

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA



UNICAMP

TESE DE DOUTORADO

***“DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUA
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM
ÊNFASE EM DETECÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E
NOVOS SORVENTES PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA”***

Autora: Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Novembro de 2001.

-i-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*Eu dedico esta tese ao meu marido Eudoxio
e à minha família.*

Agradecimentos

Meu agradecimento especial é para a minha orientadora e mentora Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim. Sua liderança, capacidade, conhecimento científico e generosidade tem sido motivo de inspiração constante para mim. Eu tenho muito orgulho de ter sido sua aluna, tudo que tenho aprendido tem sido fundamental não somente para a minha carreira, mas também para a minha vida.

Eu gostaria de agradecer à Profa. Dra. Carol H. Collins e ao Prof. Dr. Kenneth Collins pelo constante incentivo e importantes sugestões feitas durante o meu trabalho. A agradável companhia da Profa. Carol em viagens sempre serão lembradas com muito carinho.

Agradeço à Universidade de Ghent e ao Prof. Dr. Pat Sandra que me acolheu em seu laboratório onde pude viver uma das maiores experiências da minha vida. Agradeço também aos seus colaboradores Karel, Peng, Koen, Gerd, Tom, Christophes, Marc e Jös pela ajuda no trabalho.

Gostaria de agradecer também ao grupo do Labcrom (ex e atual): Tânia, Joseane, Carla, Kátia, Lúcia, Priscila, Nilva, Edivan, Marcos, Dânia, Zahra, Wedson, Roberto, Rose, Valtinho, Gláucia, Ricardo(s), Marcelo, Zuim, Emerson, Claudia, Pezzin, Lúcia e Chico, pela agradável convivência. Em especial agradeço ao Lúcio pela preciosa ajuda na parte experimental da minha tese.

Agradeço ao Marcelo, Raquel, Cristina Ferrari, Cristina, Cléber, Marta, Cáritas, Nádía, André, Miriam, Marisa, Inês e tantos outros pela amizade.

Agradeço ao Instituto de Química da UNICAMP onde desenvolvi o meu trabalho.

Agradeço à FAPESP pela bolsa concedida e ao Diretor do I.Q. Prof. Dr. Célio Pasquini sem os quais o meu estágio na Bélgica não teria sido possível.

Agradeço ao FAEP pelo auxílio viagem, o que permitiu a minha participação e divulgação do meu trabalho em dois congressos internacionais.

Agradeço à IBRAS CBO pela irradiação dos sorventes desenvolvidos neste trabalho.

RESUMO

Título: “Determinação Multirresíduos de Pesticidas em Água por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ênfase em Detecção por Espectrometria de Massas e Novos Sorventes para extração em Fase Sólida”.

Autora: Sonia Cláudia do Nascimento de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Palavras-chave: determinação multirresíduos de pesticidas, análise de água, CLAE, extração em fase sólida, extração líquido-líquido, CL/EM.

Neste trabalho foi desenvolvido um método visando a “determinação multirresíduos” de pesticidas em água. Onze pesticidas foram estudados: 2,4-D, linuron, diuron, atrazina, ametrina, tebutiuron, simazina, dimetoato, carbendazim, carbaril e 3,4-DCA. Dois métodos de extração e pré-concentração dos pesticidas foram comparados: extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS). Os pesticidas foram analisados em um cromatógrafo a líquido acoplado a um detector espectrométrico de massas; a separação foi realizada usando uma coluna analítica de fase reversa tipo C-18 e eluição com gradiente. A ELL mostrou ser adequada para ser utilizada como técnica de extração e pré-concentração dos analitos, exceto para o carbendazim. A EFS, usando como sorvente o copolímero estireno-divinilbenzeno (Supelclean Envi-chrom P), foi apropriada para a determinação do conjunto de pesticidas estudados, exceto para o linuron. A metodologia foi validada e limites de detecção de 0,1 µg/L ou menores foram encontrados, exceto para a 3,4-DCA e 2,4-D. O detector de massas mostrou ser robusto e possibilitou detectabilidades e seletividades adequadas para análises de rotina.

Também foram desenvolvidos materiais do tipo fase reversa, C-8 e C-18, obtidos através do recobrimento da sílica por polissiloxanos, (polimetiloctilsiloxano-PMOS ou polimetiloctadecilsiloxano-PMODS) e imobilização através de diferentes processos: irradiação gama, microondas e temperatura para serem usados em EFS. Estes materiais foram caracterizados através de espectroscopia no infravermelho, análise elementar, análise termogravimétrica e microscopia eletrônica de varredura. Foram estimados os volume de *breakthrough* para o benomil, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina. Estes sorventes foram aplicados para análise dos pesticidas em amostras de água nos modos *on-line* e *off-line*, e em urina mostrando desempenho tão bom quanto os dos sorventes comerciais.

ABSTRACT

Title: "Multiresidue Determination of Pesticides in Water by High Performance Liquid Chromatography, with emphasis in Mass Spectrometry Detection, and New Sorbents for Solid Phase Extraction".

Author: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Promotor: Prof. Dr. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (President)

Key-words: multiresidue analysis of pesticides, water analysis, HPLC, solid-phase extraction, liquid-liquid extraction, LC/MS.

A multiresidue method for determination of pesticides in water samples was developed. The following pesticides were studied: 2,4-D, linuron, diuron, atrazine, ametryn, tebuthiuron, simazine, dimethoate, carbendazim, carbaryl and 3,4-DCA. Two methods of extraction and preconcentration were compared: liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). The pesticides were analysed by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The separation was carried-out using a reversed phase C-18 analytical column with gradient elution. LLE was shown to be suitable as an extraction and preconcentration technique, except for carbendazim; while SPE, using the copolymer styrene-divinylbenzene (Supelclean Envi-chrom P), was suitable for the pesticide extraction, except for linuron. The methodology was validated and limits of detection at 0.1 µg/L or lower were obtained, except for 3,4-DCA and 2,4-D. The LC/MS procedure was robust and good detectibility and selectivity was obtained for routine analysis.

New reversed-phase sorbents, C-8 e C-18, for SPE were developed. These were obtained by depositing polysiloxanes (polymethyloctylsiloxane-PMOS or polymethyloctadecylsiloxane-PMODS) onto silica, with immobilization using different process: gamma irradiation, microwave and temperature. These sorbents were characterized by elemental analysis, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and termogravimetric analysis. The breakthrough volumes for benomyl, tebuthiuron, simazine, atrazine, diuron e ametryn were estimated. These sorbents were applied in analysis of pesticides in water samples in both the on-line and off-line modes and in urine. The performance of these sorbents was at least as good as that of commercial cartridges.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica:

- 📖 Mestrado em Química Analítica – Instituto de Química da UNICAMP.
“Estudo de Variáveis Experimentais no Desempenho de Colunas Recheadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)”, 1995.
Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.
- 📖 Bacharelado em Química – modalidade: Tecnológica – UNICAMP, 1990.

2. Artigos Publicados:

- 📖 An RMN Tool for Cyclodextrin Selection in Enantiomeric Resolution by HPLC
Antônio Laverde Jr., Gelson J. A. da Conceição, **S. C. N. Queiroz**, Fred Y. Fujiwara e Anita J. Marsaioli
Magnetic Resonance in Chemistry, *in press*.
- 📖 “Poly(methyloctadecylsiloxane) Immobilized on Silica by Gamma Radiation for use in Solid-Phase Extraction”
Sonia C. N. Queiroz, Lúcio F. C. Melo e Isabel C. S. F. Jardim
Journal of Chromatography A, 948 (2002) 155-160.
- 📖 “Semi-Preparative HPLC Separation of Terpenoids from the Seed Pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*”
Raquel T. Nogueira, **Sonia C. N. Queiroz** e Paulo M. Imamura
Journal of Liquid Chromatography & Related Technology, 25 (2002) 59-67.
- 📖 “Métodos de Extração e/ou Concentração de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica”
Sonia C. N. Queiroz, Carol H. Collins e Isabel C. S. F. Jardim
Química Nova, 24 (2001) 62-76.

- ☞ “Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* Roots”
 Aderbal F. Magalhães, Ana M. Tozzi, Eva G. Magalhães, Marisa A. Nogueira, **Sonia C. N. Queiroz**
Phytochemistry, 55 (2000) 787-792.
- ☞ “Relationships of the Mineral and Fatty Acid Contents in Processed Turkey Meat Products”
 Márcia M. C. Ferreira, Marcelo A. Morgano, **Sonia C. N. Queiroz** e Dilza, M. B. Mantovani
Food Chemistry, 69 (2000) 259-265.
- ☞ “Irradiação de Alimentos”
Sonia C. N. Queiroz, Marcelo A. Morgano e Isabel C. S. F. Jardim
Engenharia de Alimentos, 33 (2000) 20-22.
- ☞ “Aplicação da Análise Exploratória na Diferenciação de Vegetais”
 Marcelo A. Morgano, **Sonia C. N. Queiroz** e Márcia M. C. Ferreira
Brazilian Journal of Food Technology, 2 (1999) 73-79.
- ☞ “Determinação dos Teores de Minerais em Sucos de Frutas por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)”
 Márcia M. C. Ferreira, Marcelo A. Morgano e **Sonia C. N. Queiroz**
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19 (1999) 344-348.

3. Patente:

- ☞ “Processo de Confecção de Cartucho Tipo C-18 Obtido via Tratamento Térmico para Uso em Extração em Fase Sólida”
 Isabel C. S. F. Jardim, Lúcio F. C. Melo e **Sonia C. N. Queiroz**
 Patente requerida ao INPI, em 09.02.01, Nº 100.578-2

4. Resumos apresentados em congressos internacionais: 9

5. Resumos apresentados em congressos nacionais: 20

6. Material didático: “Eletroforese Capilar”, artigo publicado no site: www.chemkeys.com, 2001.

ÍNDICE GERAL

Descrição	Página
ÍNDICE GERAL.....	xv
ÍNDICE DE TABELAS.....	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxiii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Introdução.....	3
I.1.1. O uso de Pesticidas.....	3
I.1.2. Importância do Controle de Qualidade das Águas.....	5
I.2. Análise de Resíduos de Agrotóxicos.....	8
I.3. Amostragem e Armazenamento de Amostras.....	8
I.4. Extração e Pré-concentração de Pesticidas.....	9
I.4.1. Extração Líquido-Líquido (ELL).....	10
I.4.2. Extração em Fase Sólida (EFS).....	11
I.4.2.1. Modos de Extração “Off-line” e “On-line”.....	15
I.4.2.2. Recentes Desenvolvimentos em EFS.....	18
I.4.2.2.1. Preparo de Materiais Baseados em Suporte de Sílica para EFS.....	18
I.4.2.2.1.1. Imobilização por Irradiação Gama.....	22
I.4.2.2.1.2. Imobilização por Irradiação Microondas.....	23
I.4.2.2.1.3. Imobilização Térmica.....	24
I.4.2.2.2. Desenvolvimento de Sorventes mais Seletivos	24
I.4.2.2.2.1. Imunossorventes.....	25
I.4.2.2.2.2. Polímeros Impressos Molecularmente (MIP).	26
I.4.2.2.2.3. Fase de Acesso Restrito (RAM).....	27
I.4.2.2.2. Novas Configurações Experimentais para EFS.....	28
I.4.2.2.2.1. Extração em Discos.....	28
I.4.2.2.2.2. Automação.....	30
I.5. Determinação dos Pesticidas.....	30

I.5.1 Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CL/EM).....	33
I.5.1.1. O Espectrômetro de Massas (EM)	33
I.5.1.2. Interfaceamento da Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas.....	34
I.5.1.2.1. Interfaces API.....	36
I.5.1.2.1.1. Interface <i>Electrospray</i> (ES)	37
I.5.1.2.1.2. Interface Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)	40
I.6. Validação de Métodos Analíticos por CLAE.....	42
I.6.1. Linearidade.....	43
I.6.2. Sensibilidade.....	44
I.6.3. Exatidão	45
I.6.4. Precisão.....	48
I.6.5. Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)	50
I.6.6. Especificidade.....	51
I.6.7. Robustez.....	52
I.7. Bibliografia.....	53
CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	63
II.1. Objetivos.....	65
CAPÍTULO III - DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS POR CL-EM.....	67
III.1. Justificativa do Trabalho Desenvolvido.....	69
III.2. Parte Experimental.....	69
III.2.1. Seleção dos Pesticidas a Serem Estudados.....	69
III.2.2. Reagentes.....	71
III.2.3. Sorventes para Extração em Fase Sólida.....	72
III.2.4. Instrumentação e Condições de Análise.....	72
III.2.5. Preparação da Solução Estoque.....	73
III.2.6. Preparação da Amostra.....	73
III.2.6.1. Extração Líquido-Líquido.....	74

III.2.6.2. Extração em Fase Sólida.....	74
III.3. Resultados e Discussão.....	76
III.3.1. Otimização das Condições Cromatográficas.....	76
III.3.2. Recuperação da Extração Líquido-Líquido.....	80
III.3.3. Recuperação da Extração em Fase Sólida.....	81
III.3.4. Validação da Metodologia.....	85
III.3.5. Análise de Amostras Reais.....	88
III.4. Conclusão.....	89
III.5. Bibliografia.....	91
CAPÍTULO IV - NOVOS SORVENTES PARA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO.....	93
IV.1. Justificativa do Trabalho Desenvolvido.....	95
IV.2. Parte Experimental.....	96
IV.2.1. Materiais e Reagentes.....	96
IV.2.2. Polímeros.....	96
IV.2.3. Pesticidas Seleccionados.....	97
IV.2.4. Instrumentação.....	97
IV.2.5. Recobrimento da Sílica com o Polímero.....	98
IV.2.6. Processo de Imobilização.....	99
IV.2.6.1. Imobilização Térmica.....	99
IV.2.6.2. Imobilização por Irradiação Gama.....	99
IV.2.6.3. Imobilização por Irradiação com Microondas.....	99
IV.2.7. Extração do Polímero Excedente.....	100
IV.2.7.1. Extração do PMODS.....	100
IV.2.7.2. Extração do PMOS.....	100
IV.2.8. Caracterização dos Sorventes.....	101
IV. 2.8.1. Análise Elementar (CHN)	101
IV. 2.8.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	101
IV. 2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	101
IV. 2.8.4. Análise Termogravimétrica (ATG)	102
IV.2.9. Confecção dos Cartuchos.....	102

IV.2.10. Confeccão da Coluna de Enriquecimento de Traços.....	102
IV.2.11. Recuperação dos Pesticidas (Modo <i>Off-line</i>).....	102
IV.2.12. Volume de <i>Breakthrough</i>	104
IV.2.13. Validação da Metodologia.....	105
IV.3. Resultados e Discussão.....	105
IV.3.1. Caracterização dos Sorventes.....	105
IV. 3.1.1. Análise por Cromatografia de Permeação em Gel (CPG).....	105
IV. 3.1.2. Análise Elementar (CHN)	105
IV.3.1.3. Análise por Infravermelho (IV).....	106
IV.3.1.4. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	109
IV.3.1.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	111
IV.3.2. Aplicações dos Sorventes.....	113
IV.3.2.1. Extrações em Cartuchos Tipo C-18.....	114
IV.3.2.1.1. Extração de Pesticidas em Água no Modo <i>Off-line</i>	114
IV.3.2.1.2. Extração de Pesticidas no Modo <i>On-line</i>	119
IV.3.2.1.2.1. Volume de <i>Breakthrough</i> (V_b).....	119
IV.3.2.1.2.2. Validação da Metodologia.....	122
IV.3.2.1.3. Extração de Pesticidas em Urina no Modo <i>Off-line</i>	127
IV.3.2.2. Extrações em Cartuchos tipo C-8.....	130
IV.4. Conclusões.....	132
IV.5. Bibliografia.....	135
CAPÍTULO V – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DESENVOLVIDOS.....	137
V.1. Comparação entre os Métodos Desenvolvidos.....	139
V.1.1. Comparação Entre as Técnicas de Extração.....	139
V.1.2. Comparação Entre os Detectores.....	139
APÊNDICE.....	143

ÍNDICE DE TABELAS

N ^o	Descrição	Página
I.1	Pragas na agricultura.....	4
I.2	Exemplos de sorventes utilizados em EFS.....	14
I.3	Características de alguns sorventes comercialmente disponíveis, do tipo C-8 e C-18. ²⁸	21
I.4	Vantagens iniciais do interfaceamento de cromatografia líquida com espectrometria de massas.....	35
III.1	Características dos pesticidas estudados.....	71
III.2	Íons utilizados para a análise quantitativa dos pesticidas. Modo íon positivo.....	78
III.3	Recuperações obtidas através da extração líquido-líquido.....	81
III.4	Recuperações obtidas para os pesticidas através de EFS. Amostra: água de torneira fortificada, concentração 0,1 µg/L (n=2).....	83
III.5	Recuperações obtidas para os pesticidas através da EFS. Amostra: água de poço artesiano fortificada, concentração 0,1 µg/L (n=2).....	83
III.6	Curva analítica e linearidade para os pesticidas estudados.....	86
III.7	Parâmetros de validação da metodologia.....	87
IV.1	Porcentagem de carbono dos sorventes preparados neste trabalho.....	106
IV.2	Resultados obtidos das curvas termogravimétricas.....	113
IV.3	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada (n=2) no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de pré-concentração = 1000 vezes.....	115
IV.4	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada (n=2) no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 100 vezes.....	115

IV.5	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada (n=2) no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 10 µg/L. Volume de amostra = 20 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 10 vezes.....	116
IV.6	Recuperações e precisões dos pesticidas em água de torneira (n=2) no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de enriquecimento = 1000 vezes.....	116
IV.7	Volume de <i>breakthrough</i> , V_b , dos pesticidas nos sorventes tipo C18.....	121
IV.8	Parâmetros de validação para extrações no modo <i>on-line</i>	123
IV.9	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações <i>on-line</i> usando os diferentes sorventes tipo C-18. Concentração de fortificação 0,1 µg/L. Volume de amostra = 50 mL. (n=5).....	124
IV.10	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações <i>on-line</i> usando as diferentes fases tipo C-18. Concentração de fortificação 0,5 µg/L. Volume de amostra = 50 mL. (n=5).....	124
IV.11	Recuperações e precisões dos pesticidas em água de torneira obtidas através de extrações <i>on-line</i> utilizando cartuchos C-18. Concentração de fortificação 0,5 µg/L. Volume de amostra = 50 mL. (n=5).....	125
IV.12	Resultados de validação obtidos após pré-concentração e <i>clean-up</i> dos herbicidas em urina humana, usando um cartucho C-18 imobilizado termicamente (120°/4h).....	129
IV.13	Resultados de validação obtidos após pré-concentração e <i>clean-up</i> dos herbicidas em urina humana, usando um cartucho C-18 comercial.....	130
IV.14	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de pré-concentração = 1000 vezes. (n=2).....	131
IV.15	Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada no modo <i>off-line</i> . Fortificação = 10 µg/L. Volume de amostra = 20 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 10 vezes. (n=2).....	131
V.1	Comparação entre as técnicas de extração.....	140

V.2	Comparação entre os detectores em termos de LOD.....	140
-----	--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

N ^o	Descrição	Página
I.1	Volume de vendas de defensivos agrícolas no Brasil - 1990/1999.....	6
I.2	Esquema de procedimento de extração em fase sólida <i>off-line</i> . A) ativação e condicionamento do cartucho; B) aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; C) troca de solvente e eluição dos interferentes(<i>clean-up</i>); D) troca de solvente e eluição do(s) analito(s) com retenção de outros interferentes.....	13
I.3	Diagrama do sistema "comutação de colunas". A) Pré-concentração e B) Dessorção e separação cromatográfica.....	17
I.4	Exemplo de reação de derivatização da sílica visando o preparo de sorvente quimicamente ligado.	20
I.5	Fase de acesso restrito (RAM).	28
I.6	Faixa de aplicações das interfaces.....	37
I.7.	A) Esquema ortogonal da interface ES e B) interface APCI.....	38
I.8	Comparação gráfica de dois métodos, A e B, quanto à sensibilidade.....	45
III.1	Estruturas dos pesticidas. 1) 2,4-D; 2) carbendazim; 3) carbaril; 4) diuron; 5) linuron; 6) 3,4-DCA; 7) ametrina; 8) atrazina; 9) simazina; 10) tebutiuron e 11) dimetoato.	70
III.2	Cromatogramas obtidos para a separação da mistura de padrões de pesticidas: 1= carbendazim; 2= dimetoato; 3= simazina; 4= tebutiuron; 5= carbaril; 6= 3,4-DCA; 7= atrazina; 8= diuron; 9= ametrina; 10= linuron. A) utilizando detector espectrômetro de massas (" <i>Full scan</i> ") e B) detector UV/Vis. ($\lambda=235$ nm). Condições cromatográficas: coluna analítica de 250 x 4,6 mm, C-18, tamanho de partícula de 5 μ m, Phenomenex. Vazão = 1 mL/min, eluição por gradiente com metanol e água pH 3,8. Gradiente: 45% de MeOH à 55% em 20 min., de 55% à 75% em 17 min., em seguida manteve-se a composição constante por 7 minutos e depois retornou as condições iniciais em 3 minutos.....	77
III.3	Espectros de massas. A) dimetoato, B) carbaril e C) carbendazim.....	79

III.4	Cromatogramas obtidos para amostra de água da torneira utilizando com fase sólida: Supelclean Envicarb. A) <i>Full scan</i> ; B) Detecção de simazina em t_R 16,8 min e C) Detecção de atrazina em t_R 25,0 min. Condições cromatográficas: idem à figura III.2.	90
IV.1	Sistema para extração <i>off-line</i> simultânea de amostras.....	103
IV.2.	Espectro de IV da sílica gel.....	108
IV.3	Espectros de IV dos sorventes tipo C-18. A) Imobilização térmica (4h/120°C); B) Microondas; C) Irradiação gama (60 kGy); D) Irradiação gama (80 kGy).....	108
IV.4	Espectros de IV das fases tipo C-8. A) Imobilização térmica (4h/120°C); B) Irradiação gama (dose 60 kGy); C) Irradiação gama (dose 80 kGy).....	109
IV.5	Micrografias eletrônicas de varredura: A) sílica pura; Sorventes tipo C-18 obtido por: B) imobilização térmica 4h/120°C, C) imobilização por microondas; D) imobilização por irradiação gama, dose 80 kGy.	110
IV.6	Micrografias dos sorventes tipo C-8: A) imobilização térmica (4h/120°C), B) imobilização por irradiação gama, dose 60 kGy e C) imobilização por irradiação gama dose, 80 kGy.	111
IV.7	Cromatogramas obtidos para água fortificada com pesticidas. A) branco de Milli-Q, b) água Milli-Q fortificada, C) branco de água de torneira, D) água de torneira fortificada. 1) benomil ($t_R = 3,3$ min), 2) tebutiuron ($t_R = 4,4$ min), 3) simazina ($t_R = 6,1$ min), 4) atrazina ($t_R = 9,8$ min), 5) diuron ($t_R = 11,4$ min), 6) ametrina ($t_R = 16,0$ min). Condições cromatográficas: coluna C18 Microsorb-MV de 150x4.6 i.d. mm. Fase móvel: ACN/H ₂ O/NH ₄ OH (40:60:0,1, v/v/v), eluição isocrática. Detecção UV a 235 nm.....	118
IV.8	Volumes de <i>breakthrough</i> para as fases tipo C-18 com diferentes imobilizações. A) Microondas, B) Imobilização térmica (120°C/4h); C) Irradiação gama (60kGy) e D) Irradiação gama (80 kGy). Legenda: ■ Benomil; • Tebutiuron; ▲ Simazina; ▼ Atrazina; ◆ Diuron; ◀ Ametrina.....	121



CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

“Os homens que amam o trabalho são naturalmente otimistas.

A vida é o próprio labor em evolução, e amar o trabalho é amar a vida.”

Austragésilo de Athayde

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. O uso de Pesticidas

Pesticidas, agrotóxicos, praguicidas ou defensivos agrícolas são denominações genéricas de substâncias utilizadas para o controle de animais ou vegetais que possam trazer problemas à agricultura ou à saúde pública. Ainda que seja admitida a necessidade do controle químico, uma vez que são inúmeros os exemplos de safras integralmente perdidas devido à ação predatória de pragas (ver Tabela I.1), caso as aplicações de tais produtos sejam feitas de forma racionalizada, os problemas ambientais poderiam ser significativamente reduzidos. O que se observa em muitos casos são aspersões sem controle de dosagens, manuseios indevidos dos recipientes, sendo freqüentes as descargas de restos de produtos e lavagens dos galões utilizados nas águas naturais. E, principalmente, em alguns casos não são observados os afastamentos necessários das plantações das margens dos rios e não são construídos sistemas de drenagem que impeçam o acesso de águas de enxurradas aos mesmos. Os pesticidas que são aplicados na lavoura e depositados no solo eventualmente são transportados para as águas superficiais através de vários mecanismos e seus resíduos podem permanecer no meio ambiente, causando riscos potenciais aos ecossistemas aquáticos e à saúde humana.^{1, 2} Esta é uma situação que demonstra claramente que os problemas de contaminação das águas devem ser resolvidos na fonte geradora. Uma vez atingidas as águas naturais, pouco se pode fazer no sentido de reverter os prejuízos da qualidade que, neste caso, são muito sérios.³

Os pesticidas são classificados como inseticidas, acaricidas, fungicidas e herbicidas. Idealmente, eles devem ter uma ação tóxica específica para um dado organismo alvo e não afetar outros.⁴ Há casos onde a ação é específica, como por

exemplo os herbicidas sistêmicos, que atuam através da seiva das plantas, porém na maioria das vezes eles agem como venenos e atingem todo o ecossistema e também os seres humanos. Conseqüentemente, o uso de pesticidas requer cuidadosa seleção e quantificação, bem como meios de aplicação que minimizem os efeitos para os organismos “não-alvo”. Além disso, muitos pesticidas são persistentes, e podem portanto bio-acumular no meio ambiente.⁵

Tabela I.1 - Pragas na agricultura.⁶

Animal	Vegetal Atingido
Moluscos (caramujos)	Café e hortaliças
Nematóides (vermes)	Café, côco, banana, algodão e batata
Aracnídeos (aranha)	Café
Acaros (carrapatos)	Algodão, mamão, batata, mandioca e beterraba
Crustáceos (tatuzinhos de jardim)	Hortaliças e viveiros
Miriápodos (piolhos de cobra)	Batata, mandioca e beterraba
Gafanhotos	Plantas em geral
Grilos e Paquinhas	Hortas, viveiros e jardins
Percevejos	Soja, batata e algodão
Cigarrinhas	Cana e frutas em geral
Colchonilhas	Frutas, café, batata, algodão
Pulgões	Milho, cana, batatinha, algodão, laranja e trigo
Brocas	Café, cana e abacaxi
Lagartas	Soja, amendoim, frutas, milho, tomate, trigo, algodão e gramíneas
Gorgulho	Feijão, milho e trigo

Os maiores problemas do uso inadequado de agrotóxicos ocorrem nos países em desenvolvimento, onde milhões de pessoas são contaminadas todos os anos.⁷ Na tentativa de resolver esses problemas, programas educacionais e de treinamento têm sido ministrados.⁸

Em contrapartida ao uso de agrotóxicos, tem sido observada uma crescente tendência no uso de controle biológico.⁹ Por exemplo, na região sul do Brasil, cerca de 1,2 milhão de hectares de soja (correspondente a 10% da área total do plantio no país) utiliza um vírus (*Baculovirus anticarsia*) no combate à lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*). Para o combate da broca-da-cana, o agricultor pode usar vespínhas do gênero *Cotesia*. Na citricultura, as vespas *Ageniaspis citricola*, ajudam a combater a incidência de cancro cítrico nos pomares paulistas. A joaninha é predadora natural de cochonilhas e alguns tipos de bactérias combatem a praga do algodão. O uso de técnicas agrícolas, tal como a rotação de culturas, também diminui a incidência de pragas.

Apesar do protesto dos ecologistas e dos adeptos aos alimentos orgânicos, enquanto os agrotóxicos representarem lucros para os fazendeiros, o uso desses produtos será mantido. A Figura I.1 apresenta um gráfico mostrando a venda crescente de defensivos agrícolas no Brasil.¹⁰

I.1.2. Importância do Controle de Qualidade das Águas

A descarga de pesticidas nas águas leva à contaminação química que traz diversos problemas à saúde pública, em geral muito graves. As conseqüências que se pode ter com a contaminação por pesticidas estão diretamente relacionadas à toxicidade do composto, ao grau de contaminação e ao tempo de aplicação. As principais vias de entrada de compostos orgânicos no organismo humano e animal são a gastrointestinal, respiratória e dérmica.¹¹ Os pesticidas são amplamente acumulados no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração.¹²

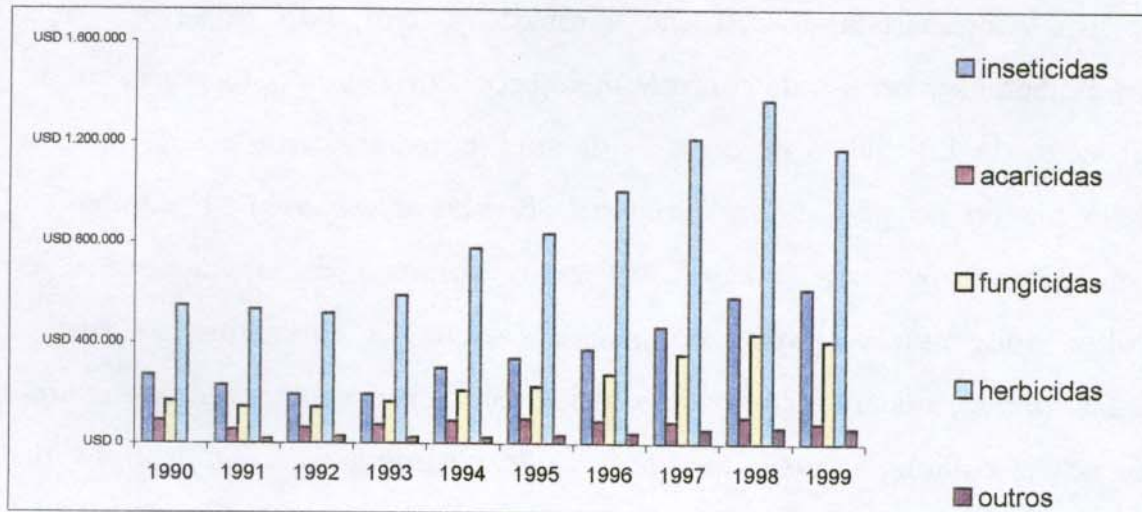


Figura I.1 – Volume de vendas de defensivos agrícolas no Brasil - 1990/1999.¹⁰

Devido ao alto grau de toxicidade, muitos compostos são classificados como “substâncias prioritárias”. O termo “prioritária” se aplica a todas as substâncias que são identificadas em fontes de águas em concentrações maiores que $0,1 \mu\text{g/L}$, que são relevantes à saúde pública (suspeitos de serem carcinogênicos ou mutagênicos) e são também (às vezes) encontradas em água potável.¹³

Pensando nisso, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) elaborou uma lista contendo as propriedades dos pesticidas que indicam o seu potencial em contaminar águas superficiais, na qual inclui, dentre outros, a solubilidade em água ($>30 \text{ mg/L}$); o coeficiente de adsorção linear do pesticida no solo, K_d (<5 , usualmente <1); o coeficiente de adsorção à matéria orgânica, K_{oc} ($< 300\text{-}500 \text{ mL/g}$); o coeficiente de partição octanol/água, K_{ow} (<300); os tempos de meia-vida de hidrólise (>25 semanas) e de fotólise (>1 semana) e o tempo de meia-vida de dissipação no solo (>3 semanas).^{14, 15} Baseado nestas propriedades a EPA elaborou uma lista de pesticidas “prioritários”, que

inicialmente continha 161 substâncias e foi desenvolvida em 1984.¹⁶ Em outubro de 1986 foi reduzida para 100 pesticidas e seus produtos de degradação.¹⁷

A União Européia (ECC) também possui legislação própria com respeito aos limites máximos permitidos para água potável e estabelece o valor de 0,1 µg/L para pesticidas individuais e 0,5 µg/L para a soma de vários.¹⁸ A lista de “substâncias prioritárias” da ECC é conhecida como “lista negra”.

As diferenças entre as listas de pesticidas prioritários elaboradas pela EPA e pela EEC foram discutidas por Barceló.¹⁹ Uma das principais diferenças entre os programas de regulamentações dos Estados Unidos e da União Européia é que na Europa cada país usa o seu próprio método, ao passo que nos Estados Unidos os métodos EPA são amplamente usados. A EPA estabelece limites de tolerância baseados em dados de toxicidade e cada pesticida tem um nível máximo permitido enquanto que a ECC estabelece um valor fixo (0,1 µg/L para pesticidas individuais e de 0,5 µg/L para soma total). Os valores da ECC não são baseados em dados toxicológicos e em alguns casos níveis maiores são permitidos, porém de uma forma geral a legislação é bastante rígida e tem resultado no desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar estes níveis baixos de concentração.

A Organização Mundial da Saúde também tem apresentado os requisitos para as concentrações de resíduos de pesticidas fornecendo informações necessárias sobre os métodos analíticos para a determinação de pesticidas “prioritários” e seus produtos de transformações em amostras de águas.²⁰

Com base neste quadro, torna-se de vital importância para a sociedade moderna o desenvolvimento de metodologias para detecção e quantificação destas espécies residuais.

I.2. Análise de Resíduos de Agrotóxicos

Segundo o decreto nº 98.816, “resíduo de agrotóxico” é definido como sendo uma substância ou mistura de substâncias remanescentes ou existentes em alimentos ou no meio ambiente, decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive quaisquer derivados específicos, tais como, produtos de conversão e de degradação, metabólitos, produtos de reação e impurezas consideradas toxicológica e ambientalmente importantes.²¹ Neste decreto houve a substituição do termo “pesticidas” por “agrotóxicos”, entretanto devido à sua popularidade o termo “pesticida” será utilizado neste texto.

