

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

**INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS
HÚMICAS AQUÁTICAS NA DETERMINAÇÃO DE
ATRAZINA POR IMUNOENSAIO (ELISA)**

Aluna: Ilda Antonieta Salata Toscano

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

Tese apresentada ao Instituto de Química
de Araraquara para obtenção do título
de Doutor em Química

Araraquara, Fevereiro de 1999

ÍNDICE

RESUMO	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
GLOSSÁRIO	<i>iii</i>
ABREVIATURAS	<i>iv</i>
INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	v
I – SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	01
I.1 – A química do humus ou substâncias húmicas de solo.....	02
I.2 – Substâncias húmicas aquáticas	03
I.2.1 – Importância das substâncias húmicas no ambiente.....	07
II – AGROTÓXICOS.....	11
II.1 – Uso de agrotóxicos	12
II.2 – Herbicida atrazina.....	14
II.3 – Agrotóxicos e substâncias húmicas	15
II.4 – Análise de agrotóxicos.....	17
III – TÉCNICAS IMUNOQUÍMICAS.....	19
III.1 – Imunoensaios.....	20
III.2 – Tipos de imunoensaios.....	22
III.2.1 – Ensaio imunoenzimático sobre suporte sólido (ELISA).....	24
III.3 – Obtenção de anticorpos.....	25
III.4 – Obtenção do sinal analítico.....	27
IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
IV.1 – Coleta e extração das substâncias húmicas aquáticas.....	31
IV.2 – Caracterização das substâncias húmicas aquáticas	34

IV.2.1 – Teor de cinzas.....	34
IV.2.2 – Análise elementar.....	34
IV.2.3 – Teor de substâncias húmicas aquáticas	34
IV.2.4 – Determinação dos valores de pK.....	35
IV.2.5 – Espectrometria na região do UV- Visível.....	35
IV.2.6 – Espectrometria na região do infravermelho.....	36
IV.3 – Testes ELISA.....	36
IV.3.1 – Equipamentos e reagentes.....	36
IV.3.2 – Método ELISA para análise de atrazina.....	37
IV.4 – Efeito matriz.....	40
IV.4.1 – Influência do tempo de contato.....	40
IV.4.2 – Influência da concentração de substâncias húmicas aquáticas..	41
IV.4.3 – Influência do pH.....	41
IV.4.4 – Influência da luz solar.....	41
V – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
V.1 – Extração das substâncias húmicas aquáticas.....	44
V.2 – Caracterização das substâncias húmicas aquáticas.....	47
V.2.1 – Teor de cinzas.....	48
V.2.2 – Análise elementar.....	49
V.2.3 – Teor de substâncias húmicas aquáticas.....	50
V.2.4 – Determinação dos valores de pK	51
V.2.5 – Espectrometria na região do UV- Visível.....	55
V.2.6 – Espectrometria na região do infravermelho.....	58
V.3 – Efeito matriz.....	61
V.3.1 – Influência do tempo de contato.....	66
V.3.2 – Influência da concentração de substâncias húmicas.....	68
V.3.3 – Influência do pH.....	70
V.3.4 – Influência da luz solar.....	74
VI – CONCLUSÕES.....	80
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO

Substâncias húmicas aquáticas (SHA) foram obtidas por processo de adsorção em resinas macroporosas não-iônicas, XAD 7 e XAD 2, dispostas em série. Após eluição com solução de NaOH, o extrato alcalino de SHA foi acidificado a pH 1,0 para separação em ácidos húmico (AH) que precipita, e ácido fúlvico (AF) o qual permanece em solução. Para caracterização físico-química do material húmico (AH e AF), foram feitas análise elementar, determinação do teor de substâncias húmicas e acidez total. Os resultados obtidos por UV-VIS e FTIR indicaram que AH apresenta maior número de grupos aromáticos em relação a AF, que em geral possui mais cadeias alifáticas.

A aplicação da técnica imunoquímica, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), para a determinação do herbicida atrazina em águas foi avaliada em amostra de água contendo alto teor de matéria orgânica (~35 mg L⁻¹) e baixo valor de pH (3,8). O efeito matriz devido a presença de SHA pode ser notado pela perda de sensibilidade da técnica, ou seja, os valores de IC₅₀ variaram de 60 ng L⁻¹, na ausência de SHA, para 112 ng L⁻¹ em concentrações acima de 10,0 mg L⁻¹ de material húmico e para 137 ng L⁻¹ em pH < 5,0.

Além disto, pode-se inferir que a luz solar aumentou a velocidade de degradação da atrazina na presença de SHA formando produtos, com partes de suas estruturas, semelhantes ao produto original levando a resultados falso-positivos. A quantidade de material húmico presente na amostra de água foi a principal fonte de erro na análise de atrazina, levando à interações não-específicas entre as SHA e os reagentes enzimáticos. O procedimento ELISA, aplicado neste estudo, pode ser utilizado para determinação de atrazina desde que se faça diluição da amostra até cerca de 2,5 mg L⁻¹ de húmicos e em pH alcalino (7,0 – 9,0).

ABSTRACT

Aquatic humic substances (AHS) were isolated from water samples using Amberlite XAD 7 and XAD 2. After elution with NaOH solution, the XAD concentrated AHS was fractionated at pH 1.0 resulting in fulvic acid (FA - supernatant) and humic acid (HA - slurry). All humic materials were characterized with respect to elemental analysis, amount of AHS and total acidity. UV and FTIR spectra showed HA aromatic character greater than FA.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was evaluated by analyzing atrazine in rich-humic matter water sample ($\sim 35 \text{ mg L}^{-1}$) and acid water (pH 3.8). From all the conditions studied the low pH (pH < 5.0) and high humic substances concentrations ($>10 \text{ mg L}^{-1}$) showed the greatest influence. The IC_{50} values to control sample (no humic) decreased from 60 ng L^{-1} to 112 ng L^{-1} to humic solution at $>10 \text{ mg L}^{-1}$ and to 137 ng L^{-1} at pH < 5.0. The presence of AHS alters the photochemical behaviour of atrazine by accelerating its degradation forming metabolites which can be recognized by the antibodies.

The assay performance showed a strong dependence on the pH values and amount of humic matter. However, analysis could be carried out directly in samples containing HA or FA that had been adjusted the pH in the range between 7.0 and 9.0, and humic concentration at 2.5 mg L^{-1} .

GLOSSÁRIO

Analito = molécula marcada ou composto de interesse para análise.

Anticorpo = imunoglobulina ou proteína produzida pelo sistema imunológico em resposta a uma substância estranha e que tem a habilidade de ligar-se especificamente a um antígeno.

Antígeno = substância que se liga a um anticorpo em uma reação imunológica.

ELISA = formato de ensaio imunoenzimático sobre suporte sólido.

ELISA competitivo = o analito compete com o analito marcado (conjugado enzimático) pelos sítios ligantes do anticorpo.

Formato ELISA direto = imunoenensaio consistindo de uma só etapa.

Hapteno (*haptén*) = molécula que não é capaz de induzir diretamente uma resposta imunológica, mas pode ligar-se ao anticorpo após a adição de grupos funcionais capazes de se ligarem a uma proteína.

Imunógeno ou substância imunogênica = antígeno quimicamente modificado (hapteno+proteína) utilizado para a produção de anticorpos específicos.

Conjugado enzimático ou traçador enzimático = hapteno ligado a uma enzima, que por sua vez produz sinal analítico (desenvolvimento de coloração).

ABREVIATURAS

Ab	Anticorpo
AF	Ácidos fúlvicos
Ag	Antígeno
AH	Ácidos húmicos
$A_{máx}$	Absorbância máxima
$A_{mín}$	Absorbância mínima
BSA	Soro albumina bovina
CC	Capacidade complexante
CE	Conjugado enzimático (traçador enzimático)
COD	Carbono orgânico dissolvido
CR	Reatividade cruzada
CV	Coefficiente de variação
ELISA	Ensaio imunoenzimático sobre suporte sólido
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
HRP	Peroxidase de rabanete
IC_{50}	Concentração do analito que reduz 50% a $A_{máx}$
IgG	Imunoglobulina
Kd	Coefficiente de distribuição
KLH	Hemocianina de molusco
K_{oc}	Coefficiente de adsorção de carbono orgânico
K_{ow}	Coefficiente de partição octanol/água
LD	Limite de detecção
PBS	Tampão fosfato
PBST	Tampão fosfato com Tween 20
SH	Substâncias húmicas
SHA	Substâncias húmicas aquáticas

INTRODUÇÃO GERAL

Grande parte das substâncias orgânicas contidas no solo e em águas naturais encontram-se como Substâncias Húmicas (SH). Essas substâncias são uma mistura complexa de moléculas com alto peso molecular, semelhantes entre si e formadas pela decomposição biológica e enzimática de vegetais no solo (BUFFLE, 1990). São transportadas às águas naturais por processos de lixiviação, e/ou podem também ser formadas diretamente no meio aquático por decomposição de plantas e organismos aquáticos. As SH apresentam grupos funcionais comuns, por exemplo, fenólicos e carboxílicos os quais conferem-lhes excepcional reatividade (KUCKUK, *et al.*, 1994). No ambiente, as SH são de especial relevância devido à variedade de trocas que são capazes de fazer com traços orgânicos e inorgânicos (BURBA *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 1994).

As interações das SH com compostos orgânicos antropogênicos, por exemplo os pesticidas, estão relacionadas com efeitos de adsorção, efeitos solubilizantes, hidrólises, processos microbiológicos e fotossensibilizantes (CHOUDRY, 1982). O efeito solubilizante do material húmico sobre compostos orgânicos pode desempenhar um papel importante na dispersão, mobilidade e transporte desses produtos no ambiente aquático.

A determinação de pesticidas em águas naturais, solos e sedimentos é geralmente complexa exigindo várias etapas de extração e clean-up das amostras, além de equipamentos sofisticados tornando a análise cara e demorada. Isto é devido as etapas de purificação, e às vezes, à necessidade de derivatização dos compostos a serem analisados (SANTOS *et al.*, 1998). Embora muitos métodos cromatográficos continuem predominando, novas metodologias técnicas para análise de resíduos de pesticidas em amostras

ambientais vêm sendo desenvolvidos rapidamente nos últimos 10 anos (MARTY *et al.*, 1995; THOMAS *et al.*, 1994; JOHNSON & VAN EMON, 1996). Nesse aspecto, técnicas imunoquímicas e biosensores estão sendo muito utilizados. As razões para isto são a alta seletividade, fácil manuseio e a sensibilidade que pode chegar a partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$) e até mesmo a partes por trilhão (ng L^{-1}) (GASCÓN *et al.*, 1997a).

Existem vários tipos ou formatos de imunoenaios e um deles, *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA, está sendo cada vez mais utilizado para quantificação de pesticidas, como técnica complementar aos métodos cromatográficos tradicionais. Uma das vantagens é que os testes ELISA podem ser feitos *in situ* e para um grande número de amostras simultaneamente. Vários estudos mostram uma excelente correlação com os resultados obtidos por cromatografia e por ELISA (AGA *et al.*, 1994).

RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Em vista da aplicação indiscriminada de agrotóxicos e da crescente preocupação social, estão surgindo programas de vigilância e controle (monitoramento) cada vez mais rigorosos. Para tal, é necessário o uso de técnicas menos laboriosas, permitindo a determinação de grande número de amostras e, que possam ser aplicadas o mais próximo possível do local de coleta.

Os testes ELISAs têm sido bastante utilizados para determinação de atrazina em amostras de alimentos, solos, ar, matrizes aquáticas e amostras biológicas (ULRICH, *et al.*, 1996; SCHLAEPPI, *et al.*, 1990; NUNES *et al.*, 1998; WIGFIELD & GRANT, 1992). Entretanto, por se tratar de uma técnica relativamente nova, há necessidade de se avaliar a aplicabilidade do método

para diversos tipos de amostras ambientais. Neste sentido, o aspecto mais importante a ser destacado é o do efeito matriz, causado pela complexidade das amostras ambientais, de alimentos e de origem biológica (DANKWARDT *et al.*, 1996; BUSHWAY & FAN, 1995).

OBJETIVOS

Os principais objetivos desse trabalho foram:

- i)* extrair e caracterizar as substâncias húmicas aquáticas;
- ii)* avaliar a influência das substâncias húmicas aquáticas na determinação do herbicida atrazina utilizando testes ELISA (efeito matriz);
- iii)* observar a influência da luz solar nas interações de material húmico com atrazina, utilizando técnicas espectrométricas ultravioleta-visível e infravermelho.

I.1 - A QUÍMICA DO HUMUS OU SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLO

A primeira tentativa para isolar substâncias húmicas (SH) de solo foi de ACHARD (1786), quando submeteu turfas a solventes alcalinos e obteve uma solução escura que precipitava por acidificação. Esse material, solúvel em álcali e insolúvel em ácido, foi denominado ácido húmico (AH), cuja definição mantém-se até hoje.

O primeiro estudo objetivando a compreensão da origem e natureza química das substâncias húmicas foi feito por SPRENGEL (1837). Muitos dos seus procedimentos foram adotados, como o pré tratamento do solo com ácidos minerais e posterior extração alcalina.

Na década de 10 iniciaram-se os estudos sobre a origem do húmus. A teoria de maior consideração surgiu com MAILLARD (1916), propondo a formação das substâncias húmicas durante o processo de decomposição de resíduos vegetais. A seguir, baseado em MAILLARD, surge o conceito de humificação, também considerando a formação das substâncias húmicas devido a atividade de microorganismos. Este conceito de humificação é mantido até hoje.

A chamada teoria clássica (WAKSMAN, 1936), propõe as SH como ligninas modificadas mas, a maioria dos pesquisadores, acredita num mecanismo relacionado com a formação de quinonas. MALCOLM (1990), afirma que a lignina não é o principal precursor de substâncias húmicas de solo. Além disso, mostra que há grandes diferenças estruturais entre substâncias húmicas de diferentes origens como por exemplo de solo, rios e mar. Devido à natureza heterogênea e complexa das SH, apesar de esforços de pesquisadores da área, pouco se sabe sobre a exata estrutura química dessas substâncias (POPPI & TALAMONI, 1992).

Aparentemente, não há uma separação nítida entre substâncias húmicas e substâncias não húmicas. Essa dificuldade em propor uma estrutura bem definida para as SH está associada, possivelmente, aos diferentes estágios de degradação do material. Embora muitas informações sobre as características estruturais das SH sejam bem conhecidas, estas ainda não são suficientes para um perfeito entendimento sobre a natureza dessas substâncias (RICE & LIN, 1993).

I.2 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS (SHA)

Por ser o humus do solo capaz de reter água e nutrientes, influenciando no crescimento das culturas, seu estudo era mais popular que os estudos sobre SHA. Até 1906, é praticamente inexistente dados na literatura sobre SHA quando, começaram estudos sobre a origem da coloração de determinados tipos de águas (THURMAN, 1985a). A formação do humus em águas está diretamente relacionada com a origem da molécula húmica, ou melhor, com o ambiente aquático. Várias hipóteses sobre a formação de SHA incluem:

- entrada de matéria orgânica de plantas diretamente para a água e/ou através do solo, com subsequente modificação química e bioquímica;
- lixiviação de ácidos fúlvicos e húmicos originários do solo;
- ação bacteriana sobre algas e fitoplanctons;
- incidência de irradiação ultravioleta sobre a matéria orgânica, presente na superfície de sistemas aquáticos, podendo catalisar as reações de polimerização;
- reações de polimerização entre grupos funcionais fenólicos, amino e aldeídicos presentes em produtos biológicos, abundantes em lagos eutróficos e águas sedimentarias.

Portanto, o tipo da água (rios, lagos ou mar), e a estação do ano são fatores determinantes na formação e processos de humificação (THURMAN, 1985a).

A definição de SHA está baseada nos métodos de extração e são classificadas em termos de solubilidade em soluções ácidas e básicas. Ácidos húmicos são a fração de SH insolúvel em água abaixo de pH 2; ácidos fúlvicos são a fração solúvel em todo intervalo de pH. THURMAN & MALCOLM (1981) definiram SHA como a porção não específica, amorfa, constituída de carbono orgânico dissolvido (COD) em pH 2 e adsorvente em coluna de resina XAD 8 com altos valores de coeficiente de distribuição. A matéria orgânica retida pela resina é eluída com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Assim, o extrato alcalino de material orgânico é chamado de substâncias húmicas aquáticas (SHA). Ainda, de acordo com THURMAN & MALCOLM (1981), SHA compreende cerca de um terço até a metade do carbono orgânico dissolvido na água e são constituídas em sua maior parte por ácidos hidrofóbicos. Estes, podem apresentar concentração de 20 µg L⁻¹ em águas de subsolo e chegando a 30 mg L⁻¹ em águas de superfície (MacCARTHY & SUFFET, 1989).

Pesquisadores como MANTOURA & RILEY (1975), têm citado adsorventes inorgânicos, tais como carbono ativado, alumina, sílica gel e carbonato de cálcio, para a extração de SH em águas naturais. Entretanto, a taxa de recuperação com esses materiais é baixa por causa da pouca adsorção e também pela dificuldade para eluir as SH desses adsorventes fortes; além disso, podem ocorrer alterações químicas na amostra. O uso de adsorventes orgânicos como nylon, poliamidas e poliestirenos tem mostrado altas taxas de recuperação, embora segundo alguns autores, esses adsorventes também causem algumas alterações.

Devido a concentração de SH em águas naturais raramente exceder 5 mg L⁻¹ como COD, é necessário um volume muito grande de amostra para obter quantidades da ordem de gramas de SHA. A separação analítica de compostos húmicos aquáticos, tem sido feita por processos de adsorção simples e rápidos, separando o material húmico de substâncias inorgânicas em grandes volumes de amostra. A desvantagem desses métodos é uma possível contaminação do extrato pela matéria orgânica oriunda do trocador e por isso, a resina deve ser cuidadosamente tratada antes do uso. Esses métodos são mais eficientes que outros procedimentos como precipitação e extração por solventes, os quais não são quantitativos para análise de COD (THURMAN & MALCOLM, 1981).

