostra, na qual temos uma redução proporcional a 6,86% de herbicida após sua interação com CMC. Embora numericamente os resultados sejam pequenos, são promissores, pois a celulose é um material natural e abundante. Seu uso como meio de remediação não tem sido explorado nem devidamente avaliado, os quais são os objetivos de estudos em andamento na Embrapa Instrumentação Agropecuária.

CT/38, CNPDIA, set/2000, p.6

REFERENCIAS

- ASSIS O.B.G., FLORES A.M., CAMPANA FILHO, S.P. Liquid-Chromatography Evaluation of Atrazine Removal by CMC, in VI CONGRESSO IBEROAMERICANO DE POLIMEROS, SLAP 2000, Havana, Cuba, Nov. 2000, Paper ref.: 7C8, **Abstract Book**, pg.286
- ALVES, C.R., VIEIRA, D.C.; ASSIS, O.B.G. Estudo por Polarografia da Interação Quitosana-Atrazina. **PESQUISA EM ANDAMENTO** no.22, jun/98 (Publicação interna Embrapa PA), 5p., 1998
- EWING, G.G Liquid Chromatography in **Instrumental Methods of Chemical Analysis**. Chapter 11 McGraw-Hill International Edition, 5th edition, Singapore 1984, p.375
- VIEIRA, D.C., CAMPANA-FILHO, S.P ALVES, C. R., ASSIS, O.B.G. Potential of Biopolymer Application as Purifying Agent in Wastewater Treatment, in The 5th Brazilian Congress on Polymers (5o. Congresso da ABPol) paper ref. CBPol 082, Águas de Lindóia, MG., **Proceedings**, CDRom...pg 1104-1105, 1999
- FLORES, A. M., ALVES, C. R.; ASSIS, O. B.G. Avaliação da Interação Carboximetil Celulose-Atrazina por Técnica Eletroquímica, 10°. ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA 10 ENQUA, Agosto/Set. 1999, UFSM Sta Maria, RS, **Livro de Resumos** p. EL 43
- FLORES, A.M., ALVES, C. R., CAMPANA FILHO, S. P.; ASSIS, O.B.G. Carboxymethylcellulose interaction with chemical solutes in water: a polarographic study. In NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES (Mattoso, L.H.C.; Leão, A., Frollini E. eds), (Proceedings of ISNaPol 2000) Embrapa Instrumentação Agropecuária, S. Carlos, 2000, p.93-96
- FLORES, A.M. Estudo da Interação do Herbicida Atrazina com o Biopolímero CMC por polarografia de Pulso Diferencial. Relatório de Estágio Técnico, Embrapa Instrumentação Agropecuária, S.Carlos, SP., 2000, 24p.
- SINESI, N., TESTINI, C. Physico-chemical investigations of interaction mechanisms between s-triazine herbicides and soil humic acids. **Geoderma** v. 28 (1982): 129-131