A análise de resíduos de pesticidas geralmente é bastante complexa e envolve várias etapas as quais estão descritas a seguir.

I.3. Amostragem e Armazenamento de Amostras

Em programas de monitoramento de pesticidas, a amostragem é o passo inicial e uma das etapas mais críticas. Assim, a seleção do processo de amostragem é de fundamental importância. Tanto as agências de regulamentação quanto os órgãos de pesquisa levam em consideração a representatividade da amostra. Isto significa que uma quantidade suficiente de amostra deve ser coletada de forma a representar a variabilidade total do sistema. Em geral um plano específico de amostragem deve definir clara e sistematicamente todos os passos requeridos para a coleta da amostra.

Após a coleta apropriada da amostra, um outro aspecto importante é a garantia da integridade da amostra até o momento de análise.^{22, 23} A estabilidade dos pesticidas é um fator muito importante. Em alguns casos, produtos de degradação são mais estáveis que o composto original, assim o alvo da análise deve ser focado nestes produtos. Em geral, as meias-vidas dos pesticidas a baixas concentrações, $\mu\text{g/L}$, são, conforme esperado, muito dependente das condições de estocagem (pH, exposição à luz e temperatura). Degradação biológica também é um fator importante. Para alguns compostos, a degradação pode ser muito rápida. Estudos de degradação de pesticidas carbamatos em água mostraram que as perdas podem levar 20 dias para alguns compostos,²⁴ ao passo que para outros, perdas de até 90% podem ocorrer em apenas um dia.²⁵ Em geral as amostras devem ser analisadas o mais rápido possível após terem sido coletadas. As perdas podem ser devido à adsorção dos pesticidas nos frascos, hidrólise, biodegradação, fotólise e evaporação. Cada um destes mecanismos irá depender das propriedades físico-químicas dos pesticidas e da matriz.²⁶

I.4. Extração e Pré-concentração de Pesticidas

A análise de pesticidas compreende, basicamente, as etapas de extração do analito da matriz, remoção de interferentes (*clean-up*), pré-concentração e análise quali/quantitativa. Muitas vezes as etapas de extração e pré-concentração são realizadas simultaneamente e as técnicas mais utilizadas são a extração líquido-líquido (ELL) e a extração em fase sólida (EFS). Outras técnicas²⁷ descritas na literatura, tais como, extração com fluido supercrítico, extração com Soxhlet, extração por microondas e extração com solvente acelerado, não serão descritas aqui devido aos seus usos serem limitados à amostras sólidas e a ênfase neste trabalho é dada para amostras líquidas.

I.4.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)

Na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Para alguns sistemas, o valor da constante de distribuição, K_D , entre as fases pode ser aumentado pelo ajuste do pH, para prevenir a ionização de ácidos ou bases, pela formação de par-iônico com solutos ionizáveis, pela formação de complexos lipofílicos com íons metálicos ou pela adição de sais neutros, para diminuir a solubilidade de compostos orgânicos na fase aquosa.²⁸

A ELL é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e tem sido ainda utilizada em análises de diversos tipos de substâncias, pois extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos. A ELL apresenta as vantagens de ser simples (na configuração mais comum usa-se um funil de separação ou tubos de centrífuga) e possuir um número grande de solventes puros disponíveis comercialmente, os quais fornecem amplas faixas de solubilidade e seletividade. Entretanto, esta técnica possui uma série de desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perdas do analito; impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer a formação de emulsões, o que implica em grande consumo de tempo; volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; alguns solventes orgânicos são tóxicos; o processo é suscetível a erros e, relativamente, de difícil automação.

Embora a ELL seja considerada uma técnica bastante desvantajosa, alguns estudos usando microextração líquido-líquido (MELL) mostraram ser alternativas viáveis para análise de compostos orgânicos em água. O princípio da MELL é baseado na extração de um volume grande de amostra (~400 mL) com um volume pequeno de solvente (~500 µL) e pode ser aplicado em análises por Cromatografia Gasosa (CG) sem a etapa de evaporação. A microextração líquido-líquido foi aplicada na análise de alaclor e dois de seus derivados em amostras de água.²⁹

I.4.2. Extração em Fase Sólida (EFS)

Hoje em dia a extração em fase sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas, permitindo que concentrações a níveis muito baixos (traços) sejam detectadas pelos instrumentos. Esta técnica possui avanços quando comparada à técnica tradicional da extração líquido-líquido, principalmente com relação à redução da quantidade de solventes e amostra envolvidas em cada extração. Além disso, muitos analitos polares, tais como, produtos de degradação de micropoluentes orgânicos, não podem ser extraídos com boas recuperações quaisquer que sejam os solventes orgânicos imiscíveis em água utilizados. Uma consequência disso é que a EFS tem sido utilizada cada vez mais, inclusive em métodos oficiais, como os recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).

A técnica de extração em fase sólida foi revisada recentemente por Hennion³⁰ e por Majors.³¹ A EFS emprega sorventes recheados em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é

formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, retidos no tubo através de dois filtros. O formato de cartucho pode variar de maneira a ser compatível com os sistemas robóticos de preparação de amostras. Os reservatórios têm sido modificados para conter volumes crescentes de amostra. Alguns fabricantes têm incluído um filtro integrado aos cartuchos para evitar entupimentos, quando amostras contendo partículas são extraídas (por exemplo águas superficiais).

Em geral, os procedimentos de EFS envolvem 5 etapas: i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleção do analito.^{32, 33} A **Figura I.2** mostra a seqüência de um procedimento de extração em fase sólida direcionado para a pré-concentração de analitos e o *clean-up* (limpeza, ou remoção de interferentes) da amostra.

Atualmente, um grande número de sorventes é disponível comercialmente. Em geral, os materiais de recheio, empregados para EFS, são similares aos usados em cromatografia líquida (**Tabela I.2**). Assim, carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), fases quimicamente ligadas e polímeros (por exemplo, o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno), têm sido empregados. Os grupos mais freqüentemente usados como sorventes à base de sílica quimicamente ligada podem ser divididos em 3 categorias: i) fase reversa (FR); ii) fase normal (FN) e iii) troca iônica (TI).

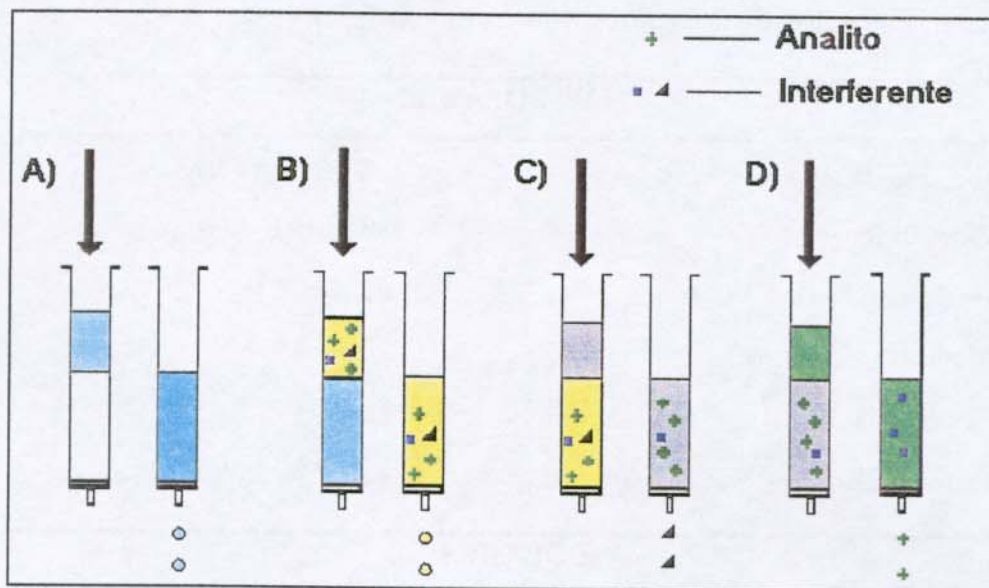


Figura I.2 - Esquema do procedimento de extração em fase sólida *off-line*. A) ativação e condicionamento do cartucho; B) aplicação da amostra, com retenção do(s) analito(s) e dos interferentes; C) troca de solvente e eluição de alguns dos interferentes (*clean-up*); D) troca de solvente e eluição do(s) analito(s), com retenção de outros interferentes.

A EFS empregando fase normal usualmente substitui a adsorção em extrações de solutos polares que podem sofrer adsorção irreversível e não serem eluídos do cartucho. A amostra é aplicada em um solvente de baixa polaridade e os analitos serão retidos em maior ou menor grau (dependendo de suas polaridades) na fase sólida. Em seguida, um solvente polar, como em adsorção, é aplicado para romper a interação do analito com a fase sólida polar e eluir os analitos.

Tabela I.2 - Exemplos de sorventes utilizados em EFS.

NÃO POLARES		
C18	Octadecilsilano	$\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$
C8	Octilsilano	$\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
C2	Etilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
C1	Metilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_3$
PH	Fenilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5$
CH	Cicloexilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{11}$
POLARES		
FL	Florisil	MgO_3Si
Al	Alumina	Al_2O_3
Si	Sílica	SiO_2
CN	Cianopropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CN}$
2OH	Diolsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}_2$
NH2	Aminopropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
PSA	N-Propiletenodiaminossilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
TROCA IÔNICA		
SCX	Benzenossulfonilpropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^- \text{H}^+$
PRS	Sulfonilpropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$
CBA	Carboximetilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
DEA	Dietilaminopropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
SAX	Trimetilaminopropilsilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
PSA	N-Propiletenodiaminossilano	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Na EFS empregando fase reversa, acontece o oposto: a fase móvel apresenta maior polaridade que a fase sólida, que retém os analitos menos polares presentes em solventes polares. Posteriormente, os analitos retidos serão eluídos com um solvente de baixa polaridade. Uma vez que o aumento do tamanho das cadeias hidrocarbônicas aumenta o caráter apolar do solvente, em muitos casos o uso de fases do tipo octadecil (C18) pode acarretar em uma retenção de analitos apolares maior que a desejada. Neste caso, empregam-se solventes contendo cadeias menores como octil (C8) ou butil (C4), diminuindo a retenção.

Para aumentar a seletividade da extração os solventes podem ser combinados das seguintes maneiras:

- i) Dentro de um mesmo cartucho de extração, usando as chamadas fases mistas com vários grupos funcionais de características diferentes ligados ao mesmo suporte;
- ii) Fazendo sucessivas extrações com cartuchos de diferentes recheios, passando o material eluído do primeiro cartucho para o segundo no modo “*on-line*” ou “*off-line*”;
- iii) Recheando o mesmo cartucho com diferentes solventes, em camadas, resultando em uma coluna de extração tipo sanduíche.

I.4.2.1. Modos de Extração “*Off-line*” e “*On-line*”

A EFS pode ser subdividida em dois modos: “*off-line*” e “*on-line*”.

No modo “*off-line*”, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. Após o preparo, a amostra é

introduzida no sistema cromatográfico por meio de um injetor, como qualquer outra amostra. Hoje em dia, muitos equipamentos para extrações múltiplas estão disponíveis comercialmente. Alguns deles fazem o processo de extração automaticamente, mas a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual (sistema semi-automático), enquanto outros, além de extração automatizada, são também capazes de transferir a amostra ao sistema cromatográfico (sistema completamente automático).

No sistema "on-line", a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada no próprio sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios. Na configuração "on-line", o sistema de extração em fase sólida faz parte do cromatógrafo a líquido e está freqüentemente inserido na alça de amostragem, sendo, após a pré-concentração, conectado diretamente na linha de alta pressão da fase móvel, que atua como eluente da amostra. Faz parte da extração "on-line" uma técnica chamada de comutação de colunas, que inclui todos os métodos nos quais a direção do fluxo da fase móvel é alterada por meio de uma válvula rotatória, onde o efluente de uma coluna é desviado para uma outra coluna após um certo intervalo de tempo. A primeira coluna, coluna de enriquecimento, é freqüentemente de baixa eficiência e faz um enriquecimento ou pré-concentração da amostra. A fração contendo o analito é transferida para uma segunda coluna, coluna analítica, que possui alta eficiência. O arranjo mais comum está mostrado na **Figura I.3**. Quando o injetor está na posição "pré-concentração", a amostra é bombeada pela bomba 1 através da coluna de enriquecimento, onde os analitos são retidos. Simultaneamente, a fase móvel é bombeada pela bomba 2 passando diretamente para a coluna analítica. Quando a etapa de pré-concentração termina, a válvula de injeção é colocada na posição "dessorção" e então a fase móvel passa pela coluna de enriquecimento e remove os analitos, enviando-os para a coluna analítica, onde são separados. Esta técnica

não requer manuseio da amostra entre as etapas de enriquecimento ou pré-concentração e separação, e é, portanto, adequada para sistemas totalmente automatizados. Esta técnica representa uma maneira fácil, eficiente, moderna e confiável para análise de traços. Algumas das principais vantagens são: a diminuição dos riscos de contaminação, a eliminação de perdas do analito por evaporação e finalmente a transferência e análise da totalidade das espécies extraídas.³⁴ Em contraste com a EFS "off-line", onde somente uma alíquota do extrato é injetada no cromatógrafo, a análise da amostra completa permite que o volume de amostra seja drasticamente reduzido.

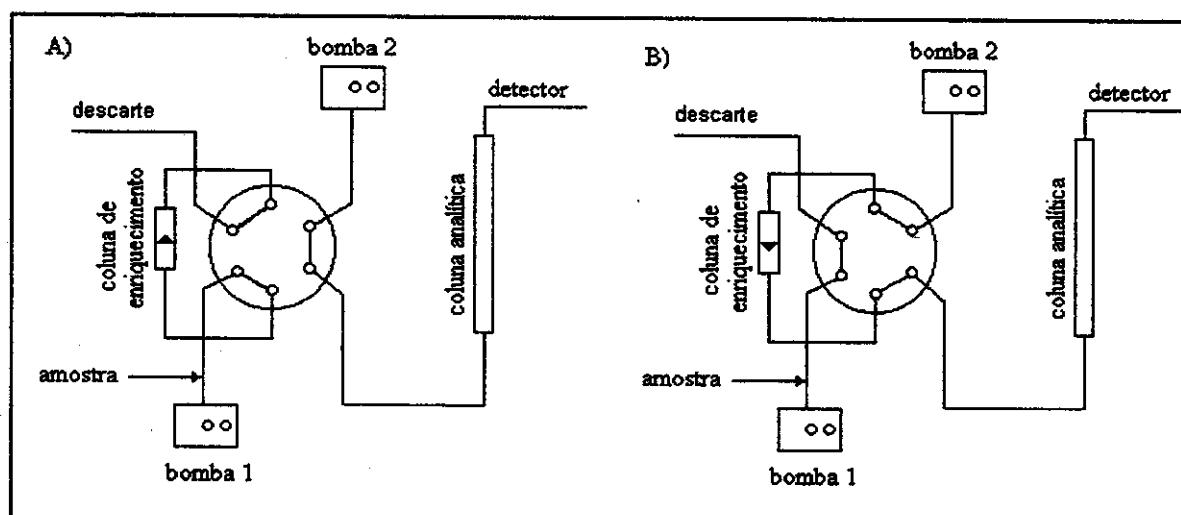


Figura I.3 – Diagrama do sistema "comutação de colunas". A) Pré-concentração e B) Dessorção e separação cromatográfica.

É surpreendente verificar que embora a cromatografia gasosa (CG) tenha sido o método preferido dos químicos analíticos por um longo período, o acoplamento "on-line" de EFS com CLAE foi a primeira técnica "on-line" robusta. Isto pode ser explicado pela boa compatibilidade entre as fases móveis da CLAE com amostras ambientais e biológicas, as quais são aquosas. O acoplamento de

CG “*on-line*” é mais delicado devido à incompatibilidade inerente entre a parte aquosa da etapa de EFS e a parte gasosa da CG.

I.4.2.2. Recentes Desenvolvimentos em EFS

Na área ambiental os recentes desenvolvimentos estão focados na pesquisa de técnicas envolvendo extrações de vários analitos (multirresíduos) com ampla faixa de polaridades, com posterior determinação por CLAE, visando alta eficiência de extração, com redução de tempo e de custo. Portanto, as pesquisas têm sido direcionadas para a obtenção de sorventes mais seletivos, para novas configurações cromatográficas e automação. Alguns aspectos representativos estão citados a seguir.

I.4.2.2.1. Preparo de Materiais Baseados em Suporte de Sílica para EFS

A grande maioria das fases utilizadas em EFS com mecanismo de separação baseado em partição são preparadas a partir de sílica. Sílica gel é o suporte mais popularmente utilizado devido à grande disponibilidade de materiais com diâmetros de poros diferentes, uniformidade de poros, resistência mecânica a elevadas pressões, alta área superficial e facilidade de derivatização. Além disso há um grande conhecimento de sua superfície.³⁵ A principal desvantagem dos materiais baseados em sílica são: instabilidade na faixa fora do pH 2-8, devido à hidrólise dos grupos siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) que fazem parte da estrutura das fases quimicamente ligadas em pH baixo e a solubilidade da sílica em meio básico.

No caso mais comum de preparo de fases, faz-se a sílica reagir com um derivado organoclorossilano, ligando o grupo alquil (R) do reagente à estrutura da

sílica (fase quimicamente ligada). A **Figura I.4** mostra o esquema da reação de síntese de um sorvente empregado em EFS.

Neste exemplo, a reação pode ser com um, dois ou mais grupos funcionais, sendo chamada de derivatização monofuncional, difuncional, etc. A escolha do grupo R definirá se a fase preparada será polar (R = propil-OH, propil-CN, propil-NH₂, etc.) e, portanto denominada “fase normal”, ou apolar (R = C18, C8, C2, etc.), denominada “fase reversa”. No caso de fase reversa, quanto maior a cadeia do radical alquil, mais apolar será a fase, apresentando assim maior potencial para reter analitos apolares. De forma análoga à CLAE, os grupos silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) remanescentes na fase estacionária (**Figura I.4**) podem atuar como sítios de adsorção e, desse modo, criam uma superfície heterogênea. Isto é usualmente resolvido através do tratamento com trimetilclorossilano, como em CLAE. O trimetilclorossilano é um reagente similar ao organoclorossilano utilizado na preparação da fase quimicamente ligada, porém com cadeia alifática $-\text{CH}_3$, de pequeno volume e que permite o acesso a alguns dos silanóis residuais. Esta reação terminal é chamada capeamento (ou *end-capping*) e visa reduzir os silanóis residuais.

Apesar do desenvolvimento de sorventes altamente seletivos, o uso de materiais do tipo fase reversa continua sendo amplamente aplicado no tratamento de amostras aquosas. Os tipos mais utilizados são o C-8 e o C-18.³⁶

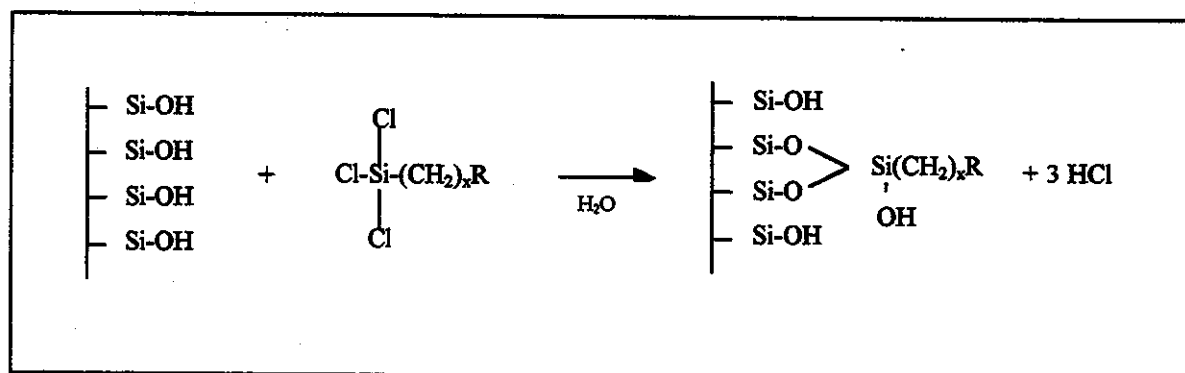


Figura I.4: Exemplo de reação de derivatização da sílica visando o preparo de sorvente quimicamente ligado.

O primeiro requisito da EFS é fornecer altas recuperações, não somente para analitos apolares e moderadamente polares, mas também para analitos polares. Inicialmente os cartuchos do tipo C-18 eram recheados utilizando as mesmas fases estacionárias usadas em colunas de CLAE, exceto que a granulometria era maior. Estas fases evoluíram com o objetivo de se obterem fases mais hidrofóbicas, com um mínimo de grupos silanóis residuais. Entretanto foi demonstrado o potencial dos grupos silanóis em produzirem interações adicionais nos processos de EFS e portanto, vários tipos de cartuchos C-18 têm sido especificamente preparado para EFS.

Hoje em dia, os produtores fornecem diversos tipos de cartuchos C-18. Quase todos os cartuchos do tipo C-18 são feitos com sílica gel porosa, com área superficial 500-600 m²/g. Alguns destes materiais são disponíveis com uma elevada porcentagem de carbono (recobrimento) correspondendo a fases com alto recobrimento pelas cadeias alquilsilanos. Mas suas propriedades podem diferir dependendo se as cadeias de alquilsilanos são mono ou trifuncionais e se foram submetidas ou não ao capeamento dos grupos silanóis. Há também materiais com baixas porcentagens de carbono, os quais contém, geralmente,

maiores porcentagens de silanóis. As características de alguns cartuchos do tipo C-18 e C-8 estão apresentadas na Tabela I.3.

Tabela I.3 - Características de alguns sorventes comercialmente disponíveis, do tipo C-8 e C-18.²⁸

Sorvente	Fabricante	Poros (nm)	d _p (µm)	Função do silano	Capreamento	%C
Bond-Elut C ₁₈	Varian	6	40	tri	Sim	18
Bond-Elut C ₁₈ /OH	Varian	6	40	n.d.	Não	13,5
Bond-Elut C ₈	Varian	6	40		Sim	12,5
Bakerbond C ₁₈	J.T. Baker	6	40	tri	Sim	17-18
Bakerbond C ₁₈ -Polar Plus	J.T. Baker	6	40	tri	Não	16-17
Bakerbond C ₁₈ -light	J.T. Baker	6	40	tri	Não	12-13
Bakerbond C ₈	J.T. Baker	6	40	tri	Sim	14
Isolute C ₁₈ (EC)	IST	5,5	70	tri	Sim	18
Isolute C ₁₈	IST	5,5	70	tri	Não	16
Isolute MF C ₁₈	IST	5,5	70	mono	Não	16
Isolute C ₈ (EC)	IST	5,5	70	tri	Sim	12
Isolute C ₈	IST	5,5	70	tri	Não	12
Sep-Pak C ₁₈ t	Waters	12,5	37-55	tri	Sim	17
Sep-Pak C ₁₈	Waters	12,5	37-55	mono	Sim	12
Sep-Pak C ₈	Waters	12,5	37-55	mono	Sim	9
Chromabond C ₁₈ ec	Machery-Nagel	6	45/100	n.d.	Sim	14
Chromabond C ₁₈	Machery-Nagel	6	45/100	n.d.	Sim	14
Chromabond C ₈	Machery-Nagel	6	45	n.d.	Não	8
DSC C ₁₈	Supelco	7	50	tri	Sim	18

n.d = não disponível

Assim como as colunas para CLAE, estes materiais possuem uma série de vantagens, tais como, ampla faixa de aplicação; são disponíveis comercialmente em uma grande variedade de apresentação (quantidade de fase, formatos de cartuchos, seringas ou discos), características físico-químicas diferentes (tamanho de partícula, porcentagem de carbono, capeamento, etc.); grande número de aplicações descritas na literatura, etc.

Recentemente novos processos de imobilização do polímero (polissiloxano) sobre o suporte, para uso como fase estacionária em CLAE, têm sido estudados em nosso grupo de pesquisa e são obtidos através da irradiação com raios gama,^{37, 38} irradiação com microondas³⁹ e aplicação de temperatura.⁴⁰ Entretanto, nada existe sobre o preparo de sorventes para aplicações em EFS até o momento, sendo este o primeiro trabalho sobre o assunto utilizando estes procedimentos. Os princípios de cada um destes processos estão descritos a seguir.

I.4.2.2.1.1. Imobilização por Irradiação Gama

A irradiação gama consiste de fótons de energia muito alta que interagem principalmente com elétrons dos materiais que estão sendo irradiados. A interação ocorre muito rapidamente, uma vez que leva somente $\sim 10^{-18}$ s para um fóton atravessar um átomo como o Si ou O. A interação pode transferir um impulso, que remove um elétron de um átomo ou molécula causando ionização ou transferência de uma quantidade de energia menor, produzindo centros excitados em átomos ou moléculas.⁴¹

A preparação de fases estacionárias tipo reversa para CLAE usando polissiloxanos sobre sílica normalmente compreende uma etapa de imobilização

envolvendo o entrecruzamento promovido por radicais livres, induzidos pela radiação ionizante e ou por um iniciador radicalar (peróxidos ou azo compostos). Schomburg e colaboradores têm mostrado que polissiloxanos imobilizados sobre sílica por entrecruzamento induzido por peróxidos ou irradiação gama fornecem materiais tipo fase reversa de boa qualidade.^{42, 43, 44, 45}

A imobilização por irradiação gama é necessária para obterem fases estacionárias mais estáveis por períodos mais longos, conforme sugerido em estudos prévios em nosso laboratório.^{46, 47, 48} A irradiação gama aumenta a quantidade de polímero (PMOS ou PMODS) retido no suporte e portanto melhora o desempenho cromatográfico. Mesmo após contato prolongado com fases móveis com pH altos, a quantidade de PMOS é apenas reduzida ligeiramente.

O mecanismo de imobilização ainda não foi totalmente esclarecido, mas, tem sido referenciada a possibilidade da radiação γ promover reticulação das cadeias poliméricas ou ainda induzir a ligação química do polímero com o suporte.⁴⁶

1.4.2.2.1.2. Imobilização por Irradiação com Microondas

A radiação microondas é um tipo de energia não ionizante que causa movimentos moleculares tais como, migração iônica e rotação dipolar. Como consequência estes fenômenos causam um aquecimento rápido das moléculas polares. Reações de síntese orgânica e cura de resinas têm sido realizadas com sucesso utilizando a energia proveniente de fornos de microondas.⁴⁹

Kapor e Jardim⁵⁰ têm utilizado a energia microondas como meio de imobilização de PMOS sobre sílica para uso como fase estacionária em CLAE.

Fases sorvidas e imobilizadas por microondas foram comparadas. Os autores observaram que as eficiências das colunas praticamente dobravam após imobilização. A principal vantagem do uso do microondas é a alta velocidade de aquecimento e desse modo a imobilização térmica ocorre mais rapidamente que a usando um forno convencional.

A radiação microondas é uma radiação eletromagnética que provoca o movimento das espécies em solução pela migração dos íons e/ou rotações de dipolo causadas pelo elevado número de vezes que o campo eletromagnético se altera. Um forno caseiro se alterna cerca de $4,9 \times 10^9$ vezes. O mecanismo de transmissão de calor por microondas é diferente dos três modos bem estabelecidos: condução, radiação e convecção.⁵¹ O aquecimento é gerado pela interação das microondas e das moléculas da amostra. As frequências de um microondas vão de 300 a 300.000 MHz.

I.4.2.2.1.3. Imobilização Térmica

Ohmacht et al. estudaram a imobilização térmica do PMOS em sílica à altas temperaturas (200-400°C) na presença de um catalisador (peróxido de benzoíla).⁵² As colunas forneceram melhores resultados à temperatura de 400°C. Collins e colaboradores, recentemente, verificaram que a imobilização térmica de PMODS e PMOS sobre sílica se ocorre na ausência de reagentes de entrecruzamento e em temperaturas mais baixas (80-180°C).^{53, 54, 55}

I.4.2.2.2. Desenvolvimento de Sorventes mais Seletivos

As novas tecnologias de fabricação de sorventes têm sido direcionadas para a obtenção de materiais especialmente preparados para extrair analitos com uma ampla faixa de polaridade. Isto inclui sorventes do tipo C-18 não capeados,

ou seja sorventes com grande número de silanóis residuais, que permitem que hajam interações polares secundárias com os solutos. Além disso, problemas com a extração de analitos polares em amostras ambientais têm sido parcialmente resolvidos com o uso de sorventes baseados em carbono grafitizado ou de copolímeros altamente entrecruzados, tal como, estireno-divinilbenzeno, com alta área superficial específica de 500 a 1200 m²/g e elevado grau de pureza.

Outros tipos relevantes de sorventes usados na análise de resíduos de pesticidas são os imunossorventes, polímeros impressos molecularmente e os chamados de fase de acesso restrito. Estes sorventes estão descritos a seguir.

I.4.2.2.2.1. Imunossorventes

A tecnologia de imunoensaio é baseada nas reações específicas entre antígenos e anticorpos. Diferente do imunoensaio, procedimentos baseados em imunossorventes envolvem, após a etapa de dessorção, uma segunda etapa de separação analítica e detecção de analitos individuais. Cartuchos para EFS recheados com imunossorventes e/ou pré-colunas têm sido utilizados na análise de pesticidas.^{56,57} Alguns exemplos de aplicações de imunossorventes em análises de águas são análise de atrazina⁵⁸ e clortoluron.⁵⁹ As primeiras aplicações multirresíduo envolveram a EFS no modo *off-line* usando imunossorvente para a pré-concentração de traços de pesticidas da classe feniluréias e triazinas em amostras ambientais de água.^{60, 61} A alta seletividade obtida foi claramente demonstrada pelo fato de não se terem interferentes em comprimentos de onda de 244 nm, onde normalmente aparecem picos de ácidos húmicos, nos extratos de águas do rio Sena. Limites de detecção foram obtidos na faixa de 0,1 µg/L após uma pré-concentração de 200 mL usando o cartucho com o imunossorvente. A tecnologia imunossorvente envolveu a produção e purificação

de anticorpos policlonais contra isoproturon e atrazina e a seleção de sorventes baseados em sílica ao invés de polímeros rígidos, para a ligação covalente do anticorpo ao suporte. Extrações *on-line* usando estes imunossorventes também tem sido reportadas na literatura.^{62, 63}

I.4.2.2.2. Polímeros Impressos Molecularmente (MIP)

Recentemente, extrações altamente seletivas baseadas em colunas recheadas com polímeros impressos molecularmente, conhecidos como MIP (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*), têm sido desenvolvidas. Os MIP são obtidos através da preparação de polímeros com sítios de reconhecimento sintéticos e têm uma seletividade pré-determinada para um ou mais analitos.^{64, 65} Estes sítios de reconhecimento são obtidos pelo arranjo de monômeros funcionais polimerizáveis ao redor das moléculas do analito. Assim, são formados complexos, através de interação molecular, entre o analito e o monômero precursor. Os complexos são fixados através de reações de entrecruzamento de polímeros. A remoção do analito da matriz polimérica forma lacunas (sítios de reconhecimento) que irão exibir afinidade pelo analito. O potencial deste tipo de material, também chamado de “anticorpo de plástico”, é alto uma vez que oferece resistência mecânica à alta temperatura e à pressão e é inerte frente à condições extremas de ácidos, bases, íons metálicos e solventes orgânicos. Estas características são bastante favoráveis para serem utilizadas em análises de rotina.

Recentemente foi publicada a aplicação de MIP, usando EFS no modo *on-line*, na análise de triazinas. Neste estudo foi empregada uma coluna de 15 x 4,6 mm, recheada no próprio laboratório com o MIP, combinada com outra coluna de 250 x 4,6 mm recheada com fase tipo C-18. Na análise instrumental foi colocada uma pré-coluna de 55 x 2 mm antes da coluna de MIP, que foi usada

para EFS da amostra de água. Após a amostragem, todas as espécies extraídas foram transferidas, usando 100 % de acetonitrila, para a coluna de MIP a qual reteve os analitos de interesse e permitiu que os contaminantes fossem eluídos. Com um pequeno volume de água pura (200 µL) os analitos foram capturados em uma alça de amostragem (*loop*) de uma válvula de comutação de coluna (*switching*) e então injetados na coluna analítica. Foi observada uma excelente seletividade na determinação de triazinas em amostras de águas ricas em ácidos húmicos (20 mg/L).⁶⁶

I.4.2.2.3. Fase de Acesso Restrito (RAM)

Originalmente a fase de acesso restrito (do inglês *Restricted Access Matrix* - RAM) foi desenvolvida para aplicação em análises biomédicas para a determinação de analitos presentes em fluidos biológicos, contendo compostos de alta massa molar (proteínas). Este material possui uma superfície hidrofílica biocompatível na parte externa e hidrofóbica no interior dos poros da partícula do sorvente. A primeira RAM foi desenvolvida por Hagestam e Pinkerton⁶⁷ e o mecanismo de separação é baseado em uma combinação de exclusão e partição. As moléculas grandes, tais como proteínas, não conseguem penetrar nos poros e eluem rapidamente, enquanto as moléculas pequenas entram nos poros e são retidas, para posterior eluição e análise, **Figura I.5**.

Devido às diferenças nas massas molares entre os analitos de interesse (moléculas pequenas) e as substâncias húmicas (moléculas grandes), o uso do acoplamento de RAM com fase reversa tem mostrado ser uma alternativa interessante para a análise de pesticidas. Pré-colunas recheadas com RAM melhoraram substancialmente a análise de herbicidas ácidos em amostras

ambientais de água.⁶⁸ Entretanto as pré-colunas mostraram pobre reprodutibilidade, limitando este tipo de aplicação em análise de rotina.