Quando as SHA são extraídas, várias precauções devem ser tomadas para minimizar alterações desse material. Algumas dessas recomendações são, por exemplo, a escolha de métodos que não requeiram o uso de ácidos ou bases, limpeza cuidadosa da resina antes da operação, a utilização de solventes como acetonitrila no processo de eluição etc..

Atualmente são empregados uma série de métodos de extração, como por exemplo precipitação, ultrafiltração e extração por solvente. O fracionamento do COD em uma amostra, varia em função do tipo de resina, do volume de amostra que passa através da resina e dos eluentes utilizados. A Tabela 01 lista alguns dos métodos de extração mais utilizados (AIKEN, 1985; BURBA *et al.*, 1995; ASTER *et al.*, 1996).

Tabela 01 - Técnicas utilizadas para extração de substâncias húmicas aquáticas.

MÉTODO	VANTAGEM	DESVANTAGEM
Liofilização	-método brando -alto fator de concentração	-solutos são concentrados, menos os voláteis
Co-precipitação	econômico -eficaz para águas com alto teor de COD	-ineficiente para grandes volumes de amostra
Ultrafiltração	-fracionamento dos solutos por peso molecular -grandes volumes de amostra	-interação com a membrana -entupimento
Extração com solventes	-exclusão de sais inorgânicos	-método lento -interações irreversíveis amostra/solvente
Resinas	-grandes volumes de amostra -alto fator de concentração -fácil regeneração de adsorvente	-alterações na amostra -contaminação proveniente da resina

Atualmente, resinas macroporosas tais como a série Amberlite XAD têm sido utilizadas para extração e concentração de SHA. As resinas a base de estireno polivinilbenzeno (XAD-1, XAD-2 e XAD-4), apresentam menor facilidade de eluição das substâncias húmicas que as resinas a base de ester acrílico (XAD-7 e XAD-8). Além disso, as resinas XAD-7 e XAD-8 são as mais hidrofílicas da série e têm maior capacidade de umidificação e absorvem mais água que as demais resinas XAD. Isto resulta em uma rápida cinética de adsorção. As resinas mais utilizadas para a extração de SHA são XAD-2 e XAD-7. As resinas XAD 1 e XAD 2 são mais empregadas

na extração de substâncias húmicas em águas marinhas. As resinas XAD 7 e XAD 8, são utilizadas preferencialmente para extração de SHA de águas de superfície e de subsolo. O desenvolvimento de métodos cromatográficos melhorou a eficiência dos processos de extração de SHA e tem sido responsável, em parte, pelo crescente interesse na química desses materiais (THURMAN & MALCOLM, 1981).

As resinas Amberlite XAD, têm sido utilizadas como adsorventes para solutos orgânicos. Essas resinas apresentam área superficial elevada e em geral a adsorção de ácidos orgânicos é determinada pela solubilidade do soluto e pH da solução. O "efeito hidrofóbico" é o principal agente na adsorção dessas resinas. Em baixos valores de pH os ácidos fracos são protonados e adsorvidos na resina; em pH básico os ácidos são ionizados e a dessorção é favorecida. Diferenças no tamanho dos poros, área superficial e composição química levam a diferentes resultados para um mesmo soluto (AIKEN, 1988).

A separação de SHA por cromatografia de adsorção tem sido muito empregada (RILEY & TAYLOR, 1969; STUERMER & HARVEY, 1977; THURMAN & MALCOLM, 1981). A fração extraída de COD em uma amostra depende do tipo de resina utilizada, da quantidade de amostra passada pela resina e do eluente. Conseqüentemente, amostras extraídas por métodos diferentes não são comparáveis.

I.2.1 - Importância das substâncias húmicas no ambiente

O interesse por SHA deve-se ao papel desempenhado por elas nos ecossistemas aquáticos naturais em razão da multiplicidade de sítios ligantes contendo oxigênio, como por exemplo, carboxilas, carbonilas, hidroxilas fenólicas e alcoólicas (THURMAN, 1985a). De acordo com HART

(1981), em sistemas aquáticos íons metálicos podem estar presentes em diferentes formas físico-químicas. A especiação é influenciada por diversos fatores como pH, potencial redox, tipos e concentrações de ligantes orgânicos (p. ex. substâncias húmicas) e inorgânicos (p. ex. hidróxidos e bicarbonatos), material particulado e coloidal. Já é sabido que a biodisponibilidade de metais é influenciada principalmente pela forma em que se encontram na natureza e não só pela concentração total como acreditava-se no passado (MORRISON *et al.*, 1989).

WEBER (1988), em revisão bibliográfica a respeito das interações de metais com SH, ressaltou que a capacidade total de reação de ácidos húmicos com íons metálicos, é de 200 a 600 $\mu\text{mol g}^{-1}$. Aproximadamente, 1/3 do total são sítios de complexação, a área superficial é de aproximadamente 2000 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, sendo muito maior que as superfícies de argilas e óxidos metálicos. A complexação dos metais pelos grupos carboxílicos é a mais importante. As frações de material húmico de menor peso molecular e com maiores concentrações de grupos carboxílicos e fenólicos são mais eficientes na complexação de íons metálicos.

A poluição ambiental é causada principalmente por despejos de restos industriais, esgotos domésticos, aplicação indevida de pesticidas/herbicidas às lavouras e remanescentes de poluentes do ar (ROCHA *et al.*, 1996). Dentre estes poluentes, os metais pesados representam um grupo especial pois não são degradados química ou biologicamente de forma natural (ALLOWAY, 1993).

Devido ao alto teor de oxigênio encontrado na estrutura das SH, elas têm excepcional capacidade para complexar metais (ZHANG *et al.*, 1996). Esta propriedade de interagir com íons metálicos formando complexos de diferentes estabilidades e características estruturais, tem sido objeto de

estudos de vários pesquisadores (SCHNITZER & SKINNER, 1968; BURBA *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 1998; BARROS *et al.*, 1994).

Valores típicos de COD são de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em água do mar, $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em rios, $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ em pântanos e nos estuários variam entre os valores dos rios e da água do mar. Em águas salgadas cerca de 20% do COD é proveniente de material húmico, 60% em rios e 70% em áreas alagadas. Estes dados mostram que as SH são importantes, se não predominantes, adsorventes metálicos em águas naturais (CHOUDRY, 1982).

A presença de variados grupos funcionais, permite o uso de várias técnicas para obter informações a respeito da funcionalidade e mecanismos de reação das SH no ambiente. Estudos utilizando espectrometria na região do infravermelho (IV), ultravioleta-visível (UV-VIS) bem como ressonância magnética nuclear (RMN C^{13} e RMN H^1) têm contribuído para um melhor conhecimento estrutural das SHA (HAIDER *et al.*, 1991; ABBT-BRAUN, 1992). Entretanto, de acordo com alguns autores, a complexidade dessas substâncias, via de regra, não permite uma caracterização mais detalhada da composição estrutural e de possíveis mecanismos de formação de complexos (GAFFNEY *et al.*, 1996).

Existem diversos métodos propostos para elucidar algumas propriedades das SH como por exemplo, a determinação do peso molecular utilizando-se filtração em gel ou viscosimetria (TOWN & POWELL, 1992). Estudos sobre mecanismos de reação têm sido feitos por espectrometria, troca iônica, titulação potenciométrica etc.. Muitos desses métodos fornecem informações limitadas devido a falta de padrões apropriados. Outro problema, são os resultados contraditórios relatados por

pesquisadores. BUDDRUS *et al.* em 1989, encontraram ~78% dos átomos de carbono de SHA eram alifáticos quaternários e que os sinais de carbonos aromáticos eram derivados de ligninas. Estudo anterior de HATCHER (1987) apresenta um outro padrão para o espectro de lignina.

Além das contradições de resultados sobre a composição e estrutura das SH, há ainda dados discordantes em relação aos mecanismos de reações. Alguns estudos sugerem que as reações das SH no ambiente estão relacionadas com a presença de grupos oxigenados, principalmente os grupos carboxílicos (GAFFNEY *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1992). A formação de complexos metálicos com contaminantes orgânicos está relacionada à capacidade de complexação do material húmico, que por sua vez é dependente do pH, força iônica, concentração de SH e do tipo de metal (CARLSEN *et al.*, 1996; PERDUE, 1988). Os mecanismos envolvidos na formação de complexos metálicos podem ser do tipo salicilato ou formação de quelatos (BARROS *et al.*, 1994). Para complexos com compostos orgânicos, os mecanismos de reação podem ser atribuídos à formação de pontes de hidrogênio, transferências de carga/próton, dependendo das características do ambiente, do contaminante e das SH. (MacCARTHY & JIMENEZ, 1985; WELHOUSE & BLEAM, 1992).

Os mecanismos de ligação de material húmico com pesticidas são complexos, pois neles podem estar envolvidas ligações do tipo covalente, pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas etc. (WERSHAW, 1986). Devido a essa variedade de interações, existem muitos estudos que têm como objetivo obter informações sobre os mecanismos de reação (SENESI, 1992; BOLLAG *et al.*, 1992; SPOSITO *et al.*, 1996; LANDGRAF *et al.*, 1998).

II.1 - USO DE AGROTÓXICOS

Atualmente é difícil imaginar a produção de alimentos sem o uso de agrotóxicos, pois estes produtos propiciam o aumento da produtividade agrícola, diminuição dos preços dos alimentos e da mão-de-obra. Assim, parece certo que, os praguicidas continuarão sendo um componente indispensável às muitas atividades agrícolas. Denomina-se praguicidas a toda substância de origem natural ou sintética utilizada no controle e/ou eliminação/diminuição de pragas que causam prejuízos na produção de alimentos, ou transferem enfermidades aos seres humanos e a outros organismos.

Além da aplicação na agricultura, esses compostos têm outros usos importantes, como por exemplo, o combate à malária que já chegou a matar milhões de pessoas em todo o mundo. Outra aplicação não agrícola é o combate às ervas daninhas em rodovias, parques e portos marítimos. O consumo de praguicidas para aplicações não industriais representa cerca de 25% do total utilizado (STUDIES, D.O.E.P., 1991).

Infelizmente, o uso de defensivos agrícolas pode causar sérios danos à saúde, além de problemas ambientais. Embora a presença desses compostos seja mais frequente nas proximidades dos locais de fabricação e aplicação, têm-se detectado concentrações significativas de resíduos de praguicidas na atmosfera, águas pluviais, subterrâneas e superficiais, no solo e em alimentos. Hoje em dia, já se sabe que algumas classes de praguicidas são agentes cancerígenos, se ingeridos ou em contato com a pele, a maioria deles podem afetar o sistema nervoso central, sistema imunológico e sistema reprodutivo (BRANCO, 1990).

Muitos dos problemas ambientais e ecológicos decorrentes do uso de pesticidas são devidos aos efeitos tóxicos sobre os organismos vivos. A gravidade das consequências depende de como o pesticida se degrada e se move através dos ciclos hidrológicos, solos e cadeias alimentares. Alguns estudos mostram que, aproximadamente, 500 espécies de insetos e 270 espécies de plantas daninhas tornaram-se resistentes a um ou mais pesticidas (HASSAL, 1983).

Desde 1986, a *Environmental Protection Agency* (EPA), vem proibindo e reduzindo o uso de certos defensivos agrícolas. Esses produtos apresentam um certo grau de toxicidade para humanos, especialmente os compostos menos degradáveis e mais persistentes. Em muitos países, vigoram leis que fixam limites máximos toleráveis de resíduos de herbicidas como $0,05 \text{ mg k}^{-1}$ para frutas e vegetais, $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para cada praguicida ou $0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o total de agrotóxicos presentes em águas destinadas ao consumo humano (BARCELÓ, 1993).

Uma vez liberados ao ambiente os agrotóxicos podem ter basicamente dois caminhos a seguir. Podem degradar-se por ação de processos químicos (hidrólises ácida ou básica), fotoquímicos (fotólise) e bioquímicos (ação microbiana). Neste caso, pode ocorrer a formação de sub-produtos mais ou menos tóxicos que os compostos originais. A segunda possibilidade é que o agrotóxico seja resistente à degradação e permaneça sem alterar-se durante longos períodos. Em geral, os compostos mais facilmente degradáveis têm menos tempo para moverem-se e provocar danos tanto ao ambiente como aos seres vivos. Por sua vez, os compostos mais resistentes movem-se percorrendo grandes distâncias, possuindo assim maior potencial para causar danos ao ambiente.

A poluição e os processos de degradação dos pesticidas têm sido objeto de estudos tanto nos Estados Unidos como na Europa, principalmente em áreas de estuários dos países banhados pelo Mediterrâneo (WELLS, 1993; RECK & FREVERT, 1990; BARCELÓ, 1991; FERRER *et al.*, 1997).

II.2 - HERBICIDA ATRAZINA

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) é o principal membro da classe de herbicidas triazinas (Figura 01). É um herbicida seletivo utilizado para o controle de ervas daninhas em cultivos de milho, cana-de-açúcar e zonas de reflorestamento. Pode também ser usado como herbicida não seletivo no acondicionamento de terrenos industriais, construção de estradas, ferrovias etc. (FIELDING *et al.*, 1992).

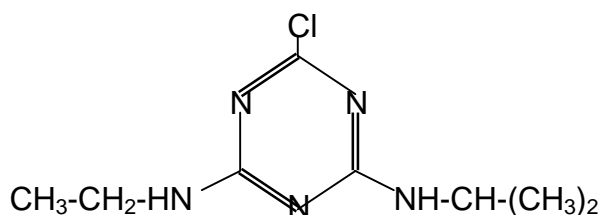


Figura 01 - Estrutura molecular da atrazina adaptada de GASCÓN (1998).

A EPA classificou a atrazina como praguicida de uso restrito devido ao seu potencial para contaminar águas subterrâneas e em 1991, estabeleceu-se um limite máximo de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina em águas potáveis (US EPA, 1991). Desde 1959, quando o herbicida foi registrado com o nome de atrazina, muito se tem estudado sobre suas propriedades físico-químicas, modo de ação, toxicologia e biodegradação (WANG *et al.*, 1992; KOLPIN & KALKHOFF, 1993). Essa classe de compostos

corresponde a 70-80% do total de agrotóxicos aplicados na agricultura nos países em desenvolvimento.

A atrazina é relativamente estável sob condições normais de temperatura e pressão. O aquecimento excessivo pode produzir fumos tóxicos de cloro e nitrogênio, é estável em meios aquosos neutros (até 70 °C), ligeiramente ácidos ou básicos, mas hidroliza facilmente em meio ácido ou fortemente alcalino, apresenta solubilidade de 33 mg L⁻¹ em água, 18000 mg L⁻¹ em metanol e 24000 mg L⁻¹ em acetato de etila (GASCÓN, 1998).

A atrazina é absorvida pelas raízes e folhas das plantas e seu principal modo de ação parece ser o bloqueio da capacidade da planta fazer a fotossíntese (METS & THIEL, 1989). Considerada moderadamente tóxica a humanos e outros animais, sendo que após 72 h de ingestão, 85% é excretado pela urina e 15% é retido principalmente no fígado, rins e pulmões. Cobaias que receberam doses elevadas de atrazina desenvolveram tumores mamários e câncer. Algumas propriedades físico-químicas da atrazina, como coeficiente de partição octanol-água ($K_{ow} = 2,68$) e coeficiente de adsorção no solo ($K_d = 0,2 - 2,46$) indicam que, apesar da baixa solubilidade em água, a atrazina pode se mover rapidamente por solos com baixo teor de argila ou matéria orgânica. Estas características somadas a baixa volatilidade e tempo de vida médio entre 80–150 dias, fazem da atrazina um contaminante potencial para águas subterrâneas (HAYES & LAWS, 1990).

II.3 - AGROTÓXICOS E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As interações das SH com compostos orgânicos antropogênicos, por exemplo os pesticidas, estão relacionadas com efeitos de adsorção, efeitos

solubilizantes, hidrólises, processos microbiológicos e fotossensibilizantes. O efeito solubilizante do material húmico sobre compostos orgânicos pode desempenhar importante papel na dispersão, mobilidade e transporte desses produtos no ambiente aquático (TANAKA *et al.*, 1997; MARTINETTO *et al.*, 1994; ZEPP *et al.*, 1985). TORRENTS *et al.* (1997), demonstraram que a velocidade de degradação (fotólise indireta) da atrazina diminui com o aumento da concentração de COD. Humatos de sódio causam a diminuição da tensão superficial da água elevando a solubilidade do 2,2-bis(p-clorofenil)-1.1.1-tricloroetano (DDT) cerca de vinte vezes (CHOUDRY, 1982). Resíduos de dicloranilinas, enquanto ligados a matéria orgânica do solo, causam baixa ou nenhuma toxicidade aos microorganismos. Os ácidos húmicos retardam a fotólise de soluções aquosas de produtos como benzoantraceno, benzopireno, quinolina etc. (CHOUDHRY, 1982).

Estudos de fotodegradação de pesticidas carbamatos mostraram os ácidos húmicos atuando como catalisadores aumentando a velocidade de degradação dos pesticidas (BERTRAND & BARCELÓ, 1991). Estudos cinéticos indicaram que a velocidade de degradação da atrazina triplicou na presença de 10 mg L⁻¹ de COD (MINERO *et al.*, 1992). O pesticida clorado Mirex é rapidamente convertido em seu principal produto de degradação, 10-monohidromirex quando na presença de ácidos húmicos (BURNS *et al.*, 1997). GAUTHIER *et al.* (1987) relataram que a extensão da ligação de pireno com ácidos húmicos e fúlvicos está fortemente associada a estrutura e composição do material húmico. Sugerem ainda, que este fato deve ser considerado nos estudos de transporte e destino de poluentes orgânicos hidrofóbicos em sistemas aquáticos.