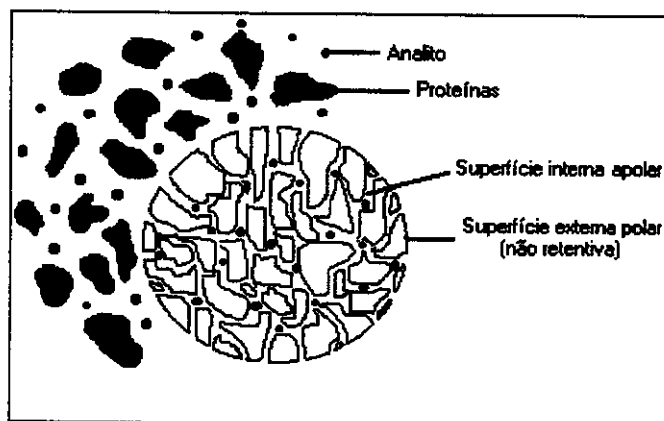


Figura I.5 – Fase de acesso restrito (RAM).

Um estudo de vários tipos de RAM foi investigado usando fase reversa e detecção por UV para a pré-concentração de diferentes classes químicas de herbicidas em amostras ambientais de águas.⁶⁹

I.4.2.2.2. Novas Configurações Experimentais para EFS

I.4.2.2.2.1. Extração em Discos

O segundo formato de EFS mais utilizado depois do cartucho é o disco ou membrana carregada de partícula. Neste tipo de EFS, as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibrilas de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro.⁷⁰ A extração em discos foi originalmente introduzida para extração de traços de materiais orgânicos em água.⁷¹ Um disco típico, 47 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura, contém 500 mg de sorvente, por exemplo, partículas de C-8 ou C-18, de 8 μm de diâmetro de partícula e 6 nm de poro, imobilizadas no suporte.⁷² O diâmetro do disco é escolhido de

acordo com o volume de amostra. Os discos são disponíveis em vários diâmetros, 4 a 90 mm. Os avanços recentes desta técnica foram descritos por Blevins e Hall.⁷³

Os discos possuem uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação da amostra e na eluição, ausência de caminhos preferenciais, maior capacidade, melhor repetibilidade e reprodutibilidade, vazões mais altas e menores volumes de eluentes para a dessorção. O melhor desempenho dos discos é devido ao tamanho menor da partícula, que proporciona uma transferência de massa mais rápida. Uma das desvantagens do uso de discos é que a etapa de condicionamento é mais crítica. Diferente da EFS em cartuchos, a secagem do disco deve ser evitada, pois, devido à grande área superficial, uma interface ar/água é formada facilmente, resultando em um decréscimo das recuperações. Da mesma forma que nos cartuchos, os poros dos discos podem ser obstruídos quando se extrai amostras contendo uma concentração relativamente alta de macromoléculas ou de material particulado. Assim, é aconselhável filtrar as amostras aquosas antes da extração ou usar pré-filtros inertes.

Para aumentar a seletividade ou a capacidade dos discos, pode-se utilizar a técnica de empilhamento. Empilhando vários discos de mesmo sorvente irá aumentar a capacidade e se os sorventes forem diferentes, tem-se a retenção de compostos com características diferentes.

O processo de extração pode ser realizado de duas maneiras:

i) A mais comum é empregar o mesmo equipamento utilizado em CLAE para filtração de solventes e passar a amostra através do disco sob vácuo. Os

analitos são retidos para posterior remoção com um volume adequado de solvente;

ii) O disco é suspenso na amostra líquida, por um período de tempo controlado, em seguida é secado e os analitos são dessorvidos com outro solvente apropriado.

I.4.2.2.2. Automação

Hoje em dia, muitos equipamentos para extrações múltiplas estão disponíveis comercialmente. Alguns deles fazem o processo de extração automaticamente, mas a transferência da amostra para o injetor cromatográfico é manual, enquanto outros, além de extração automatizada, são também capazes de transferir a amostra para o sistema cromatográfico. Alguns exemplos são o ASPEC da Gilson, Microbal da Hamilton e o Autotrace da Zymark. Existe a possibilidade de alguns destes equipamentos realizar a injeção automática de uma alíquota do extrato no cromatógrafo.

Uma automação completa também existe para sistemas *on-line* de EFS e CLAE. Alguns exemplos compreendem o Prospec da Spark Holland, ODS-2 da Merck e o Aspec XL da Gilson. Estes aparelhos melhoram sensivelmente a produtividade uma vez que a próxima amostra está sendo preparada enquanto a anterior está sendo analisada.

Assim, o desenvolvimento de método pode ser facilmente automatizado com vários graus de automação.

I.5. Determinação dos Pesticidas

O monitoramento de resíduos de pesticidas em ambas as áreas ambiental e de saúde pública é feito através da identificação e quantificação de vários pesticidas, os quais diferem largamente quanto as características físico-químicas. Assim a determinação destes componentes, à nível de traços, tem sido um desafio para os químicos analíticos. As técnicas instrumentais mais comumente utilizadas para análise de resíduos de pesticidas são as cromatográficas e mais recentemente a eletroforese capilar (EC).⁷⁴

Desde a sua introdução na década de 50, a cromatografia gasosa (CG), usando colunas recheadas, foi rapidamente adotada devido à sua capacidade em analisar multirresíduo de pesticidas. Importantes desenvolvimentos nesta área, tais como, colunas capilares e detectores mais seletivos e mais sensíveis, aumentaram significativamente o número de pesticidas analisados em uma única corrida. Estes atrativos fizeram da CG a técnica mais largamente usada para a análise de resíduos de pesticidas.⁷⁵ Por exemplo, na Holanda um método multirresíduo, empregando coluna capilar para CG com detecção por espectrometria de massas (EM), compreende a determinação de quase 300 pesticidas em gêneros alimentícios, os quais cobrem cerca de 60% dos pesticidas mencionados no “*Dutch Regulation on Pesticides in Foodstuffs*”.⁷⁶

Várias tendências podem ser observadas na ciência de pesticidas como resultado da mudança no uso de pesticidas e no desenvolvimento de novos produtos. Por exemplo, tem sido observado o decréscimo no uso de inseticidas persistentes (de longo termo), tais como organoclorados, substituídos por pesticidas mais polares e mais rapidamente degradados (tempo de meia-vida curto), por exemplo os N-metilcarbamatos. Outra tendência é a substituição do uso de herbicidas tradicionais, tais como, triazinas, ácidos clorofenoxi e feniluréias pelos pesticidas chamados de modernos, por exemplo, sulfoniluréias e

imidazolinonas, os quais apresentam propriedades favoráveis, tais como, uma baixa dose de aplicação e alto grau de bio-degradação.⁷⁷ Muitos destes pesticidas são bastante polares, pouco voláteis e/ou termo-lábeis e não são analisáveis diretamente por CG.⁷⁸ Devido ao seu forte atrativo, métodos envolvendo derivatização seguida por CG/EM permanecem em uso para compostos polares termo-estáveis, por exemplo ácidos clorofenoxi. Entretanto, muitos dos pesticidas polares podem ser eficientemente separados por cromatografia líquida de alta eficiência usando fase reversa, sem a etapa tediosa de derivatização. Assim a CLAE usando detectores de UV ou fluorescência, rapidamente tornou-se um atrativo, na década de 80, e estabeleceu-se como uma técnica complementar à CG para a determinação de pesticidas polares. A ampla faixa de aplicação, estabilidade, fácil uso e aumento na seletividade advinda do detector por arranjo de diodos (DAD), fez da detecção por UV a mais amplamente usada na análise de pesticidas. Entretanto a confirmação se torna difícil para pesticidas da mesma classe devido ao alto grau de similaridade entre os espectros. Isto faz da CLAE-FR-UV o método mais efetivo para *screening* rápido de amostras, mas usualmente requer análise adicional confirmatória no caso de resultados positivos.

O detector de fluorescência é o mais sensível e seletivo para analitos que fluorescem, entretanto a sua aplicabilidade é limitada uma vez que poucos pesticidas contém fluoróforo. Derivatização pré e pós-coluna aumentaram o campo de aplicação para análises multirresíduos. Estes métodos são baseados no trabalho de de Kok et al.⁷⁹ os quais empregam hidrólise pós-coluna de N-metilcarbamatos com um reator de fase sólida seguido por reação com orto-ftalaldeído (OPA). A mesma aproximação, incluindo preparação de amostras automática e análise "*on-line*"⁸⁰ e "*off-line*"⁸¹ de 22 N-metilcarbamatos em amostras ambientais de águas, demonstram claramente a importância da CLAE neste campo de análise.

Durante os últimos anos, com a recente introdução no mercado de instrumentos de CLAE acoplados a espectrômetros de massas, robustos e de fácil operação, conseguiu-se uma nova maneira de analisar pesticidas mais eficientemente. O potencial da CL/EM em analisar, confirmar e quantificar analitos polares faz desta técnica um atrativo para análise de pesticidas.⁸² Além disso, um importante aspecto da EM é realizar análise de compostos que não contém cromóforo. Isto permite a determinação de uma ampla gama de pesticidas. Esta técnica está descrita a seguir.

I.5.1. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CL/EM)

I.5.1.1. O Espectrômetro de Massas (EM)

A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular devido ao seu potencial de fornecer informações de massa molar bem como sobre a estrutura do analito. A base da espectrometria de massas é a produção de íons, que são subseqüentemente separados ou filtrados, de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), e detectados. O resultado é um gráfico de abundância relativa dos íons produzidos em função da massa/carga (m/z).

O espectrômetro de massas é um instrumento sofisticado e é constituído basicamente das seguintes partes: introdução da amostra, fonte de ionização, muitas vezes denominada de interface, analisador de massas (ou filtro de massas), detecção de íons e aquisição/processamento de dados.

Após a injeção da amostra no EM, ocorre a produção de íons pela fonte de ionização. A ionização do analito pode ser realizada de várias maneiras sendo os principais métodos são impacto de elétrons (EI) e ionização química (CI).

Uma vez formados os íons, eles são analisados de acordo com a sua razão massa/carga pelo analisador de massas. Os mais comuns são: quadrupolo (triplo quadrupolo), setor magnético, “*ion trap*” (quadrupolo “*ion trap*”) e “*time of flight*” (quadrupolo TOF), sendo os dois primeiros os mais usados em CL/EM.

A detecção do íon é feita por meio de um tubo multiplicador de elétrons, que determina a intensidade do feixe de elétrons.

Uma enorme quantidade de dados é gerada pelo EM e programas computacionais altamente avançados são necessários para a aquisição e o processamento de dados.

I.5.1.2. Interfaceamento da Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas

O acoplamento da cromatografia líquida com espectrometria de massas tem sido estudado há cerca de 25 anos e as vantagens iniciais que incentivaram o desenvolvimento desta técnica multidimensional estão sumarizadas na Tabela I.4.⁸³ Entretanto a história da CL/EM tem sido caracterizada pelas muitas tentativas em resolver as incompatibilidades fundamentais geradas no interfaceamento entre estas duas técnicas.

O primeiro problema é a quantidade do efluente da coluna que pode ser introduzida no sistema de vácuo do EM. Normalmente a CLAE emprega colunas analíticas (cerca de 4,6 mm d.i.) e vazões típicas de 1 mL/min.

O segundo problema é a composição do efluente da coluna. A interface CL/EM impõe restrições quanto à composição da fase móvel utilizada em CLAE. Em geral, o uso de aditivos não voláteis na fase móvel, tais como tampão fosfato, EDTA, reagente par-iônico como tetraalquilamônio e alquilsulfonatos, são proibidos.

Tabela I.4 - Vantagens iniciais do interfaceamento de cromatografia líquida com espectrometria de massas.

-
- 1) Espectrômetro de massas é um detector universal para CL
 - 2) Potencial para análises de compostos não voláteis
 - 3) Potencial para análise de compostos termolábeis
 - 4) Evita a necessidade de derivatização do analito
 - 5) Baixos limites de detecção
 - 6) Identificação não ambígua dos analitos
 - 7) Avaliação de pureza de picos
-

O terceiro problema é o tipo de analito a ser utilizado. Para se obter sucesso no acoplamento de CL/EM foi necessário o desenvolvimento de técnicas de ionização capazes de ionizar compostos altamente polares, termolábeis, iônicos e/ou compostos de massa molar alta.

A ionização da amostra foi um problema importante no início do desenvolvimento da CL/EM uma vez que somente dois tipos de fontes de ionização eram disponíveis, EI e CI.

EI e CI requerem que a amostra esteja no estado gasoso, ao passo que CL e CL/EM são especialmente interessantes para análise de analitos não voláteis. Isto conduziu a introdução de técnicas suaves de ionização como "*Fast-Atom*

Bombardment" (FAB), "*Thermospray*" e "*Electrospray*" e, mais recentemente, "*Matrix-Assisted Laser Desorption*" (MALDI). Como resultado, a ionização dos analitos atualmente não é mais considerada um problema. Para resolver a incompatibilidade da vazão, uma variedade de soluções técnicas foram desenvolvidas: as interfaces de CL/EM. Interface é um dispositivo colocado entre o CL e o EM e serve para remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons. As principais interfaces utilizadas na análise de pesticidas polares e compostos relacionados são denominadas: "*Thermospray*" (TS); "*Particle Beam*" (PB) e Ionização à Pressão Atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization* - API); "*Electrospray*" (ES), Ionização Química à Pressão Atmosférica ("*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*" - APCI) e "*Ionspray*" (IS).^{84, 85} A Figura I.6 ilustra o campo de aplicações das diferentes interfaces.

As interfaces baseadas em ionização à pressão atmosférica (API), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e "*electrospray*" (ES), são atualmente as mais utilizadas no acoplamento de CL/EM⁸⁶ devido a uma série de vantagens que oferecem, tais como, facilidade de operação, baixo limite de detecção, confiabilidade, robustez e ampla faixa de aplicações. Estas interfaces podem ser consideradas como padrões em CL/EM.^{87, 88, 89}

I.5.1.2.1. Interfaces API

Duas maneiras diferentes de introdução de amostra são usadas em combinação com API. Elas diferem principalmente no sistema de nebulização e na faixa de aplicação que cobrem. A Figura I.7 mostra um esquema das interfaces: ES (Figura I.7A) e APCI (Figura I.7B).

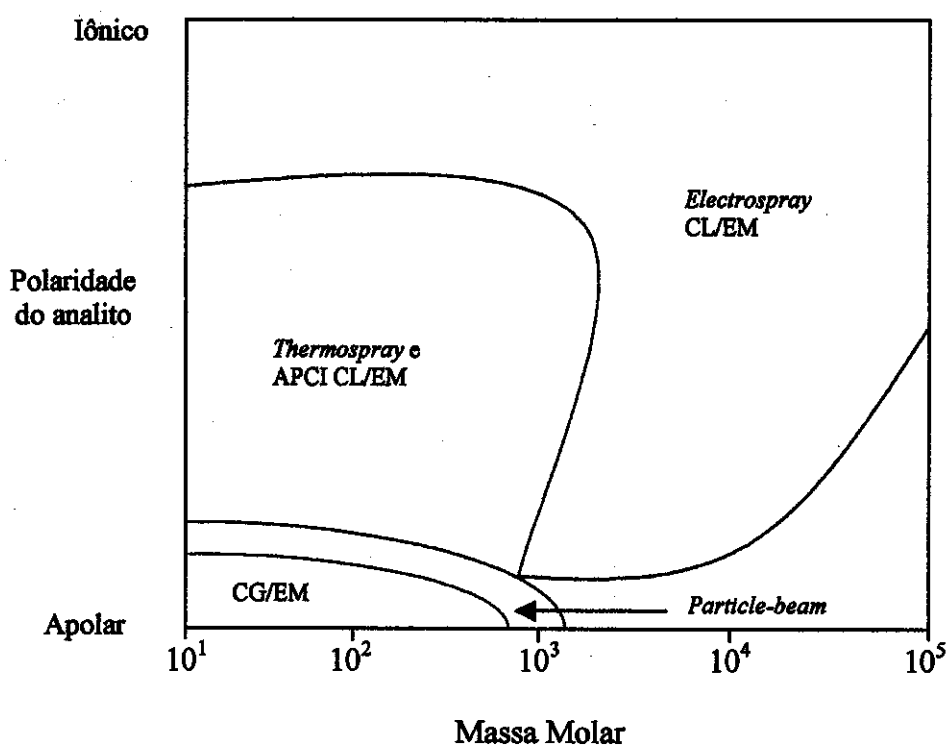
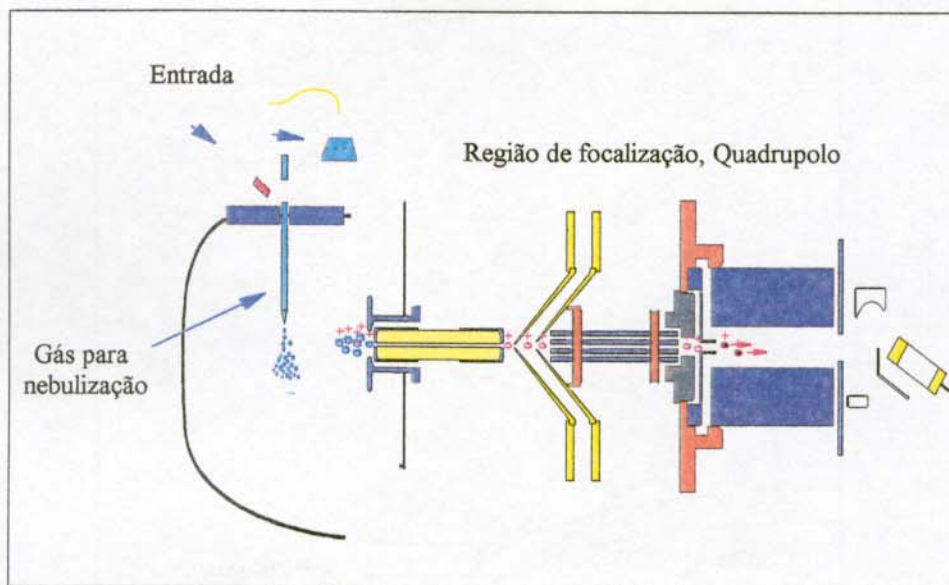


Figura I.6 – Faixa de aplicações das interfaces.

I.5.1.2.1.1. Interface *Electrospray* (ES)

A interface “*electrospray*” é hoje em dia a mais largamente utilizada para a introdução de líquidos no espectrômetro de massas. É uma técnica simples e elegante, que opera à pressão atmosférica e à temperatura moderada, e é provavelmente a técnica de ionização mais suave para CL/EM. Além disso possui limites de detecção, em geral, melhores que as demais técnicas, é de fácil operação e manutenção. O surgimento da interface “*electrospray*” proporcionou um importante avanço no campo de CL/EM, principalmente na análise de compostos de alta massa molar e multicarregados, tais como, proteínas e peptídeos.

A)



B)

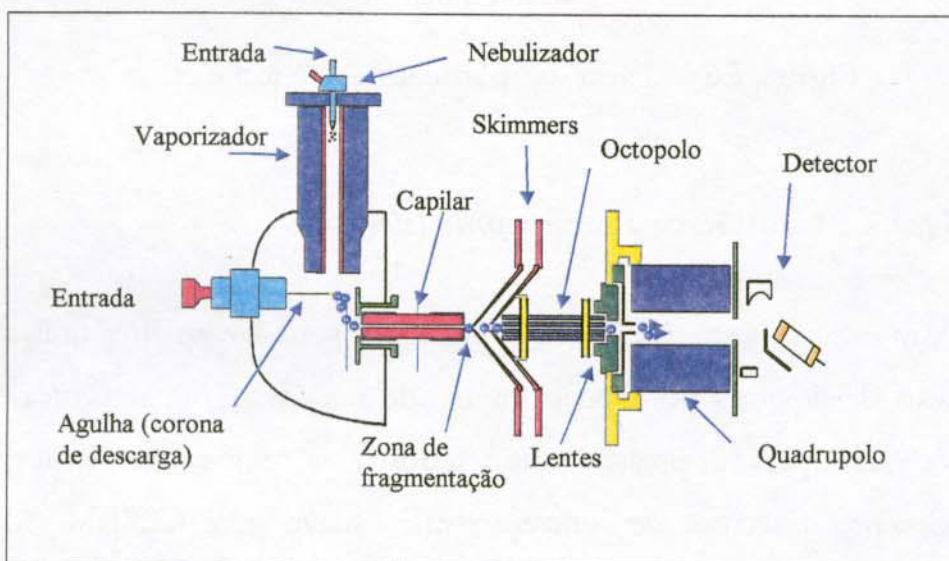


Figura I.7 - A) Esquema ortogonal da interface ES e B) interface APCI.⁹⁰

O processo “*electrospray*” pode ser dividido em 3 passos: nebulização da solução da amostra em gotas altamente carregadas, liberação dos íons das gotas, e transporte dos íons da região à pressão atmosférica para a região de alto vácuo do analisador de massas do EM.

A nebulização do líquido ocorre devido à aplicação de um campo elétrico alto resultante da diferença de potencial, normalmente de 3-6 kV, entre o capilar e um contra-eletrodo.

O mecanismo da ionização “*electrospray*” tem sido bastante debatido e o mais aceito é que a ionização resulta da evaporação de moléculas neutras do solvente acompanhado pelo aumento da força do campo elétrico na superfície da gota. Quando a força do campo elétrico se aproxima do limite de instabilidade de *Rayleigh*, a instabilidade da superfície, induzida pelo campo, conduz a formação de um jato de líquido na superfície da gota, de onde são emitidas pequenas microgotas também carregadas (explosões coulômbicas). Este processo de evaporação na superfície das gotas continua até um certo campo elétrico crítico, quando se acredita que inicie a emissão direta de íons dessolvatados das microgotas. A evaporação das gotas é estimulada pelo uso de um gás contra-corrente (aquecido) ou por aquecimento do capilar.⁹¹

Na prática o mecanismo de ionização “*electrospray*” dos analitos é mais complexo, pois além da evaporação dos íons pré-formados nas microgotas, também ocorrem reações na fase gasosa e este fenômeno tem um importante papel no processo de ionização.

Na interface “*electrospray*” deve-se utilizar tampões com pH altos para íons negativos e pH baixos para íons positivos (dependendo do pKa do analito):



O tampão deve ser volátil e possuir baixa concentração (< 50 mmol/L). Normalmente são utilizados ácidos fórmico, acético (1-2%) ou trifluoroacético (0,1%) no modo íon positivo. No modo íon negativo normalmente se utiliza NH_4OH ou trietilamina (0,5%).

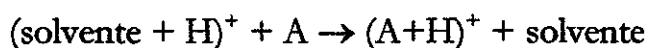
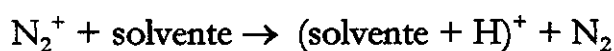
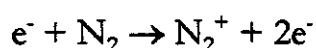
A **Figura I.7A** ilustra um esquema da interface "*electrospray*" utilizada nos equipamentos da Hewlett Packard. O "*sprayer*" é posicionado ortogonalmente em relação ao orifício de amostragem. Este esquema permite que vazões mais altas sejam utilizadas. Além disso, ele reduz a contaminação do orifício de amostragem do EM.

Algumas desvantagens desta técnica são: que a fase móvel influencia na ionização, há a possibilidade de formação de adutos ($\text{M}+\text{Na}$, K , NH_4), não é muito útil na análise de compostos apolares e a vazão deve ser menor ou igual a 1 mL/min. Além disso, os mecanismos de ionização não estão bem esclarecidos.

I.5.1.2.1.2. Interface Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI)

A APCI é uma interface complementar à ES para analitos menos polares e pode ser utilizada acoplada à fase normal. Entretanto é menos adequada para compostos termicamente instáveis e não tolera altas quantidades de acetonitrila e tampões com alta força iônica.

Na interface APCI, **Figura I.7B**, o efluente da coluna é pneumaticamente nebulizado em um tubo aquecido (quartzo ou aço-inoxidável), onde a evaporação do solvente é quase completa. O efluente nebulizado através do tubo aquecido é arrastado por um fluxo adicional de gás (N_2). A mistura aquecida de solvente e vapor é então introduzida na fonte API. A ionização química a pressão atmosférica (APCI) é iniciada por elétrons de uma agulha (corona de descarga) e íons reagentes para a ionização dos analitos são gerados:



A formação de íon-positivo pode ser obtida por transferência de próton (doação), formação de aduto ou reações de troca de carga enquanto, no modo íon-negativo, os íons são formados devido à transferência de próton (abstração), anexação de ânion ou reações de captura de elétrons. Subseqüentemente, os íons são enviados em direção ao alto vácuo do EM para análise. A interface com nebulização aquecida é fácil de operar e pode ser usada em combinação com líquidos aquosos e vazões de 2 mL/min. Para sistemas contendo um gás de secagem em contra-corrente, é assumido que tanto tampões voláteis como não voláteis podem ser utilizados. Materiais não voláteis e não carregados são arrastados para fora do bocal por um gás contra-corrente e a contaminação de não voláteis depositados na fonte de íons a pressão atmosférica pode ser limpa sem a necessidade de desligar o sistema de vácuo.

I.6. Validação de Métodos Analíticos por CLAE

O número de análises realizadas diariamente em todo o mundo é enorme e os objetivos de cada tipo de análise diferem muito e vão desde análises de inspeção, até análises mais refinadas, onde o resultado deve ser o mais confiável possível, por exemplo, a contaminação de seres humanos por pesticidas. Isso envolve a saúde das pessoas e tratamentos adequados são baseados nos resultados de análise. Além disso, as ações judiciais são baseadas nos laudos das análises.

É impossível realizar uma análise química de forma que os resultados sejam totalmente livres de erros e incertezas. Assim é necessário minimizar estes erros e estimar a sua grandeza com uma exatidão aceitável.

Validação, segundo a ISO (NBR ISO 8402), é a confirmação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos específicos, para um determinado uso pretendido são atendidos. Assim quando se desenvolve um método cromatográfico deve realizar testes para verificar a confiabilidade, a exatidão e a precisão de forma a confirmar se o teste empregado é adequado para uso.

A validação de métodos tem recebido muita atenção nos últimos tempos e uma vasta literatura sobre o assunto é encontrada. O ISO Guia 25 apresenta um capítulo abordando sobre validação de métodos. A EPA preparou um guia para desenvolvimento e validação de métodos para a *Resource Conservation and Recovery Act* (RCRA). A *American Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e a EPA fornecem métodos que são validados através de estudos interlaboratoriais.

A validação total de um método pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação envolve a execução e interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. A validação do método não deve ser feita em uma única etapa, só para atender as agências de regulamentação, mas também para assegurar a robustez. Os métodos devem ser reprodutíveis quando usados por outros analistas, em equipamentos equivalentes, em outros dias e em locais diferentes. Os dados que são gerados são dignos de confiança somente se os métodos usados para gerar os dados são também confiáveis.

A seguir são definidos os principais parâmetros de validação.

I.6.1. Linearidade

É a faixa ou intervalo de concentração no qual o sinal produzido pelo detector é diretamente, ou através de uma transformação matemática bem definida, proporcional a concentração do soluto nas amostras. Em outras palavras, a linearidade é a medida de quanto uma curva, obtida para resposta versus concentração, se aproxima de uma linha reta, ou seja quão bem os dados se ajustam a equação linear:

$$y = ax + b$$

Onde y é a resposta em cromatografia, em termos de área do pico ou altura do pico, se ele for simétrico, x é a concentração, a é o coeficiente angular (inclinação) e b o coeficiente linear (intersecção). Idealmente uma relação linear é preferível por ser mais precisa, mais fácil de calcular, e pode ser definida com poucos padrões. Além disso, a resposta para o detector de UV para uma amostra

diluída é esperada seguir a lei de Beer e ser linear. Uma calibração linear dá evidências que o sistema está operando adequadamente na faixa de concentração de interesse.

Idealmente a deve ser reproduzível de experimento para experimento e b não deve ser significativamente diferente de zero. A regressão linear deve também ter um coeficiente de correlação alto ($r > 0,99$). O coeficiente de correlação tem o valor ideal de uma unidade, mas é afetado pela faixa e distribuição das concentrações na calibração. Preconiza-se que a faixa de concentração das calibrações vá desde o limite de quantificação estimado (LOQ) até 3 ordens de magnitude deste valor, como exemplo, 1 a 1000 ng/mL se o LOQ for 1 ng/mL. Normalmente para a validação de métodos de análise de resíduos de pesticidas não é necessário que seja avaliada toda a faixa linear, pois somente níveis muito baixos de concentrações são esperados.⁹² A análise de regressão comumente utilizada é a dos mínimos quadrados, em que a variável independente se refere à concentração teórica do analito em questão presente na matriz.

I.6.2. Sensibilidade

A sensibilidade é definida como sendo a inclinação (*slope*) da curva analítica que possibilita a medida em qualquer ponto. O gráfico da curva analítica é obtido colocando-se o valor observado da medida (ordenada) como função da concentração do analito (abscissa). Quanto maior for o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração, **Figura I.8**, no qual o método A é mais sensível que o método B. Quanto maior for o coeficiente angular, maior será a sensibilidade do método. Comumente o termo sensibilidade é confundido com limite de detecção.⁹³

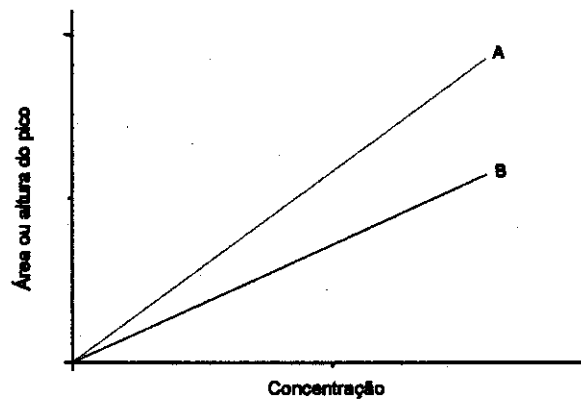


Figura I.8 – Comparação gráfica de dois métodos, A e B, quanto à sensibilidade.

I.6.3. Exatidão

A exatidão é grau de concordância entre o valor real da substância na amostra e o estimado pelo processo analítico. Exatidão em seu significado analítico é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança. Estes limites podem ser estreitos a níveis de concentrações elevadas e mais amplos à níveis de traços. É expressa pelo erro absoluto ou relativo que é calculado por:

a) Erro Absoluto

$$E = x_i - x_v$$

Onde: x_i é o valor individual de uma medida, e x_v é o valor verdadeiro ou o aceito como verdadeiro.

b) Erro Relativo

$$E_r(\%) = \frac{x_i - x_v}{x_v} \cdot 100$$

A baixa exatidão é proveniente de erros sistemáticos que contribuem para desvios ou tendências nos resultados. Por exemplo:

$E_r = 102\%$ indica a tendência positiva de 2%

$E_r = 98\%$ indica a tendência negativa de 2%

Alguns exemplos de agentes causadores de erros sistemáticos são: baixa recuperação após a extração do analito de interesse, solução padrão inadequada, medidas volumétricas imprecisas, reagentes contaminados, presença de interferentes. Quantificações a níveis de traços freqüentemente não são tão boas, entretanto, exatidões dentro de 20% do valor verdadeiro e precisões de ± 10 a 20% em níveis mais baixos de quantificações são aceitáveis.

A exatidão também pode ser expressa como a porcentagem de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado ou fortificado (*spiked*) na matriz limpa da amostra (branco ou placebo) ou como a diferença entre a média e o valor de referência aceito, junto com o intervalo de confiança.

Em outras palavras, recuperação é a relação entre a concentração determinada para uma amostra fortificada e a concentração adicionada no processo de fortificação e ela é expressa como porcentagem.

$$R(\%) = \frac{\text{média do valor obtido} \times 100}{\text{média do valor adicionado}}$$

A recuperação é dependente da concentração e por esse motivo deve ser avaliada na faixa de concentração esperada das amostras.

Os valores de recuperação aceitos para avaliação do método analítico em análises de resíduos (concentrações a nível de $\mu\text{g/L}$ (ppb)) devem estar no intervalo de 70 a 120%, porém, dependendo do tipo de resíduo e da complexidade analítica, este valor pode ser de 50% a 120%.⁹⁴ A recuperação nada mais é que uma medida da eficiência do procedimento de extração do soluto, a partir de uma amostra matriz.

Cabe salientar que, recuperações baixas indicam que o método possui exatidão insatisfatória, porém ótimas recuperações não é garantia de precisão e exatidão satisfatória quando se utilizam amostras artificiais adicionadas de padrão.

Existem duas formas de medir a exatidão e recuperação de um método analítico:

- **Amostras certificadas:** submetidas a testes colaborativos, estas amostras são submetidas à análise por laboratórios credenciados, de renome internacional, e que, após estudo estatístico, é estabelecida a concentração esperada. Existem instituições que fornecem amostras certificadas e/ou amostras de estudos colaborativos, como exemplo o *National Institute of Standards and Technology* (NIST) e o *Community Bureau of Reference* (BCR).⁹⁵
- **Amostra adicionada de padrões:** na falta dos materiais citados acima, o analista pode utilizar-se de amostra livre de pesticidas,

adicionada de padrão. Adiciona-se na amostra, quantidades conhecidas de padrão de pesticidas e submete-a à análise. Neste caso calcula-se a concentração do princípio ativo em amostras submetidas ao procedimento de extração com base em curva analítica da solução padrão analisada diretamente.

I.6.4. Precisão

A precisão é o grau de concordância ou grau de dispersão entre resultados de medidas independentes, em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições experimentais pré-estabelecidas.

Os dois termos largamente usados para descrever a precisão são:

a) Desvio padrão absoluto (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

b) Desvio padrão relativo (RSD) ou Coeficiente de Variação (CV)

$$\text{RSD (\%)} = \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

Onde n é o número de medidas e \bar{x} é a média aritmética das medidas efetuadas. Se o número de medidas tende ao infinito tem-se o desvio padrão absoluto ou relativo. Entretanto como o número de replicatas é reduzido, cinco ou sete no máximo, tem-se a estimativa do desvio padrão absoluto ou relativo.

Tanto a exatidão como a precisão devem ser verificadas em testes intra e inter-ensaios.

Teste intraensaio ou repetibilidade: é o grau de concordância entre resultados de testes individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente a várias amostragens de amostras homogêneas ou preparadas artificialmente (mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo instrumento e em um curto intervalo de tempo). A precisão é expressa em termos de s ou RSD (CV). O coeficiente de variação não deve ser superior a 20%.

Teste interensaio ou reprodutibilidade: é o grau de concordância entre resultados de testes obtidos para análise de uma mesma amostra sob várias condições (diferentes laboratórios, diferentes dias, diferentes analistas e diferentes instrumentos).

Horwitz⁹⁶ estabeleceu uma relação matemática para determinar a dependência entre valores de CV_R e concentração do analito, pelo exame de resultados cumulativos de estudos colaborativos envolvendo grande faixa de analitos; matrizes e técnicas analíticas.

$$CV_R = 2^{(1-0,5 \log c)}$$

onde:

CV_R = coeficiente de variação, sob condições de reprodutibilidade

c = concentração expressa em fração decimal

Precisão aceitável dentro do laboratório é:

$$CV_{\text{intra}} = 1/2 \text{ a } 2/3 CV_R$$

Precisão aceitável entre laboratórios é :

$$CV_{\text{inter}} = 1/2 \text{ a } 2 CV_R$$

I.6.5. Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Limite de detecção: é a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico com um nível de confiança especificado ou ainda, que pode ser estatisticamente diferente do ruído. É o ponto onde o valor da medida é maior do que a incerteza a ela relacionada. Existem dois tipos de limite de detecção, cada um com um objetivo estabelecido:

Limite de detecção do instrumento: é definido como a concentração ou quantidade de uma dada substância que produz um sinal ou resposta maior do que $3s$ (onde s = desvio padrão de uma série de medidas do branco). Em geral, o limite de detecção do instrumento serve como um guia para o estabelecimento do limite de detecção do método.

Limite de detecção do método: é a menor concentração do analito na amostra que, quando submetido a um processo analítico, produz um sinal definido como o limite de detecção do método.

Limite de quantificação do método: é a menor concentração do analito que pode ser medida com exatidão e precisão aceitáveis nas condições experimentais.

Costuma ser definido como $10s$, neste ponto o erro associado a medida é de 30% com 99% de probabilidade. Normalmente é expresso em unidades de concentração.

As origens e o histórico sobre os termos limites de quantificação e de detecção foram recentemente descritas por Currie.⁹⁷

1.6.6. Especificidade

O termo especificidade é muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade uma vez que ambos demonstram a capacidade de um método detectar o analito de interesse na presença de outros componentes (interferentes), que possam estar presentes na matriz da amostra (impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz). Para alguns autores o termo especificidade se refere a um método específico para um único analito, enquanto que seletividade diz respeito a um método que permite a análise de várias substâncias químicas que podem ou não ser distinguíveis. Como são poucos os métodos que respondem a um único analito, o termo seletividade parece ser mais apropriado.

A seletividade é obtida em função do processo de preparação da amostra, sistema de detecção utilizado e da separação cromatográfica.

- Testes de identificação – Discriminar os componentes de estruturas similares ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra, isto garante a identidade do analito.
- Comparação da matriz branca (todos os componentes exceto o analito de interesse) com a matriz fortificada. Nenhum pico deve eluir no tempo de retenção do analito de interesse.

- Testes de pureza – Uso de técnicas hífenadas, tais como, cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (CL/DAD), CL/EM, etc.

I.6.7. Robustez

É a habilidade do resultado de um método permanecer inalterado com pequenas mudanças de parâmetros operacionais e ambientais, como diferentes analistas, temperatura, pH, concentração da fase móvel, colunas de diferentes procedências, etc.

A robustez de um método pode ser determinada através da análise individual ou simultânea (planejamento fatorial) dos parâmetros sujeitos à variação.

IV.7. Bibliografia

- ¹ M. Ibáñez; Y. Picó, J. Mães, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 325.
- ² G. Font; J. Mães; J. C. Molto; Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 642 (1993) 135.
- ³ R. P. Piveli, apostila do curso “Qualidade de Águas”, 1996, p 135.
- ⁴ C. Bolognesi; G. Morasso, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 182.
- ⁵ M. Younes; H. Galal-Gorchev, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) S87.
- ⁶ A. A. Rocha “Poluição, Proteção e Usos Múltiplos de Represas” CETESB/ASCETESB, 1980.
- ⁷ D. Koh; J. Jeyaratnam, *Sci. Total Environ.* 188 Suppl. 1 (1996) S78.
- ⁸ R. Plestina; M. Mercier, *Sci. Total Environ.* 188 Suppl. 1 (1996) S135.
- ⁹ D. Pimentel, *Sci. Total Environ.* 188 Suppl. 1 (1996) S186.
- ¹⁰ <http://www.agricultura.gov.br/Estatisticas/343.htm>
- ¹¹ L Larini, “Toxicologia dos Praguicidas”, Editora Manole, São Paulo, 1999.
- ¹² M. Biziuk; A. Przyjazny; J. Czerwinski; M. Wergowski, *J. Chromatogr. A.* 754 (1996) 103.
- ¹³ A. M. van Dijk-Looijaard; J. van Genderen, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) S37.

- ¹⁴ D. Cova; G.P. Molinari; L. Rossini, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 20 (1990) 234.
- ¹⁵ S.Z. Cohen; R.D. Wauchope; W. Klein; C.V. Eadsporth; R. Grancy, *Pure and Appl. Chem.* 67 (1995) 2109.
- ¹⁶ D.J. Munch; R.L. Graves; R.A. Maxey; T.M. Engel, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1446.
- ¹⁷ H. Sabik; R. Jeannot; B. Rondeau, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 217.
- ¹⁸ ECC Drinking Water Guidelines, 80/779/EEC, EEC n^o L229/11-29, Bruxelas, 1980.
- ¹⁹ D. Barceló, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 117.
- ²⁰ WHO, Drinking Water Quality: Guidelines for Selected Herbicides, Environmental Health Criteria, N^o. 27, 1987.
- ²¹ Decreto 98.816, publicado no DOU em 11 de Janeiro de 1990.
- ²² D. Barceló; M.-C. Hennion, *Anal. Chim. Acta* 338 (1997) 3.
- ²³ WRC Guide to Analytical Quality Control for Water Analysis, June 1994, WRC, Medmenham, UK, p 100.
- ²⁴ S. Chiron; A. Fernandez-Alba; D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 2352.
- ²⁵ N. de Bertrand; D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 254 (1991) 235.

- ²⁶ D. Barceló; M. F. Alpendurada, *Chromatographia* 42 (1996) 704.
- ²⁷ V. Lopez-Avila, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 195.
- ²⁸ L. R. Snyder; J. J. Kirkland; J. L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1997, p. 110.
- ²⁹ R. Heyer; A. Zapf; H.J. Stan, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 752.
- ³⁰ M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A.*, 856 (1999) 3.
- ³¹ R. E. Majors, *LC-CG Supplement* Maio (1998) 8.
- ³² H. Lingeman; S. J. F. Hoekstra-Oussoren, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 221.
- ³³ L.A. Berrueta; B. Gallo; F. Vicente, *Chromatographia* 40 (1995) 474.
- ³⁴ U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 665 (1994) 217.
- ³⁵ R.E. Majors, *LC-GC* 5 (1997) 508.
- ³⁶ J. Nawrocki; A. Dabrowska, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 1.
- ³⁷ T.A. Anazawa, "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas – SP, 1992.

- ³⁸ T. A. Anazawa, "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, Tipo C8, para CLAE", Tese de doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas – SP, 1996.
- ³⁹ M. A. Kapur, "Preparação de Fases Estacionárias, tipo SiO₂, Imobilizado por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, em andamento.
- ⁴⁰ C. B. Bottoli "Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas Usadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, em andamento.
- ⁴¹ J. W. T. Spinks; R. J. Woods, "Introduction to Radiation Chemistry", 3rd ed., Wiley-Interscience, New York, 1990.
- ⁴² G. Schomburg; A. Deege; J. Köhler; U. Bien-Vogelsang, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 27.
- ⁴³ U. Bien-Vogelsang; A. Deege; H. Figge; J. Köhler; G. Schomburg, *Chromatographia* 19 (1984) 170.
- ⁴⁴ G. Schomburg; J. Köhler; H. Figge; A. Deege; U. Bien-Vogelsang, *Chromatographia* 18 (1984) 265.
- ⁴⁵ H. Figge; A. Deege; J. Köhler; G. Schomburg, *J. Chromatogr.* 351 (1986) 393.
- ⁴⁶ M.C.H. da Silva; I.C.S.F. Jardim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21 (1998) 2447.

- ⁴⁷ T. A. Anazawa; I. C. S. F. Jardim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 21 (1998) 645.
- ⁴⁸ T. A. Anazawa; I. C. S. F. Jardim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 17 (1994) 1265.
- ⁴⁹ S.L. Cresswell; S.J. Haswell, *J. Chem. Educ.* 78 (2001) 900.
- ⁵⁰ M.A. Kapor; I.C.S.F. Jardim, 25th Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Maastricht, Holanda 17-22 de Junho de 2001, Livro de Resumos Vol. 1, pg 108.
- ⁵¹ A. Zlotorzynski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25 (1995) 43.
- ⁵² R. Ohmacht; M. Kele; Z. Matus, *Chromatographia* 28 (1989) 19.
- ⁵³ K. E. Collins; A. L. A. Sá; C. B. G. Bottoli; C. H. Collins, *Chromatographia*, 53 (2001) 661.
- ⁵⁴ K. E. Collins; C. B. G. Bottoli; S. Bachmann; C. R. M. Vigna; C. H. Collins; K. Albert, *Chem. Mater.*, no prelo.
- ⁵⁵ C.B.G. Bottoli; Z.F. Chaudhry; D.A. Fonseca; K.E. Collins; C.H. Collins, *J. Chromatogr. A*, no prelo.
- ⁵⁶ V. Pichon; M. Bourzige; M.-C. Hennion, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 21.
- ⁵⁷ D.H. Thomas; V. Lopez-Avila; L.D. Betowski; J. van Emon, *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 207.


- ⁵⁸ D.H. Thomas; M. Beck-Westermeyer; D.S. Hage, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3823.
- ⁵⁹ S.J. Shahtaheri; M.F. Katmeh; P. Kwasowki; D. Stevenson, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 131.
- ⁶⁰ V. Pichon; L. Chen; M.-C. Hennion; R. Daniel; A. Martel; F. le Goffic; J. Abain; D. Barceló, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2450.
- ⁶¹ V. Pichon; H. Rogniaux; N. Fischer-Durand; S. Ben Rejeb; F. le Goffic; M.-C. Hennion, *Chromatographia* 45 (1997) 289.
- ⁶² V. Pichon; L. Chen; N. Fischer-Durand; F. le Goffic; M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 107.
- ⁶³ V. Pichon; L. Chen; M.-C. Hennion, *Anal. Chim. Acta.* 311 (1995) 429.
- ⁶⁴ L. I. Andersson, *J. Chromatogr. B* 739 (2000) 163.
- ⁶⁵ D. Stevenson, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 154.
- ⁶⁶ B. Bjarnason; L. Chimuka; O. Ramstrom, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2152.
- ⁶⁷ I. H. Hagestam; T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 1757.
- ⁶⁸ J.V. Sancho-Llopis; F. Hernandez; E.A. Hogendoorn; P. van Zoonem, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 287.
- ⁶⁹ E.A. Hogendoorn; E. Dijkman; R.A. Baumann; C. Hidalgo; J.V. Sancho; F. Hernandez, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1111.

- ⁷⁰ C.F. Poole; S.K. Poole; D.S. Seibert; C.M. Chapman, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 245.
- ⁷¹ D. F. Hagen; C. G. Markell; G. A. Schmitt, *Anal. Chim. Acta* 286 (1990) 157.
- ⁷² D. A. Wells; G. L. Lensmeyer; D. A. Wiebe, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 386.
- ⁷³ D. D. Blevins; D. O. Hall, *LC-GC Supplement* Maio (1998)16.
- ⁷⁴ Z. El Rassi, *Electrophoresis* 18 (1997) 2465.
- ⁷⁵ G.R. van der Hoff; P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 301.
- ⁷⁶ Regeling Residuen van Bestrijdingsmiddelen, Staatcourtant, 5 November 1998 (Stct. 212).
- ⁷⁷ E. Hogendoorn; P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 435.
- ⁷⁸ I. Liska; J. Slobodník, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 235.
- ⁷⁹ A. de Kok; M. Hiemstra; C. P. Vreeker, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 459.
- ⁸⁰ M. Hiemstra; A. de Kok, *J. Chromatogr. A* 667 (1994) 155.
- ⁸¹ A. de Kok; M; Hiemstra; U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 265.
- ⁸² H. Itoh; S. Kawasaki; J. Tadano, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 61.

- ⁸³ W. M. A. Niessen. "Liquid Chromatography - Mass Spectrometry", 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, N. Y., 1999.
- ⁸⁴ W. M. A. Niessen; A. P. Tinkle, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 37.
- ⁸⁵ J. Slobodník; B.L.M. van Baar; U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 81.
- ⁸⁶ W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 407.
- ⁸⁷ W. M. A. Niessen. *J. Chromatogr. A*. 856 (1999) 179.
- ⁸⁸ J. Alban, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 157.
- ⁸⁹ I. Ferrer; D. Barceló, *Analisis*, 26 (1998) 118.
- ⁹⁰ Y. Zhao, "Possibilities and Limitations of a Single Quadrupole Mass Spectrometer Coupled to Pressure and Electro-Driven Separation Techniques", Tese de doutorado, University of Ghent - Bélgica, 1999.
- ⁹¹ A P. Bruins, *J. Chromatogr. A*, 794 (1998) 345.
- ⁹² C. Aguilar; F. Borrull; R. M. Marcé, *LC-GC*, 14 (1996) 1048.
- ⁹³ A.A.M. Chasin; E.S. Nascimento; L.M. Ribeiro-Neto; M.E.P.B. de Siqueira; M.H.Andraus; M.C. Salvadori; N. A.G. de Fernícola; R. Gorni; S. Salcedo, *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11 (1998) 1.
- ⁹⁴ GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. "Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos", 1999, p 42.
- ⁹⁵ J.M. Green, *Analytical Chemistry News & Features* 1 (1996) 305.

⁹⁶ W. Horwitz; L.R. Kamps; K.W. Boyer. *J AOAC. Int.* 63 (1980) 1344.

⁹⁷ L.A. Currie, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 127.



CAPÍTULO II - OBJETIVOS

“É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe.”

Epiteto

II.1. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- ☞ Desenvolver uma metodologia para análise multirresíduo de pesticidas, que possam estar presentes em amostras de água de torneira e de poço artesiano, usando diferentes técnicas de extração/pré-concentração (ELL e EFS), e posterior análise por CL/EM.
- ☞ Desenvolver novos materiais, sorventes, baseados em poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), sorvidos sobre suporte de sílica e imobilizados através de diferentes processos: irradiação gama, microondas e temperatura, para serem empregados em extração em fase sólida.
- ☞ Caracterizar os sorventes preparados através de espectroscopia no infravermelho (IV), análise termogravimétrica (ATG), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise elementar (CHN).
- ☞ Aplicar os sorventes, nos modos *off-line* e *on-line*, em análises de amostras de água deionizada e de torneira.
- ☞ Aplicar os sorventes para extração e *clean-up* de pesticidas em extratos de urina.
- ☞ Comparar os métodos de preparo de amostra, extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS) nos modos "*on-line*" e "*off-line*".

- ☞ Comparar os métodos de detecção CL/EM e CL/DAD na análise do seguinte conjunto de pesticidas: tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina, presentes em amostras de água de torneira.



CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUOS

DE PESTICIDAS EM ÁGUA POR CL/EM

“As dificuldades iluminam a existência, mas devem ser novas e de alta qualidade.”

Tom Robbins

III.1. Justificativa do Trabalho Desenvolvido

Os métodos de análise de resíduos de pesticidas são desenvolvidos para atender as seguintes necessidades: i) análise de analitos individuais, ii) análise de classes de pesticidas ou iii) análise simultânea de vários pesticidas, pertencentes a diferentes classes, denominada "análise multirresíduo". O desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo é muito trabalhoso, pois os pesticidas apresentam características físico-químicas bastante diferentes, os constituintes das matrizes normalmente interferem na análise e, além disso, eles se encontram somente a níveis de traços.

Muitas vezes, nas lavouras, são aplicados vários defensivos agrícolas simultaneamente, sendo que cada um tem uma função específica no plantio. O número de artigos publicados sobre o desenvolvimento de métodos de análise multirresíduo em amostras ambientais tem crescido, e, como resultado há uma extensa bibliografia sobre este assunto, principalmente sobre herbicidas.^{1, 2, 3} Entretanto, até agora, há uma falta de informações sobre a presença de inseticidas e fungicidas em águas naturais. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de análise multirresíduo, incluindo pesticidas das classes dos herbicidas, fungicidas e inseticidas, que possam estar presentes em diferentes tipos de águas e aplicar a metodologia na análise de amostras reais. Os pesticidas escolhidos fazem parte das "listas de prioritários" da EPA e do ECC por possuírem alto potencial de contaminar o meio ambiente.

III.2. Parte Experimental

III.2.1. Seleção dos Pesticidas a Serem Estudados

Os pesticidas utilizados neste estudo pertencem às importantes classes: ácidos fenoxiacéticos, carbamatos, feniluréias, triazinas, organofosforados e benzimidazóis. Estes pesticidas, cujas estruturas são mostradas na Figura III.1 e características na Tabela III.1, apresentam instabilidade térmica e/ou não volatilidade e, portanto a CLAE é a técnica de escolha para a análise destas substâncias.

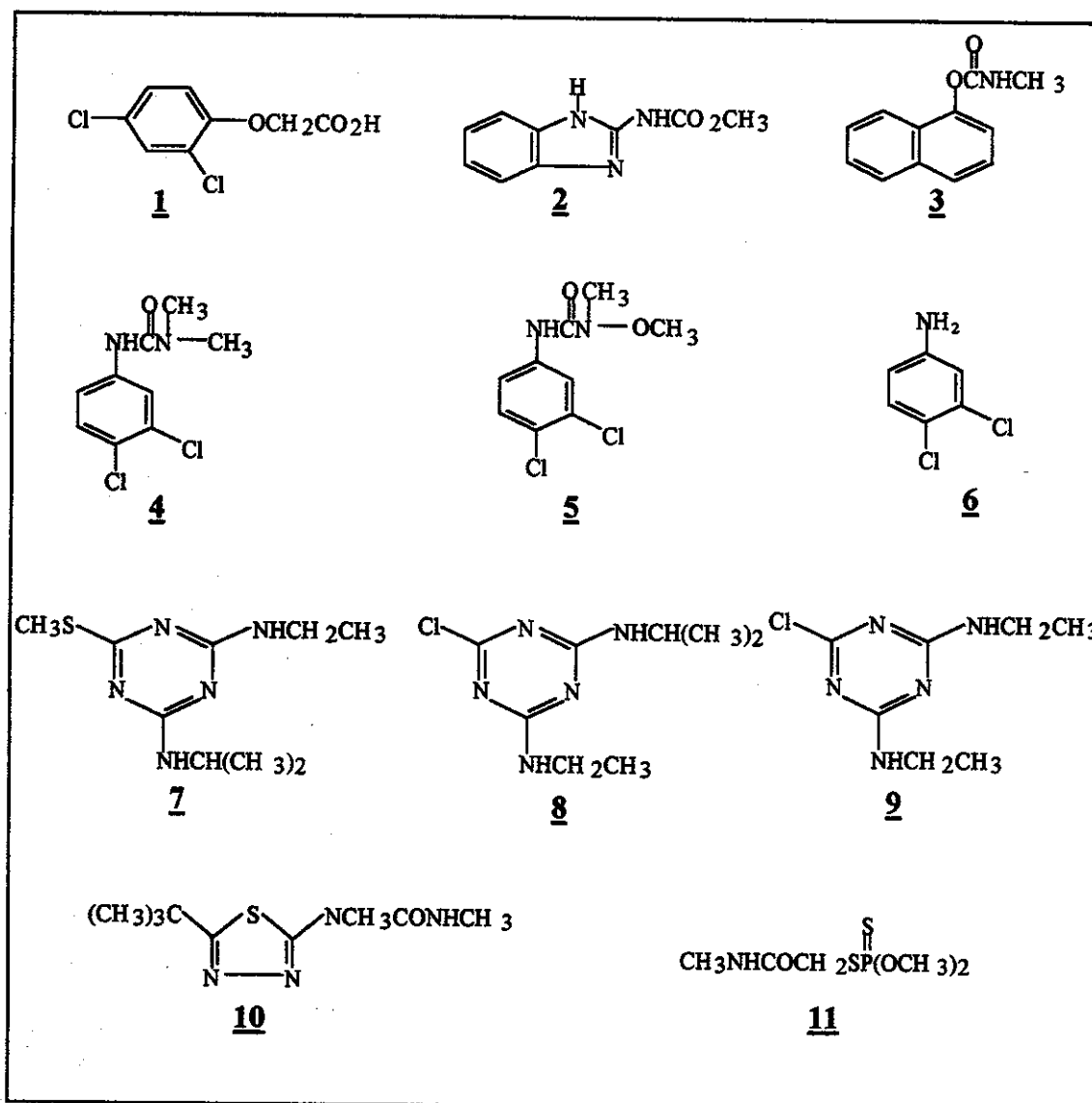


Figura III.1 – Estrutura dos pesticidas: 1) 2,4-D; 2) carbendazim; 3) carbaril; 4) diuron; 5) linuron; 6) 3,4-DCA; 7) ametrina; 8) atrazina; 9) simazina; 10) tebutiuron e 11) dimetoato.

Tabela III.1 – Características dos pesticidas estudados.

Pesticida	Grupo	Grau de pureza	Fornecedor	Classe	Solubilidade em água (mg/L) ⁴
2,4-D	H	>99	Dow	Ácidos fenoxiacéticos	600
Carbendazim	F ^a	99,3	Riedel-de-Häen	Benzimidazol	28
Carbaril	I	98,5	*	Carbamatos	1.000
Diuron	H	99,3	Du Pont	Feniluréia	42
Linuron	H	99,5	Hoescht	Feniluréia	75
3,4-DCA	H ^b	99,0	Riedel-de-Häen	-	-
Tebuturion	H	99,8	**	Feniluréia	2.500
Ametrina	H	96,8	Novartis	Triazina	185
Atrazina	H	97,7	Novartis	Triazina	70
Simazina	H	98,3	Novartis	Triazina	5
Dimetoato	I	99,0	***	Organofosforado	25.000

H = Herbicida; F = Fungicida; I = Inseticida; a = metabólito do benomil; b = metabólito do diuron, linuron, neburon e propanil.

* Doado gentilmente pela Sra. Nádia Rodrigues do CPQBA da UNICAMP

** Doado gentilmente pela Dra. Vera Ferracini da EMBRAPA.

***Doado gentilmente pelo Dr. Eduardo Vicente do ITAL

III.2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados na preparação da fase móvel foram: água ultrapurificada, obtida de um sistema Milli-Q da Millipore e metanol grau cromatográfico, obtido da ACRÓS (EUA). O pH da água foi ajustado em 3,8 com ácido fórmico, obtido da ACRÓS (EUA).

A acetonitrila utilizada, grau cromatográfico, foi obtida da ACRÓS (EUA); o sulfato de sódio anidro, grau P.A., foi obtido da MERCK (Alemanha) e o acetato de etila, grau pesticida, foi obtido da ACRÓS (EUA).

O ácido clorídrico, grau P.A., para ajuste de pH foi obtido da ACRÓS (EUA).

Na extração líquido-líquido foi utilizado diclorometano como fase orgânica e este solvente, grau cromatográfico, foi obtido da BIOSOLVE (Holanda).

III.2.3. Sorventes para Extração em Fase Sólida

Os seguintes sorventes foram empregados na etapa de extração/pré-concentração dos analitos:

- Supelclean Envicarb, carbono grafitizado não poroso, área superficial 100 m²/g, 120/140 mesh. Cartuchos de 6 mL (250 mg), Supelco.
- Supelclean Envichrom-P, resina de copolímero estireno/divinilbenzeno, tamanho de partícula 80-160 µm, 2-3 nm de tamanho de poro, área superficial de 900 m²/g. Cartuchos de 6 mL (250 mg), Supelco.
- Bond Elut-C8, sílica modificada, tamanho de partícula 40-120 µm, 6 nm de tamanho de poro. Cartuchos com 6 mL (500 mg), Varian.
- Lichrolut EN, resina de copolímero estireno/divinilbenzeno, área superficial de 1200 m²/g. Cartuchos de 2 mL (200 mg), Merck.

III.2.4. Instrumentação e Condições de Análise

As análises por CL/EM foram realizadas em um instrumento HP 1100 série MSD (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanha) com injetor automático

dotado de alça de amostragem de 100 μL . As condições ótimas do detector foram obtidas com a interface *electrospray*, modo íon positivo, íons selecionados (SIM): 125, 145, 160, 162, 202, 216, 228, 229, 233 e 249. Temperatura do gás 340°C, vazão do gás de nebulização 12,0 L/min (N_2), pressão de nebulização 0,38 MPa, voltagem do capilar 4000V, temperatura do quadrupolo 100°C e voltagem do CID 100V. A separação da mistura de pesticidas foi realizada usando uma coluna analítica, 250 x 4,6 mm, recheada com fase reversa tipo C-18, tamanho de partícula de 5 μm , Phenomenex. A vazão foi de 1 mL/min e utilizou eluição por gradiente com metanol e água com pH ajustado em 3,8, com ácido fórmico. O seguinte programa de gradiente foi empregado: 45% de metanol à 55% em 20 minutos, de 55% à 75% em 17 minutos, em seguida manteve-se a composição constante por 7 minutos e depois retornou às condições iniciais em 3 minutos.

III.2.5. Preparação da Solução Estoque

As soluções estoque dos pesticidas individuais foram preparadas na concentração 1 mg/mL, em metanol, com exceção do carbendazim que foi preparado na concentração de 0,092 mg/L e diluído em acetonitrila, devido à melhor solubilidade. Em seguida preparou-se uma solução contendo a mistura dos pesticidas em concentrações de cerca de 1 mg/L. Esta solução foi utilizada para fortificar as amostras (concentração final de 0,1 $\mu\text{g/L}$) e fazer as curvas analíticas (faixa de 10 $\mu\text{g/L}$ a 500 $\mu\text{g/L}$).

III.2.6. Preparação da Amostra

Diferentes técnicas de preparo de amostra foram empregadas:

III.2.6.1. Extração Líquido-Líquido

Um volume de 500 mL de amostra, água da torneira (coletada no laboratório, Ghent-Bélgica) ou água de poço artesiano (coletada em um poço localizado na Bélgica), com pH ajustado para 2,5 com HCl, fortificadas ou não, foram extraídas com 3 porções de 50 mL de diclorometano. Em seguida o solvente foi evaporado até cerca de 3 mL, utilizando um rotaevaporador. Secou-se o extrato com sulfato de sódio anidro, transferiu-se quantitativamente para um tubo de ensaio e evaporou-se o solvente sob fluxo lento de nitrogênio. O resíduo foi ressuspensão em 1 mL de MeOH:H₂O 60:40 (v/v), em seguida foi filtrado em membrana de 0,45 µm e um volume de 10 µL foi injetado no CL/EM.

III.2.6.2. Extração em Fase Sólida

Bond Elut-C8: os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol e em seguida duas porções de 2,5 mL de água deionizada. Passou-se a amostra, 500 mL (pH ajustado em 3,0 com HCl), sob vácuo, com vazão de 10 mL/min. A seguir efetuou-se a secagem do cartucho, sob vácuo, durante 20 minutos. Após a secagem, os cartuchos foram eluídos com 2 mL de metanol. O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio e ressuspensão em 1 mL de MeOH:H₂O 60:40 (v/v). Uma alíquota foi posteriormente injetada no CL/EM.

Supelclean Envichrom-P (E-DVB): os cartuchos foram condicionados na seqüência: 5 mL de metanol e 5 mL de água deionizada pH 3 (ajustada com HCl). Passou-se a amostra, 500 mL (pH ajustado em 3,0 com HCl), sob vácuo, com vazão de 10 mL/min. Lavou-se o cartucho com 5 mL de água e a seguir efetuou-se a secagem do cartucho, sob vácuo, durante 20 minutos. Após a secagem, os

cartuchos foram eluídos com 5 mL de metanol. O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio e ressuspenso em 1 mL de MeOH. Uma alíquota foi posteriormente injetada no CL/EM.

Lichrolut EN (E-DVB): os cartuchos foram condicionados na sequência: 2 mL de metanol e 2 mL de água. Passou-se a amostra, 500 mL (pH ajustado em 5,5 - 6,0 com HCl), sob vácuo, com vazão de 10 mL/min. Lavou-se o cartucho com 5 mL de água e a seguir efetuou-se a secagem do cartucho, sob vácuo, durante 20 minutos. Após a secagem, os cartuchos foram eluídos com 0,5 mL de metanol e, duas vezes, com 3 mL de metanol:acetato de etila 1:1 (v/v). O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio e ressuspenso em 1 mL de MeOH. Uma alíquota foi posteriormente injetada no CL/EM.

Supelclean Envicarb (carbono grafitizado): os cartuchos foram condicionados na sequência: 5 mL de metanol e 5 mL de água deionizada. Passou-se a amostra, 500 mL (pH ajustado em 3,0 com HCl), sob vácuo, com vazão de 10 mL/min. Lavou-se o cartucho com 5 mL de água e a seguir efetuou-se a secagem do cartucho, sob vácuo, durante 20 minutos. Após a secagem, os cartuchos foram eluídos com 1 mL de metanol seguido de duas porções de 2 mL de CH₂Cl₂:MeOH 90:10 (v/v). O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio e ressuspenso em 1 mL de MeOH/H₂O 60:40 (v/v). Uma alíquota foi posteriormente injetada no CL/EM.

III.3. Resultados e Discussão

III.3.1. Otimização das Condições Cromatográficas

Os pesticidas selecionados pertencem à diferentes classes e possuem diferentes características físico-químicas. A diferença na polaridade entre eles é bastante grande, e portanto a eluição isocrática não é uma escolha adequada, pois os últimos picos são largos, apresentam baixa eficiência e, conseqüentemente, dificulta a quantificação. Além disso, tempos de análise maiores são observados. Por isso a eluição por gradiente é a melhor alternativa para este tipo de separação.

Os compostos foram injetados no CL/EM usando o modo íon positivo. Foi adicionado o ácido fórmico na fase móvel para aumentar a ionização das moléculas que possuem caráter básico (carbendazim e triazinas) e, desse modo, melhorar a detecção destas espécies. Diferentes condições foram testadas e a melhor, em termos de fase móvel, está mostrada na **Figura III.2**. Esta figura apresenta dois cromatogramas, um obtido no detector espectrômetro de massas (**III.2A**) e um outro (**III.2B**) obtido no detector UV/Vis. com detecção em 235 nm. Como pode ser observado na **Figura III.2B**, ocorre uma variação na linha de base devido ao aumento da quantidade de metanol durante a corrida cromatográfica. Esta subida na linha de base implica em menor detectabilidade e problemas durante a integração, enquanto que na detecção por EM isto não ocorre. De maneira geral, o detector de massas mostrou ter detectabilidade mais favorável que o UV/Vis, com exceção da 3,4-dicloroanilina, pico 6, provavelmente devido à não ionização desta molécula nas condições da análise.

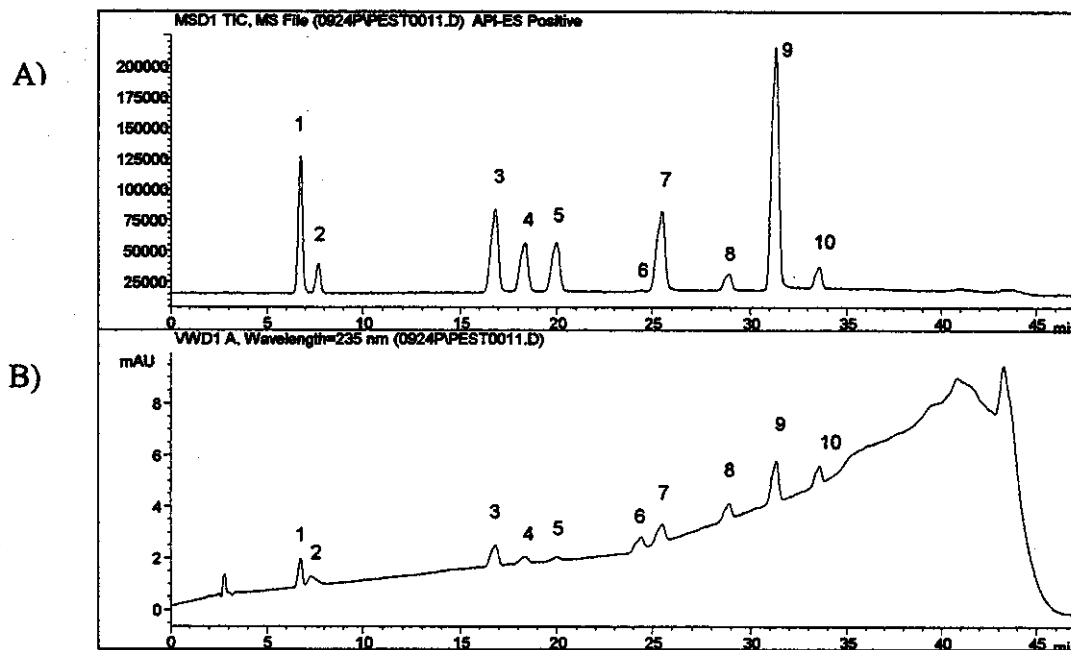


Figura III.2 - Cromatogramas obtidos para a separação da mistura de padrões de pesticidas: 1= carbendazim; 2= dimetoato; 3= simazina; 4= tebutiuron; 5= carbaril; 6= 3,4-DCA; 7= atrazina; 8= diuron; 9= ametrina; 10= linuron. A) utilizando o detector espectrômetro de massas ("Full scan") e B) detector UV/Vis. ($\lambda=235$ nm). Condições cromatográficas: coluna analítica de 250 x 4,6 mm, C-18, tamanho de partícula de 5 μ m, Phenomenex. Vazão = 1 mL/min, eluição por gradiente com metanol e água pH 3,8. Gradiente: 45% de MeOH à 55% em 20 min., de 55% à 75% em 17 min., em seguida manteve-se a composição constante por 7 minutos e depois retornou as condições iniciais em 3 minutos.