II.4 - ANÁLISE DE AGROTÓXICOS

A escolha da técnica analítica deve levar em consideração, principalmente, a classe do agrotóxico a ser analisado, sua estabilidade e a forma de detecção apropriada. No caso do herbicida atrazina existem vários métodos de detecção testados e aprovados pela EPA (SHERMA, 1995). Métodos cromatográficos para determinação das s-triazinas em alimentos e amostras ambientais foram revisados por TEKEL & KOVACICOVA em 1993.

Os métodos instrumentais utilizados na análise de resíduos de praguicidas incluem uma série de etapas, com a finalidade de detectar e quantificar especificamente um ou mais compostos em uma amostra. Para isto, são requeridas etapas como extração, purificação, modificação, resolução, detecção e confirmação. Dependendo dos compostos a analisar e do objetivo, nem sempre são necessárias todas essas etapas.

A análise de contaminantes orgânicos em solos e águas contendo altos teores de matéria orgânica, em especial material húmico, apresenta dificuldade adicional devido ao efeito matriz. Este efeito pode ser observado, principalmente, nas etapas de extração pois, o material húmico sendo solúvel na maioria dos solventes utilizados dificulta a remoção do analito da matriz. Quando se utiliza cromatografia líquida com detetor UV-VIS, o problema maior está na etapa final de detecção do analito uma vez que as substâncias húmicas absorvem fortemente a partir de 400 nm, mascarando o composto a ser determinado.

A grande vantagem dos métodos cromatográficos é permitirem a determinação simultânea de vários compostos da mesma família ou relacionados. Entretanto, como qualquer outra técnica apresentam alguns inconvenientes e limitações. A determinação de pesticidas em águas

naturais, solos e sedimentos, em geral, é complexa e exige várias etapas de extração e *clean-up* das amostras, equipamentos sofisticados tornando a análise cara e demorada. Isto é devido às etapas de purificação e, às vezes, à necessidade de derivatização dos compostos a serem analisados (SANTOS *et al.*, 1998; HAIDER *et al.*, 1991). Além disso, alguns métodos cromatográficos utilizam grandes volumes de solventes orgânicos gerando resíduos, em geral, tóxicos e inflamáveis. Normalmente, esse tipo de análise pode ser feito somente em laboratórios equipados com instrumentação adequada e pessoal qualificado.

Em vista da indiscriminada aplicação de agrotóxicos e da crescente preocupação social, estão surgindo programas de vigilância e controle cada vez mais rigorosos. Para tal, é necessário o uso de técnicas versáteis menos laboriosas, permitindo a determinação de um grande número de amostras e que, se possível, sejam feitas o mais próximo possível do local de coleta. Embora vários métodos cromatográficos continuem predominando, novas metodologias para análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais vêm sendo desenvolvidas nos últimos 10 anos. Nesse aspecto, as técnicas imunoquímicas e os biosensores estão sendo muito utilizados (MARTY *et al.*, 1995; THOMAS *et al.*, 1994; GEE *et al.*, 1994).

III.1 - IMUNOENSAIOS

Os imunoenaios fazem uso de anticorpos, que são moléculas de polipeptídeos, produzidos pelas células do sistema imunológico quando este é exposto a uma substância estranha (antígeno). Têm como base o conceito fundamental que os anticorpos, preparados em animais, podem reconhecer com alta especificidade e ligarem-se ao antígeno, que foi utilizado para a produção dos anticorpos. Devido aos imunoenaios apresentarem-se como qualitativos, semi-quantitativos ou quantitativos, uma variedade de substâncias desde microorganismos complexos até simples moléculas de pesticidas e poluentes industriais podem ser analisados (VAN EMMON, 1990).

Os métodos imunquímicos foram primeiramente utilizados em análises clínicas para determinação de insulina em sangue (YALOW & BERSON, 1960). O uso de técnicas imunquímicas para análise de amostras ambientais foi proposto por ERCEGOVICH, em 1977, aumentando sua aceitação a partir de 1988. Desde então, vários tipos de imunoenaios têm sido utilizados (TOSCANO *et al.*, 1998b).

Atualmente, existem várias empresas que comercializam *kits* para a análise de poluentes facilitando seu uso no próprio local aonde apresenta o problema. Alguns desses *kits* já estão aprovados como métodos oficiais por agências governamentais como a EPA. A Tabela 02 lista alguns desses métodos aprovados pela EPA.

Tabela 02 - Métodos imunquímicos aprovados pela EPA^a.

MÉTODO	COMPOSTO A SER ANALISADO
4010A	Pentaclorofenol
4020	PCBs
4035	HPAs, em solos
4050	Explosivos TNT em águas e solos

^aUS EPA, USEPA 1991

As principais vantagens das técnicas imunquímicas são:

- Simplicidade e/ou eliminação de procedimentos de extração e purificação da amostra;
- capacidade para processar um grande número de amostras;
- alta sensibilidade com limites de detecção abaixo de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para análises de águas e em alguns casos até $1 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de alimentos, solos e matrizes biológicas;
- alta especificidade, capaz de analisar um determinado composto mesmo na presença de substâncias afins;
- baixo custo.

Entretanto, os ensaios imunológicos apresentam alguns inconvenientes. Quando as amostras são matrizes complexas, esses métodos servem apenas como técnicas para avaliação inicial de contaminação devido a possibilidade de resultados falso-positivos. Este fato está relacionado ao conceito de reatividade cruzada, que é definida como a característica que apresentam alguns compostos com estruturas semelhantes a do analito de induzirem resposta positiva ao ensaio. Outras características próprias da amostra que interferem na análise estão

associadas ao efeito matriz, como por exemplo pH, força iônica, temperatura, tempo de reação etc..

A aceitação e implantação da metodologia dos ensaios imunológicos depende da demonstração da sua qualidade e validação comparados aos métodos tradicionais. Dependendo do tipo de análise e do composto de interesse, os ensaios imunológicos podem ser utilizados como métodos de monitoramento e também quantitativos. As razões para isto são fácil manuseio, análise *in situ*, seletividade e a alta sensibilidade que pode chegar a partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$) e até mesmo partes por trilhão (ng L^{-1}) (GASCÓN *et al.*, 1997).

III.2 - TIPOS DE ENSAIOS IMUNOQUÍMICOS

Os ensaios imunoquímicos podem ser de diversos tipos e formatos em função do complexo antígeno-anticorpo que se deseja determinar. Assim, há um grande número de possíveis configurações, gerando uma terminologia extensa e confusa. Entretanto, os ensaios imunoquímicos podem ser classificados em duas categorias principais: heterogêneos ou homogêneos. Os heterogêneos, ao contrário dos homogêneos, requerem a separação dos reagentes livres em solução daqueles que estão ligados aos anticorpos.

Genericamente, os ensaios imunoquímicos são um método analítico dependente da união específica de um anticorpo com o analito. Esta interação é quantificável graças a utilização de marcadores. Estes, incluem radioisótopos, enzimas, fluorescência, fosforescência, quimioluminescência e bioluminescência.

A maioria dos marcadores enzimáticos são do tipo peroxidase extraída de rabanete (HRP) e fosfatase alcalina que possuem requisitos imprescindíveis como atividade altamente específica, substrato estável, facilmente conjugáveis etc. (TIJSSEN, 1985).

Em geral, o desenvolvimento de um ensaio imunológico para análise de praguicidas envolve 4 fases distintas:

1. *Seleção do analito de interesse*: Conhecimento da estrutura química, estabilidade e produtos de degradação;
2. *Preparo dos reagentes*: Consiste da obtenção, purificação e modificação dos anticorpos, enzimas ou analitos a serem utilizados no formato final do ensaio. Inicia-se pela obtenção da *substância imunogênica*, que é injetada no animal para estimular a produção de anticorpos específicos. Essas substâncias são formadas através de ligações covalentes entre uma molécula de baixo peso molecular (<1000 D) e moléculas de proteínas solúveis, tais como soroalbumina bovina (BSA) e hemocianina (KLH). Essas moléculas pequenas, que são o próprio analito ou outra com estrutura semelhante, são denominadas *hapteno (hapten)*. Após um período de 15 a 20 dias obtém-se os anticorpos que consistem de uma mistura de anticorpos com pequenas diferenças estruturais, gerando sítios de ligações de afinidades e especificidades variadas. Esses anticorpos são denominados policlonais. O *traçador-enzimático* ou *analito-enzima conjugado* é obtido a partir da reação entre a molécula hapteno e uma enzima, por exemplo glucoxidase, fosfatase alcalina, peroxidases e β -D-galactose.
3. *Protocolo do ensaio*: Nesta etapa é definido o protocolo do método, visando obter o máximo em sensibilidade e reprodutibilidade. Consiste da escolha do traçador enzimático e de parâmetros como pH, temperatura e

concentração. Ou seja, é a etapa de determinação, seleção e aplicação das condições ótimas do ensaio.

4. *Otimização e avaliação do ensaio*: É a fase de refinamento do protocolo, definindo todos os parâmetros fundamentais, incluindo sensibilidade, recuperação, linearidade e precisão. Também durante esta fase, estuda-se a reatividade cruzada e efeito matriz que possam vir a comprometer o desempenho do método. Então, a validação do método é feita por comparação com os resultados obtidos por técnicas convencionais já estabelecidas, utilizando-se amostras reais e amostras certificadas.

III.2.1 - Ensaio imunoenzimático sobre suporte sólido (ELISA)

Este tipo de imunoensaio heterogêneo é o mais utilizado para amostras ambientais, sendo conhecido como ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) que inclui ensaios competitivos e não-competitivos.

Existem no mercado vários tipos de suportes sólidos para acoplamento dos anticorpos ou do antígeno. Dentre eles, as microplacas de poliestireno irradiadas são as mais populares, apesar da menor capacidade de retenção dos anticorpos. Como vantagens, utiliza-se pequeno volume de reagentes e os ensaios são extremamente sensíveis (TIJSSEN, 1895).

A Figura 02 mostra um exemplo de ensaio ELISA, tipo competitivo onde o antígeno liga-se diretamente aos sítios ligantes do anticorpo. ELISA é um ensaio que faz uso de enzimas conjugadas, onde um dos reagentes, o anticorpo, é adsorvido em suporte sólido.

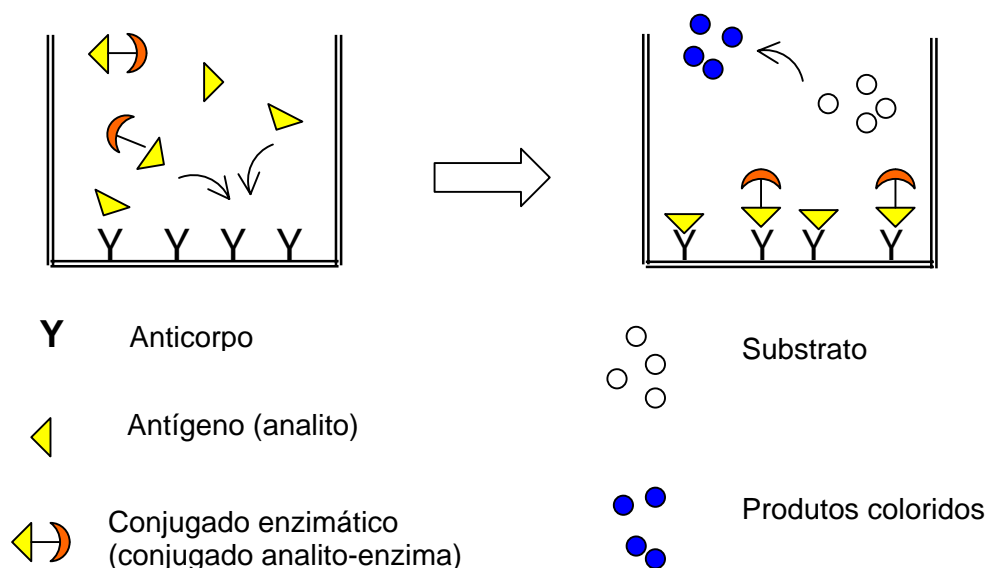


Figura 02 – Representação gráfica de um ensaio imunoenzimático sobre suporte sólido (ELISA) do tipo competitivo.

III.3 - OBTENÇÃO DE ANTICORPOS

Os anticorpos pertencem a uma família de glucoproteínas denominadas imunoglobulinas (IgG) presentes no soro de todos os mamíferos. São componentes fundamentais para os métodos imunquímicos por apresentarem em sua estrutura sítios de ligação que reagem especificamente com os antígenos (analito).

O principal objetivo é o anticorpo reconhecer ao máximo um único composto ou uma classe particular de compostos. A maioria das proteínas e polipeptídeos de grande peso molecular são substâncias imunogênicas naturais, ou seja, são capazes de produzir uma resposta imunológica. Um composto produzirá uma resposta imunológica aceitável a partir de 5000 D, e como os praguicidas são moléculas de baixo peso molecular (< 1000 D) é necessário fazer uma ligação covalente à moléculas de proteínas (GASCÓN, 1998).

Quando se injeta um conjugado hapteno-proteína (ou analito-proteína) em um animal (cobaia), este desencadeia uma resposta frente ao complexo de forma que alguns anticorpos produzidos como consequência dessa resposta, irão dirigir-se às moléculas do analito ligadas à proteína. Esta é uma etapa laboriosa com 3 sub-etapas: síntese de haptenos, preparo de imunógenos e imunização dos animais.

Muitas vezes os compostos objetos de obtenção de anticorpos não apresentam nenhum grupo funcional para unir-se covalentemente a uma molécula de maior tamanho sendo necessário recorrer à síntese de haptenos (GOODROW *et al.*, 1990). O hapteno ideal deve imitar quase à perfeição o composto a ser analisado em relação a estrutura, geometria, carga, capacidade de se ligar por pontes de hidrogênio e propriedades hidrofóbicas. O maior problema é que para poder acoplar covalentemente um praguicida a uma proteína, o analito (praguicida) deve possuir grupos funcionais como carboxilas, amino, hidroxilas ou sulfidrilas. Infelizmente, muitos praguicidas carecem desses grupos, sendo necessário introduzi-los por modificação química do próprio analito ou por síntese de derivados que os contenham (BALLESTEROS *et al.*, 1997).

Após a síntese, o hapteno é ligado a uma proteína. As proteínas comumente utilizadas são as albuminas de soro bovino (BSA), de soro humano (HSA), de ovo de galinha (OVA) ou hemocianina (KLH) (MARCO *et al.*, 1995). Depois de preparados e caracterizados, os imunógenos são introduzidos em animais, ratos ou coelhos, para a produção de anticorpos. A molécula do anticorpo apresenta estrutura tridimensional, usualmente representada pela letra Y como mostra a Figura 03.

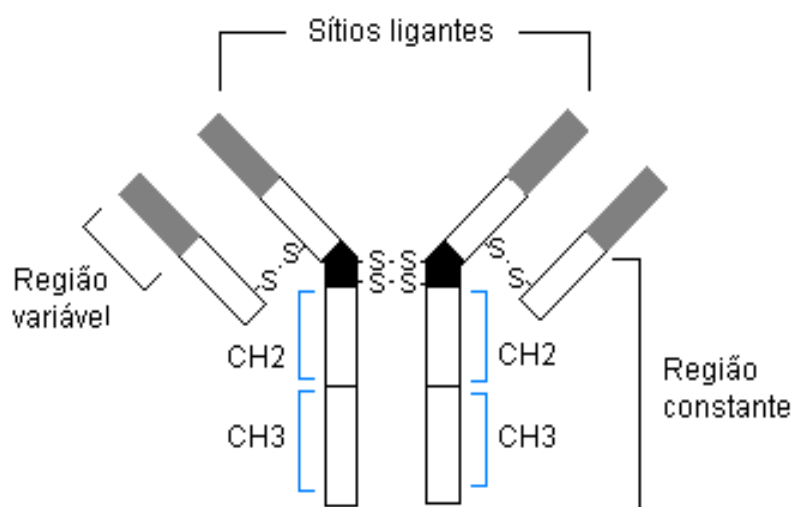


Figura 03 - Representação gráfica simplificada da estrutura de um anticorpo.

III.4 - OBTENÇÃO DO SINAL ANALÍTICO

No caso de ensaios tipo ELISA o sinal analítico é a absorvância dos produtos coloridos formados a partir das interações antígeno-anticorpo. O produto da ligação antígeno-anticorpo é chamado imunocomplexo e sua formação pode ser descrita pela equação (I):



onde o antígeno (analito), Ag, compete com o conjugado analito-enzima, Ag*, por um número fixo e limitado de sítios ligantes específicos presentes nas moléculas do anticorpo Ab. Os produtos livres (em solução) são retirados e em seguida o substrato reage com o conjugado analito-enzima formando produtos de coloração azul, cuja intensidade é inversamente proporcional à concentração de analito. A reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a determinação da concentração do analito é feita

através de leitura de absorbância contra uma curva de calibração (MARCO *et al.*, 1995).

As curvas de calibração são feitas com solução do antígeno em diferentes concentrações. Assim, obtém-se curvas do tipo sigmoidal com um intervalo linear de trabalho e a melhor sensibilidade. No eixo das ordenadas (Y) a variação da absorbância do padrão ou amostra, A, compreende o ponto A_0 (ponto zero) e A_{exc} (excesso de analito). No eixo das abscissas (X), tem-se a variação da concentração do analito. Quando a concentração de analito é muito baixa, o equilíbrio favorece de uma alta concentração de conjugado enzimático unido aos anticorpos e a absorbância correspondente será mais alta. O intervalo de trabalho, parte linear da curva, é uma característica importante que indica a sensibilidade do teste.