O limite de detecção no EM pode ser abaixado sensivelmente através da otimização da fase móvel e do uso do modo SIM (*Selective Ion Monitoring*) e por essa razão os íons mais abundantes obtidos foram os escolhidos, conforme **Tabela III.2**. Os espectros de massas obtidos para o dimetoato, carbaril e carbendazim são mostrados na **Figura III.3**. O fragmento 145, obtido pela fragmentação do carbaril, é devido à perda de $\text{CH}_3\text{-N=C=O}$, no carbendazim devido à perda de $-\text{O-CH}_3$ e no dimetoato de $\text{CH}_3\text{NHCOCH}_2\text{S-}$. Os íons mais intensos para os demais compostos correspondem a $[\text{M}+\text{H}]^+$ devido ao fato de se estar trabalhando no modo íon positivo e não ocorrerem fragmentações. O pesticida 2,4-D, por ser um ácido, o modo íon negativo é o mais adequado e um

valor alto de limite de detecção foi obtido devido à presença de ácido fórmico na fase móvel, que reduz a sua ionização. Assim, desistiu-se de determinar este composto.

Tabela III.2 - Íons utilizados para a análise quantitativa dos pesticidas. Modo íon positivo.

Pesticida	Massa Molar	Íon mais intenso (utilizado para a quantificação)
Dimetoato	229,2	125
Carbaryl	201,2	145
Carbendazim	191,2	160
Simazina	201,6	202
Atrazina	215,7	216
Ametrina	227,0	228
Tebutiuron	228,3	229
3,4-DCA	161,0	162
Diuron	232,1	233
Linuron	248,0	249

Apesar do EM apresentar detectabilidade mais favorável que o detector UV/Vis, não foi possível a injeção direta da amostra, sem tratamento prévio. Assim, foi necessário realizar uma etapa de pré-concentração de forma a adequar a concentração do analito à detectabilidade do detector. Para isso diferentes tratamentos de amostra foram realizados e comparados. Os resultados obtidos com os métodos usados estão descritos a seguir.

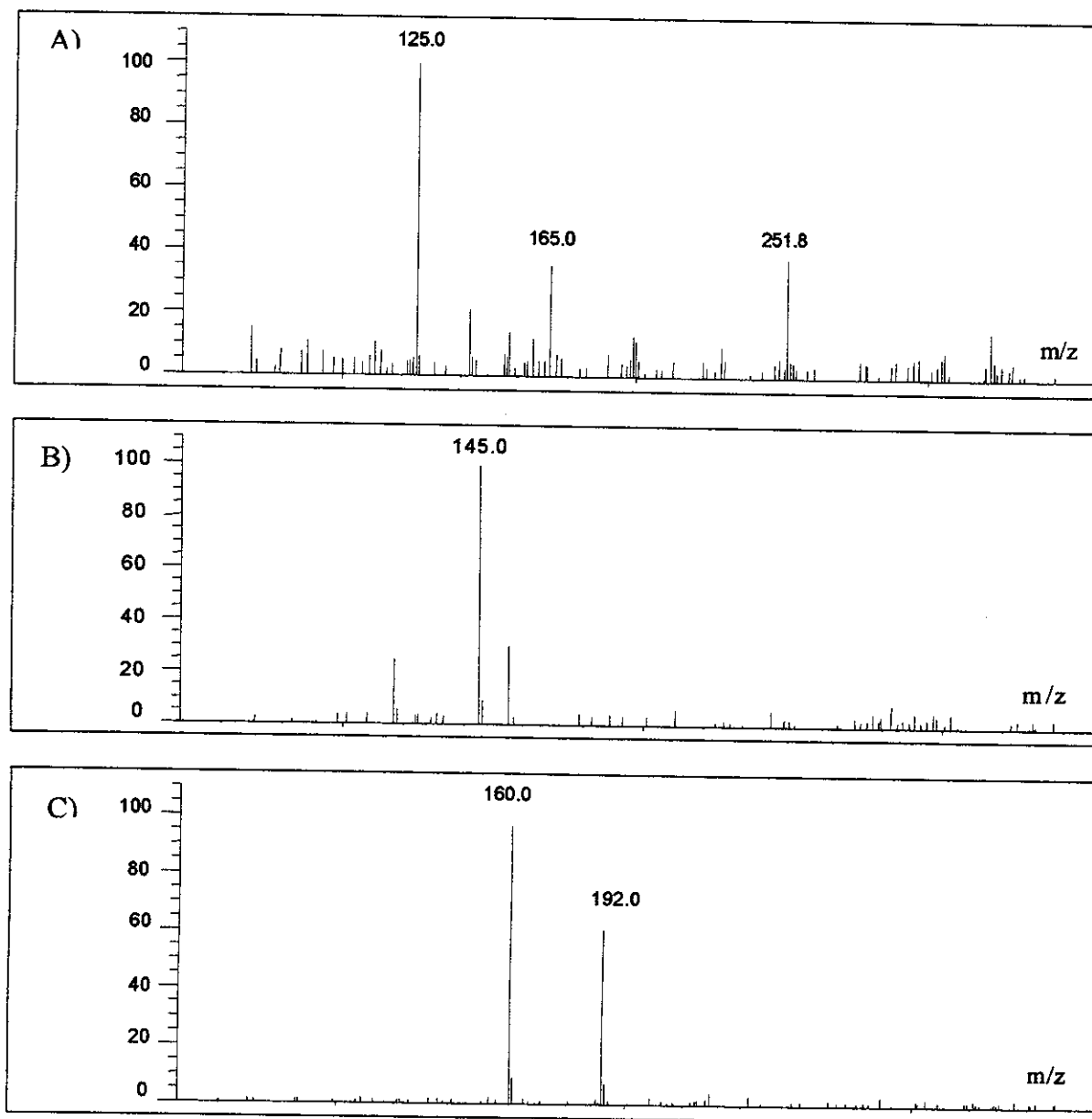


Figura III.3 – Espectros de massas. A) dimetoato, B) carbaril e C) carbendazim.

III.3.2. Recuperação da Extração Líquido-Líquido

A extração com diclorometano é considerada clássica para a análise de resíduos de pesticidas em água, devido a sua capacidade em extrair compostos com uma larga faixa de polaridades e a facilidade de evaporação do solvente.^{5, 6} Assim esta foi a primeira técnica a ser empregada.

Os resultados das recuperações obtidas para este tipo de metodologia estão mostrados na Tabela III.3. Como pode-se observar houve uma ótima recuperação para todos os pesticidas, exceto para o carbendazim, devido, provavelmente, às perdas durante o processo de extração, uma vez que este composto é básico e como o pH da amostra foi ácido (pH=3,0) ele provavelmente ficou retido na fase aquosa. A 3,4-DCA, não foi detectada, pois o limite de detecção é maior que a concentração utilizada para a fortificação (0,1 µg/L).

Apesar das recuperações para a maioria dos compostos estudados, utilizando a ELL, estarem dentro dos valores aceitos pela literatura⁷ que é de 50-120% e com estimativa do desvio padrão relativo de no máximo 20%, resolveu-se testar a EFS devido a uma série de vantagens que ela oferece em relação a ELL. Os principais problemas da ELL são: requer grandes quantidades de solvente orgânico (que são tóxicos), é lenta, trabalhosa e de difícil automação. Assim a EFS está sendo uma alternativa interessante e vem ganhando muita atenção nos últimos anos.⁸

Tabela III.3 - Recuperações obtidas através da extração líquido-líquido (n=2).

Pesticida	Recuperações para água de torneira (%)	RSD (%)	Recuperações para água de poço artesiano (%)	RSD (%)
Dimetoato	97	1	81	1
Carbaril	89	0	81	2
Carbendazim	nd	-	nd	-
3,4-DCA	-	-	-	-
Simazina	112	10	83	2
Atrazina	95	1	98	1
Ametrina	94	1	94	1
Tebuturon	101	1	91	3
Diuron	101	1	86	6
Linuron	102	4	75	1

RSD = estimativa do desvio padrão relativo; nd = não detectado.

III.3.3. Recuperação da Extração em Fase Sólida

Esta técnica tem sido largamente utilizada na pré-concentração de soluções muito diluídas, tais como águas naturais, onde grandes volumes de amostra são processados para possibilitar concentrações do analito suficientes para serem detectadas. Dentre outras vantagens desta técnica pode-se citar: a amostra pode ser extraída no campo (melhor para transporte), velocidade de extração e simplicidade, e é mais segura (usa menor volume de solvente orgânico).

O carvão ativado foi a primeira fase sólida a ser empregada na extração de compostos orgânicos de água e a vantagem deste material é a alta retenção de compostos de baixa massa molar e seus metabólitos. Alguns autores demonstraram que estes materiais são mais eficientes que o C-18 para pré-concentrar pesticidas muito polares em amostras aquosas.^{9,10} Entretanto, dependendo do tipo utilizado, resultados diferentes são encontrados na literatura quando este material é comparado com sorventes poliméricos.¹¹

Polímeros sintéticos, tais como copolímero de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno, têm sido usados como alternativa e são bastante adequados para compostos altamente polares. A estrutura homogênea dos polímeros resulta em experimentos mais reprodutíveis que utilizando o carvão ativado. Com polímeros sintéticos são obtidas recuperações mais altas para analitos polares que em fases apolares quimicamente ligadas à sílica, pois apesar da superfície da sílica ser hidrofílica, as cadeias de hidrocarbonetos que a recobrem tornam a superfície hidrofóbica e há pouca interação com soluções aquosas. Embora o copolímero estireno-divinilbenzeno tenha uma superfície hidrofílica, ele contém um número relativamente alto de sítios aromáticos, os quais permitem interações tipo π - π com analitos aromáticos.¹² Além disso, estes polímeros têm um alto grau de entrecruzamento e uma estrutura aberta (material de alta porosidade), os quais aumentam a sua área superficial.¹³

Outros materiais, tal como, sílica modificada, principalmente do tipo fase reversa (C-8 ou C-18), têm sido intensamente empregados.

Assim, utilizaram-se diferentes fases sólidas de forma a testar qual delas forneceria as melhores recuperações. Os resultados obtidos estão nas Tabelas III.4 e III.5.

O dimetoato é um pesticida extremamente polar e, de acordo com a literatura, fases do tipo reversa não são adequadas para extrair este composto. Parrila et al. encontraram recuperações de 56 e 39% para o dimetoato em água Milli-Q e de torneira, respectivamente, usando cartuchos C-18.¹⁴ No presente trabalho, baixa recuperação, conforme esperado, também foi encontrada usando

Tabela III.4 - Recuperações obtidas para os pesticidas através de EFS. Amostra: água de torneira fortificada, concentração 0,1 µg/L (n = 2).

Pesticida	Bond Elut-C8		Lichrolut EN		Supelclean Envichrom-P		Supelclean Envicarb	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Dimetoato	12	44	70	0	88	3	43	5
Carbaril	84	4	64	9	74	5	73	4
Carbendazim	14	10	24	3	94	1	36	19
Simazina	109	6	89	1	77	4	88	1
Atrazina	98	1	89	1	78	1	86	4
Ametrina	73	18	88	1	90	1	84	-
Tebutiuron	-	-	97	1	102	2	60	1
Diuron	91	1	90	7	74	2	59	9
Linuron	-	-	66	2	58	3	74	11

Rec. = recuperação

RSD = estimativa do desvio padrão relativo

Tabela III.5 - Recuperações obtidas para os pesticidas através da EFS. Amostra: água de poço artesiano fortificada, concentração 0,1 µg/L (n = 2).

Pesticida	Supelclean Envichrom-P		Supelclean Envicarb	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Dimetoato	77	4	12	0
Carbaril	67	4	56	3
Carbendazim	79	2	3	3
Simazina	82	1	82	4
Atrazina	80	4	80	0
Ametrina	80	4	73	6
Tebutiuron	77	4	54	5
Diuron	70	-	36	6
Linuron	48	2	46	1

Rec. = recuperação

RSD = estimativa do desvio padrão relativo.

o sorvente C-8. Dessa forma, o uso de sorventes do tipo carbono grafitizado e resina de estireno-divinilbenzeno¹⁵ tem sido descrito como uma alternativa promissora para extrair eficientemente este pesticida. Boas recuperações foram obtidas utilizando o sorvente Envicrom-P e Lichrolut EN. Este bom resultado para o dimetoato em sorventes de polímero sintético está de acordo com a literatura. Usando o Envicarb a baixa recuperação pode ser devido ao fato deste pesticida ser muito polar e ter sido retido fortemente no sorvente.

A determinação de carbendazim, que é um produto de degradação do benomil (fungicida sistêmico), em água tem sido publicada.^{16, 17} Os autores verificaram que este pesticida é eficientemente extraído usando o LiChrolut EN (97%) e pH 4 para a amostra. Recuperações baixas foram obtidas usando sorventes do tipo fase reversa modificada, quando amostras com alto teor de carbono dissolvido foram extraídas. Este resultado foi observado ao utilizar o sorvente Bond Elut-C8. O uso de fases com quantidades maiores de carbono poderia contornar o problema da baixa capacidade do material, entretanto o custo e o tempo de extração aumentariam. O LiChrolut EN, que tem uma capacidade 10 vezes maior que o das fases ligadas, foi usado. Entretanto a pH 4 os ácidos húmicos são co-extraídos e interferem na análise usando o UV. Ao contrário do que foi publicado por Junker-Buchheit e Witzendacher,¹⁸ no presente trabalho, foram encontradas recuperações baixas usando o sorvente LiChrolut EN, melhores resultados foram alcançados usando o cartucho Supelclean Envichrom-P que também é baseado em estireno-divinilbenzeno. Deve-se salientar que o detector de massas mostrou ser altamente seletivo ao não detectar os picos de ácidos húmicos, apresentando-se mais adequado que o detector DAD.

O sorvente Supelclean Envichrom-P, que é uma resina de estireno-divinilbenzeno, forneceu os melhores resultados para o conjunto de pesticidas estudados, tanto em água de torneira quanto de poço artesiano. Para água de torneira, além do dimetoato e do carbendazim, as feniluréias são retidas com ótima recuperação empregando-se polímero de Envichrom-P (exceto o linuron).

Para o carbaril, presente em água de torneira, somente a fase sólida Lichrolut EN apresentou baixa recuperação. A 3,4-DCA, que é um metabólito, não foi detectada, pois o limite de detecção é maior que a concentração utilizada para a fortificação (0,1 µg/L). Para as triazinas, de um modo geral, todas as fases sólidas mostraram ser adequadas, mesmo estas substâncias tendo caráter levemente básico¹⁹ e usando pH ácido para a amostra.

Pode-se observar que, de um modo geral, as recuperações para amostras de água da torneira, fortificadas à níveis de 0,1 µg/L, foram maiores que para águas de poço artesiano. Isto se deve ao fato que a água de poço artesiano contém maiores quantidades de compostos orgânicos dissolvidos e eles competem com os pesticidas pelos sítios ativos da fase sólida, diminuindo portanto as recuperações.

III.3.4. Validação da Metodologia

Os parâmetros de linearidade, obtidos para os pesticidas estudados, estão descritos na **Tabela III.6**. Normalmente, para a validação é preciso que se utilize 3 ordens de grandeza, entretanto para análise de resíduos de pesticidas isto não é necessário, pois somente níveis de concentrações muito baixos são esperados. Como pode se observar, obtiveram-se excelentes coeficientes de correlação, estando todos acima de 0,9997, exceto para a 3,4-DCA.

Tabela III.6 - Curva analítica e linearidade para os pesticidas estudados.

Pesticida	Íon Selecionado	a	b	r	Linearidade (µg/L)
Dimetoato	125	-111,14	774,38	0,9999	23-500
Carbaril	145	628,53	2248,2	0,9999	16-500
Carbendazim	160	-8799,69	3335	0,9999	6-500
Simazina	202	-12681,0	3607,9	0,9999	9-500
Atrazina	216	-14496,52	3912,3	0,9999	9-500
Ametrina	228	-28562,52	7812,6	0,9999	9-500
Tebutiuron	229	-746,78	2168,38	0,9999	50-500
3,4-DCA	162	-1868,00	70,8	0,9980	120-500
Diuron	233	2803,00	682,70	0,9997	50-500
Linuron	249	692,53	288,23	0,9999	50-500

a = coeficiente angular; b = coeficiente linear e r = coeficiente de correlação.

Na **Tabela III.7** encontram-se os valores de limite de detecção, após a pré-concentração, calculados usando 3 vezes a razão sinal/ruído, os quais são menores ou iguais a 0,1 µg/L (exceto para a 3,4-DCA). Os limites de quantificação, correspondentes a 10 vezes a razão sinal/ruído, também apresentaram uma variação dependendo do pesticida considerado (**Tabela III.7**). Observa-se que os pesticidas pertencentes as mesmas classes possuem LOD e LOQ semelhantes, pois quando são submetidos às mesmas condições de análise eles apresentam o mesmo comportamento, em termos de ionização. O dimetoato não apresenta cromóforo e portanto detectores de UV não são adequados. No EM baixo LOD é obtido para este inseticida.

Tabela III.7 - Parâmetros de validação da metodologia.

Pesticida	LOD* (µg/L)	LOQ* (µg/L)	LOD** (µg/L)	LOQ** (µg/L)	RSD (n=7) (%)
Dimetoato	7	23	0,01	0,05	0,05
Carbaril	5	16	0,01	0,03	0,2
Carbendazim	2	6	0,004	0,01	0,08
3,4-DCA	35	120	0,07	0,2	0,1
Simazina	3	9	0,006	0,02	0,03
Atrazina	3	9	0,006	0,02	0,03
Ametrina	3	9	0,006	0,02	0,01
Tebutiuron	17	50	0,03	0,1	0,06
Diuron	17	50	0,03	0,1	0,04
Linuron	17	50	0,03	0,1	0,07

LOD = limite de detecção

LOQ = limite de quantificação

RSD = estimativa do desvio padrão relativo

* valor obtido para o instrumento;

** valor obtido para o método (após pré-concentração de 500 vezes).

A precisão foi determinada em termos de repetibilidade, que é expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) das áreas dos padrões após sete injeções (Tabela III.7) e das duplicatas das amostras (Tabelas III.3 à III.5). Os valores obtidos estão dentro da faixa aceitável, ou seja $\leq 20\%$, e portanto são adequados.

A recuperação é uma medida da exatidão do método. Os resultados para as recuperações, obtidos por ELL estão apresentados na Tabela III.3, e por EFS estão nas Tabelas III.4 e III.5 e os resultados já foram discutidos anteriormente.

Verificou-se que a seletividade do método em grande parte depende do tipo de detector empregado. O EM pode ser considerado, a princípio, um detector universal. Todos os compostos introduzidos no instrumento têm massa e uma vez ionizados eles são detectados pelo tubo multiplicador de elétrons.

Entretanto a resposta do instrumento depende da habilidade do composto em ser convertido em espécies iônicas. O EM também pode ser usado como detector seletivo ou específico porque ele pode ser ajustado, antes ou após a análise, em um modo de operação seletivo através do denominado monitoramento seletivo de íons. Estas características são de enorme importância na análise de pesticidas tanto em termos qualitativos como quantitativos, mostrando que a seletividade do método é excelente. Assim, o EM pode ser considerado adequado para análise dos pesticidas estudados, pois não se verificou interferência da matriz nos cromatogramas. Já o DAD sofre interferência da matriz como por exemplo os ácidos húmicos presentes em amostras de água, que não são detectados pelo EM.

O método mostrou ser robusto, uma vez que pequenas mudanças na composição da fase móvel, temperatura, etc., não afetaram significativamente as medidas.

III.3.5. Análise de Amostras Reais

Água de poço artesiano foi analisada, pois esta é a principal fonte de abastecimento de água potável na Europa, local onde foi desenvolvido este trabalho e também foram analisadas amostras de água de torneira, coletada no próprio laboratório (Universidade de Ghent- Bélgica). Nas análises de água de poço artesiano não foram encontrados nenhum dos pesticidas estudados, entretanto em água de torneira foram detectados pesticidas, das classes das triazinas, e os cromatogramas podem ser visualizados na **Figura III.4**. Os níveis de concentrações estimados foram de 0,008 µg/L (valor próximo do LOD) para a simazina e de 0,028 µg/L para a atrazina, portanto estão bem abaixo do limite aceitável imposto pela legislação europeia que é de no máximo 0,1 µg/L para

pesticidas individuais e 0,5 µg/L para a soma de vários. De acordo com dados da literatura estes pesticidas são, dentre a classes das triazinas, os dois mais estudados e têm sido freqüentemente detectados em águas naturais.²⁰ A atrazina, embora ainda esteja sendo largamente usada em muitos países, foi recentemente banida na Itália e na Alemanha devido ao seu potencial tóxico. A EPA estima que a exposição a 3 µg/L de atrazina, que é o limite máximo imposto, apresenta o risco de 1/100.000 da pessoa ter câncer durante a vida e este é o motivo de preocupação com este herbicida.

III.4. Conclusão

A validação mostrou que o método desenvolvido, empregando-se ELL com diclorometano ou EFS com Supelclean Envichrom-P (E-DVB), é adequado para determinar o conjunto de pesticidas estudados, que possa estar presente em águas de torneira e de poço artesiano, à níveis abaixo de 0,1 µg/L, exceto 3,4-DCA e 2,4-D, devido aos seus valores altos de limites de detecção. O carbendazim não é extraído adequadamente por ELL, devido às perdas no processo. O linuron teve baixas recuperações por EFS possivelmente devido a problemas no processo de eluição do cartucho com os solventes utilizados.

O detector de massas mostrou ser adequado para análises de rotina e apresentou excelente seletividade e sensibilidade.

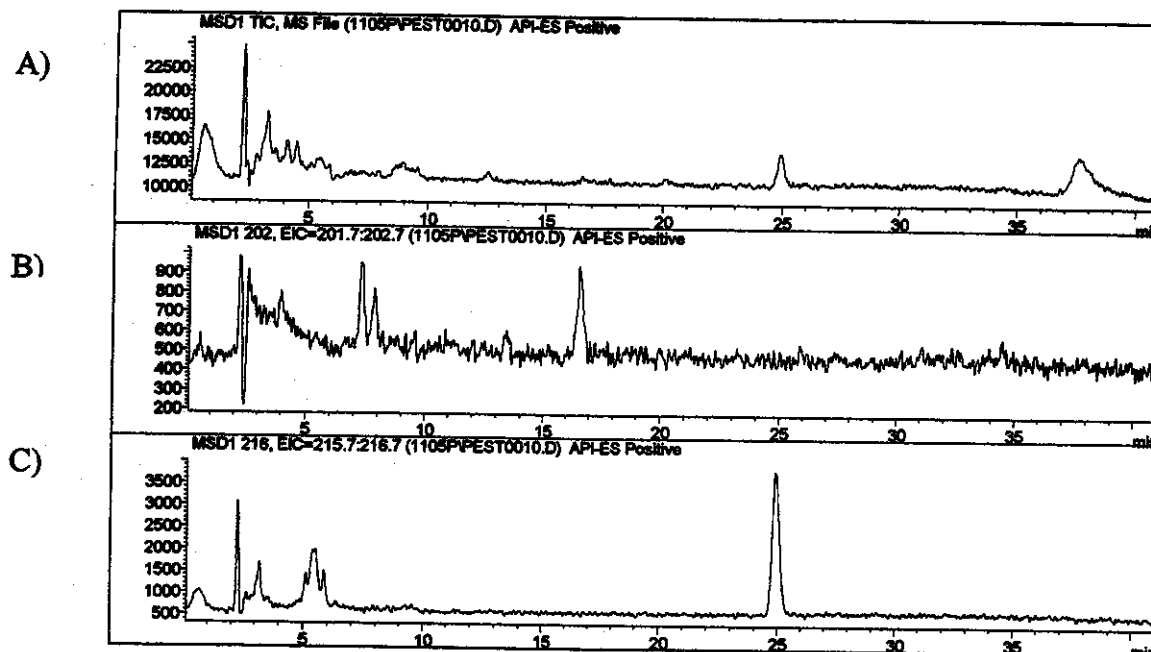
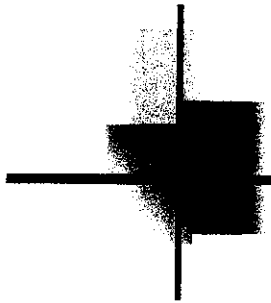


Figura III.4 - Cromatogramas obtidos para amostra de água da torneira utilizando como sorvente: Supelclean Envicarb. A) *Full scan*; B) Detecção de simazina em t_R 16,8 min e C) Detecção de atrazina em t_R 25,0 min. Condições cromatográficas: idem à figura III.2.

III.5. Bibliografia

- ¹ D.W.Koplin; D.A. Goolsby; E.M. Thurman, *J. Environ. Qual.* 24 (1995) 125.
- ² S.A. Senseman; T.L. Lavy; T.C. Daniel, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 283.
- ³ Z.Cai; S.J. Mosson, R.F. Spalding, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 929.
- ⁴ S. Hatrík; J. Tekel, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 217.
- ⁵ P. Parrilla; J.L.M. Vidal, *Anal. Lett.* 30 (1997) 1719.
- ⁶ A. Balinova, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 125.
- ⁷ GARP – Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas, "Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos", 1999.
- ⁸ S.C.N. Queiroz; C.H. Collins; I.C.S.F. Jardim, *Quim. Nova* 24 (2001) 62.
- ⁹ A. di Corcia; R. Sampieri; A. Marcomini; S. Stelluto, *Anal. Chem.* 65 (1993) 907.
- ¹⁰ A. di Corcia; S. Marchese; R. Samperi, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 163.
- ¹¹ E. Pocurull; M. Calull; R.M. Marcé; F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 105.
- ¹² N. Masqué; M. Gália; R.M. Marcé; F. Borrull. *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 147.
- ¹³ N. Masqué; R.M. Marcé; F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 257.

- ¹⁴ P. Parrila; J.L. Martinez Vidal; M. Martinez Galera; A.G Frenich, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 633.
- ¹⁵ A.R. Fernandez-Alba; A. Aguera; M. Contreras; G. Peñuela; I. Ferre; D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- ¹⁶ J.S. Dhoot; A.R. del Rosario, *J. Chromatogr.* 645 (1993) 178.
- ¹⁷ J.V. Sancho; F. Hernández; F.J. López; E.A. Hogendoorn; E. Dikman, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 55.
- ¹⁸ A. Junker-Buchheit; M. Witzemberger, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 67.
- ¹⁹ G. Sacchero; S. Apone; C. Sarzanini; E. Mentasti, *J. Chromatogr. A* 668 (1994) 365.
- ²⁰ H. Sabik; R. Jeannot; B. Rondeau, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 217.



CAPÍTULO IV – NOVOS SORVENTES PARA
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA: PREPARAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO

“Se não tentar, certamente estará fadado ao fracasso”.

Blaise Pascal

IV.1. Justificativa do Trabalho Desenvolvido

A extração em fase sólida é uma alternativa muito atraente para pré-concentrar analitos ou para limpeza de amostras (*clean-up*) devido ao grande número de vantagens que ela oferece em relação à ELL, como já foi descrito anteriormente. Entretanto esta técnica, quando aplicada em análises de rotina, apresenta o inconveniente de que todos os materiais para uso em EFS, disponíveis atualmente, são importados e os preços são elevados. Além disso, a reação utilizada para se obterem materiais à base de sílica quimicamente ligada utiliza reagentes tóxicos, o que vai contra a tendência atual na área de síntese. A chamada “química verde” ou “síntese limpa”, requer procedimentos que poluam o menos possível o meio ambiente e também que os reagentes sejam incorporados ao máximo no produto final. Além disso, o tempo de preparo desses materiais é muito demorado. Assim este trabalho propõe o desenvolvimento de novos processos para obtenção de sorventes tipo C-8 e C-18, destinados a extração em fase sólida. Os pontos-chaves deste novo processo, aqui proposto, são:

- ✓ substituição do reagente organoclorossilano pelo polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) ou poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), que são polissiloxanos, como fonte das cadeias alifáticas do tipo C-18 e C-8, respectivamente;
- ✓ substituição da reação química por um processo de sorção física dos polímeros sobre a sílica, seguida da imobilização através de temperatura, irradiação gama ou microondas;
- ✓ eliminação da etapa de capeamento.

A fim de avaliar o potencial destes materiais empregaram-se os mesmos na análise de pesticidas presentes em diferentes tipos de matrizes: água e urina

IV.2. Parte Experimental

IV.2.1. Materiais e Reagentes

A acetonitrila, usada na fase móvel, e o metanol, utilizado na extração do excesso de polímero, foram grau cromatográfico, obtidos da Mallinckrodt.

O pentano utilizado para dissolver o polímero foi grau cromatográfico da Mallinckrodt.

O hexano, utilizado na extração do excesso de polímero, foi grau cromatográfico da Merck.

A sílica utilizada como suporte dos sorventes foi obtida da Fluka. As características deste material foram: partículas na faixa de 40-63 μm , 200-400 mesh, e de tamanho de poro de 10 nm.

O tolueno utilizado na caracterização das massas molares dos polissiloxanos foi grau cromatográfico obtido da Tedia.

O hidróxido de amônio, P.A., utilizado na fase móvel foi obtido da Nuclear.

Cartucho Supelclean C-18, 500 mg, volume 6 mL (Supelco).

IV.2.2. Polímeros

Os polímeros poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) e o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) foram obtidos da Petrarch Silanes and

Silicones. Estes materiais foram caracterizados por cromatografia de permeação em gel. A faixa de massas molares dos padrões de poliestireno, utilizadas na calibração do equipamento foi: 456 - $4,48 \cdot 10^6$ Da. As condições de análise foram: três colunas Ultrastyrigel (Waters) de 7,8 x 300 mm, acopladas em série, com 50 nm, 10^2 nm e 10^3 nm de tamanho de poro; fase móvel: tolueno; vazão: 1,0 mL/min; detecção por índice de refração e temperaturas do forno e da coluna 40°C.

IV.2.3. Pesticidas Seleccionados

Os pesticidas seleccionados para caracterizar os sorventes foram: o benomil, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina. As características destes pesticidas, exceto para o benomil, foram descritas na parte experimental do **Capítulo III**. O benomil foi obtido da Du Pont e tem uma pureza de 98,4%.

IV.2.4. Instrumentação

Os seguintes equipamentos foram utilizados neste trabalho:

- Cromatógrafo de permeação em gel da Waters constituído de bomba de alta pressão modelo 510, detector de índice de refração modelo 410, programa computacional Millenium, injetor Rheodyne, modelo 7725, com alça de amostragem 2 mL e forno para colunas.
- As análises das amostras de água, após extração no modo “*off-line*” foram realizadas em um cromatógrafo a líquido, da marca Waters, modelo 600E, com a seguinte configuração: bomba quaternária, injetor Rheodyne (volume da alça de amostragem: 20 µL), detector

espectrofotométrico de absorção no UV/Vis de comprimento de onda variável, modelo 484, e integrador Waters, modelo 746.

- A determinação do volume de *breakthrough*, bem como as recuperações obtidas após extrações no modo “*on-line*”, foram obtidos através de um cromatógrafo a líquido da marca Hewlett-Packard, modelo 1090, série II/M, que consiste de uma bomba ternária, amostrador de 25 μ L, compartimento de coluna termostaticado, detector por arranjo de diodos, válvula de seis vias, e um programa computacional escrito em Pascal denominado Workstation, que controla o sistema.
- Forno microondas, tipo caseiro, marca CCE modelo M34.
- Analisador de CHN da Perkin-Elmer, modelo 2400.
- Espectrofotômetro FT-IR da Perkin-Elmer, modelo 1600.
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JMST-300.
- Analisador termogravimétrico TA Instruments, modelo TGA-2050.
- Sistema para extração em fase sólida da Supelco.

IV.2.5. Recobrimento da Sílica com o Polímero

O recobrimento do suporte pelo polímero foi feito usando o método da evaporação do solvente¹. Assim, uma quantidade determinada de sílica, pré-aquecida a 150°C por 24 h, foi adicionada à solução de PMODS ou PMOS dissolvido em pentano. A razão massa/massa utilizada foi igual a 4:6 entre polímero e sílica. A dissolução do PMODS no pentano é facilitada se realizada

em banho ultrassônico durante 20 a 30 min. A mistura sílica/polímero/pentano ficou sob agitação magnética durante 3 h. Após este tempo, a mistura foi deixada em repouso, para evaporação do pentano, à temperatura ambiente. Para assegurar a evaporação completa do pentano, a fase sólida foi levada a estufa à 40 °C, durante 60 min. O material obtido (polímero sorvido sobre a sílica) foi dividido em partes para posterior imobilização por temperatura e irradiação gama.

O processo de obtenção do PMODS sorvido sobre sílica, para posterior imobilização por microondas, foi o mesmo descrito para a imobilização térmica e por irradiação gama, exceto que a sílica não foi seca em estufa a 150°C, pois a água exerce um papel importante no aquecimento por microondas.

IV.2.6. Processo de Imobilização

IV.2.6.1. Imobilização Térmica

A etapa de imobilização térmica consistiu em levar o sorvente, isento de solvente, para a estufa a 120°C, por 4 h, à pressão atmosférica. O sorvente foi depositado em uma placa de Petri, permitindo assim uma alta exposição de sua área superficial.

IV.2.6.2. Imobilização por Irradiação Gama

Os sorventes foram colocados em ampolas de vidro, do tipo pyrex, e foram selados sob condição ambiente, utilizando-se um maçarico. As amostras foram irradiadas nas doses de 60 e 80 kGy por uma fonte de Cobalto-60, pertencente à empresa IBRAS CBO - Campinas, SP.

IV.2.6.3. Imobilização por Irradiação com Microondas

Após o preparo, o material (polímero sorvido sobre a sílica) foi acondicionado em um copo de teflon e levado para um forno de microondas. Aplicaram-se 80% de potência (total de 495,2 Watts), durante 15 min, em intervalos de 3 minutos para evitar superaquecimento.

IV.2.7. Extração do Polímero Excedente

Durante a sorção do polímero sobre a sílica, utilizou-se a proporção 4:6 (m/m) entre PMODS ou PMOS e o suporte. Com esta proporção, há um excesso de polímero, a fim de assegurar um amplo recobrimento das partículas de sílica, bem como o preenchimento dos poros. Após a etapa de imobilização, faz-se necessário a remoção da massa excedente de polímero, através de extração, descrita a seguir.

IV.2.7.1. Extração do PMODS

A extração do polímero excedente consistiu em introduzir o sorvente dentro de um tubo de aço inoxidável, de 190 mm x 19 mm d.i., com filtro em ambas as extremidades, e fazer passar através dele solventes que arrastassem o excesso do polímero. O solvente foi bombeado por meio de uma bomba cromatográfica convencional. A seqüência de eluição foi a seguinte: i) hexano grau cromatográfico, na proporção de 25 mL de hexano : 1 g de sorvente, a uma vazão de 2 mL/min; ii) metanol, na proporção de 15 mL de metanol: 1 g de fase sólida, a uma vazão de 3 mL/min. Na seqüência, foi realizado um bombeamento de metanol sob alta pressão (1000 psi ou 6,9 MPa), na proporção de 20 mL de metanol: 1 g de sorvente e secagem da fase à temperatura ambiente.

IV.2.7.2. Extração do PMOS

O procedimento de extração do PMOS foi igual ao do PMODS exceto que a lavagem com metanol grau cromatográfico foi feita em somente uma etapa, na proporção de 35 mL de metanol : 1 g de sorvente e a pressão empregada foi de 2000 psi (ou 13,9 MPa). A secagem da fase foi realizada em temperatura ambiente.

IV.2.8. Caracterização dos Sorventes

Após o preparo dos sorventes e da extração do excesso de polímero foi realizada a caracterização dos mesmos através das seguintes técnicas:

IV.2.8.1. Análise Elementar (CHN)

Esta análise foi feita para determinar o teor total de carbono, ou seja a quantidade de polímero que ficou retida no suporte. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO₂, que é então medido em função de sua condutividade térmica.

IV.2.8.2. Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 até 500 cm⁻¹. Esta análise foi feita a fim de verificar o grau de recobrimento dos grupos silanóis da sílica e a existência ou não de polímero, através da presença de determinados grupos funcionais que o caracteriza. Os espectros foram obtidos através da prensagem da fase sólida juntamente com brometo de potássio anidro, na proporção de 1:100 (m/m), respectivamente, a fim de se obter uma pastilha.

IV.2.8.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica permite determinar a forma de um material, o tamanho das partículas que os compõem e seu arranjo. Além disso, nesta técnica é possível

verificar a homogeneidade do recobrimento do polímero sobre a superfície do suporte.

IV.2.8.4. Análise Termogravimétrica (ATG)

Estas análises foram feitas a fim de verificar a estabilidade do polímero sobre a sílica. O princípio da técnica baseia-se em um analisador térmico, onde, através de uma microbalança, se obtém a porcentagem de perda de massa da amostra em função do aumento da temperatura. A análise é realizada sob atmosfera inerte de argônio, com taxa de aquecimento de 10⁰C/min, no intervalo de 25 à 900⁰C.

IV.2.9. Confeção dos Cartuchos

Os cartuchos foram confeccionados utilizando uma seringa tipo hipodérmica com corpo de polipropileno de 5 mL (Ibrasgamma) preenchida com 500 mg de sorvente, que ficou retido por meio de dois filtros de polietileno com tamanho de poros de 20 µm.

IV.2.10. Confeção da Coluna de Enriquecimento de Traços

Os corpos das colunas utilizados neste trabalho foram feitos a partir de tubos de aço inoxidável 316L, sem costura, com diâmetro externo de 9,5 mm e interno de 4 mm e comprimento de 20 mm. As colunas, polidas no próprio laboratório,² foram recheadas à seco ou através do método de suspensão com alta pressão. Para cada coluna foi necessário cerca de 0,5 g de fase.

IV.2.11. Recuperação dos Pesticidas (Modo *Off-line*)

Foram testadas as capacidades de retenção dos cartuchos com a seguinte mistura de pesticidas: benomil; tebutiuron, simazina; atrazina; diuron e ametrina.

Inicialmente, o cartucho foi ativado com 10 mL de metanol e condicionado com 3 mL de água deionizada. A seguir a amostra foi eluída através do cartucho. Às amostras foram adicionados cerca de 1% de metanol para que as cadeias do polímero continuassem estendidas e, desse modo, obtivesse uma maior recuperação. Após a etapa de pré-concentração, secou-se o cartucho, utilizando vácuo, e os pesticidas foram eluídos com duas porções de 0,5 mL de metanol. O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio (N₂) e ressuspense em um volume conhecido de fase móvel (200 µL) no momento da análise. A **Figura IV.1** mostra um sistema para extração simultânea de amostras.

Após a extração, os extratos foram analisados utilizando uma coluna C18 Microsorb-MV, 5 µm, 150 x 4,6 mm, tamanho de poro 10 nm, e pré-coluna Hypersil C18 20 x 2 mm. As condições de análise foram: fase móvel acetonitrila:água 40:60 (v/v) com 0,01% (v/v) de NH₄OH; vazão: 1 mL/min; eluição isocrática e detecção: UV em 235 nm.

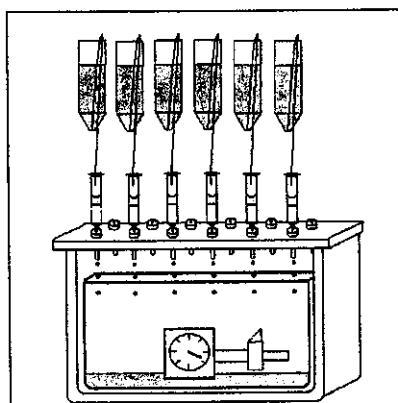


Figura IV.1 - Sistema para extração, *off-line*, simultânea de amostras.

IV.2.12 - Volume de *Breakthrough*

O volume de *breakthrough* é o volume máximo de amostra que pode ser percolado através da coluna de pré-concentração ou do cartucho, para um dado analito, sem que haja prejuízos nas recuperações das amostras. Na prática a determinação do V_b tem sido feita monitorando continuamente ou discretamente o sinal UV/Vis da saída de uma pré-coluna ou através de cálculos a partir do coeficiente de partição em octanol/água.³ Entretanto, estes métodos são trabalhosos e concentrações relativamente altas de analitos devem ser utilizadas, o que não reflete uma situação real.⁴ Assim, neste estudo utilizou-se uma aproximação experimental, descrita recentemente na literatura por Slobodnik *et al.*⁵ Uma mistura de 6 pesticidas foi investigada simultaneamente a nível de sub- $\mu\text{g/L}$. Vários volumes de amostra (água de torneira), fortificados com os analitos (0,5 $\mu\text{g/L}$), foram pré-concentrados e a curva, área do pico *versus* o volume de amostra, foi construída. O ponto onde a curva declinou da linearidade foi considerado ser o volume de *breakthrough*.

Uma bomba de alta pressão, marca Waters modelo 510, foi utilizada para pré-concentrar as amostras (água deionizada e de torneira). Volumes diferentes de amostras foram passados através das colunas de enriquecimento de traços, recheadas com os sorventes preparados neste trabalho, a fim de determinar o volume de *breakthrough*. Para as análises foram selecionados os comprimentos de onda 220 nm e 252 nm, com largura de banda de 10 nm. As separações foram obtidas através de uma coluna de fase reversa Hypersil ODS, 5 μm , 250 x 4,0 mm, da marca Agilent. As condições de análise foram: temperatura ambiente, eluição por gradiente, solvente A: água: NH_4OH 100:0,1 (v/v); solvente B: ACN: NH_4OH 100:0,1 (v/v). O gradiente iniciou com 95% de A e foi até 5%A,

em 20 min, em seguida foi a 100% de A em 5 minutos, onde permaneceu por mais 5 min, até o início da próxima análise. Vazão: 1 mL/min.

IV.2.13. Validação da Metodologia

Uma vez calculado o volume de *breakthrough*, validou-se a metodologia através do cálculo das seguintes figuras de mérito: linearidade, recuperação, exatidão, precisão, limite de detecção e de quantificação e robustez.

IV.3. Resultados e Discussão

O procedimento de sorção de polissiloxanos sobre sílica tem sido amplamente empregado, com sucesso, em nosso grupo de pesquisas (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida – LabCrom⁶ – IQ/Unicamp) para a obtenção de fases estacionárias para CLAE. Vários trabalhos do nosso grupo de pesquisas, utilizando este procedimento, estão disponíveis na literatura científica^{7,8,9,10,11}. Entretanto o uso de sorção de polissiloxanos sobre sílica, seguido de imobilização térmica, por irradiação gama ou por microondas, para uso em extração em fase sólida é inédito até o momento.

IV.3.1. Caracterização dos Sorventes

IV.3.1.1. Análise por Cromatografia de Permeação em Gel (CPG)

Os polímeros utilizados neste trabalho foram caracterizados por CPG. As massas molares, em termos de massa molar média numérica (Mn), para o PMODS e PMOS foram: 12401 e 4963 Da, respectivamente.

IV.3.1.2. Análise Elementar (CHN)

Na **Tabela IV.1** estão mostradas as porcentagens de carbono presentes nos sorventes preparados neste trabalho. Os materiais preparados apresentaram

porcentagem de carbono muito próximas aos dos cartuchos comerciais, que são obtidos via reação de derivatização da sílica, nos quais a quantidade de carbono varia de 8–18%C, conforme apresentado na Tabela I.3.

Tabela IV.1- Porcentagem de carbono dos sorventes preparados neste trabalho.

Novos sorventes	Porcentagem de Carbono (%)
C18 -imobilização por microondas	14
C18 - imobilização por radiação gama (60 kGy)	12
C18 - imobilização por radiação gama (80 kGy)	12
C18 - imobilização por temperatura (120°C/4h)	15
C8 - imobilização por radiação gama (60 kGy)	18
C8 - imobilização por radiação gama (80 kGy)	17
C8 - imobilização por temperatura (120°C/4h)	14

IV.3.1.3. Análise por Infravermelho (IV)

Os espectros de IV obtidos para a sílica gel pura e para as sílicas recobertas com PMODS, após a imobilização, seguido de extração do excesso de polímero, e para as sílicas recobertas com PMOS estão mostrados nas **Figura IV.2**, **Figura IV.3** e **Figura IV.4**, respectivamente.

As principais bandas dos espectros de IV da sílica podem ser atribuídas ao estiramento (ν) de grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água

fisicamente adsorvida e aos grupos hidroxilas geminais (3500 cm^{-1}), grupos siloxanos (1100 cm^{-1}) e grupos silanóis livres (ombro em 975 cm^{-1}).

Os espectros no IV da sílica recoberta com PMDOS têm em comum as bandas do suporte e as do polímero (dublete, em 2850 e $2918,5\text{ cm}^{-1}$), relativo ao estiramento (ν) dos grupos metila, duplete largo em 1100 e 1030 cm^{-1} relativo ao estiramento (ν) dos grupos siloxanos e uma banda em torno de 800 cm^{-1} relativa a deformação assimétrica (ρ) dos grupos metilas). As bandas relativas ao estiramento (ν) dos grupos siloxanos (1100 cm^{-1}) da sílica e ao duplete largo em 1100 e 1030 cm^{-1} de estiramento (ν) dos grupos siloxanos do PMODS se confundem nos espectros do sorvente. Nos espectros de IV da **Figura IV.3** pode-se observar uma redução do sinal em 975 cm^{-1} , indicando um leve recobrimento dos grupos silanóis da sílica pelo PMODS.

Os espectros obtidos para os sorventes tipo C-8 foram similares ao C-18, exceto pela presença de um triplete em 2958 , $2923,5$ e $2854,6\text{ cm}^{-1}$, relativo ao estiramento (ν) dos grupos metila. Através destes espectros foi possível a confirmação da incorporação do PMOS sobre a sílica. Pode-se observar que, para este tipo de sorvente, houve um maior recobrimento dos grupos silanóis.

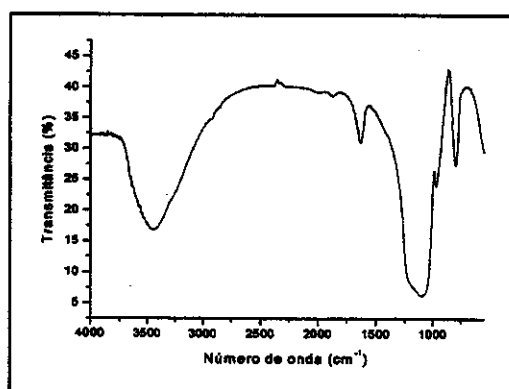


Figura IV.2 – Espectro de IV da sílica gel.

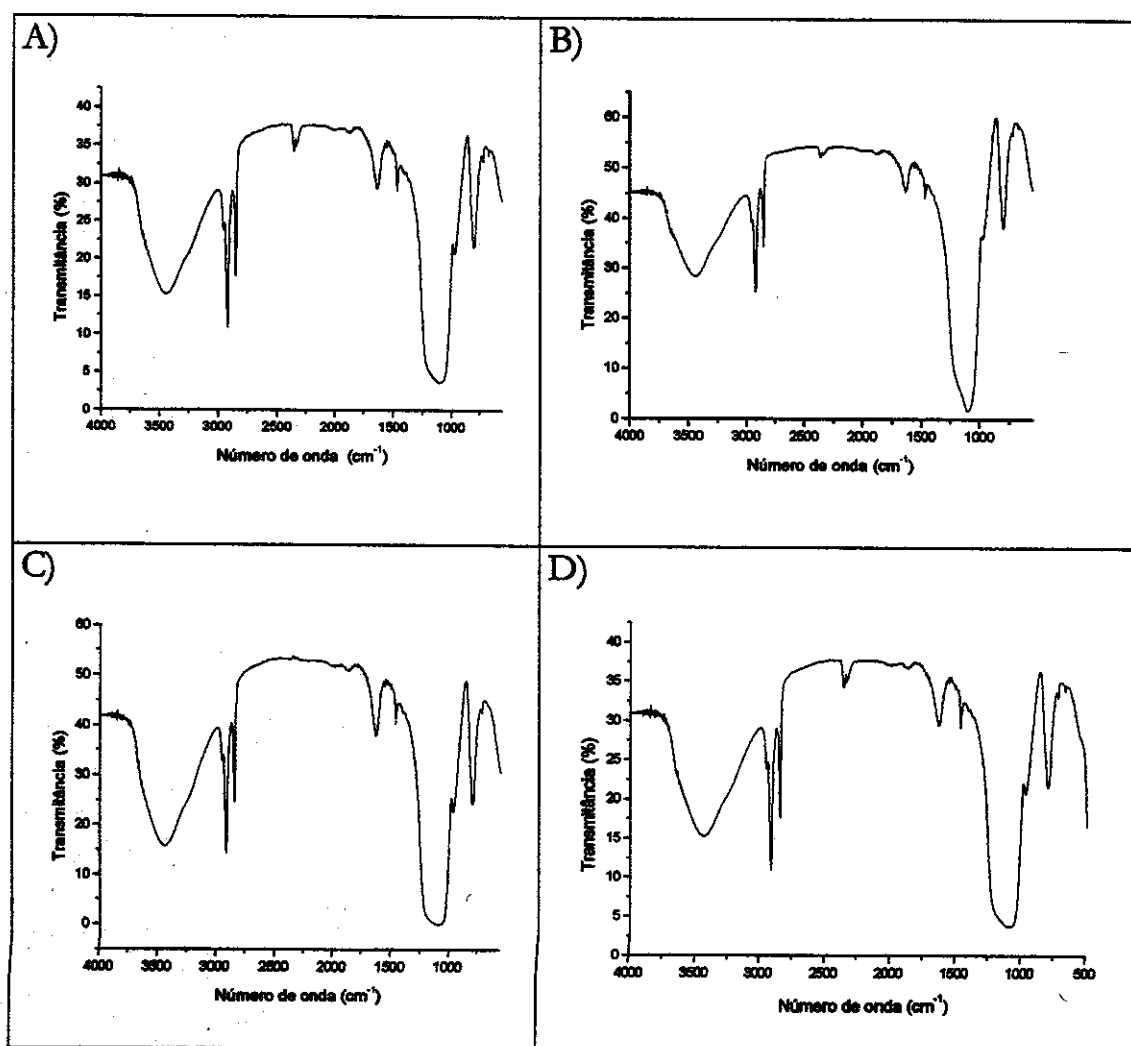


Figura IV.3 – Espectros de IV dos sorventes tipo C-18. A) Imobilização térmica (4h/120°C); B) Microondas; C) Irradiação gama (60 kGy); D) Irradiação gama (80 kGy).

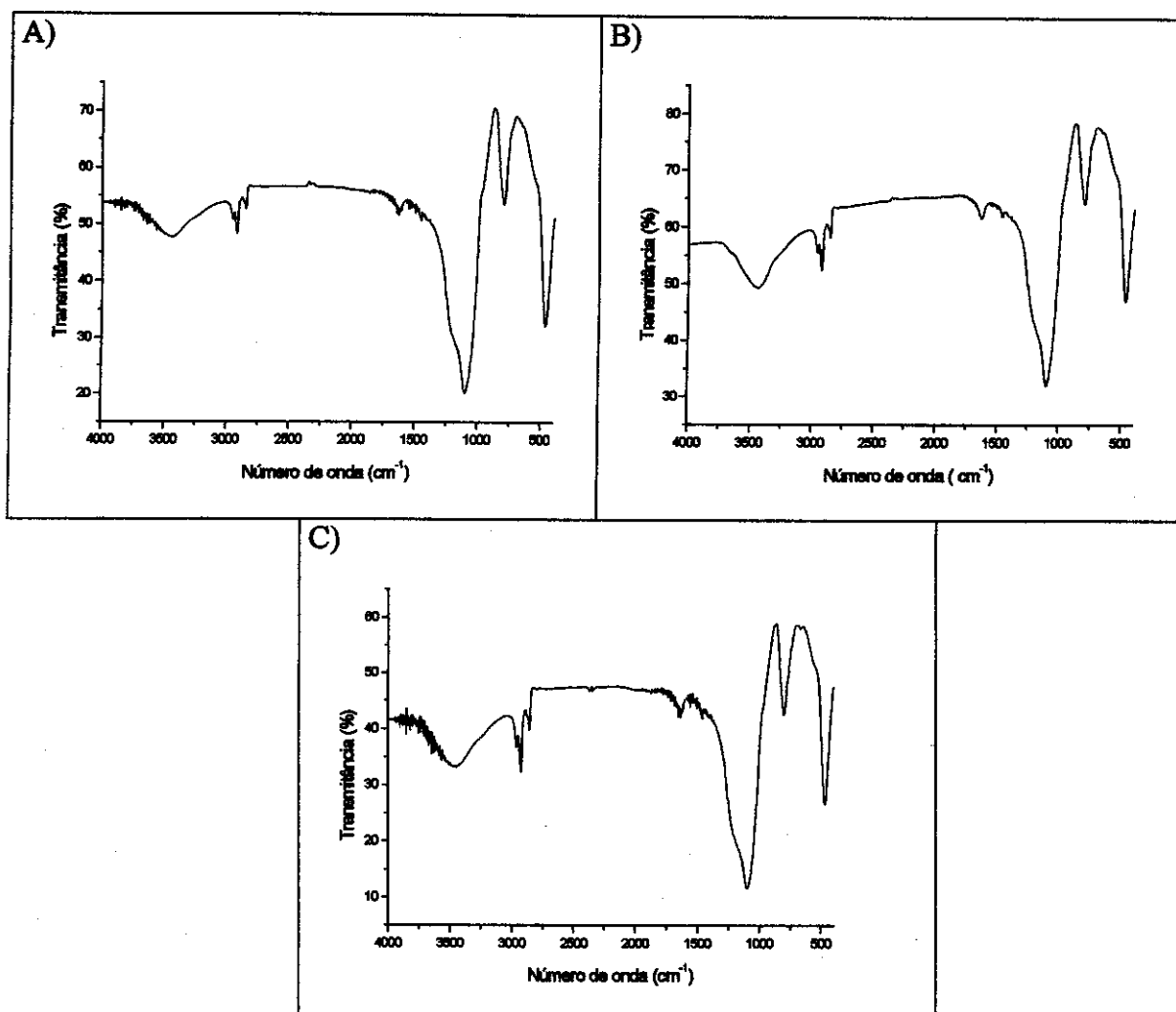


Figura IV.4 – Espectros de IV dos sorventes tipo C-8. A) Imobilização térmica (120°C/4h); B) Irradiação gama (dose 60 kGy); C) Irradiação gama (dose 80 kGy).

IV.3.1.4. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram tiradas fotos da sílica pura, **Figura IV.5.A**, e das obtidas após o recobrimento com polímero (imobilizadas e extraídas). As **Figuras IV.5.B, C** e

D mostram as micrografias obtidas para o sorvente tipo C-18 e a **Figura IV.6** mostra as micrografias dos sorventes do tipo C-8. Nelas pode-se observar uma camada polimérica recobrendo homogeneamente a superfície do suporte, que possui forma irregular.

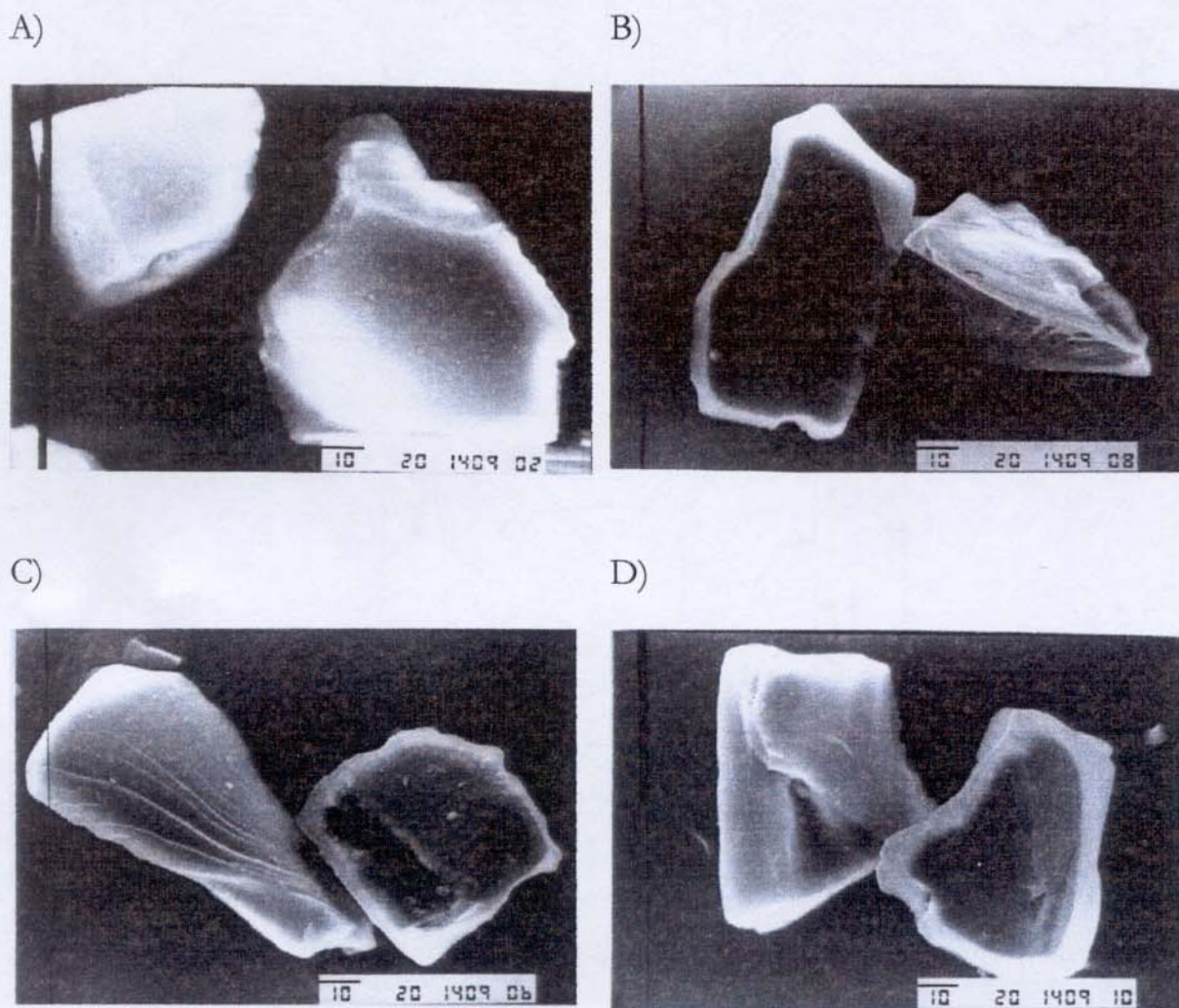


Figura IV.5. – Micrografias eletrônicas de varredura: A) sílica pura; Sorventes tipo C-18 obtido por: B) imobilização térmica (120°C/4h), C) imobilização por microondas; D) imobilização por irradiação, gama dose 80 kGy.

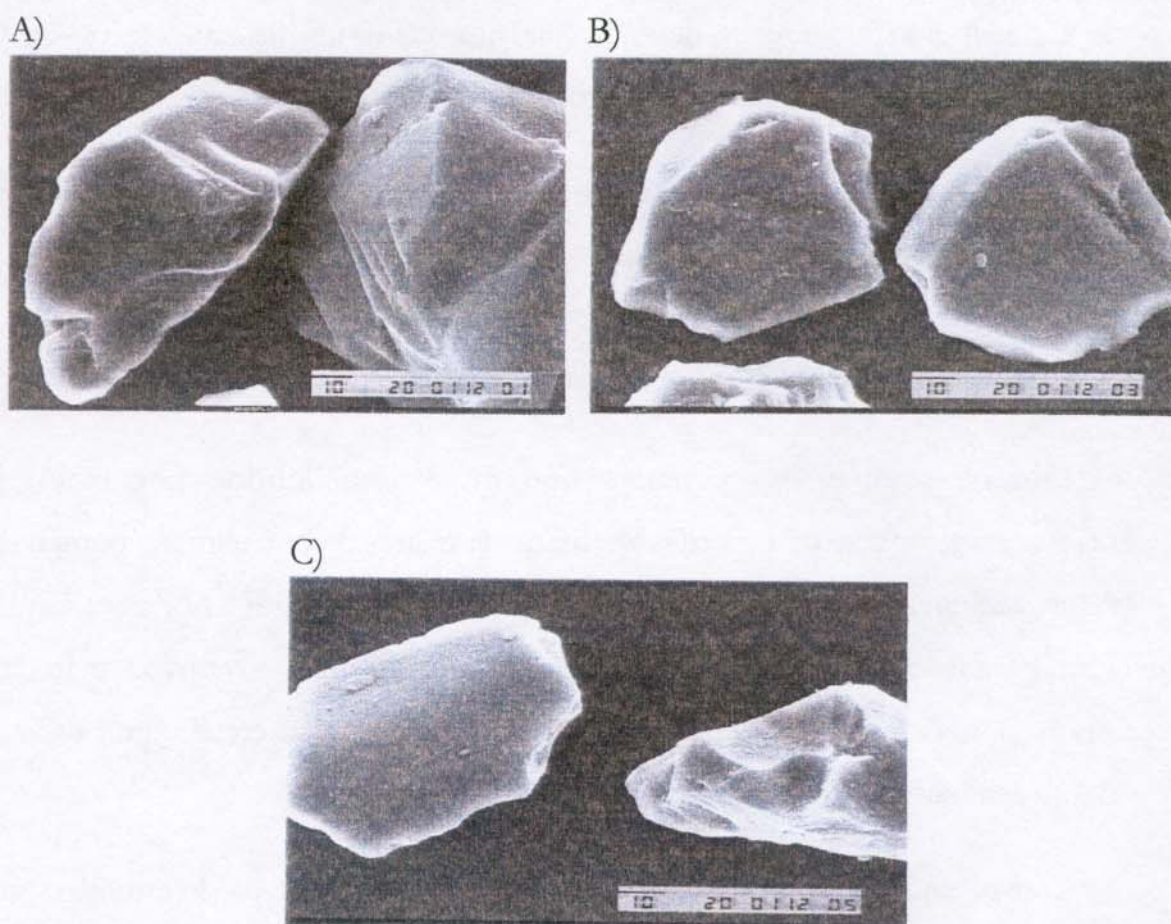


Figura IV.6. – Micrografias dos sorventes tipo C-8: A) imobilização térmica (120⁰C/4h), B) imobilização por irradiação gama, dose 60 kGy e C) imobilização por irradiação gama, dose 80 kGy.

IV.3.1.5. Análise Termogravimétrica (ATG)

Foram submetidas à análise termogravimétrica: os sorventes imobilizados tipo C-18 (estudados neste trabalho), um sorvente C-18 comercial (Supelco), um sorvente C-8 sorvido sobre a sílica (sem a etapa de imobilização) e sorventes tipo C-8 imobilizados (estudadas neste trabalho). No **Apêndice A** estão apresentadas as curvas termogravimétricas obtidas para os materiais em estudo. Quando o material foi submetido ao aquecimento observou-se, através das curvas termogravimétricas, uma perda pequena de massa ao redor de 100⁰C. Isso

pode ser atribuído à presença de água que fica adsorvida fisicamente ou ligada aos grupos hidroxila por pontes de hidrogênio.

As curvas termogravimétricas dos sorventes, usando diferentes tipos de imobilização foram comparadas em relação às perdas de massa do polímero e a faixa de temperatura onde essas perdas ocorrem. A Tabela IV.2. apresenta os valores extraídos dos termogramas.

Observa-se que os sorventes tipo C-18 imobilizados por meio de irradiação gama apresentam perdas de massa similares à do polímero comercial, sorvente da Supelco, e os sorventes imobilizados termicamente e por microondas tiveram perdas de massa um pouco maiores. Por outro, os novos materiais sofreram perdas em temperaturas superiores ao do comercial, indicando a excelente estabilidade destes sorventes.

Comparando os sorventes do tipo C-8, com e sem a etapa de imobilização, observa-se que o sorvente sem imobilização apresenta perdas maiores que os imobilizados, indicando que a imobilização aumenta a estabilidade do material preparado.

Tabela IV.2 – Resultados obtidos das curvas termogravimétricas.

Sorvente e tipo de imobilização	% de perda de massa	ΔT de perda de massa (°C)
C-18 Térmica (120°C/4h)	20,93	292,73-513,86
C-18 Microondas	20,09	338,49-515,08
C-18 Irradiação gama (60 kGy)	15,69	295,17-530,12
C-18 Irradiação gama (80 kGy)	15,59	305,68-531,09
C-18 Supelco	15,47	258,98-509,54
C-8 + Sílica	30,36	291,25-511,64
C-8 térmica(120°C/4h)	16,08	311,22-536,73
C-8 Irradiação gama (60 kGy)	20,99	263,84-508,38
C-8 Irradiação gama (80 kGy)	22,06	294,09-524,07

ΔT = variação de temperatura

IV.3.2 – Aplicações dos Sorventes

Para verificar o poder de retenção dos pesticidas, tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina, nos sorventes e portanto a capacidade extrativa dos materiais sintetizados, foram analisadas amostras de água. As extrações das amostras foram realizadas no modo *off-line*, utilizando cartuchos contendo 0,5 g do sorvente. Este modo de extração é o mais empregado na análise de pesticidas presentes em água.

O detector utilizado foi o espectrofotométrico com arranjo de diodos (DAD). Este detector permite explorar comprimentos de onda no UV, melhorando a detectabilidade instrumental e a seletividade das análises, possibilitando a confirmação dos compostos não somente pelo tempo de

retenção, mas também pelos espectros de absorção no UV. No **Apêndice B** estão apresentados os espectros de UV destes compostos.

IV.3.2.1. Extrações em Cartuchos Tipo C-18

IV.3.2.1.1. Extração de Pesticidas em Água no Modo *Off-line*

As concentrações usadas para as fortificações foram: 0,1 µg/L, 1 µg/L e 10 µg/L. A concentração 0,1 µg/L foi escolhida de forma a atender os critérios da legislação internacional européia.

Os valores das recuperações foram calculados através da razão entre as áreas dos picos após o processo de pré-concentração e as áreas obtidas pela injeção direta dos padrões (concentrações conhecidas). Os resultados das recuperações estão apresentados nas **Tabelas IV.3 à IV.6**.

Foram realizados testes com um cartucho Supelclean C-18 (Supelco) de 500 mg, a fim de comparar o desempenho do sorvente obtido por imobilização térmica com um cartucho comercial. Os resultados obtidos para o cartucho comercial são mostrados nas **Tabelas IV.3 e IV.4**.

Tabela IV.3 – Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada ($n=2$) no modo *off-line*. Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de pré-concentração = 1000 vezes.

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	158	50	121	43	86	22	97	19	92	0	72	12
C18-IT	100	13	94	18	81	17	80	20	92	9	89	12
C18-60 kGy	81	14	103	3	84	14	96	10	91	1	82	10
C18-80 kGy	89	1	101	8	86	0	85	3	94	6	93	3
Supelco	79	3	78	7	78	12	74	6	79	1	76	5

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.4 – Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada ($n=2$) no modo *off-line*. Fortificação = 1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 100 vezes.