Para fazer comparação direta entre várias curvas de calibração, os dados de absorbância devem ser convertidos em $\%B/B_0$, normalizados a 100% (A_0) e a 0% (A_{exc}). A conversão é feita pela equação (II), onde A é a absorbância do padrão ou da amostra:

$$\%B / B_0 = \frac{(A - A_{exc})}{(A_0 - A_{exc})} \times 100 \quad (II)$$

A transformação matemática que melhor se adapta a este tipo de curva é a equação de quatro parâmetros logísticos feita mediante regressão não linear, definida pela equação (III):

$$y = \frac{(A - D)}{[1 + (x / C)^B]} + D \quad (III)$$

onde y é a absorbância, x é a concentração do analito, A e D são a absorbância máxima e mínima, respectivamente, B é a inflexão da curva no ponto de inflexão e C é o valor de x no ponto de inflexão. O valor C corresponde a concentração de analito que produz uma redução de 50% da absorbância máxima e é um indicativo da sensibilidade e reprodutibilidade do método, representado por IC_{50} (GASCÓN *et al.*, 1995). A Figura 04 mostra uma curva representativa de ensaios imunológicos competitivos, com a indicação dos parâmetros característicos.

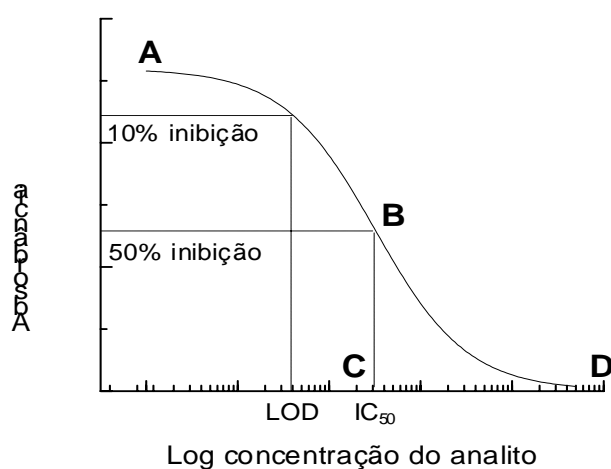


Figura 04 - Curva de calibração característica de imunoenaios competitivos, com os parâmetros provenientes do ajuste matemático com uma equação de quatro parâmetros.

O valor de IC_{50} também é utilizado para comparar diferentes curvas tanto do próprio analito como de compostos distintos, comumente denominados *cross-reactants*. Assim, pode-se determinar a reatividade cruzada (CR) de um composto que não seja o analito segundo a equação (IV):

$$\% \text{ Reatividade Cruzada} = \frac{(IC_{50} \text{ do analito})}{(IC_{50} \text{ do composto})} \times 100 \quad (IV)$$

IV.1- COLETA E EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS

As etapas de extração, purificação e caracterização das SHA foram feitas nos laboratórios do Instituto de Química de Araraquara (UNESP) e do Instituto de Química de São Carlos (USP).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções, de ácidos e bases, foram preparadas com água destilada purificada em sistema deionizador de água Milli-Q Plus Millipore, até apresentar resistividade $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25°C .

Cerca de 350 litros de água superficial foram coletados do córrego Itapitangui localizado na bacia 54 – Ribeira do Iguape, município de Iguape, litoral sul do estado de São Paulo. Após coleta, a amostra foi acidificada até pH 2,5 com HCl e armazenada em recipientes plásticos.

Para a extração das SHA foram utilizadas as resinas XAD 2 e XAD 7 (Serva Feinbiochemica GmbH & Co). Cada resina foi mantida, sob agitação mecânica, em metanol durante 24 h e em seguida lavada exaustivamente com água Milli-Q. Antes da extração, a amostra foi filtrada em papel qualitativo para remoção de sólidos e partículas suspensas. Em seguida, cerca de 330 litros de água foram passados, por gravidade, a uma vazão de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ através de colunas de vidro contendo as resinas XAD 7 e XAD 2, dispostas em série. As resinas XAD foram suspensas em água deionizada e acondicionadas em colunas de vidro, dispostas em série, formando um leito trocador de 16,0 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro interno. Foram empacotadas 6 colunas de modo a obter três sistemas extratores, cada um

contendo uma coluna com resina XAD 7 e uma com XAD 2, como mostra a Figura 05 (LARA & THOMAS, 1994).

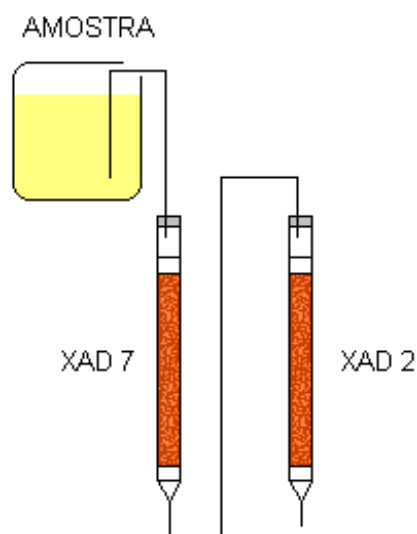


Figura 05 - Sistema de extração de SHA com resinas XAD 7 e XAD 2 dispostas em série.

O líquido efluente, em pH 2,0, foi monitorado por leituras de absorvância a 250 nm com o objetivo de estimar o momento de saturação da resina (LARA & THOMAS, 1994). Com o valor da absorvância do efluente apresentando, aproximadamente, metade do valor da absorvância da amostra bruta (medida logo após a coleta) o processo de extração foi interrompido. Antes da eluição, as resinas foram tratadas com solução de HCl 0,01 mol L⁻¹ para remoção de compostos não húmicos que pudessem ter sido retidos na coluna. Em seguida, as SHA foram extraídas com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH 13,0), com vazão de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Este extrato alcalino de SHA, foi utilizado para a obtenção das frações ácidos húmicos (AH) e ácidos fúlvicos (AF). Após o uso, as resinas XAD 7 e XAD 2 foram recuperadas por lavagens sucessivas com metanol, até

desaparecimento da coloração amarela do líquido sobrenadante. Em seguida, as resinas foram lavadas com água Milli-Q e armazenadas em metanol.

O extrato alcalino de SHA foi acidificado com solução de HCl 6,0 mol L⁻¹ até pH 1,0. Nesta etapa, ocorreu a precipitação da fração AH permanecendo em solução a fração AF. Esta mistura foi mantida em repouso por 24 h e depois foi centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. A fração insolúvel de AH, recolhida em um bequer, foi dissolvida no menor volume possível de NaOH. Cerca de 200 mL do extrato alcalino foi reservado, antes da acidificação, para a estimativa do teor de SHA na amostra bruta.

Para a purificação dos extratos SHA, AH e AF foram necessárias várias etapas utilizando-se as resinas trocadoras aniônica, tipo base forte (IRA-400), e catiônica, tipo ácido forte (IR-120), acondicionadas em colunas de vidro de 16,0 cm de altura por 2,0 cm de diâmetro interno. Todos os extratos passaram, primeiramente, pela resina aniônica e depois pela resina catiônica, a uma vazão de fluxo de 4,0 mL min⁻¹, e o material húmico retido, fisicamente foi eluído com água Milli-Q. Os efluentes húmicos foram concentrados, separadamente, em evaporador rotativo. Em seguida, foram dializados utilizando-se membranas (SEAMLESS CELL 16 X 100 CLEAR) contra água deionizada até teste negativo para cloretos (método AgNO₃) e posteriormente liofilizados (CAMPANELLA *et al.*, 1994). As membranas foram pré-tratadas com água Milli-Q a 30 °C e armazenadas em água deionizada. Depois do uso, cada resina foi recondicionada com solução a quente de KOH e H₂O₂ por 30 minutos, posteriormente lavada exaustivamente até pH neutro e conservada em soluções de KOH (IRA-400) e HCl (IR-120).

IV.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS

IV.2.1 - Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas utilizou-se mufla equipada com circulador de ar, EDGON 5P, FV-2, pesando-se 0,030 g de AH e de AF em cadinho de platina, previamente limpo com solução de HNO₃ 1:1 (v/v). As amostras foram mantidas a 800 °C por 1 h (HUFFMAN & STTUBER, 1985).

IV.2.2 - Análise elementar

A composição elementar das frações AH e AF foi determinada em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre em equipamento Perkin Elmer 240-C. Para a análise de fósforo na amostra de água foi utilizado o método colorimétrico do ácido ascórbico/molibdato. Foram preparadas soluções com 10,0 mg das amostras de AH e de AF dissolvidas em 10,0 mL de solução de H₂SO₄ 0,025 mol L⁻¹. Para AH foi necessário fazer a digestão da amostra com solução de H₂SO₄ conc./ácido salicílico, água oxigenada e aquecimento. A curva de calibração foi feita com as concentrações no intervalo de 0,2 a 3,2 mg L⁻¹ utilizando KH₂PO₄ como padrão.

IV.2.3 – Teor de substâncias húmicas aquáticas

O teor de SHA na amostra de água bruta foi estimado colorimetricamente em espectrofotômetro Hitachi U-2000. Para tal, utilizou-se uma curva padrão a partir de solução estoque preparada por dissolução de 50,0 mg de SHA, purificada, em 100 mL de água deionizada. A curva

padrão foi preparada por diluições sucessivas da solução estoque. Para efeitos de comparação, a leitura de absorbância da amostra de água bruta foi feita logo após a coleta, antes da acidificação. As soluções padrão foram ajustadas a pH 4,0 (valor próximo do original da amostra de água) e as leituras de absorbância foram feitas a 250 nm (MacCARTHY & RICE, 1985).

IV.2.4 - Determinação dos valores de pK

Este experimento foi feito por titulação potenciométrica das frações AH e AF. Para isso utilizou-se uma micro bureta semi automática, para a titulação de soluções contendo 60 mg de amostra em 30 mL de água deionizada, tendo a força iônica mantida em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com KCl. O pH inicial foi ajustado a 2,0 com solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a titulação da amostra foi feita com adição de 0,05 mL de NaOH $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ a cada 30 segundos, sob atmosfera de nitrogênio. Os resultados foram obtidos por equações de Gran modificadas.

IV.2.5 - Espectrometria na região do UV-Visível

As soluções de AH e AF foram preparadas dissolvendo-se 2,0 mg das amostras liofilizadas em 10,0 mL de solução de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros foram obtidos fazendo-se a varredura do espectro na região de 200 a 700 nm, a intervalos de 5 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico (BARROS *et al.*, 1994). Os valores de absorbância a 250 e 365 nm foram utilizados para a determinação da relação E_2/E_3 (PEURAVUORI & PIHLAJA, 1997).

IV.2.6 - Espectrometria na região do infravermelho

Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho foram preparadas pastilhas contendo 3,0 mg da amostra liofilizada e 100 mg de KBr previamente seco a 100 °C. Os espectros foram obtidos no intervalo entre 400 e 4000 cm^{-1} (MARTIN-NETO *et al.*, 1994).

IV.3 - ELISA

Todas as etapas de preparo dos reagentes biológicos, incluindo os testes ELISA foram feitos nos laboratório de Química Ambiental e Química Orgânica Biológica, do Centro de Investigación y Desarrollo, Barcelona.

IV.3.1 - Equipamentos e reagentes

Os ensaios ELISA foram feitos em placas de poliestireno com 96 cavidades de base cônica (Nunc, Maxisorb), recobertas com fitas adesivas de acetato de 8,3 x 13,3 cm. Pipetas multicanais automáticas de vários volumes, de 0,5 μL até 1000 μL , microtubos e cubetas de poliestireno foram utilizados para o preparo de soluções e transferência de volumes. Lavador de placas (SLT 96PW) e um leitor de placas (fotômetro Multiskan Plus MK II) também foram necessários.

Herbicida atrazina (6-cloro-N-etil-N-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) de alta pureza (98%), sais fosfato, carbonato e acetato foram utilizados para a preparação das soluções padrão e tampão. Os reagentes biológicos, anticorpos policlonais antiatrazina, Ab10, e o traçador (conjugado

enzimático) 2a-HRP foram preparados como descrito por GOODROW *et al.* (1990). As soluções utilizadas foram preparadas seguindo o protocolo abaixo:

Tampão fosfato, pH 7,5 (PBS 10x): dissolução de 80,0 g de NaCl, 2,0 g de KH_2PO_4 , 11,4 g de Na_2HPO_4 , 2,0 g de KCl em 100 mL de H_2O Milli-Q.

Tampão para lavagem, pH 7,5 (PBST): mistura de 50,0 mL PBS 10x, 5,0 mL Tween 20 (5%) em 445,0 mL, mantido sob refrigeração a 4 °C.

Solução de trimetilbenzidina (TMB 0,6%): dissolução de 6,0 mg de TMB em 1,0 mL de dimetilsulfóxido, mantido ao abrigo da luz.

Solução de substrato, pH 5,5: 400 μL TMB 0,6%, 100 μL H_2O_2 1% em 25 mL tampão citrato, preparado imediatamente antes de usar.

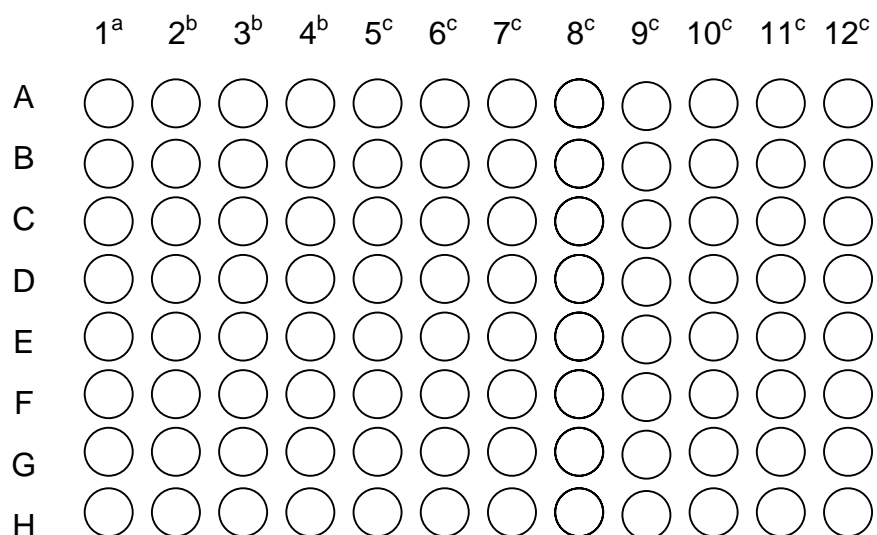
IV.3.2 - Método ELISA para análise de atrazina

A técnica imunológica empregada na determinação de atrazina, em soluções de substâncias húmicas, foi aplicada seguindo o protocolo abaixo:

- preparar a solução 1:10000 (v/v) do anticorpo, Ab10, em solução tampão de recobrimento, tampão carbonato pH 9,6;
- imobilizar o anticorpo Ab10 em placas de poliestireno por adição de 100 μL da solução de anticorpo em todas as cavidades da placa, e deixar em repouso por 4 horas a temperatura ambiente ou 15 horas a 4 °C;
- iniciar a análise com a lavagem da placa com tampão PBST para a retirada do excesso de solução de anticorpos não aderidos às paredes das cavidades da placa;

- adicionar 50 μL das amostras às cavidades da placa e manter em repouso durante 30 minutos, mantendo as placas tampadas com fitas adesivas de acetato (estéreis). Na mesma placa preencher algumas cavidades com 50 μL de soluções padrão de atrazina, de 0 a 50 nmol L^{-1} , para a curva de calibração, e com 100 μL de tampão PBST, que são os chamados “brancos”;
- após esse período, adicionar 50 μL de solução do CE 2a-HRP 1:32000 (v/v) em tampão PBST e esperar 6 minutos. Nas cavidades destinadas aos “brancos” não adicionar o CE 2a-HRP. Nesta etapa ocorre a formação do imunocomplexo (conjugado analito-enzima);
- lavar a placa com solução tampão PBST para retirar o excesso de reagentes livres. Em seguida adicionar 100 μL de solução substrato TMB. Manter a placa coberta com a fita adesiva, para evitar perda por evaporação e possível contaminação. Nessa etapa, ocorre o desenvolvimento de coloração azul, inversamente proporcional a concentração de analito;
- após 30 min, interromper a reação pela adição de 50 μL de solução de ácido sulfúrico 4 mol L^{-1} , causando mudança de coloração para amarelo. Ler as absorbâncias em um leitor de placas a 450 nm. Após analisar os dados obtidos, pelo programa computacional Genesys (Labisystems), esses fornecem as equações da curva de calibração (sigmoidal) permitindo a quantificação do analito.

A Figura 06 mostra, esquematicamente, um exemplo de distribuição de brancos, curva de calibração e amostras em uma placa de poliestireno usada para os ensaios em fase sólida, ELISA.



^a “brancos” (todos os reagentes, sem 2a-HRP); ^b curva de calibração de atrazina, em nmol L^{-1} ; ^c amostras A₁ - A₂₄, em triplicata

Figura 06 - Esquema exemplificando a distribuição dos “brancos”, curvas de calibração e amostras em ensaio tipo ELISA.

As Figuras 07 e 08 mostram o material utilizado no ensaio ELISA. Na Figura 07 pode-se observar os microtubos e a pipeta multicanal utilizados para preparação das soluções de atrazina e das amostras.

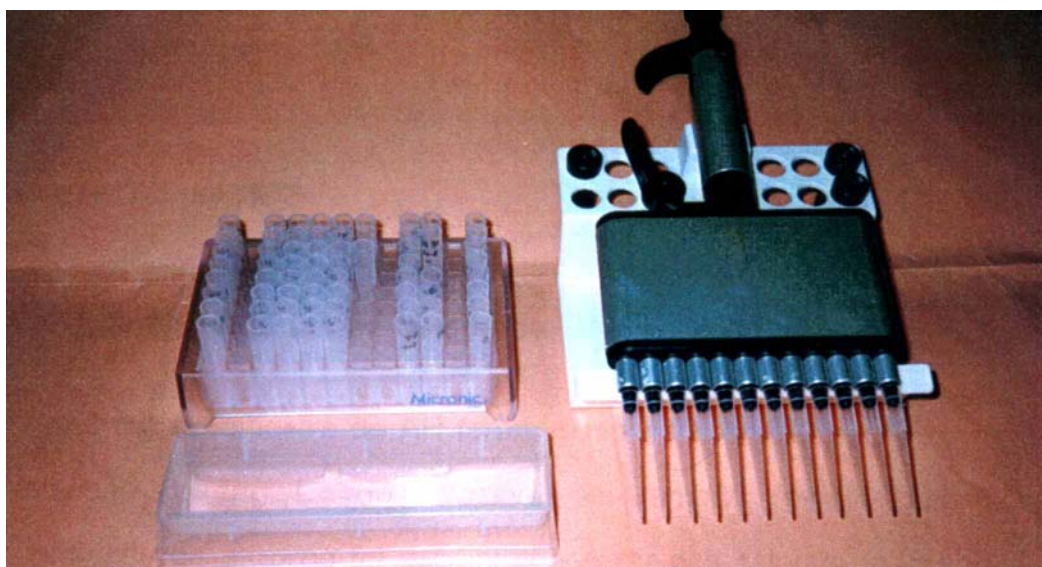


Figura 07 - Microtubos de poliestireno e pipeta de multicanal utilizados para preparação das soluções de atrazina e das amostras.

A Figura 08 mostra a placa de poliestireno na etapa final do ensaio, após a interrupção da reação com adição de H_2SO_4 produzindo coloração amarela.

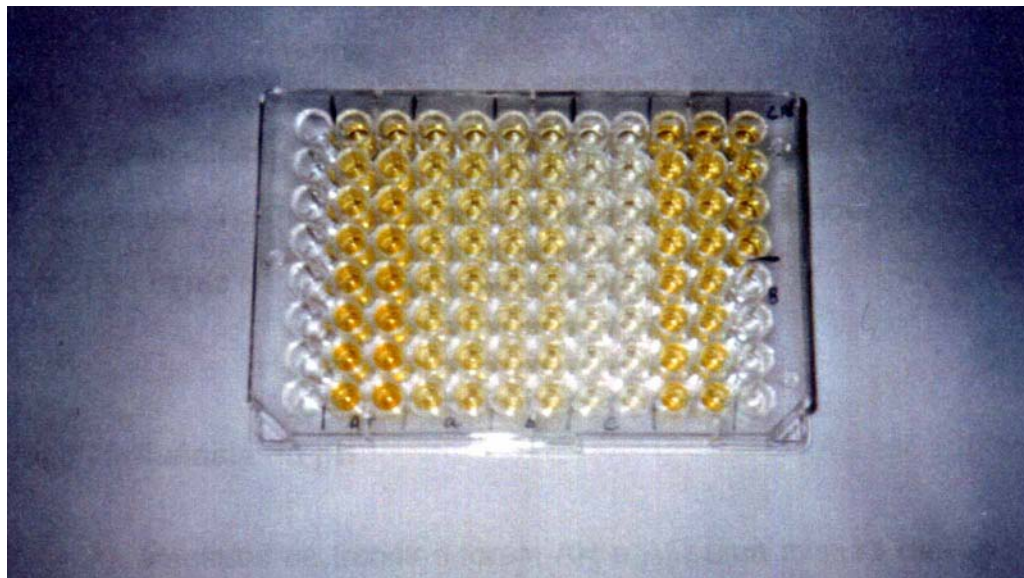


Figura 08 - Placa de poliestireno contendo as curvas de calibração, amostras e “brancos”, na etapa final do ensaio ELISA.

IV.4 - EFEITO MATRIZ

IV.4.1 - Influência do tempo de contato

2,0 mg de amostra de AH foram dissolvidos em 50 mL ($40,0 \text{ mg L}^{-1}$) de solução $0,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina, em tampão fosfato, pH 7,5. A concentração de atrazina foi escolhida a partir dos valores do intervalo de confiança obtidos em estudos prévios (GASCÓN *et al.*, 1997). Após períodos de 0, 24, 48, 120 e 192 horas de contato, sob abrigo da luz e temperatura ambiente, as concentrações do pesticida foram determinadas por testes ELISA. As análises foram feitas em triplicatas, por 3 vezes.

IV.4.2 - Influência da concentração de substâncias húmicas aquáticas

Soluções aquosas de AH e AF, purificados, foram preparadas em diferentes concentrações variando de 5,0 a 80,0 mg L⁻¹. 500 µL de cada uma destas soluções foram adicionados a 500 µL de solução padrão de atrazina em tampão PBST com concentração variando de 0 a 20,0 µg L⁻¹. Assim, obtiveram-se soluções contendo 2,5 a 40,0 mg L⁻¹ em húmicos e 0 a 10,0 µg L⁻¹ de atrazina. Todas as amostras permaneceram em repouso, ao abrigo da luz, por 24 horas antes da análise por ELISA.

IV.4.3 - Influência do pH

As amostras de trabalho foram AH e AF, uma mistura destes ácidos na proporção de 1:3 (m/m) e uma amostra de água do córrego Itapitangui. As soluções de AH, AF e AH:AF (80,0 mg L⁻¹), foram preparadas em soluções tampão PBST em pH 4,0, 7,5 e 9,0. A amostra de água foi utilizada em pH 3,8 (pH original do córrego Itapitangui) e pH 9,0 ajustado com solução diluída de NaOH. Em ambos os casos, as amostras de água não passaram por nenhum outro tratamento. Todas as amostras foram fortificadas com soluções de atrazina, em pH 4,0, 7,5 e 9,0, de modo a obter as mesmas concentrações, do pesticida, como no experimento anterior.

IV.4.4 - Influência da luz solar

Amostras de AF, foram fortificadas com solução estoque de atrazina de maneira a obter concentração de 10,0 µg L⁻¹ do herbicida. Solução de atrazina a 10,0 µg L⁻¹, solução de AF a 40,0 mg L⁻¹ e solução de AF a 40,0 mg L⁻¹ com atrazina, 10,0 µg L⁻¹, foram preparadas em pH 4,0. Alíquotas de

igual volume destas soluções foram colocadas em frascos Pirex. Em seguida uma série foi exposta às condições ambientais e outra série foi armazenada sob refrigeração, ao abrigo da luz solar.

Durante 15 dias, foram retiradas alíquotas de todas as amostras para a quantificação de atrazina por ELISA. As amostras analisadas por ELISA foram diluídas 1000 vezes com PBST, a fim de ajustar a concentração da atrazina ao intervalo de confiança, dentro da curva de calibração.

Outra série de soluções de AF e atrazina foi preparada a 40,0 mg L⁻¹ de AF e 30,0 mg L⁻¹ de atrazina para os experimentos de leituras de absorvância na região do UV-VIS e infravermelho. Estas soluções foram tratadas da mesma maneira que as soluções utilizadas para o experimento com ELISA. A cada 5 dias eram retiradas alíquotas de 100,0 mL para leituras de UV-VIS. Após liofilização, foram feitos os espectros na região do infravermelho.

V.1 - EXTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS

O método de extração por resinas XAD é o mais adequado quando se trata do processamento de grandes volumes de amostra, por ser de fácil manuseio e baixo custo. Apesar disso, apresenta alguns inconvenientes, como a liberação de produtos oriundos do processo de fabricação da resina e adsorção irreversível, podendo causar alterações na amostra. O processo de ultrafiltração, também adequado a grandes volumes de amostra, pode causar a retenção de metais e interação da amostra com as membranas do sistema, além de entupimentos e vazamentos constantes.

A concentração de SHA por liofilização é um método brando, porém lento e não adequado para o processamento de grandes volumes de amostra. Além disso, todos os solutos são concentrados dificultando a eliminação de sais após a secagem da amostra. Outro método de extração é coprecipitação das SHA com sais metálicos como CaCO_3 , Mg(OH)_2 , Fe(OH)_3 , $\text{Pb(NO}_3)_2$ e FeCl_3 . É um método de baixo custo, eficiente para águas com altos teores de COD, mas de difícil remoção das impurezas (sais), não é quantitativo e impraticável para grandes volumes (AIKEN, 1988).

O procedimento de coleta e armazenamento da amostra foi feito seguindo as recomendações da International Humic Substances Society (IHSS) (MALCOLM & THURMAN, 1983). A amostra foi acidificada a pH 2,5, com solução de HCl $6,0 \text{ mol L}^{-1}$, imediatamente após a coleta a fim de prevenir a precipitação de hidróxidos metálicos. A filtração da amostra em papel de filtro reteve material suspenso, como folhas e insetos, evitando obstruções no sistema extrator.

O processo de extração em série permitiu que a maior parte do carbono orgânico dissolvido fosse absorvido nas resinas XAD 7 (fração hidrofóbica) e XAD 2 (fração hidrofílica) (LARA & THOMAS, 1994). Dessa maneira, cerca de 330 litros de amostra foram passados pelas resinas obtendo-se 5,5 litros de extrato alcalino de SHA, com um fator de concentração de 60 vezes.

Os valores de absorvância do líquido efluente foram utilizados como indicativo de saturação da resina, por comparação com os valores de absorvância da amostra bruta. Outro indicativo de saturação foi o escurecimento dos grãos da resina XAD causado pela adsorção da matéria orgânica presente na amostra de água. A Tabela 03 mostra um exemplo de monitoramento do líquido efluente por leituras de absorvância.

Tabela 03 - Valores de absorvância da amostra bruta e das alíquotas efluentes, das colunas contendo resinas XAD 7 e XAD 2, a 250 nm em função do tempo de percolação.

Tempo de percolação (horas)	Absorvância
0 (amostra bruta)	2,38
24	0,34
48	0,36
72	0,57
80	1,18

O fracionamento das SHA em AH e AF, feito com base na solubilidade destes compostos, permitiu a separação dos ácidos húmicos (insolúveis em meio ácido) e fúlvicos (solúveis em todo intervalo de pH).

Apesar de ser um método muito utilizado, o uso de solução HCl, apresenta alguns inconvenientes como o aumento excessivo de acidez e a formação de grande quantidade de cloreto de sódio. A presença de sais interfere na pesagem das amostras, levando ao cálculo incorreto de rendimento. Além disso, o excesso de acidez dificulta a secagem da amostra por liofilização. Por tais motivos e mais a presença de metais, originalmente presentes na amostra de água bruta, foi necessário purificar as frações húmicas.

Para a retirada de metais e ânions das frações húmicas foram utilizadas as resinas IR-120 e IRA-400 que possuem alta capacidade de troca em amplo intervalo de pH. As resinas trocadoras são bastante utilizadas em processos de concentração e/ou separação de cátions e ânions. Existem no mercado várias resinas de diferentes materiais e grupos funcionais trocadores para os mais variados fins. Por exemplo, o trocador aniônico DEAE-celulose (grupos dietilaminoetil), é muito utilizado para separação e purificação de proteínas, enzimas e outras macromoléculas; resina carboximetilcelulose (CMC) usada como um trocador catiônico ácido fraco e tem uma alta capacidade para proteínas básicas ou neutras (KHYM, 1974).

Apesar de eficiente, o processo de purificação de AH e AF com resinas trocadoras não garante a remoção total de cloreto de sódio, devido a alta concentração destes íons, provenientes da etapa de extração com NaOH e de precipitação com adição de solução de HCl. Uma solução para tal problema, é a diálise do material contra água deionizada. A eficiência da diálise, em minimizar os interferentes, pode ser comprovada pela ausência de cristais de cloreto de sódio e pela qualidade do resíduo (amostra) após a secagem.

A quantidade de AF obtida foi 3 vezes maior que a de AH, sendo 14,0 e 4,0 g, respectivamente. Este resultado está de acordo com a literatura, a qual cita a maior parte das SH em águas naturais correspondendo aos ácidos fúlvicos (SENESI, 1993).

V.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS

V.2.1 - Teor de cinzas

Sendo as SHA extraídas de águas que contêm de 10 a 100 vezes mais matéria inorgânica que orgânica, o conteúdo de cinzas é função do processo de extração. No caso de materiais heterogêneos como as SH, o teor de cinzas é geralmente utilizado como um indicativo do conteúdo de compostos inorgânicos ou grau de pureza.

Entretanto, existe um grande número de fatores que influenciam nos valores obtidos, como por exemplo a presença de complexos de cálcio e magnésio (calcinação) e sílica pode elevar os valores dos resultados. Provavelmente, parte da sílica que não foi extraída com NaOH, encontra-se ligada ao ácido húmico devido ao seu tamanho coloidal (BENEDETTI, 1996; WERSHAW, 1986). Este fato pode explicar o teor de cinzas mais elevado para AH, 4,51%, em relação ao AF, 3,60%. Também a presença de compostos de fósforo, nem sempre volatilizados durante a queima, podem estar incluídos nas cinzas (HUFFMAN & STUBER, 1985).

V.2.2 - Análise elementar

Embora bastante utilizada na caracterização das SH, a análise elementar não fornece muitas informações sobre a estrutura das SH. É um recurso auxiliar que permite comparações entre classes e origens de diferentes materiais húmicos, além de avaliar a eficiência da extração e da purificação das SH obtidas (HUFFMAN & STUBER, 1985). A determinação da composição elementar do material húmico é útil na estimativa do conteúdo de grupos funcionais oxigenados. Estes grupos são tidos como os responsáveis pelas interações das substâncias húmicas com compostos orgânicos e inorgânicos.

A complexação de cátions e ânions, por exemplo, fosfatos, por SH leva a um decréscimo da toxicidade de certos metais para os microorganismos. Este mecanismo de interação entre SH e compostos de fósforo, ainda hoje não é completamente compreendido (THURMAN, 1985b). As concentrações de fósforo das frações AH e AF estão de acordo com os valores encontrados na literatura, ou seja, estão em baixas concentrações (MacCARTHY & SUFFET, 1987), como mostra a Tabela 04.

Os valores encontrados para a composição elementar, teor de cinzas e fósforo nas frações AH e AF, bem como dados citados na literatura encontram-se na Tabela 04.

Tabela 04 - Valores percentuais da composição elementar, teor de cinzas e fósforo das frações AH e AF e exemplos da literatura.

Amostra	C	H	O	N	Fósforo	Cinzas	H/C	C/N
AH	43,18	3,74	44,02	1,05	0,02	4,51	1:1	41:1
AF	38,77	5,36	47,12	0,96	0,35	3,60	1,7:1	40:1
AFCC ^a	42,40	5,32	43,61	0,76	0,01	0,74	1,5:1	56:1
AHSR ^a	51,81	4,46	42,49	0,91	0,009	0,05	1:1	57:1
AH ^b	50,5	4,70	39,60	2,0	--	5,10	1:1	25:1

^aAFCC (ácido fúlvico; MILLS *et al.*, 1997), ^bAH (ácido húmico; THURMAN, 1985a)

As razões H/C e C/N podem fornecer indícios das estruturas e fórmulas moleculares das substâncias húmicas (STEELINK, 1985). O conteúdo de hidrogênio está relacionado com o grau de saturação, isto é, um aumento no teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos (CH₂) que carbonos aromáticos (C=C) (TRAINA *et al.*, 1990). Por exemplo, uma razão H/C de 2:1 indica carbonos de caracter alifático, enquanto uma razão de 1:1 indica grau de insaturação tal como C=C, C=O, C=N ou a formação de estruturas cíclicas. Com os valores da Tabela 04 tem-se a razão H/C de 1:1 para AH e 1,7:1 para AF, indicando que a fração AH apresenta caracter aromático algo maior que a fração AF.

O conteúdo de nitrogênio dos ácidos húmicos, em geral, é de até 2 vezes mais que em ácidos fúlvicos, sendo que somente em substâncias húmicas de pântanos essa relação é inversa (THURMAN, 1985a). Razões típicas de C/N para SHA, são de 45 a 55:1 para AH e de 18 a 30:1 para AF. Entretanto, valores mais baixos podem ser encontrados como os vistos na Tabela 04. Esses valores são maiores em SH aquáticas que SH de solos devido a inúmeros mecanismos, incluindo adsorção de matéria orgânica

contendo nitrogênio por argilas e precipitação de compostos orgânicos de nitrogênio.

V.2.3 - Teor de substâncias húmicas aquáticas

As águas do córrego Itapitangui apresentam coloração amarelo escuro e pH 3,8. Estas propriedades são características de águas com altos teores de matéria orgânica. Os valores de absorbância UV-VIS, apresentados na Figura 08, mostram que é possível fazer uma estimativa do teor de SHA presentes na amostra bruta, pois a curva de calibração segue a lei de Beer. Assim, um valor de absorbância de 2,38 a 250 nm, indica um teor de SHA cerca de 35 mg L⁻¹.

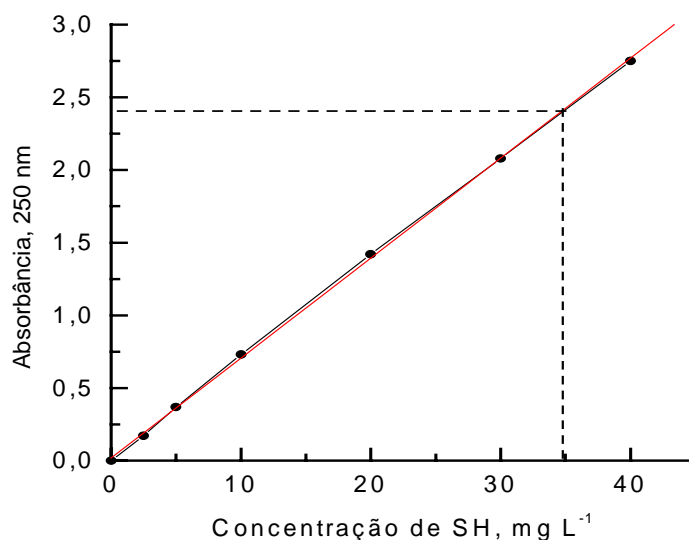


Figura 08 - Curva de calibração para estimativa da concentração do teor de SHA na amostra de água original (pH 4,0).