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	64	2	103	1	99	4	101	4	99	0	109	3
C18-IT	73	2	98	2	99	3	103	7	101	4	105	3
C18-60 kGy	76	20	97	3	101	2	94	2	97	1	101	1
C18-80 kGy	73	14	97	15	85	10	88	3	80	6	96	2
Supelco	100	3	84	7	98	12	92	6	89	1	89	5

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.5 - Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada (n=2) no modo *off-line*. Fortificação = 10 µg/L. Volume de amostra = 20 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 10 vezes.

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	102	2	90	0	87	2	92	1	91	4	93	5
C18-IT	102	2	84	3	99	5	86	2	86	0	89	2
C18-60 kGy	99	4	90	6	94	9	98	1	95	4	94	9
C18-80 kGy	96	4	86	7	95	3	103	3	103	3	102	1

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.6 - Recuperações e precisões dos pesticidas em água de torneira (n=2) no modo *off-line*. Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de pré-concentração = 1000 vezes.

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	31	6	75	6	97	5	95	5	109	7	86	5
C18-IT	44	22	99	10	105	9	88	9	96	13	71	2
C18-60 kGy	35	7	89	12	113	4	99	3	122	6	93	5
C18-80 kGy	28	18	63	6	104	7	86	17	106	14	75	11

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Os resultados para água deionizada usando a fase imobilizada por microondas e fortificações em 0,1 µg/L e 1 µg/L foram os piores. Para a concentração de 0,1 µg/L observa-se que tanto os valores de recuperação quanto de RSD estão fora dos limites aceitos para os pesticidas benomil e tebutiuron, uma vez que estão muito altos e para o herbicida simazina o valor de RSD também foi grande. Para a fortificação de 1 µg/L, o pesticida benomil apresentou uma recuperação um pouco inferior, porém em se tratando de benomil, que é um composto bastante polar pode-se considerá-la aceitável, baseado no intervalo de 50-120%. Após a imobilização do PMODS por microondas observou-se que a coloração do material se tornou amarelada. Além disso houve a formação de aglomerados de partículas e isso prejudicou a repetibilidade das extrações, uma vez que a área superficial mudou de um cartucho para outro. Observou-se também a presença de interferentes no início do cromatograma, que poderiam ter sido eluídos dos cartuchos juntamente com os pesticidas, uma vez que neste tipo de material foi notado este efeito mais marcadamente. O fato da fase sólida estar amarelada indica uma degradação do polímero e isso pode ter gerado estes interferentes. Entretanto a técnica de imobilização por microondas mostrou ser promissora já que para alguns dos pesticidas, as recuperações foram consideradas satisfatórias. Porém, é necessário que se faça maiores estudos a fim de otimizar o processo de imobilização, tais como, verificação do melhor tempo de irradiação e da melhor potência a ser aplicada. Todos os outros materiais, obtidos por imobilização térmica e irradiação gama, mostraram excelente desempenho tanto em termos de recuperações quanto de repetibilidade.

Com o objetivo de verificar o potencial de aplicação destes sorventes em extrações de água de torneira, coletaram amostras no próprio laboratório do

Instituto de Química da UNICAMP e em seguida submeteram ao processo de extração. Os resultados podem ser vistos na Tabela IV.6. Analisando-se esta tabela verifica-se que houve uma grande diminuição da recuperação para o benomil com todos os sorventes preparados. Isso pode ser explicado pelo fato de aparecer um pico intenso e largo no início do cromatograma, provavelmente, o pico de ácidos húmicos, que interferem na análise tornando mais difícil a integração, o que não ocorre com a água deionizada (Figura IV.7). Os valores de recuperação para os demais pesticidas estão excelentes, exceto para o tebutiuron usando a fase imobilizada por irradiação gama, dose 80 kGy e para o diuron usando a fase C18-60 kGy.

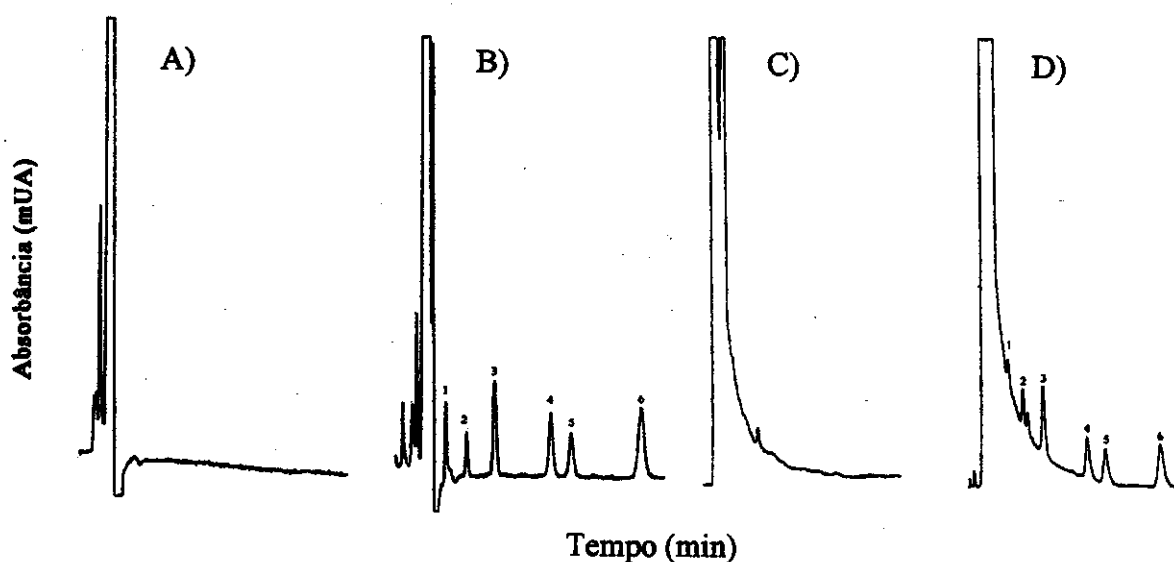


Figura IV.7 – Cromatogramas obtidos para água fortificada com pesticidas. A) branco de água Milli-Q, B) água Milli-Q fortificada, C) branco de água de torneira, D) água de torneira fortificada. 1) benomil ($t_R = 3,3$ min), 2) tebutiuron ($t_R = 4,4$ min), 3) simazina ($t_R = 6,1$ min), 4) atrazina ($t_R = 9,8$ min), 5) diuron ($t_R = 11,4$ min) e 6) ametrina ($t_R = 16,0$ min). Condições cromatográficas: coluna C18 Microsorb-MV de 150x4.6 i.d. mm. Fase móvel: ACN:H₂O:NH₄OH 40/60/0.1 (v/v/v), eluição isocrática. Detecção UV a 235 nm.

No branco da água de torneira não foi detectado nenhum dos pesticidas estudados. O pico que se visualiza na **Figura IV.7** é de uma substância não identificada que elui em tempo de retenção diferente dos pesticidas estudados.

IV.3.2.1.2. Extração de Pesticidas em Água no Modo *On-line*

As técnicas ELL e a EFS no modo *off-line* têm uma série de desvantagens, por exemplo, riscos de contaminação e degradação, perdas do analito e tempos longos de análise. Além disso o modo *off-line* apresenta um número grande de etapas entre a pré-concentração e a separação e isso dificulta a automação completa.

Hoje em dia a melhor maneira de contornar este problema é através do uso de técnicas *on-line*.¹² Nesta técnica, a amostra é pré-concentrada em uma coluna de enriquecimento de traços (CET), recheada com um sorvente apropriado e, após a extração, a direção do fluxo da fase móvel é alterada por meio de uma válvula rotatória de seis vias, eluindo os analitos retidos e desviando para uma outra coluna, analítica, onde a separação cromatográfica é realizada (**Figura I.3**). Algumas vantagens adicionais da extração *on-line* são: técnica excelente para análises de rotina, elimina erros de manipulação, evita a contaminação do operador quando solventes e/ou analitos tóxicos são empregados na análise, possui maior precisão e exatidão que o modo *off-line*. As desvantagens são: necessita de equipamentos especiais (bomba adicional e válvula de seis vias) e maior custo inicial para a implantação. Diante das vantagens desta técnica decidiu-se realizar as extrações empregando-se os sorventes preparados neste trabalho no modo *on-line*. Antes da análise em si, calculou-se o volume de *breakthrough* (V_b). Os resultados estão descritos a seguir.

IV.3.2.1.2.1. Volume de *Breakthrough* (V_b)

O volume de *breakthrough*, V_b , representa o volume máximo de amostra que pode ser aplicado em um cartucho/pré-coluna com uma recuperação teórica de 100% e esta medida pode ser usada para predições e comparações de vários tipos de sorventes. A capacidade do sorvente, a retenção e a cinética do processo de isolamento de um dado analito de uma amostra estão relacionadas com o volume de *breakthrough*. A determinação do volume de V_b é o principal passo no desenvolvimento de um método analítico usando EFS. As fases sólidas devem apresentar volumes de *breakthrough* os mais altos possíveis para que retendo maiores quantidades dos analitos, eles sejam detectados mais eficientemente. Porém, é muito difícil ajustar o volume de forma que se tenha 100% de recuperação para todos os analitos, pois, muitas vezes, eles diferem em suas propriedades físico-químicas. Assim, um compromisso deve ser sempre encontrado, de tal forma que se obtenha recuperações e detectabilidade adequadas, pois, muitas vezes, aplicando volumes maiores de amostra conseguem-se menores LOD. Portanto, para selecionar um volume de amostra apropriado, o volume de *breakthrough* dos analitos de interesse devem ser determinados.

A Tabela IV.7 mostra os valores dos volumes de *breakthrough* dos pesticidas e na Figura IV.8 encontram-se as curvas. As vantagens deste método são que o V_b de vários pesticidas podem ser estimados simultaneamente, sob condições reais.

Após as determinações dos valores de V_b para os pesticidas, foi escolhido o volume de amostra a ser empregado. O benomil foi o pesticida que apresentou menor valor de V_b , que foi de 50 mL. Este valor para o benomil era esperado uma vez que este é o pesticida de maior polaridade e o sorvente sendo apolar retém pouco este analito. Assim, um volume de amostra igual a 50 mL foi usado

Tabela IV.7 - Volume de *breakthrough*, V_b , dos pesticidas nos sorventes tipo C18.

Tipo de imobilização	V_b dos pesticidas (mL)					
	Benomil	Tebutiuron	Simazina	Atrazina	Diuron	Ametrina
MW	50	>300	200	>300	>300	>300
IT	50	>300	>300	150	200	>300
60 kGy	50	>300	200	200	200	>300
80 kGy	100	>300	200	>300	>300	>300

tipo de imobilização: MW = microondas; IT = térmica; kGy = irradiação gama.

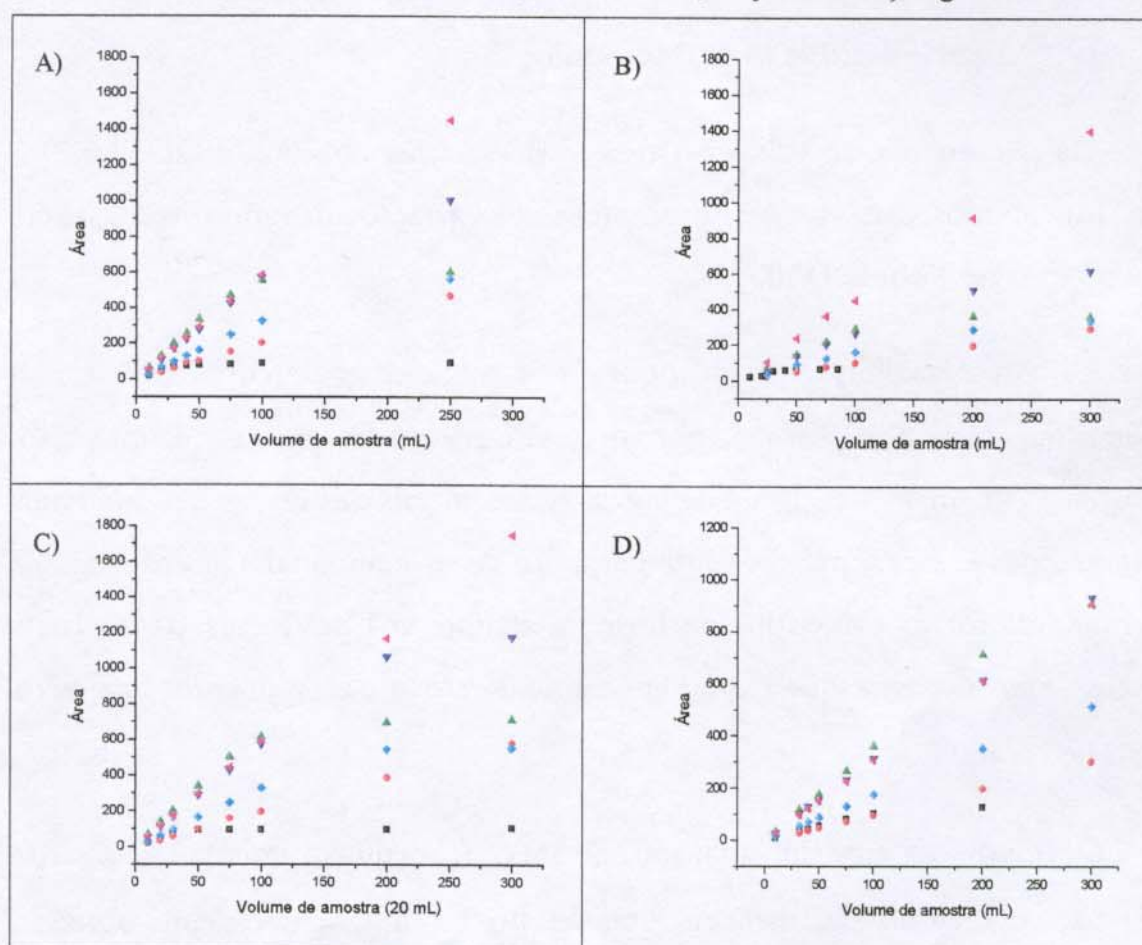


Figura IV.8 - Volumes de *breakthrough* para os sorventes tipo C-18 com diferentes imobilizações. A) Microondas, B) Imobilização térmica (120°C/4h); C) Irradiação gama (60kGy) e D) Irradiação gama (80 kGy). Legenda: ■ Benomil; ● Tebutiuron; ▲ Simazina; ▼ Atrazina; ◆ Diuron; ◀ Ametrina.

de forma a se obter uma boa recuperação para o conjunto de pesticidas, aliada a uma boa detecção.

Foram testadas duas maneiras de recheiar as pré-colunas: a seco e através do método de suspensão com alta pressão. Ambas apresentaram desempenho similares. Optou-se pelo enchimento a seco, pois não necessita de equipamentos sofisticados (bomba de enchimento) e, desse modo, qualquer pessoa pode facilmente encher as colunas de enriquecimento.

IV.3.2.1.2.2. – Validação da Metodologia

Os parâmetros de validação (linearidade, curva analítica, LOD, LOQ e precisão), obtidos para o método empregando extração no modo *on-line*, estão apresentados na Tabela IV.8.

As curvas analíticas foram obtidas e os coeficientes de correlação foram maiores ou iguais a 0,9973 e, portanto, são adequadas para a quantificação. Amostras (50 mL) de água deionizada foram fortificadas em diferentes concentrações e foram pré-concentradas a fim de se determinar a linearidade. Os experimentos foram planejados de forma a atender aos pré-requisitos do *EEC Drinking Water Guidance*, que requer limites de detecção para poluentes orgânicos abaixo de 0,1 µg/L.

O volume de amostra utilizado, 50 mL, é adequado pois os valores de LOQ para o método são menores que 0,1 µg/L. Se for necessário obterem LOQ menores, volumes maiores de amostra (300 mL) podem ser utilizados, o que melhoraria, em determinados casos, a detecção em até 6 vezes, veja a Tabela IV.7.

Tabela IV.8 - Parâmetros de validação para extrações de pesticidas em água deionizada no modo *on-line*.

Pesticida	Linearidade (µg/L)	r	LOD ^a (µg)	LOQ ^a (µg)	LOD ^b (µg/L)	LOQ ^b (µg/L)	RSD (n=6) (%)
Benomil	0,08-2,5	0,9973	0,001	0,004	0,02	0,08	5
Tebutiuron	0,02-2,5	0,9999	0,0003	0,001	0,006	0,02	8
Simazina	0,02-2,5	0,9999	0,0005	0,001	0,01	0,02	5
Atrazina	0,02-2,5	0,9999	0,0005	0,001	0,01	0,02	3
Diuron	0,002-2,5	0,9999	0,00005	0,0001	0,001	0,002	3
Ametrina	0,02-2,5	0,9999	0,0005	0,001	0,01	0,02	3

r = coeficiente de correlação; n = número de repetições; LOD = limite de detecção; LOQ = limite de quantificação; RSD = estimativa do desvio padrão relativo.

a = valor obtido do instrumento; b = valor obtido do método (após pré-concentração de 50 mL de amostra).

A exatidão foi obtida por meio de medidas de recuperação de amostras fortificadas. A Tabela IV.9 e a Tabela IV.10, apresentam as recuperações, exatidões e precisões dos pesticidas usando água deionizada nas concentrações de 0,1 µg/L e 0,5 µg/L, respectivamente. Como pode-se observar, houve uma maior recuperação para o benomil, usando a fase imobilizada por irradiação gama (80 kGy). Isto pode ser explicado pelo fato deste material apresentar volumes de *breakthrough* maiores.

Água de torneira também foi analisada para verificar o potencial do método desenvolvido na análise de amostras reais. Os resultados obtidos para os três parâmetros de validação, Tabela IV.11, indicaram a eficiência do sorvente preparado na sua utilização em EFS.

Tabela IV.9 – Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações *on-line* usando os diferentes sorventes tipo C-18. Concentração de fortificação 0,1 µg/L. Volume de amostra = 50 mL. (n=5).

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	82	6	110	3	79	7	94	4	99	3	99	7
C18-IT	70	6	100	5	102	3	106	3	110	3	110	5
C18-60 kGy	74	10	112	2	104	4	110	4	102	3	102	6
C18-80 kGy	102	3	111	4	98	5	108	2	102	2	104	6

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.10 – Recuperações e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações *on-line* usando os diferentes sorventes tipo C-18. Concentração de fortificação 0,5 µg/L. Volume de amostra = 50 mL. (n=5).

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	75	7	108	3	114	1	96	1	101	2	100	2
C18-IT	77	8	102	3	106	2	102	4	103	3	102	5
C18-60 kGy	91	1	105	4	93	1	101	1	101	1	99	1
C18-80 kGy	103	3	107	4	104	3	112	5	106	3	107	4

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.11 – Recuperações e precisões dos pesticidas em água de torneira obtidas através de extrações no modo *on-line*. Utilizando cartuchos C-18. Concentração da fortificação = 0,5 µg/L. Volume de amostra = 50 mL (n=5).

Fase sólida	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C18-MW	86	7	99	5	101	1	103	1	103	1	103	3
C18-IT	70	2	101	3	94	7	99	1	98	1	103	3
C18-60 kGy	67	9	102	3	109	14	106	5	101	1	103	4

Imobilização: MW = microondas; IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
 Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

O detector utilizado foi o DAD, este tipo de instrumento não é tão seletivo quanto o EM, mesmo assim, conseguiu-se obter uma boa seletividade para os pesticidas. Para isso foram necessários empregar dois comprimentos de onda: 220 nm (detecção de: benomil, simazina, atrazina e ametrina) e o 252 nm (detecção do tebutiuron e do diuron), que foram escolhidos com base nos espectros de UV/Vis dos pesticidas. O pico da simazina, algumas vezes sofreu interferência dos constituintes da matriz (água de torneira), porém os picos dos outros pesticidas ficaram bem separados. Este método é ideal para *screening*, sendo que se forem detectados picos nos tempos de retenção correspondentes aos dos padrões de pesticidas, são necessárias análises adicionais para confirmar a presença do contaminante. A **Figura IV.9** apresenta um cromatograma de uma amostra de água de torneira. Nas amostras analisadas não detectou a presença dos pesticidas estudados.

O método mostrou ser robusto, pois foram testados dois lotes diferentes da coluna cromatográfica, diferentes temperaturas da coluna, acetonitrila de diferentes marcas e não se observou nenhuma alteração significativa no perfil cromatográfico.

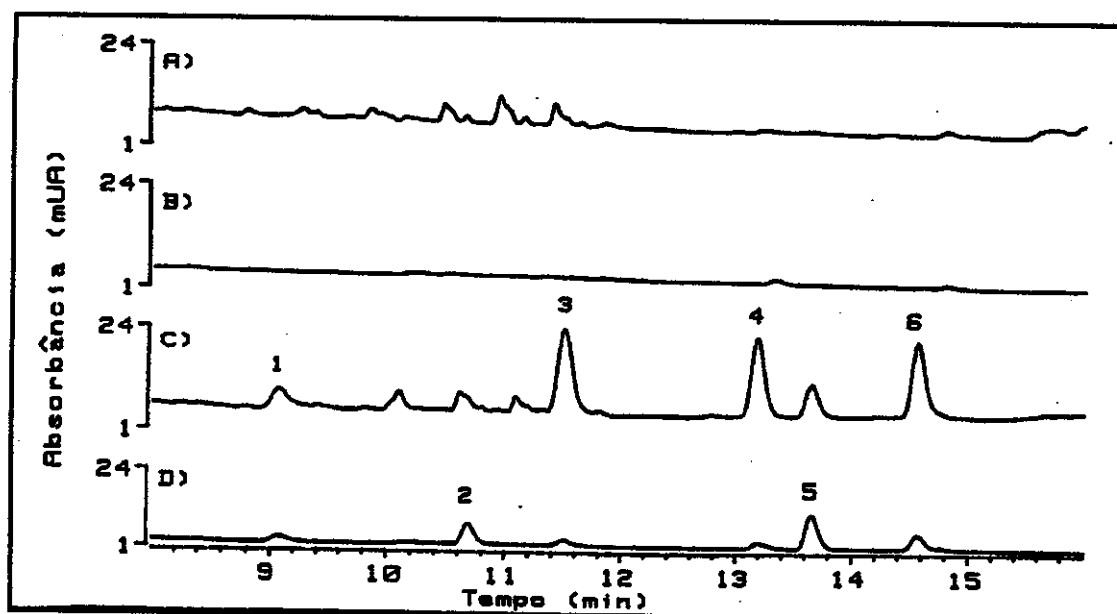


Figura IV.9 - Cromatogramas de uma amostra de água de torneira. A) Branco $\lambda = 220$ nm; B) Branco $\lambda = 252$ nm; C) Fortificada ($0,5 \mu\text{g/L}$) $\lambda = 220$ nm e D) Fortificada ($0,5 \mu\text{g/L}$) $\lambda = 252$ nm. 1) benomil, 2) tebutiuron, 3) simazina, 4) atrazina, 5) diuron e 6) ametrina. Condições cromatográficas: coluna Hypersil ODS, $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,0$ mm, Agilent. Temperatura ambiente, eluição por gradiente, solvente A: água: NH_4OH 100:0,1 (v/v); solvente B: ACN: NH_4OH 100:0,1 (v/v). O gradiente iniciou com 95% A e foi até 5% A, em 20 min, em seguida foi a 100% de A em 5 minutos, onde permaneceu por mais 5 min até o início da próxima análise. Vazão: $1\text{mL}/\text{min}$.

IV.3.2.1.3. Extração de Pesticidas em Urina no Modo *Off-line*

Este trabalho foi realizado para verificar o potencial do sorvente tipo C-18 em ser utilizado para pré-concentração e *clean-up* de amostras biológicas. Dessa forma, foi feito um estudo, em colaboração com a aluna de doutorado Joseane Montagner Pozzebon, sob orientação da Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, a fim de comparar a eficiência de extração dos herbicidas linuron, diuron e o metabólito 3,4-dicloroanilina, em urina humana, seguida de pré-concentração e *clean-up*, utilizando cartuchos tipo C-18 obtidos através de imobilização térmica.

Este método de imobilização foi escolhido por ter apresentado bom desempenho na análise de pesticidas em água aliado à facilidade no preparo.

A **Figura IV.10** apresenta dois cromatogramas: um branco de uma amostra extraída, **Figura IV.10.A**, e uma fortificada, **Figura IV.10.B**. Pode-se observar que o método apresentou uma boa seletividade. O cromatograma apresenta um pico relativo à 3,4-dicloroanilina, porém a recuperação para este composto não foi quantificada.

A **Tabela IV.12** apresenta as recuperações, a exatidões e os valores de RSD obtidos através de testes intraensaio (no mesmo dia e mesmas condições) e testes interensaio (dias diferentes), utilizando o cartucho preparado neste trabalho. As medidas das recuperações foram feitas em três níveis de fortificação. Para o diuron foram feitos nos níveis 30, 60 e 120 µg/L e para o linuron foram feitos nos níveis 50, 100 e 200 µg/L. A precisão interensaio foi calculada somente para a fortificação correspondente ao nível intermediário. De acordo com os resultados obtidos pode-se verificar que o cartucho desenvolvido neste trabalho é de qualidade, uma vez que as recuperações bem como as precisões intra e interensaio foram consideradas aceitáveis para análises toxicológicas.¹³ Além disso pode-se comparar com os resultados obtidos com cartuchos comerciais, **Tabela IV.13**, mostrando que os resultados foram similares.

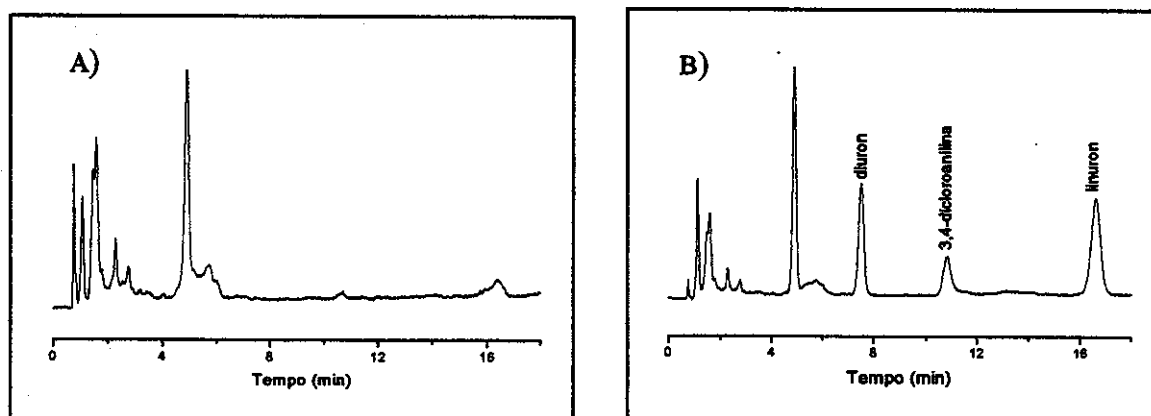


Figura IV.10 – Cromatogramas obtidos após a extração e *clean-up* dos pesticidas em urina humana: A) branco e B) amostra fortificada. Condições de análise: Coluna Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 4,6 mm, Waters. Temperatura ambiente, Fase Móvel: acetonitrila/água 40:60 (v/v), detecção em 254 nm.

Tabela IV.12 – Resultados de validação obtidos após a pré-concentração e *clean-up* dos herbicidas em urina humana, usando um cartucho C-18 imobilizado termicamente (120^o/4h).

Pesticida	Fortificação ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Precisão (%)	
			Intraensaio ^a (n=3)	Interensaio ^b (n=3)
Diuron	30	88	0,9	1,0
	60	89	1,0	
	120	97	0,3	
Linuron	50	80	1,0	1,3
	100	83	1,2	
	200	95	0,9	

^a Precisão intraensaio = análises realizadas no mesmo dia

^b Precisão interensaio = análises realizadas em três dias diferentes.

Tabela IV.13 – Resultados de validação obtidos após a pré-concentração e *clean-up* dos herbicidas em urina humana, usando um cartucho C-18 comercial.

Pesticida	Fortificação ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Precisão (%)	
			Intraensaio ^a (n=3)	Interensaio ^b (n=3)
Diuron	30	91	1,7	1,0
	60	95	1,4	
	120	100	2,0	
Linuron	50	80	0,7	0,8
	100	82	0,6	
	200	88	0,1	

^a Precisão intraensaio = análises realizadas no mesmo dia

^b Precisão interensaio = análises realizadas em três dias diferentes.

IV.3.2.2. Extrações em Cartuchos Tipo C-8

Baseado nos resultados obtidos com os sorventes tipo C-18, resolveu-se realizar um estudo com o sorvente C-8, que é o segundo tipo mais empregado em EFS.

O PMOS foi imobilizado sobre a sílica através de irradiação gama e térmica. Não foi utilizado microondas neste tipo de fase devido aos problemas apresentados na preparação do sorvente tipo C-18, tais como, formação de aglomerados, coloração amarela e extração de interferentes.

As **Tabela IV.14** e **Tabela IV.15** apresentam os resultados das recuperações, exatidões e precisões para a mesma mistura utilizada para testar o C-18, obtidas após a pré-concentração da água deionizada fortificada nas concentrações 0,1 e 10 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Tabela IV.14– Recuperções e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações no modo *off-line*. Fortificação = 0,1 µg/L. Volume de amostra = 200 mL. Volume final = 200 µL. Fator de pré-concentração = 1000 vezes. (n=2).

Solvente	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C8-IT	105	11	94	13	116	9	109	13	120	16	88	12
C8-60 kGy	89	16	82	13	96	9	94	9	105	12	86	7
C8-80 kGy	102	8	85	4	101	6	97	8	102	13	90	11

Imobilização: IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Tabela IV.15 - Recuperções e precisões dos pesticidas em água deionizada obtidas através de extrações no modo *off-line*. Fortificação = 10 µg/L. Volume de amostra = 20 mL. Volume final = 2 mL. Fator de pré-concentração = 10 vezes. (n=2).

Solvente	Benomil		Tebutiuron		Simazina		Atrazina		Diuron		Ametrina	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
C8-IT	109	9	95	5	97	8	107	10	94	0	98	6
C8-60 kGy	112	7	108	0	113	5	115	5	112	8	113	2
C8-80 kGy	111	3	103	3	114	0	109	3	107	1	107	0

Imobilização: IT = temperatura; kGy = irradiação gama.
Rec. = recuperação; RSD = desvio padrão relativo.

Estes materiais apresentaram resultados muito bons e têm potencial para serem utilizados em pré-concentração de pesticidas em amostras de água.

IV.4. Conclusões

- O presente trabalho oferece um novo processo para obtenção de sorventes do tipo C-8 e C-18 para extração em fase sólida. As fases sólidas aqui propostas são obtidas através da imobilização (térmica, irradiação gama ou microondas) do polímero sorvido sobre a sílica. Este procedimento apresenta uma série de vantagens que estão descritas a seguir:

- ☞ **Simplicidade:** O procedimento proposto é extremamente simples visto que a preparação do material envolve reagentes pouco tóxicos. Entre as técnicas estudadas, a imobilização usando um aparelho microondas do tipo caseiro é considerada mais simples, pois o forno é de fácil aquisição e o tempo necessário para a etapa de imobilização é de apenas 15 min.
- ☞ **Disponibilidade dos reagentes:** Os materiais necessários, tais como a sílica gel, os polissiloxanos e demais solventes são disponíveis comercialmente.
- ☞ **Preparação envolvendo menor número de etapas:** As características apresentadas pelos materiais dispensa a etapa de capeamento, diminuindo portanto o custo e o tempo de preparo.
- ☞ **Menor custo:** O custo do material é muito menor quando comparado aos comerciais. Uma estimativa indica que os materiais preparados têm um custo de produção de aproximadamente R\$9,00

a unidade; o cartucho para EFS tipo C-18 comercial custa em torno de R\$18,00 a unidade. O custo detalhado está apresentado no **Apêndice C**.

- ☞ **Excelente desempenho:** O desempenho dos materiais foram testados para extrair pesticidas pertencentes a diferentes classes e portanto de características físico-química muito diferentes. Tanto os materiais imobilizados via irradiação gama (em ambas as doses) quanto por imobilização térmica forneceram bons resultados quaisquer que fossem as concentrações das amostras. Entretanto em baixas concentrações (0,1 µg/L) a fase imobilizada por microondas não apresentou resultados satisfatórios devido à presença de interferentes. Porém, esta técnica (microondas) mostrou ser promissora e necessita de maiores estudos de forma a otimizar as condições de imobilização, variando, por exemplo, a potência e o tempo de imobilização.
- ☞ **Vasto campo de aplicação:** O uso da extração em fase sólida se encontra em franco desenvolvimento, sendo uma técnica aplicada na análise de diversos tipos de matrizes complexas, tais como alimentos, fluidos biológicos, amostras ambientais, águas e solos. Entretanto, todos os cartuchos de extração em fase sólida disponíveis comercialmente são importados e deste modo o tempo entre a compra e a entrega pode ser longo, caso as empresas não os tenham em estoque. Com o desenvolvimento proposto, os cartuchos podem ser confeccionados rapidamente e, se for necessário, em grandes quantidades.

- ☞ **Aplicação em extrações *on-line*:** Além da aplicação do material em extração no modo *off-line*, é possível utilizar estes mesmos sorventes para recheiar pequenas colunas (colunas de enriquecimento de traços) para uso em extrações *on-line*. Este tipo de extração apresenta uma série de vantagens, sendo uma delas que uma mesma coluna de enriquecimento de traços pode ser empregada várias vezes, quando se usa eluição por gradiente, diminuindo ainda mais o custo por análise.


- ☞ O método desenvolvido para análise de água de torneira usando extrações no modo *on-line* mostrou, após a validação, ser simples, rápido e eficiente e, portanto, adequado para ser implantado em análises de rotina para monitoramento dos poluentes ambientais estudados.