V.2.4 - Determinação dos valores de pK

Na estrutura das SHA os grupos funcionais oxigenados mais abundantes em são os carboxílicos, hidroxilas, carbonilas e hidroxilas fenólicas, sendo a soma de carboxílicos e hidroxilas fenólicas denominada de acidez total (ALEIXO *et al.*, 1992). O conteúdo de grupos carboxílicos varia com o sistema aquático, ou seja, em condições redutoras as SHA se oxidam lentamente perdendo parte desses grupamentos. Em geral, SHA contêm um grupo carboxílico para cada doze átomos de carbono. A fração AH apresenta cerca de 20% menos carboxílicos que os AF, em um mesmo ambiente, e por esse motivo é menos solúvel e precipita em condições ácidas (PEURAVUORI, 1992).

O teor de acidez da matéria orgânica dissolvida tem importantes efeitos sobre o pH e biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos e sua determinação auxilia na previsão das consequências de contaminação por metais (CABANISS, 1991). Assim, a habilidade das SH em complexar tanto orgânicos como inorgânicos é proporcional à sua capacidade complexante (CC), que pode ser definida como a quantidade máxima de metal complexado por grama de SH. A CC de SH pode ser estimada por potenciometria, FTIR, RMN etc. (CABANISS, 1991).

Na literatura, encontram-se algumas contradições em relação ao estabelecimento da CC de SH. Na teoria, a CC não varia com o pH, força iônica etc., mas alguns estudos mostram que a CC aumenta com o pH e concentração de húmicos, diminui com a força iônica e é dependente do tipo de metal adicionado. A hipótese mais aceita é que a CC de SH é equivalente a acidez total, ou seja, ao número de hidrogênios trocáveis e que a extensão dessa CC é função dos parâmetros acima citados (PERDUE, 1988)

A titulação potenciométrica tem sido empregada no estudo de substâncias húmicas por vários pesquisadores, tanto para a determinação de grupos funcionais ácidos, como para estudar a interação com metais (PERDUE, 1988). As curvas de titulação geralmente são sigmoidais sugerindo um aparente carácter monobásico. Isto é devido aos diferentes grupos funcionais COOH e OH fenólicos apresentarem dissociações de próton justapostas. O uso das funções de Gran modificadas em linearização de curvas de titulações potenciométricas ácido-base possibilitam a determinação da concentração e pK de cada tipo de grupamento ácido na macromolécula húmica (GOMEZ *et al.*, 1991).

As funções de Gran modificadas são aplicadas nas determinações dos pontos de equivalência e constantes de ionização de cada função ácida em titulação potenciométrica de mistura de ácidos. Este método está baseado na segmentação e linearização da curva de titulação. As funções de Gran modificadas são definidas pelas equações V a VIII:

- Ácido forte (HAo):

$$F_{HAo} = V_{HAo} C_b - V C_b \quad (V)$$

$$F_{HAo} = ([H^+] - [OH^-]) (V_o+V) - \sum_{n=1}^N (V_{AHn} - V_{AH(n-1)}) C_b (K_{HAN} / (K_{HAN} + [H^+])) \quad (VI)$$

- Ácidos fracos (HAN):

$$F_{HAN} = V_{HAN} K_{HAN} - V K_{HAN} \quad (VII)$$

$$F_{HAN} = ([H^+] - [OH^-]) (V_o+V) (K_{HAN} + [H^+] / C_b) + [(V - V_{HAo}) [H^+] +$$

$$[(V_{HA(n-1)} - V_{HAo}) K_{HAN}] - \left\{ \left[\sum_{j=1, n>1}^{n-1} (V_{AHj} - V_{AH(j-1)}) (K_{AHj} / (K_{AHj} + [H^+])) \right] \right\} +$$

$$\left[\sum_{j=n+1}^N (V_{AHj} - V_{AH(j-1)}) (K_{AHj} / (K_{AHj} + [H^+])) \right] (K_{HAN} + [H^+]) \quad (VIII)$$

onde : V_0 = volume inicial;

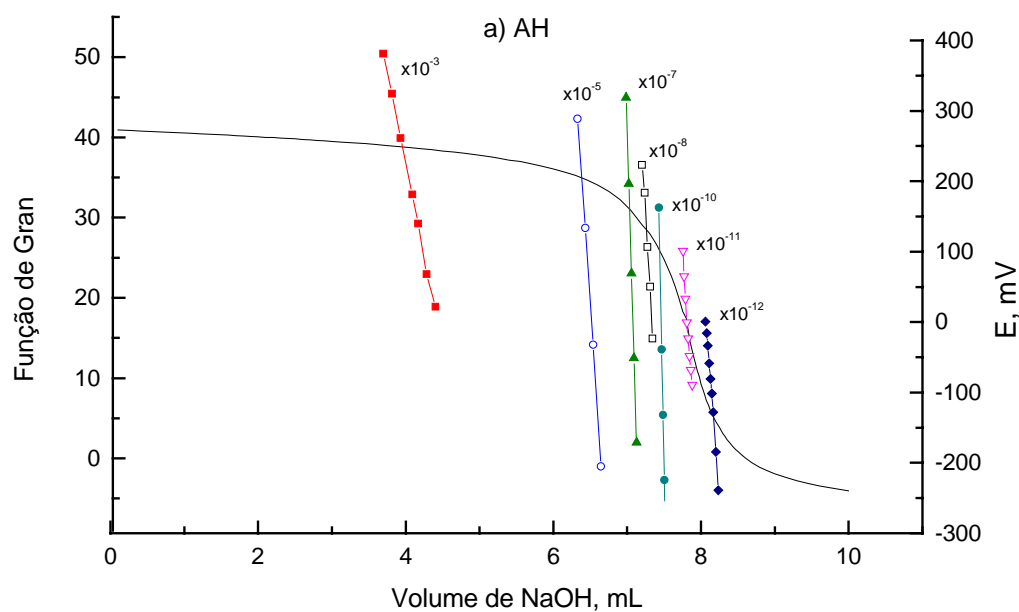
C_b = concentração da base;

K_{HA} = constante de ionização;

V_{HA} = volume de equivalente;

V_{HAj} e K_{HAj} têm significado análogos aos termos V_{HA} e K_{HA}

A utilização de programas computacionais de planilhas de cálculos com geração simultânea de gráficos possibilita melhor resolução desse cálculo iterativo. Neste trabalho, as funções de Gran modificadas foram estendidas utilizando o programa Microsoft Excel, versão 7.0, e aplicadas à titulação potenciométrica dos ácidos húmicos e fúlvicos, cujas curvas são mostradas na Figura 09 a) e b).



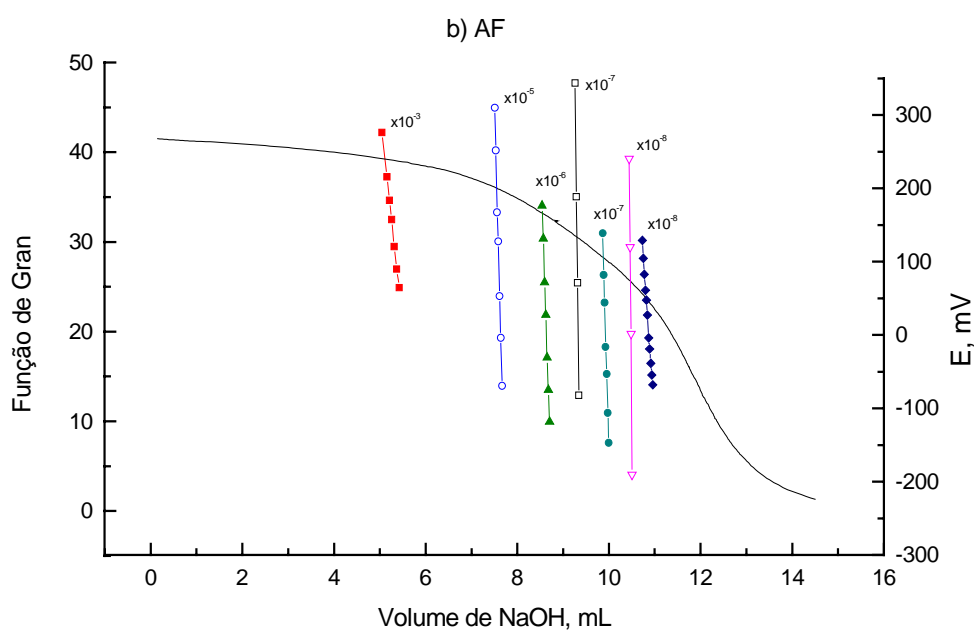


Figura 09 - Curvas de titulação potenciométrica a) ácido húmico; b) ácido fúlvico ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de amostra, NaOH $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, força iônica $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, atmosfera de nitrogênio).

Os valores da Tabela 05, obtidos a partir das curvas mostradas na Figura 09 a) e b), revelam para o AH um teor de $5,42 \text{ meq g}^{-1}$ de grupos carboxílicos representando 64% do total de grupos ionizáveis, enquanto para o AF este valor é de $6,0 \text{ meq g}^{-1}$ e representa 75%. O teor de grupamentos fenólicos do AH é cerca de metade do apresentado pelo AF. Já para os grupos, aminas totais quase não há diferença entre os valores encontrados para AF e AH. Estes valores podem ser relacionados com os da Tabela 04 onde a relação H/C e O/C para o AF revelam o carácter alifático, provavelmente devido a presença de maior quantidade de carboidratos.

Tabela 05 - Valores de pK e porcentagens de grupos funcionais, determinados por potenciometria, presentes nas frações AH e AF.

Amostra	Grupos ácidos	pK	meq g ⁻¹	% de grupos
AH		3,04		32
	Carboxílicos	4,66	5,42	21
		5,94		14
	Aminas 2 ^a ou 3 ^a	7,47	1,6	7
		8,92		13
	Grupos fenólicos	10,07	0,32	4
AF		3,55		42
	Carboxílicos	5,48	6,0	20
		7,44		13
	Aminas 2 ^a ou 3 ^a	8,60	1,3	10
		9,92		11
	Grupos fenólicos	10,79	0,6	12
AH ^a		2,64–	--	--
		10,23		

^a amostra de AH (GOMEZ *et al.*, 1991)

V.2.5 - Espectrometria na região do UV-Visível

Em muitos casos, a espectrometria UV-Visível é uma técnica valiosa na identificação de grupos funcionais cromóforos, uma vez que alguns compostos presentes nas SH absorvem fortemente abaixo de 280 nm. Este comprimento de onda não representa a absorbância máxima das SH, mas é onde ocorrem as transições eletrônicas do tipo $\pi - \pi$, características de compostos como ácidos benzóicos, derivados de anilina e outros correlatos

que são sub unidades da estrutura das SH. Entretanto, considerando a natureza complexa das substâncias húmicas essa técnica é limitada, pois não possibilita medir ou caracterizar um cromóforo em particular obtendo informações sobre a sua composição química. O que se observa é a sobreposição de absorbâncias de vários grupos funcionais (STEVENSON, 1982).

Apesar das limitações, de acordo com alguns autores, essa técnica pode ser aplicada para estimar o grau de humificação em solos (condensação) utilizando para isso, a relação E_4/E_6 , ou seja, a relação entre as absorbâncias a 465 e 665 nm (CHEN *et al.*, 1977). Em geral, um processo de humificação progressivo é indicado pela diminuição dos valores dessa relação que parece ser mais adequada para SH de solos, já que SHA apresentam absorbâncias muito baixas nessa região. Assim, há proposta que para as SHA, seja utilizada a relação E_2/E_3 , absorbâncias a 250 e 365 nm, segundo a equação IX:

$$\text{Aromaticidade} = 52,5 - 6,78 \cdot E_2/E_3, \quad r^2 = 0,71 \quad (\text{IX})$$

sugerindo uma relação inversamente proporcional entre E_2/E_3 e aromaticidade e tamanho da molécula (PEURAVUORI & PIHLAJA, 1997).

Ainda segundo PEURAVUORI & PIHLAJA (1997), as propriedades espectrométricas das SH na região do UV-VIS são uma ferramenta útil na estimativa da aromaticidade (humificação). Para tal, correlacionaram aromaticidade e tamanho molecular, obtidos por RMN e cromatografia de exclusão, com a absorvidade molar de SHA. Mesmo o coeficiente de correlação não sendo muito bom, ($r^2 = 0,84$) foi possível notar que a quantidade de unidades aromáticas aumentou com o aumento do tamanho molecular.

A Figura 10 mostra os espectros UV-VIS das frações AH e AF onde observa-se uma pequena diferença na forma da curva referente à fração AH na região entre 200 e 230 nm. Este comportamento pode ser atribuído às diferenças estruturais entre as frações, ou seja, os AF apresentam estrutura linear com maior número de cadeias alifáticas e AH apresenta menor caracter alifático com alto grau de condensação. Isto parece ser comprovado pelos valores encontrados de E_2/E_3 de 2,70 para AH e 3,30 para AF, concordantes com os valores citados na literatura, nas quais constam a relação E_2/E_3 para AH de águas superficiais como menor que AF. Apesar de serem próximos, o valor mais alto para AF indicaria um menor grau de condensação aromática e, conseqüentemente a presença de mais estruturas alifáticas e de cadeias menores (THURMAN, 1985b).

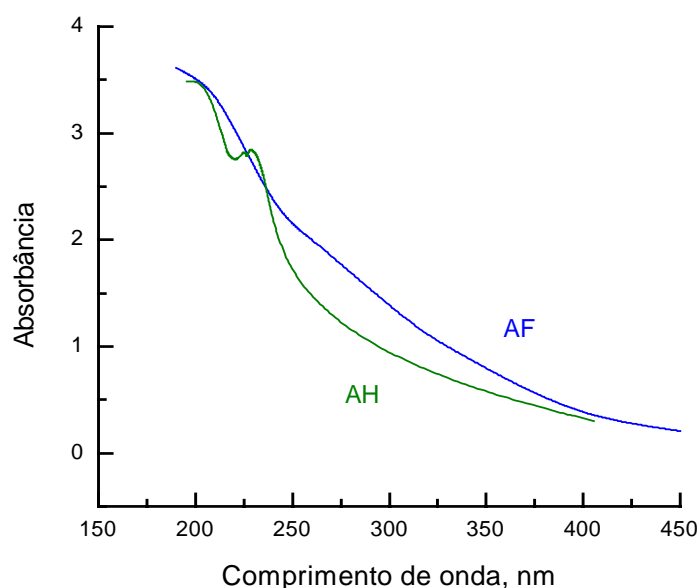


Figura 10 - Espectros na região UV-VIS das frações AH e AF ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ em solução de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0).

V.2.6 - Espectrometria na região do infravermelho

À primeira vista, os espectros de SH são relativamente simples com poucas bandas largas. Essa simplicidade é mais aparente que real por que a largura dessas bandas é resultado da sobreposição das bandas de absorção dos constituintes individuais da mistura heterogênea de grupos que constituem as SH. Além disso, nas SH, um tipo particular de grupo funcional pode existir em ambientes diferentes, cada um caracterizado por diferentes forças de ligação. Apesar da pequena diferença entre os espectros de SH de diferentes origens, isto não significa que todos tenham a mesma estrutura (ABBT-BRAUN, 1992).

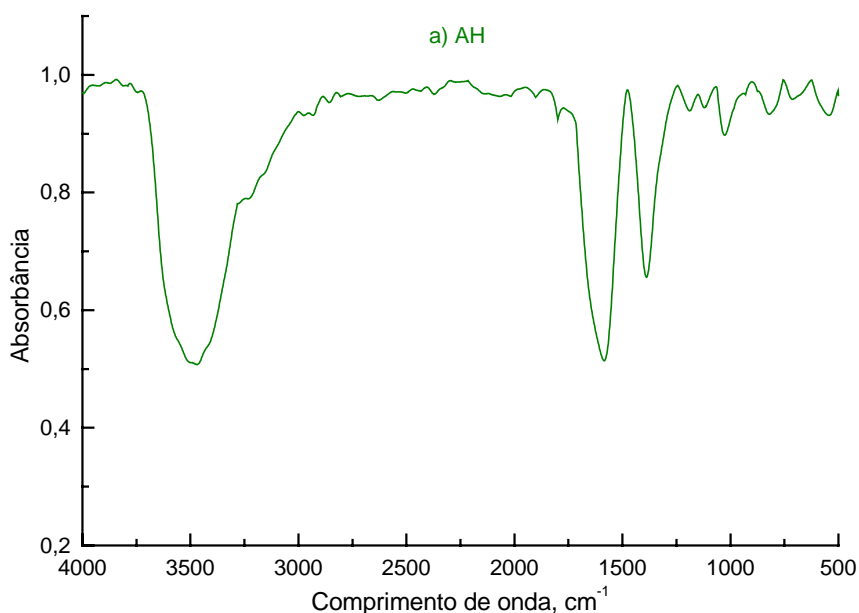
A Figura 11 a) e b) mostra os espectros dos AH e AF. Em ambos, observa-se uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} devido ao estiramento OH provavelmente em ligação por ponte de hidrogênio. Essa banda se encontra mais próxima da região característica de OH de álcoois e fenóis que de ácidos carboxílicos. As bandas em $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ são observadas nos espectros da maioria das SH, usualmente superpostas à banda larga de estiramento O-H. Estas bandas são atribuídas ao estiramento C-H dos grupos metil ou metileno alifáticos.

Na região de 1720 cm^{-1} , somente no espectro de AF, observam-se as bandas características de estiramento C=O de grupos carboxílicos, que provavelmente encontram-se conjugados. A ausência dessas bandas no espectro de AH pode ser explicada pela intensificação das bandas em ~ 1600 e 1400 cm^{-1} , indicando mudanças estruturais, principalmente neutralização dos grupos carboxílicos. Tal fato pode ter ocorrido durante a etapa de ajuste de pH pela adição de NaOH. A presença das bandas em

1720 cm^{-1} tem sido relacionada com a capacidade de troca da SH (CABANISS, 1991).

As bandas em $\sim 1500 \text{ cm}^{-1}$, presentes somente no espectro de AH, indica o caracter aromático do AH. Isto por que estas bandas são atribuídas ao estiramento C=C do anel, isto é, às vibrações de anel aromático conjugado com C=O e/ou COO^- . Podem também serem devidas ao estiramento anti-simétrico do grupo carboxilato e ao estiramento C=O do grupo COOH, devido ao hidrogênio ligado a grupo OH em posição orto, como no ácido salicílico.

Entre 1380 e 1440 cm^{-1} notam-se bandas devido a grupos C-H alifáticos e vibração O-H de álcoois ou ácidos carboxílicos. No caso do AF a banda em 1237 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-O de COOH e ao estiramento C-O de éteres.



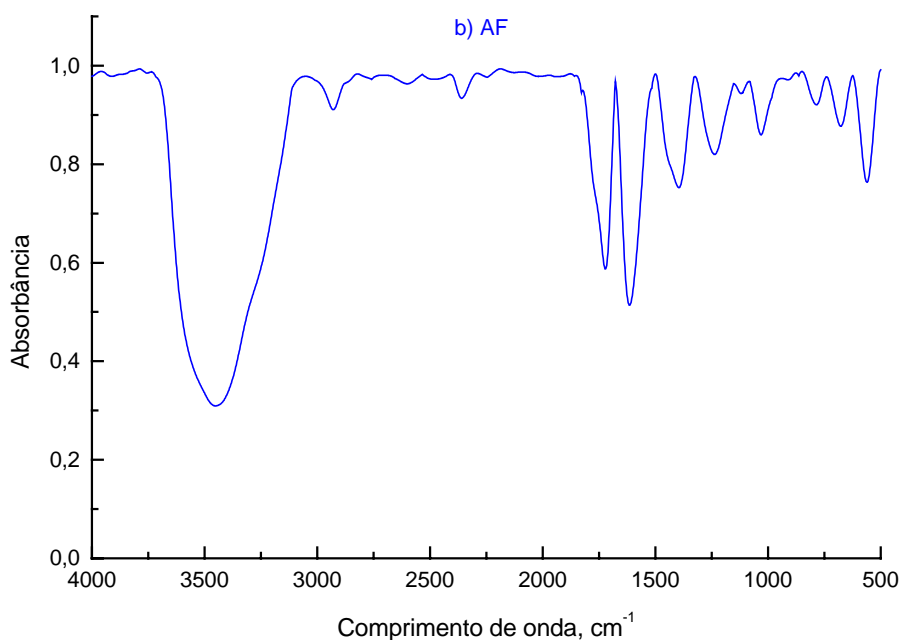


Figura 11 - Espectros na região do infravermelho a) AH e b) AF (3 mg de amostra em 100 mg de KBr, pH 4,0).

Comparando-se os espectros de AH e AF pode-se notar que algumas bandas presentes somente no espectro de AH, como aquelas na região de 3200 e 1500 cm^{-1} que são bandas características de compostos aromáticos. No espectro de AF observam-se bandas em 2900 e 1380 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos, confirmando a menor aromaticidade do AF. A banda na região de 1200 cm^{-1} pode ser devida a maior quantidade de grupamentos fenólicos, também revelada na determinação do teor de grupos funcionais (Tabela 05).

A Tabela 06 lista os comprimentos de onda das bandas de absorção mais características das SHA.

Tabela 06 - Comprimento de onda das principais bandas de absorção das frações AH e AF.

Comprimento de onda, cm^{-1}	Atribuições
3400	H, ligado a OH
3200	C-H aromáticos
2920 – 2860	C-H alifáticos
1720	C=O, COOH
1614	C=C conjugado a C=O, C=N
1580	C=C aromático, NH_3
1380	C-H alifáticos, OH álcoois e ácidos
1240	C-O álcoois e fenóis

V.3 - EFEITO MATRIZ

A obtenção de anticorpos específicos, de grande afinidade, para moléculas de baixo peso molecular como a atrazina é baseada na seleção do hapteno apropriado a ser utilizado na preparação das substâncias imunogênicas. Esta etapa é fundamental, pois dela dependem as propriedades dos anticorpos determinadas pela estrutura do hapteno.

Assim, na escolha do hapteno deve-se considerar a conservação da estrutura química e conformação espacial da molécula. Depois de selecionado, o hapteno será ligado a uma proteína transportadora, que por sua vez depende do animal a ser inoculado. Quanto mais diferente (estranha) for essa proteína das proteínas encontradas no animal, melhor será a resposta imunológica. A Figura 12 mostra um esquema simplificado de obtenção dos reagentes biológicos utilizados neste trabalho.

VI - CONCLUSÕES

A extração de SHA por adsorção em resinas XAD possibilitou trabalhar com grande volume de amostra, necessário para obter uma quantidade suficiente de material húmico utilizado no desenvolvimento do trabalho.

A determinação espectrofotométrica do teor de SHA presentes na amostra de água original, indicou que as águas do córrego Itapitangui são ricas em material orgânico, com cerca de 35 mg L^{-1} e apropriadas para o estudo desenvolvido.

A determinação da composição elementar mostrou resultados similares aos valores da literatura. Isto pode ser um indicativo que não ocorreu alterações significativas na composição da amostra durante o processo de extração.

Os baixos teores de cinzas para as frações AH e AF indicam que a inclusão da diálise no processo de purificação, embora laborioso, foi eficiente na remoção de impurezas.

A espectrometria UV-VIS forneceu dados úteis sobre a estrutura das substâncias húmicas, como por exemplo, a estimativa do teor de SHA na amostra original. Os valores encontrados para a relação das absorvâncias a 265 nm e 365 nm, E_2/E_3 , de 2,70 para a fração AH e 3,30 para AF, indicam que AH apresenta maior número de grupos aromáticos em relação a AF, que em geral possui mais cadeias alifáticas.

Em geral, a análise de pesticidas em águas contendo altos teores de material orgânico, particularmente substâncias húmicas, apresenta dificuldade adicional devido ao efeito matriz. Assim, as técnicas imunológicas podem ser uma boa alternativa para a determinação de atrazina em águas naturais, mesmo na presença de matéria orgânica.

Neste trabalho, a aplicação da técnica ELISA foi avaliada quanto ao efeito matriz causado pelas SHA. Tal efeito, pode ser notado pela perda de sensibilidade da técnica, representada pelos valores de IC_{50} . O aumento do valor IC_{50} de 60 ng L^{-1} , na ausência de SHA, para 112 ng L^{-1} em concentrações acima de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de material húmico indica perda de sensibilidade da técnica. O pH original da amostra de 3,8 também aumentou os valores de IC_{50} , para 137 ng L^{-1} .

Assim, as SHA influenciaram na determinação de atrazina, quando presentes em altas concentrações ($> 10,0 \text{ mg L}^{-1}$), superestimando a concentração do analito. Entretanto, este efeito só foi caracterizado em baixas concentrações de atrazina ($< 47,0 \text{ ng L}^{-1}$) e baixos valores de pH ($\text{pH} \leq 4,0$). A influência do pH pode ser devido à limitação desse método ELISA que apresenta melhores resultados em pH entre 7,0 e 9,0.

A luz solar aumentou a velocidade de degradação da atrazina na presença de substâncias húmicas, sendo que após 30 dias de exposição encontrou-se 34% da concentração inicial de atrazina. A presença de metabólitos, como por exemplo, a hidroxiatrazina pode ser comprovada pelo desaparecimento do pico da atrazina, em 220 nm, com aparecimento de um pico de absorção máxima em 240 nm, característico de hidroxiatrazina.

Assim, pode-se dizer que a quantidade de material húmico presente na amostra de água foi a principal fonte de erro na análise de atrazina,

levando à interações não-específicas entre as SHA e os reagentes enzimáticos.

As análises de atrazina podem ser feitas diretamente nas amostras de águas contendo material húmico ($< 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ extraído pelas XAD 7 e 2), sem necessidade de etapas preliminares. O ajuste em pH 7,0 - 9,0 e diluição adequada da amostra, até cerca de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de SHA são suficientes para minimizar o efeito matriz.

- ABBT-BRAUN, G. Spectroscopic characterization of humic substances in the ultraviolet and visible region and by infrared spectroscopy. In: MATTHESS, G.; FRIMMEL, F.H.; HIRSCH, P.; SCHULS, H.D.; USDOWSKI, E. eds.. **Progress in hidrogeochemistry**. Berlin, Springer-Verlag, 1992. p.29-35.
- ACHARD, F.K. (1786). Crell's Chem. Ann., v. 2, p. 391. *Apud* STEVENSON, F.J. Extraction, fractionation, and general chemical composition of soil organic matter. In: STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition and reactions**. New York, Wiley & Sons, 1982. p.26-53.
- AGA, D.S.; THURMAN, E.M. Environmental immunoassays: alternative techniques for soil and water analysis. In: AGA, D.S.; THURMAN, E.M. **Immunochemical technology for environmental applications**. Washington, 1996. v.657, p.1-21.
- AGA, D.S.; THURMAN, E.M.; POMES, M.L. Determination of alachlor and its sulfonic acid metabolite in water by solid-phase extraction and enzyme-linked immunosorbent assays. **Analytical Chemistry**, v.66, p.1495-1501, 1994.
- AIKEN, G.R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. In: AIKEN, G.R.; MACKNIGHT, M.D.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. eds.. **Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization**. New York, John Wiley & Sons, 1985. p.363-85.
- AIKEN, G.R. A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances. In: FRIMMEL, F.H.; CHRISTMAN, R.F. **Humic substances and their role in the environment**. New York, John Wiley & Sons, 1988. p.15-32.

- ALEIXO, L.M.; GODINHO, O.E.S.; COSTA, W.F. Potentiometric study of acid-base properties of humic acid using linear functions for treatment of titration data. **Analytica Chimica Acta**, v.257, p.35-9, 1992.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy metal in soils**. New York, John Wiley & Sons, 1993.
- ASTER, B.; BURBA, P.; BROEKAERT, J.A.C. Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.354, p.722-8, 1996.
- BALLESTEROS, B.; BARCELÓ, D.; SANCHEZ-BAEZA, F.; CAMPS, F.; MARCO, M-P. Influence of the hapten design on the development of a competitive ELISA for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051 at trace levels. **Analytical Chemistry**, v.70, p.4004-14, 1998.
- BARCELÓ, D. Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. **Analyst**, v.116, p.681-9, 1991.
- BARCELÓ, D. Official methods of analysis of priority pesticides in water using gas chromatographic techniques. In: BARCELÓ, D., ed. **Environmental analysis**. Techniques, applications and quality assurance. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V., 1993. p.149-180.
- BARROS, M.C.P.; PAULA, J.R.; RESENDE, M.O.O. Caracterização físico-química do ácido húmico de solo da ilha de Cananéia e de sua interação com Fe(III), Cu(II) e Cd(II). **Química Nova**, v.17, p.376-80, 1994.
- BENEDETTI, M.F.; RIEMSDIJK, W.H.V.; KOOPAL, L.K. Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase. **Environmental Science Technology**, v.30, p.1805-13, 1996.

- BERTRAND, N.; BARCELÓ, D. Photodegradation of the carbamate pesticides aldicarb, carbaryl and carbofuran in water. **Analytica Chimica Acta**, v.254, p.235-44, 1991.
- BOLLAG, J-M.; MYERS, C.J.; MINARD, R.D. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. **Science Total Environmental**, v.123/124, p.205-17, 1992.
- BRANCO, S.M. **Natureza e agroquímicos**. São Paulo, Moderna, 1990. 56p.
- BRASIL - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 20, 18 jun. 1986. Substâncias potencialmente prejudiciais.
- BRASIL - Ministério da Saúde. Portaria nº 20, 19 jan. 1990.
- BUDDRUS, J.; BURBA, P.; HERZOG, H.; LAMBERT, J. Quantitation of partial structures of aquatic humic substances by one-and two-dimensional solution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v.61, p.628-31, 1989.
- BUFFLE, J. Characteristics of aquatic organic compounds. In: BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. New York, Ellis Horwood, 1990. p.146-192.
- BURBA, P.; ROCHA, J.C.; KLOCKOW, D. Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances: investigations by means of ion exchange-based flow procedure. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.349, p.800-7, 1994.
- BURBA, P.; SHKINEV, V.; SPIVAKOV, B.Y. On-line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-

- stage ultrafiltration. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.351, p.74-82, 1995.
- BURKEN, J. G.; CHNOOR, J. L. Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. **Environmental Technology**, v.31, p.1399-1404, 1997.
- BURNS, S.E.; HASSET, J.P.; ROSSI, M.V. Mechanistic implications of the intrahumic dechlorination of mirex. **Environmental Science Technology**, v.31, p1365-71, 1997.
- BUSHWAY, R.J.; FAN, T.S. Detection of pesticides and drug residues in foods by immunoassay. **Food Technology**, v.49, p.108-15, 1995.
- CABANISS, S.E. Carboxylic acid content of a fulvic acid determined by potentiometry and aqueous Fourier transform infrared spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.255, p.23-30, 1991.
- CAMPANELLA, L.; PETRONIO, B.M.; BRAGUGLIA, C. Study of humic fraction from water of an Antarctic lake. **International Journal Analytical Chemistry**, v.60, p.49-60, 1994.
- CARLSEN, L.; LASSEN, P.; WARWICK, P.; RANDALL, A. Interaction between europium ions and selected size fractions of humic acids. **Chemosphere**, v.33, p.659-70, 1996.
- CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provided on humic substances by E₄/E₆ ratios. **Soil Science American Journal**, v.41, p.352-8, 1977.

- CHOUDHRY, G.G. Interactions of humic substances with environmental chemicals. In: AWTZINGER, O. **The handbook of environmental chemistry**. Berlin, Springer-Verlag, 1982. v.B, p.103-27.
- DANKWARDT, A.; HOCK, B.; SIMON, R.; FREITAG, D.; KETRUPP, A. Determination of non-extractable triazine residues by enzyme immunoassay: investigation of model compounds and soil fulvic and humic acids. **Environmental Science Technology**, v.30, p.3493-500, 1996.
- DURAND, G.; BARCELÓ, D. Determination of chlorotriazines and their photolysis products by liquid chromatography with photodiode-array and thermospray mass spectrometric detection. **Journal Chromatography**, v.502, p.275-86, 1990.
- DZANTIEV, B.B.; ZHERDEV, AV.; ROMANENKO, O.G.; TRUBACEVA, J.N. Development of various enzyme immunotechniques for pesticides detection. In: AGA, D.S.; THURMAN, E.M. eds.. **Immunochemical technology for environmental applications**. Washington, ACS, 1996. v.657, p.87-96.
- ERCEGOVICH, C.D. **Analysis of pesticide residues**. Washington, ACS, 1977. p.162-77.
- FENG, P.C.C.; WRATTEN, S.J.; HORTON, S.R.; SHARP, C.R.; LOGUSH, E.W. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for alachlor and its application to the analysis of environmental water samples. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.159-63, 1990.
- FERRER, I.; BALLESTEROS, B.; MARCO, M-P.; BARCELO, D. Pilot survey for determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in an enclosed seawater samples by direct enzyme-linked immunoassay and solid-phase

extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. **Environmental Science Technology**, v.31, p.3530-35, 1997.

FIELDING, M. et al. **Pesticides in ground and drinking water**. Commission of the European Communities, Bruselas, 1992.

GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environment. In: GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. eds.. **Humic and fulvic acids: isolation, structure, and environmental role**. Washington, ACS. p.2-16. (Symposium series 651).

GASCÓN, J. **Desarrollo y aplicación de ensayos inmunológicos para el control ambiental del herbicida atrazina en aguas naturales**. Barcelona, Espanha, 1998. 137p. Tese (Doutorado) - Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

GASCÓN, J.; MARTINEZ, E.; BARCELÓ, D. Determination of atrazine and alachlor in natural waters by a rapid-magnetic particle-based ELISA. Influence of common cross-reactants: deethylatrazine, deisopropylatrazine, simazine and metolachlor. **Analytica Chimica Acta**, v.311, p.357-64, 1995.

GASCÓN, J.; OUBIÑA, A.; BALLESTEROS, B.; BARCELÓ, D.; CAMPS, F.; MARCO, M-P.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.A.; MORAIS, S.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for atrazine. Performance evaluation by flow injection immunoassay. **Analytica Chimica Acta**, v.247, p.149-62, 1997.

- GAUTHIER, T.D.; SELTZ, W.R.; GRANT, C.L. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene K_{oc} values. **Environmental Science Technology**, v.21, p.243-8, 1987.
- GEE, S.J.; HAMMOCK, B.D.; VAN EMON, J.M. **A user's guide to environmental immunochemical analysis**. EPA/540/R/94/509, 1994.
- GOMEZ, M.J.; MARTÍ, I.; DONOSO, L. Acid-base properties of aquatic humic substances isolated from unpolluted tropical black water rivers. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.339, p.664-8, 1991.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.A; MORAIS, S.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A; MARCO, M-P.; BARCELÓ, D. Automation of a heterogeneous enzyme immunoassay for atrazine. Comparison of three immobilization supports. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.361, p.179-84, 1998.
- GOODROW, M.H.; HARRISON, R.O.; HAMMOCK, B.D. Hapten synthesis, antibody development, and competitive-inhibition enzyme-immunoassay for s-triazine herbicides. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.990-6, 1990.
- GRUESSNER, B.; SHAMBAUGH, N.C.; WATZIN, M.C. Comparison of an enzyme-immunoassay and gas-chromatography mass-spectrometry for the detection of atrazine in surface waters. **Environmental Science Technology**, v.29, p.251-4, 1995.
- GUETZLOFF, F.; RICE, J. Micellar nature of humic colloids. In: GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. eds.. **Humic and fulvic acids: isolation, structure, and environmental role**. Washington, ACS, 1997. p.18-25. (Symposium series 651).

- HAIDER, K.; SPITELLER, M.; REICHERT, K.; FILD, M. Derivatization of humic compounds: an analytical approach for bound organic residues. Intern. **Journal Environmental Analytical Chemistry**, v.46, p.201-11, 1991.
- HART, B. Trace metal complexing capacity of natural waters: A review. **Environmental Technology Letters**, v.2, p.95-110, 1981.
- HASSAL, K.A. **The chemistry of pesticides**: their metabolism, mode of action and uses in crop protections. New York, McMillan Ltda, 1983. 372p.
- HATCHER, P.G.; NORWWOD, D.L.; CHRISTMAN, R.F. Structural characterization of aquatic material. 2- Phenolic content and its relationship to chlorination mechanism in an isolated aquatic fulvic-acid. **Environmental Science Technology**, v.21, p.791-8, 1987.
- HAYES, W.J.; LAWS, E.R. eds.. **Handbook of pesticide toxicology**. Classes of pesticides. New York, Academic Press Inc., 1990.
- HUFFMAN, E.W.D.JR.; STUBER H.A. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, M.D.; WERSHAW, R.L.; MAcCARTHY, P. eds.. **Humic substances in soil, sediment and water**. Geochemistry, isolation and characterization. New York, John Wiley & Sons, 1985. p. 433-51.
- JOHNSON, J.C.; VAN EMON, J.M. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for determination of polychlorinated biphenyls in environmental soil and sediment samples. **Analytical Chemistry**, v.68, p.162-8, 1996.

- KHYM, J.X. **Analytical ion-exchange procedures in chemistry and biology**. New Jersey, Prattice-Hall, 1974.
- KOLPIN, W.K.; KALKHOFF, S.J. Atrazine interaction in a small stream in Iowa. **Environmental Science Technology**, v.27, p.134-9, 1993.
- KUCKUK, R.; BURBA, P.; DAVIES, AN. Pyrolysis-GC-FTIR for structural elucidation of aquatic humic substances. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.350, p.528-32, 1994.
- LANDGRAF, M.D.; SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.O. Mechanism of metribuzin herbicide sorption by humic acid samples from peat and vermicompost. **Analytica Chimica Acta**, v.368, p.155-64, 1998.
- LARA, R.J.; THOMAS, D.N. Isolation of marine dissolved organic matter: evaluation of sequential combinations os XAD resins 2,4 and 7. **Analytical Chemistry**, v. 66, p.2417-21, 1994.
- LAVORENTI, A.; PEIXOTO, M.F.S.P.; BURAUUEL, P.; WAIS, A.; FÜHR, F. Comparação entre hidróxido de sódio e pirofosfato de sódio na extração e distribuição do resíduo ligado de ¹⁴C-atrazina, nas frações húmicas de dois solos. **Pesticidas. Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v.7, p.77-88, 1997.
- MAcCARTHY, P.; JIMENEZ, B. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic materials: binding and dissociations. **Environmental Science Technology**, v.19, p.1072-6, 1985.
- MAcCARTHY, P.; RICE, J.A. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. In: AIKEN, G.R.; McNIGHT D.M.; WERSHAW, R.L.; MAcCARTHY, P. eds.. **Humic substances in**

- soil, sediment and water.** New York, John Wiley & Sons, 1985. p.527-60.
- MACCARTHY, P.; SUFFET, I.H. eds.. Aquatic humic substances and their influence on the fate and treatment of pollutants. **Aquatic humic substances.** Their influence on the fate and treatment of pollutants. Washington, ACS, 1989. 384p.
- MAILLARD, L.C. Synthesis of humus-like substances by the interaction of amino acids and reducing sugars. **Ann. Chim. Phys.**, v.5, p.258-317, 1916.
- MALCOLM, R. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. **Analytica Chimica Acta**, v.232, p.19-30, 1990.
- MALCOLM, R.; THURMAN, E.M. In: CHRISTMAN, R.F.; GJESSING, E.T. eds.. **Aquatic and terrestrial humic materials.** An Arbor, An Arbor Science, 1985. p.1-10.
- MANTOURA, R.F.C.; RILEY, J.P. The analytical concentration of humic substances from natural waters. **Analytical Chimica Acta**, v.76, p.97-106, 1975.
- MARCO, M-P.; GEE, S.; HAMMOCK, B.D. Immunochemical techniques for environmental analysis. I - Imunosensors. **Trends Analytical Chemistry**, v.14, p.341-50, 1995.
- MARCO, M-P.; GEE, S.J.; CHENG, H.M.; LIANG, Z.Y.; HAMMOCK, B.D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for carbaryl. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.41, p.423-30, 1993.

- MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M.; SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. **Environmental Science Technology**, v.28, p.1867-73, 1994.
- MARTY, J-L.; GARCIA D.; ROUILLON, R. Biosensors: potential in pesticide detection. **Trends Analytical Chemistry**, v.14, p.329-33, 1995.
- METS, L.; THIEL, A. **Target sites of herbicide action**. In: BOEGER, P.; SANDMANN, G. eds.. Boca Raton, CRC Press, 1989. 207p.
- MEULENBERG, E.P.; MULDER, W.H.; STOCKS, P.G. Immunoassays for pesticides. **Environmental Science Technology**, v.29, p.553-61, 1995.
- MILLS M.S.; THURMAN, E.M.; ERTEL, J.; THORN, K.A. Organic geochemistry and sources of natural aquatic foams. In: GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B., eds. **Humic and fulvic acids: isolation, structure, and environmental role**. Washington, ACS, 1996. p.151-64. (Symposium series 651).
- MINERO, C.; PRAMAURO, E.; PELIZZETTI, E. Photosensitized transformations of atrazine under simulated sunlight in aqueous humic solution. **Chemosphere**, v.24, p.1597-606, 1992.
- MORRISON, G.M.P.; BATLEY, G.E.; FLORENCE, T.M. Metal speciation and toxicity. **Chemistry in Britain** August, p.791-6, 1989.
- MOUVET, C.; AMALRIC, L.; BROUSSARD, S.; LANG, G.; BRECHT, A.; GAUGLITZ, G. Reflectometric interference spectroscopy for the determination of atrazine in natural water samples. **Environmental Science Technology**, v.30, p.1846-51, 1996.

- NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MUSUMECI, M.R.; ANDRÉA, M.M. Comportamento da atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.30, p.471-6, 1995.
- NUNES, G.S., TOSCANO, I.A.S., BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunosorbent assays. **Trends in Analytical Chemistry**, v.17, p.79-87, 1998.
- PERDUE, E.M. Measurements of binding site concentrations in humic substances. **Metal speciation: theory, analysis and application**. In: KRAMER, J.R.; ALLEN, H.E. eds.. Chelsea, Lewis Publishers, 1988. p.135-54.
- PEURAVUORI, J. **Isolation, fractionation and characterization of aquatic humic substances**. Does a distinct humic molecule exist ? Finland, 1992. 99p. Tese (Doutorado) - University of Turku. Finnish Humus News, 4 (ISSN 0786-7050).
- PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. **Analytical Chimica Acta**, v.337, p.133-49, 1997.
- POPPI, N.R.; TALAMONI, J. Estudo dos ácidos húmico e fúlvico extraídos de solos por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, v.15, p.281-5, 1992.
- RECK, B.; FREVERT, J. Competitive and inhibition-type immunoassay for determination of endosulfan. In: VAN EMMON, J.M.; MUMMA, R.O., eds. **Immunochemical methods for environmental analysis**. Washington, ACS, 1990. p.193-8. (Symposium series 442).

- RICE, J.A.; LIN, J.S. Fractal nature of humic materials. **Environmental Science Technolpgy**, v.27, p.413-24, 1993.
- RILEY, J.P.; TAYLOR, D. The analytical concentration of traces of dissolved organic materials from seawater with Amberlite XAD-1. **Analytical Chimica Acta**, v.46, p.307-9, 1969.
- ROCHA, J.C. Estudo sobre interações de íons metálicos com substâncias húmicas aquáticas. Araraquara, São Paulo, 1997. Tese (Livre Docência). Instituto de Química de Araraquara - UNESP.
- ROCHA, J.C.; DE OLIVEIRA, S.C.; DOS SANTOS, A. Recursos hídricos. Noções básicas sobre o desenvolvimento do saneamento básico. **Saneamento Ambiental**, v.49, p.36-43, 1996.
- ROCHA, J.C.; SARGENTINI, E.; TOSCANO, I.A.S.; ROSA, A.H.; BURBA, P. Multimethodical study on aquatic humic substances from Rio Negro (Amazon State, Brazil) with emphasis on molecular size classification of their metal content. **Journal Brazilian Chemical Society**, no prelo, 1999.
- ROCHA, J.C.; SENE, J.J.; BURBA, P. Interaction of mercury (II) with humic substances from Rio Negro (Amazonas State, Brazil) by means of an ion exchange procedure. **Journal Brazylian Chemical Society**, v.9, p.79-84, 1998.
- ROCHA, J.C.; TOSCANO, I.A.S.; BURBA, P. Lability of heavy metal species in aquatic humic substances characterized by ion exchange with cellulose phosphate. **Talanta**, v.44, p.69-74, 1997.
- RODRIGUES, G.S. Pesticide contamination in the South Cone: a review. **Ciência e Cultura**, v.50, p.342-55, 1998.

- RODRIGUES, G.S.; PARAÍBA, L.C.; BUSCHINELLI, C.C. Estimativa da carga contaminante de pesticidas e nitrato para as águas subterrâneas no estado de São Paulo. **Pesticidas. Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v.7, p89-108, 1997.
- SANTOS, T.C.R.; ROCHA, J.C.; BARCELÓ, D. Multiresidue analysis of rice pesticides by on-line solid phase extraction followed by LC-DAD. Influence of humic acids isolated from a brazilian estuary. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, v.67, p.1-10, 1998.
- SCHLAEPPI, J-M.; FÖRY, W.; RAMSTEINER, K. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for atrazine and hydroxyatrazine. In: VAN EMMON, J.M.; MUMMA, R.O., eds. **Immunochemical methods for environmental analysis**. Washington, ACS, 1990. p.199-210. (Symposium series 442).
- SCHMITT, P.; FREITAG, D.; SANLAVILLE, Y.; LINTELMANN, J.; KETTRUP, A. Capillary electroforetic study of atrazine photolysis. **Journal Chromatography A**, v.709, p.215-25, 1995.
- SCHNITZER, M.; SKINNER, S.I.M. Alkali versus acid extraction of soil organic matter. **Soil Science**, v.105, p.392-6, 1968.
- SENESE, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **Science Total Environmental**, v.123/124, p.63-76, 1992.
- SENESE, N. Nature of interactions between organic chemicals and dissolved humic substances and the influence of environmental factors. In: BECK, A.J.; JONES, K.; HAYES, M.H.B.; MILGELGRIN, U. eds.. **Organic substances in soil and water: natural constituents and their**

- influences on contaminant behaviour.** Cambridge, Royal Society of Chemistry, 1993. p.73-101.
- SHERMA, J. Pesticides. **Analytical Chemistry**, v.67, p.1-20R, 1995.
- SÃO PAULO é o líder em uso. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 18 out. 1998. p.3-2.
- SPOSITO, G.; MARTIN, L.N.; YANG, A. Atrazine complexation by soil humic acids. **Journal Environmental Quality**, v.25, p.1203-9, 1996.
- SPRENGEL, C. (1837). Die Bodenkunde oder die Lehre vom Boden. Müller, Leipzig. *Apud* STEVENSON, F.J. Extraction, fractionation, and general chemical composition of soil organic matter. In: STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition and reactions.** New York, Wiley & Sons, 1982. p.26-53.
- STEELINK, C. Implications of elemental characteristics of humic substances. In: AIKEN, G.R.; McNIGHT D.M.; WERSHAW, R.L.; MAcCARTHY, P. eds.. **Humic substances in soil, sediment and water.** Geochemistry, isolation and characterization. New York, John Wiley & Sons, 1985. p.457-76.
- STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition and reactions.** New York, John Wiley & Sons, 1982. 443p.
- STUDIES, D.O.E.P. **The use of herbicides in non-agricultural situations in England and Wales**, Department of Environmental Produce Studies, London, UK, 1991.

- STUERMER, D.H.; HARVEY, G.R. The isolation of humic substances and alcohol-soluble organic matter from seawater. **Deep-sea Res.**, v.24, p.303-9, 1977.
- TANAKA, S.; OBA, K.; FUKUSHIMA, M.; NAKAYASU, K.; HASEBE, K. Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances. **Analytical Chimica Acta**, v.337, p.351-7, 1997.
- TEKEL, J.; KOVACICOVA, J. Chromatographic methods in the determination of herbicide residues in crops, food and environmental samples. **Journal Chromatography**, v.643, p. 291-303, 1993.
- THOMAS, D.H.; BECK-WESTERMEYER, M.; HAGE, D.S. Determination of atrazine using high-performance immunoaffinity chromatography and reversed-phase liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v.66, p.3823-9, 1994.
- THURMAN, E.M. **Organic geochemistry of natural waters**. Dordrecht, Netherlands, Nijhoff, M. & Junk, W. Publishers, 1985a. 489p.
- THURMAN, E.M. Humic substances in groundwater. In: AIKEN, G.R.; MACKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.; MACCARTHY, P. eds.. **Humic substances in soil, sediment and water**. New York, John Wiley & Sons, 1985b. p.87-104.
- THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. Preparative isolation of aquatic substances. **Environmental Science Technology**, v.15, p.463-6, 1981.
- THURMAN, E.M.; MEYER, M. POMES, M.; PERRY, C.A; SCHWAB, A.P. Enzyme-linked immunosorbent assay compared with gas

- chromatography/mass spectrometry for the determination of triazine herbicides in water. **Analytical Chemistry**, v.62, p.2043-8, 1990.
- TIJSSEN, P. **Practice and theory of enzyme immunoassays**. Amsterdam, Elsevier, 1985.
- TORRENTS, A.; ANDERSON, B.G.; BILBOULIAN, S.; JOHNSON, W.E.; HAPEMAN, C.J. Atrazine photolysis: mechanistic investigations of direct and nitrate-mediated hydroxy radical processes and the influence of dissolved organic carbon from Chesapeake Bay. **Environmental Science Technology**, v.31, p.1476-82, 1997.
- TOSCANO, I.A.S.; GASCÓN, J.; MARCO, M-P.; ROCHA, J.C.; BARCELÓ, D. Atrazine interaction with tropical humic substances by enzyme-linked immunosorbent assay. **Analisis**, v.26, p.130-4, 1998a.
- TOSCANO, I.A.S.; NUNES, G.S.; BARCELÓ, D. Trace determination of pesticides in food and environmental samples by immunoassays. Influence of matrix interferences. **Food Technology and Biotechnology**, v.36, p.245-55, 1998b.
- TOWN, R. M.; POWELL, K. J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatography of humic substances. **Analytical Chimica Acta**, v.256, p.81-9, 1992.
- TRAINA S. J.; NOVAK, J.; SMECK, N. E. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. **Journal Environmental Quality**, v.19, p.151-3, 1990.

ULRICH, P.; WELLER, M.G.; NIESSNER, R. Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues). **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v.354, p.352-8, 1996.

US EPA, USEPA (1991).

VAN EMMON, J.M. Immunoassay methods: EPA evaluations. In: VAN EMMON, J.M.; MUMMA, R.O. eds.. **Immunochemical methods for environmental analysis**. Washington, ACS, 1990. p.58-65. (Symposium series 442).

WAKSMAN, S.A. Humus. Wilians and Wilkins, Baltimore, 1936. *Apud* STEVENSON, F.J. Extraction, fractionation, and general chemical composition of soil organic matter. In: STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition and reactions**. New York, Wiley & Sons, 1982. p.26-53.

WANG, Z.; GAMBLE, D.S.; LANGFORD, C.H. Interaction of atrazine with Laurentian soil. **Environmental Science Technology**, v.26, p.560-5, 1992.

WEBER, J. H. Binding and transport by humic materials. In: FRIMMEL, F.H.; CHRISTMAN, R.F., eds. **Humic substances and their role in the environment**. S.Bernhard, John Wiley & Sons, 1988. p.165-178.

WELHOUSE. G.J.; BLEAM, W.F. NMR spectroscopic investigation of hydrogen bonding in atrazine. **Environmental Science Technology**, v.26, p.959-64, 1992.

WELHOUSE. G.J.; BLEAM, W.F. Cooperative hydrogen bonding of atrazine. **Environmental Science Technology**, v.27, p.500-5, 1993.

- WELLS, D.E. Extraction, clean-up and recoveries of persistent traces organic contaminants from sediment and biota samples. In: BARCELÓ, D., ed.. **Environmental analysis**. Techniques, applications and quality assurance. Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science Publishers B.V., 1993. p. 80-113.
- WERSHAW, R.L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. **Journal Contaminant Hydrology**, v.1, p.29-45, 1986.
- WIGFIELD, Y.Y., GRANT, R. Evaluation of an immunoassay kit for the detection of certain organochlorine (cyclodiene) pesticide-residues in apple, tomato and lettuce. **Bulletin Environmental Contaminant Toxicology**, v.49, p.342-6, 1992.
- WITTMAN, C.; HOCK, B.J. Application and performance-characteristics of a novel ELISA for the quantitative-analysis of the atrazine metabolite deethylatrazine. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.41, p.1795-9, 1993.
- YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Immunoassay of endogeneous plasma insulin in man. **Journal Clinical Investigations**, v.39, p.1157-75, 1960.
- ZEPP, R.G., SCHLOTZHAUER, P.F., SINK, R.M. Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. **Environmental Science Technology**, v.19, p.74-81, 1985.

ZHANG, Y.J.; BRYAN, N.D.; LIVENS, F.R.; JONES, M.N. Complexing of metal ions by humic substances. In: GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B., eds. **Humic and fulvic acids**. Isolation, structure and environmental role. Washington, ACS, 1996. p.194-206. (Symposium series 651).