IV.5. Bibliografia

- ¹ M. A. Basso, "Avaliação da Radiação Gama como Agente de Imobilização de Algumas Fases Estacionárias sobre Suportes para uso em Cromatografia Gasosa". Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, SP, 1989.
- ² K.E. Collins; A.C. Franchon; I.C.S.F. Jardim; E. Radovanovic; M.C. Gonçalves, *LC-GC* 18 (2000) 106.
- ³ E. Baltussen; H. Snijders; H-G. Janssen; P. Sandra; C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 802 (1998) 285.
- ⁴ S.C.N. Queiroz; L.F.C. Melo; I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* in press.
- ⁵ J. Slobodnik; H. Lingeman; U. A. Th. Brinkman, *Chromatographia*, 50 (1999) 141.
- ⁶ <http://labcrom.iqm.unicamp.br/>
- ⁷ L.F.C. Melo; C.H. Collins; K.E. Collins; I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 129.
- ⁸ L.F.C. Melo; I.C.S.F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 423.
- ⁹ I.C.S.F. Jardim; K.E. Collins; T.A. Anazawa, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 299.
- ¹⁰ K.E. Collins; M.L.M.M. Granja; R.G. Pereira Filho; T.A. Anazawa; I.C.S.F. Jardim, *Chromatographia*, 45 (1997) 99.
- ¹¹ M.C.H. da Silva; I.C.S.F. Jardim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 21 (1998) 2447.

¹² S. Guenu; M-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 15.

¹³ Ph. Hubert; P. Chiap; J. Crommen; B. Boulanger; E. Chapuzet; N. Mercier; S. Bervoas-Martin; P. Chevalier; D. Grandjean; P. Lagorce; M. Lallier; M. C. Laparra; M. Laurentie; J. C. Nivet, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 135.



**CAPÍTULO V – COMPARAÇÃO ENTRE
OS MÉTODOS DESENVOLVIDOS**

“O mais importante é não parar de questionar. A curiosidade tem a sua própria razão de ser. Não podemos fazer nada senão contemplar extasiados os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. É mais que suficiente tentarmos simplesmente compreender um pouco deste mistério a cada dia. Nunca perca a sagrada curiosidade.”

Albert Einstein

V.1. Comparação Entre os Métodos Desenvolvidos

Neste trabalho, tanto no **Capítulo III** quanto no **Capítulo IV** foram apresentadas as várias possibilidades de analisar os pesticidas (comuns nos dois capítulos): tebutiuron, simazina, atrazina, diuron e ametrina. Foram estudados os diferentes métodos de extração a saber: ELL, EFS *off-line* e EFS *on-line*. Além disso, dois dos principais detectores utilizados na atualidade para análise de pesticidas foram empregados: o EM e o DAD. Isso permite uma comparação entre todas estas metodologias bem como as vantagens e desvantagens de cada uma.

V.1.1. Comparação Entre as Técnicas de Extração

A **Tabela V.1** apresenta uma comparação entre os três métodos de extração utilizados neste trabalho. É clara a vantagem do uso de EFS sobre a ELL e da EFS *on-line* sobre a *off-line*, a qual é mais rápida, mais barata, menos poluente e permite um número muito maior de análises por tempo devido às possibilidades de automação.

V.1.2. Comparação Entre os Detectores

A **Tabela V.2** apresenta a comparação feita entre os detectores em termos de detectabilidade. Pode-se observar que, com as triazinas, simazina, atrazina e ametrina, por terem caráter levemente básico e ter usado fase móvel ácida, há formação de espécies iônicas que são detectadas em mais baixo nível pelo EM que pelo DAD. O tebutiuron apresentou comportamento semelhante em ambos os detectores. O diuron, por ser um composto neutro, porém não muito polar, apresentou melhor detectabilidade usando o DAD que no EM devido ao fato de ser mais difícil de ionizar utilizando a interface empregada (*electrospray*).

Tabela V.1 - Comparação entre as técnicas de extração.

Parâmetro	ELL	EFS <i>off-line</i>	EFS <i>on-line</i>
Tempo de extração (min)	180	30	10
Volume de resíduos (mL)	150	4	Nenhum (a própria fase móvel)
Custo (R\$)	4,00	18,00 (comercial) 9,00 (sorventes desenvolvidos neste trabalho)	18,00 (comercial) 0,9 (sorventes desenvolvidos neste trabalho)
Acessórios	Funil de separação	Bomba de vácuo e sistema de extração simultânea	Bomba de média pressão, válvula de seis vias, sistema de gradiente
Possibilidade de automação	difícil	Possível	fácil

Tabela V.2 – Comparação entre os detectores em termos de LOD.

Pesticida	LOD-EM (ng)	LOD-DAD (ng)
Simazina	0,03	0,5
Atrazina	0,03	0,5
Ametrina	0,03	0,5
Tebutiuron	0,2	0,3
Diuron	0,2	0,05

O uso do DAD na análise multirresíduo de pesticidas apresenta vantagens para compostos neutros e polares de classes diferentes, pois os espectros podem ser discriminados, auxiliando na confirmação da presença dos analitos na amostra. Além disso, este tipo de detector é relativamente barato, fácil de usar e há uma vasta literatura sobre análises de resíduos de pesticidas usando este tipo de detecção.

Com relação ao EM, o seu uso ainda não é tão comum nos laboratórios de rotina no Brasil, sendo que alguns sistemas deste tipo têm sido utilizados em poucos laboratórios de pesquisas. Isso se deve ao custo elevado deste equipamento frente aos detectores mais comuns (UV e outros). Entretanto, ao que tudo indica, o EM estará, em um futuro próximo, presente não só na maioria dos laboratórios de pesquisas como também nos laboratórios de rotina, pois o preço deste equipamento vem caindo gradativamente. Além disso, as empresas têm aperfeiçoado os equipamentos tornando-os mais robustos e de fácil operação. A prova disso é o número elevado de artigos científicos publicados ultimamente nas mais diversas áreas ressaltando a excelente seletividade e detectabilidade destes instrumentos. Uma das grandes potencialidades deste tipo de equipamento é que ele pode ser empregado tanto como um detector seletivo como universal.

Um outro fator importante é que o uso de técnicas hífenadas, CL/DAD e CL/EM, permite a determinação sobre a pureza do pico cromatográfico. Isso não acontece com os outros tipos de detecção mais simples.



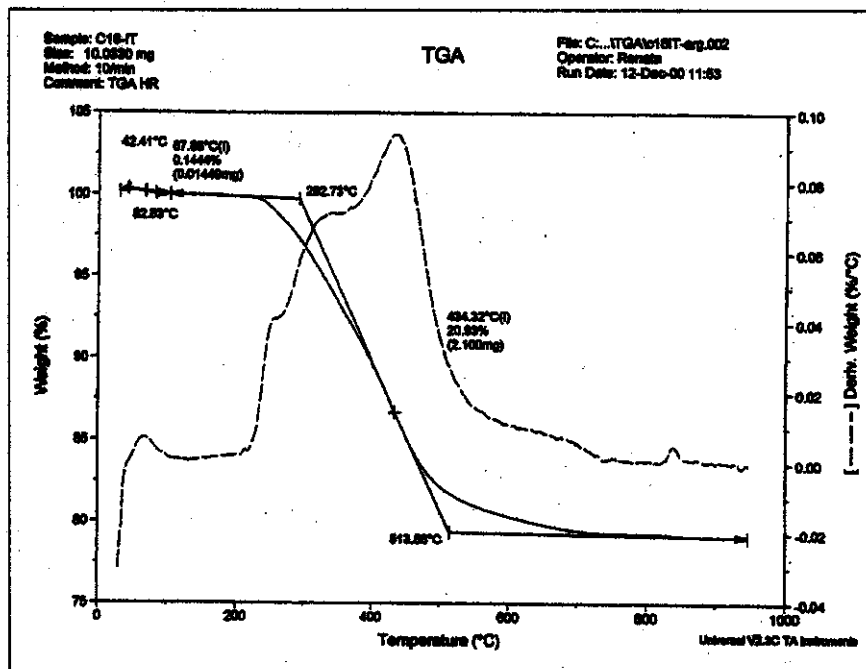
APÊNDICE

“Tudo dá certo no final, se não deu certo é porque não chegou ao fim”

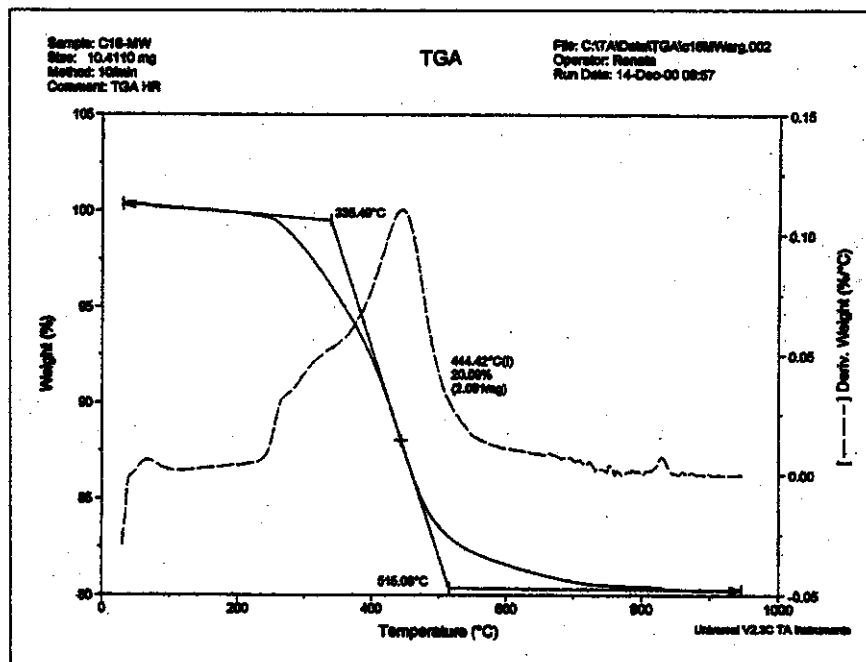
APÊNDICE A

Termogramas dos sorventes

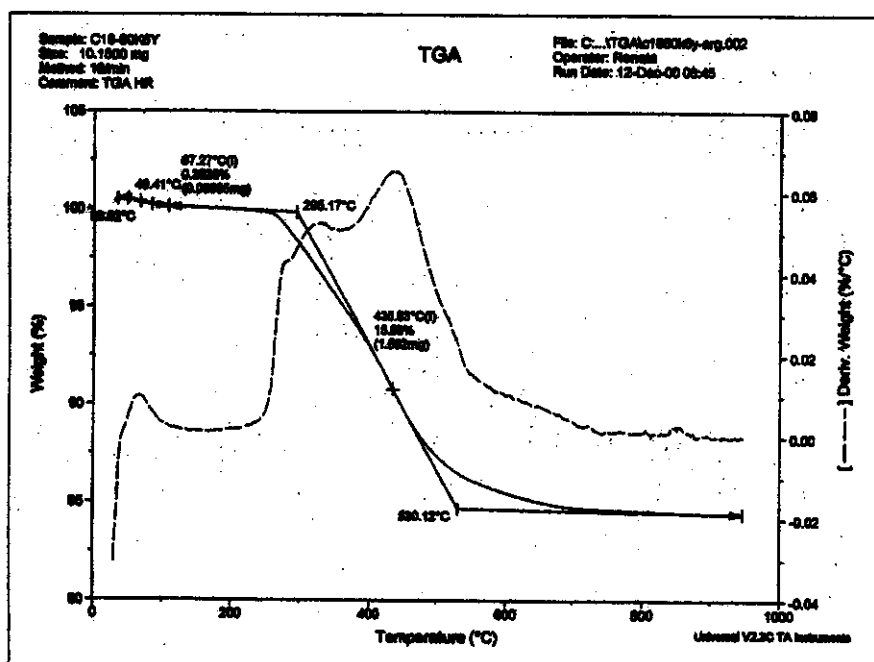
A) C-18 Imobilização térmica.



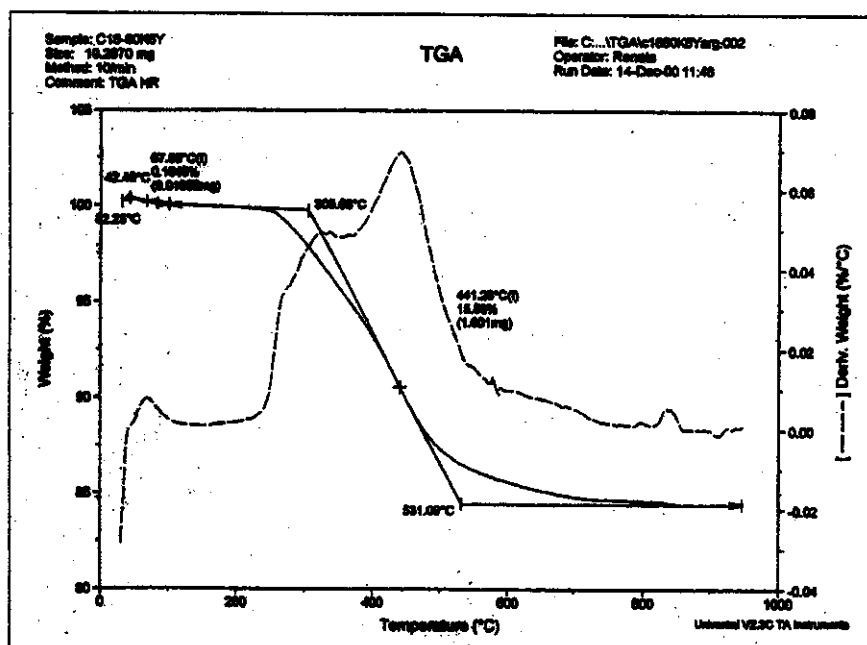
B) C-18 Microondas.



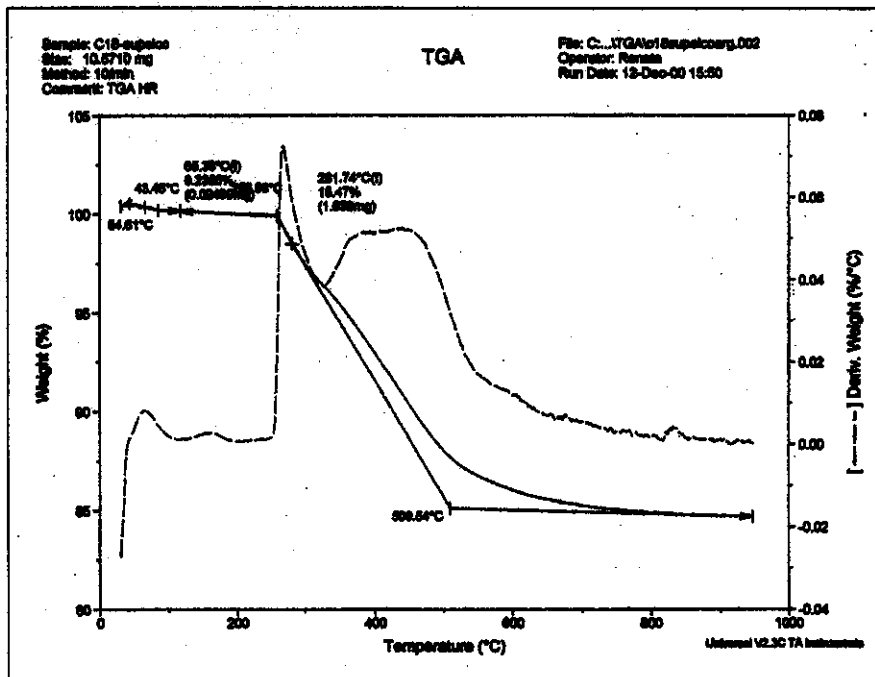
C) C-18 Irradiação gama, dose 60 kGy.



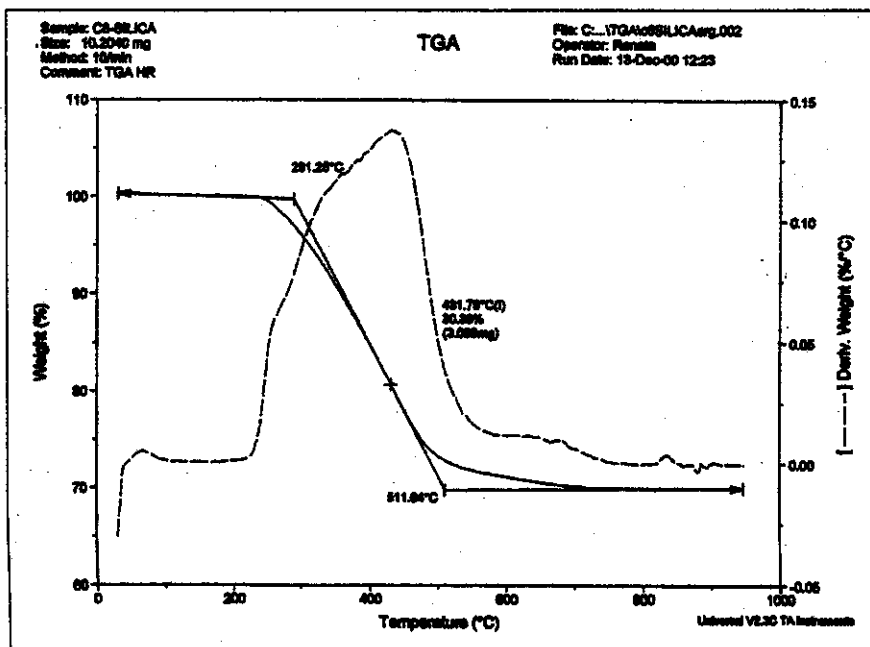
D) C-18 Irradiação gama, dose 80 kGy.



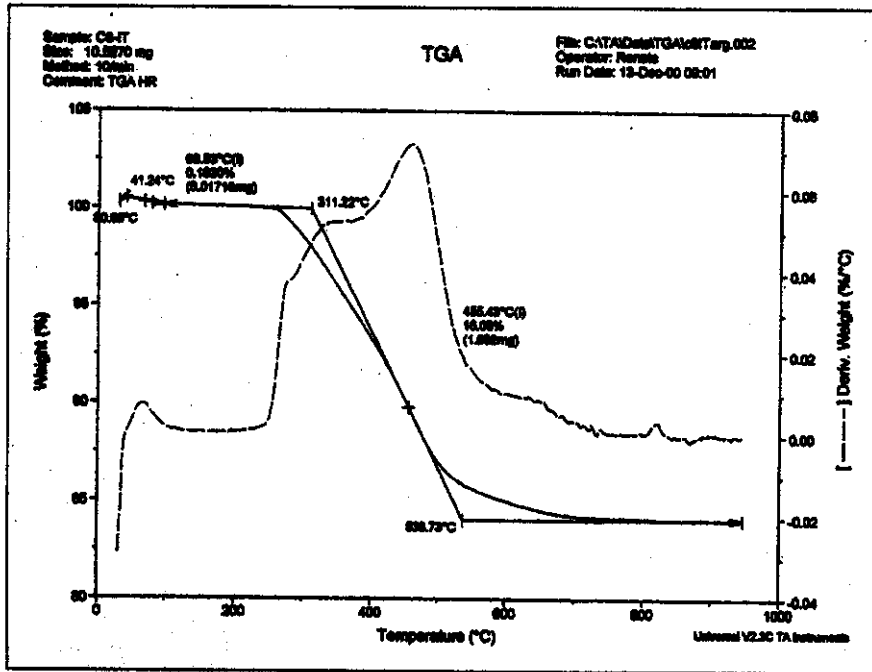
E) C-18 Supelco.



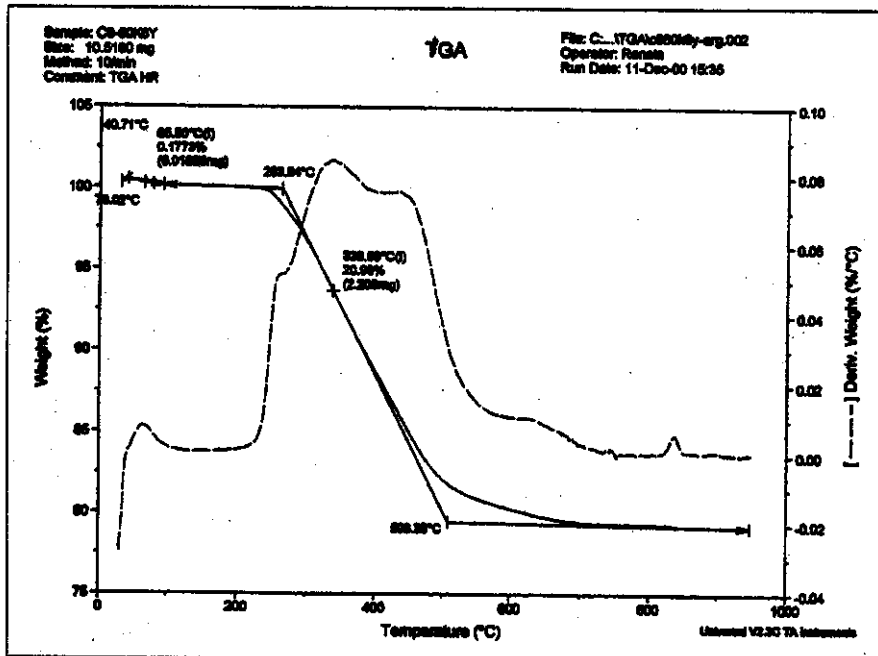
F) C-8 Sorvido sobre sílica.



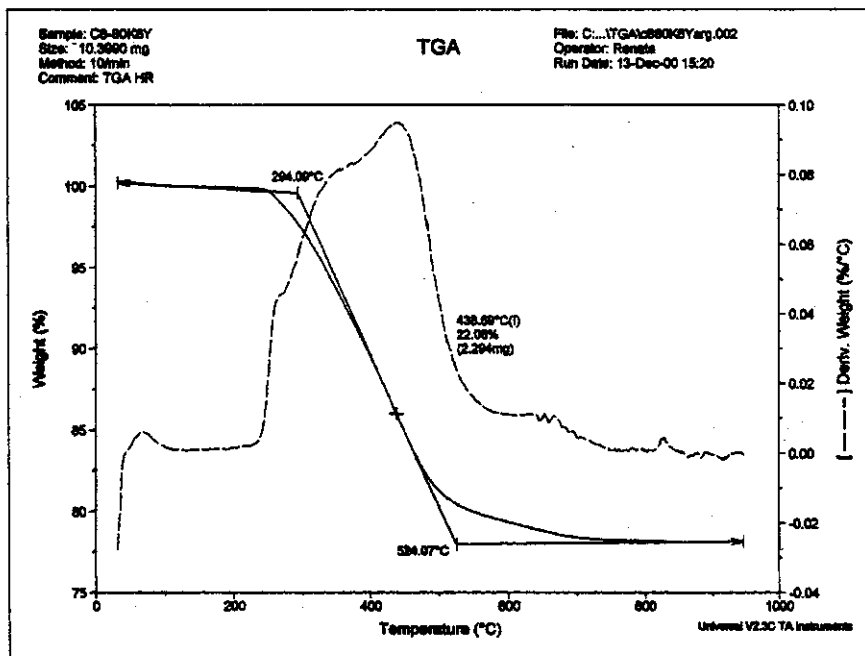
G) C-8 Imobilização térmica.



H) C-8 Irradiação gama, dose 60 kGy.



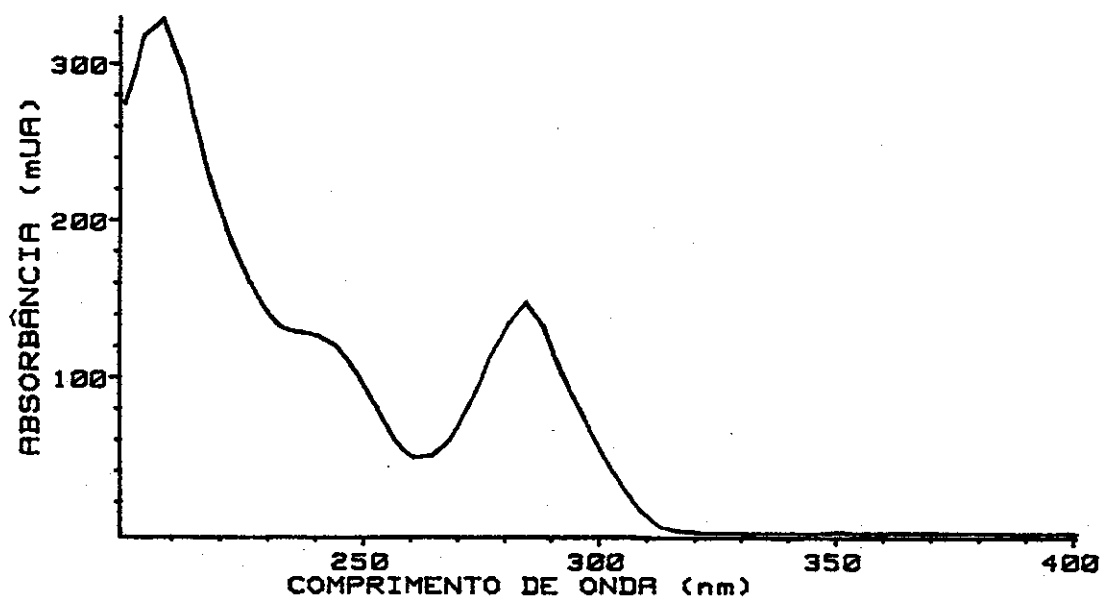
D) C-8 Irradiação gama, dose 80 kGy.



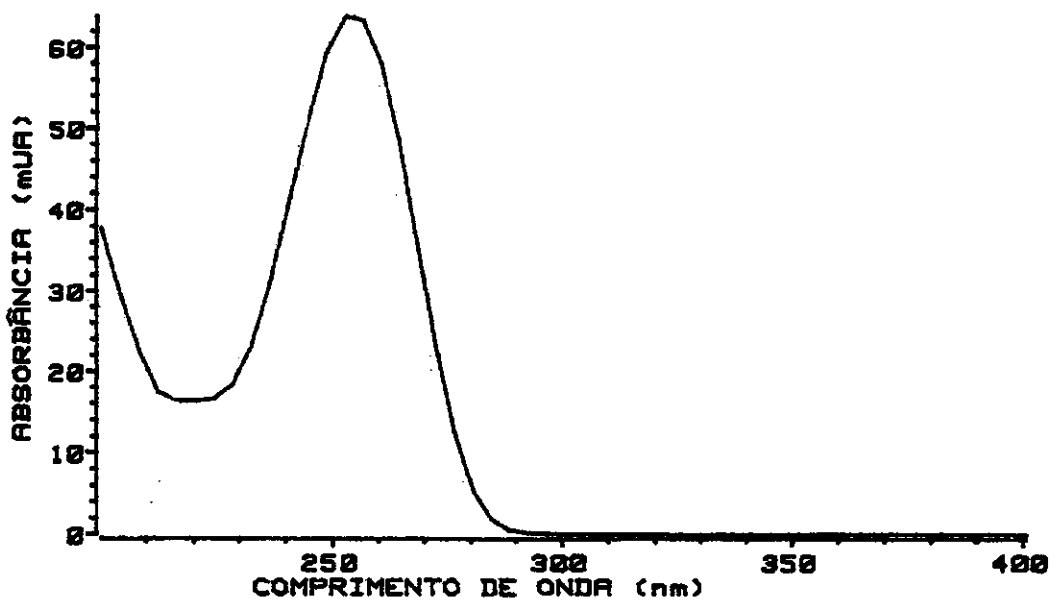
APÊNDICE B

Espectros de UV dos pesticidas

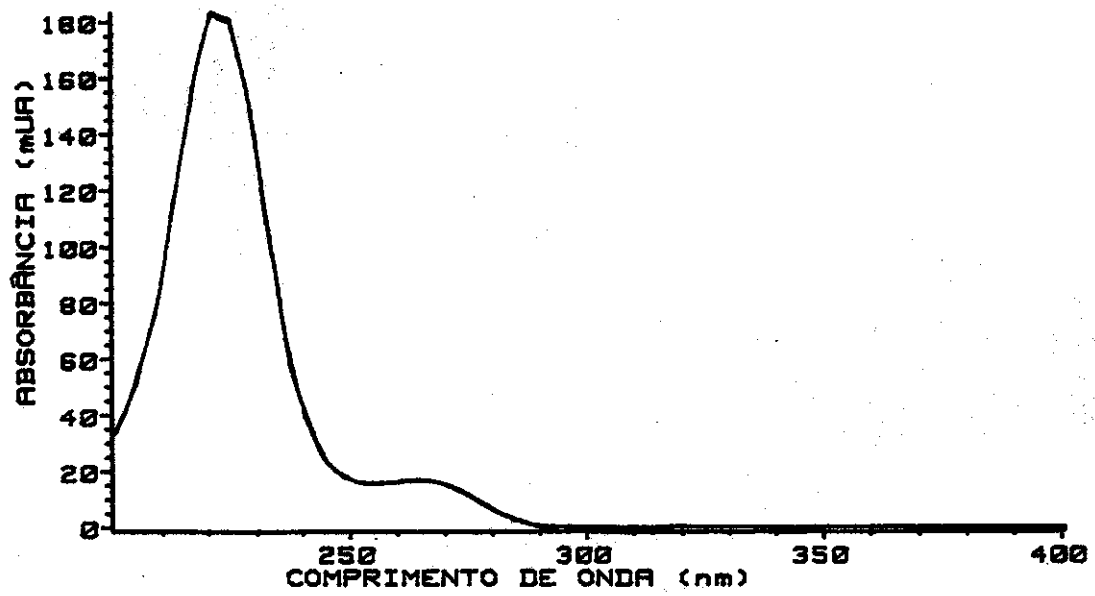
A) Benomil



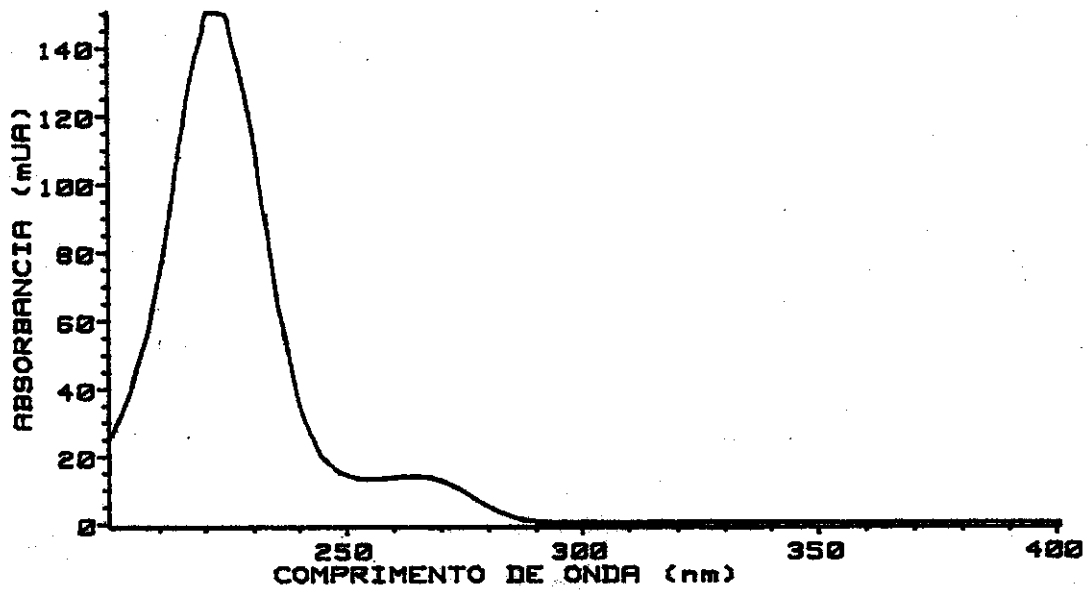
B) Tebutiuron



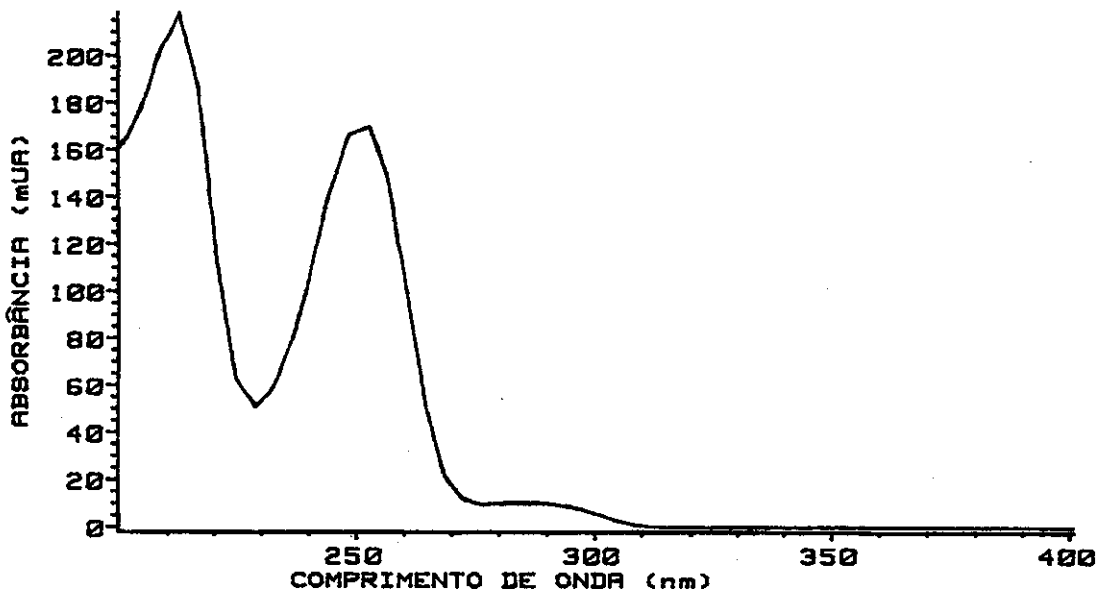
C) Simazina



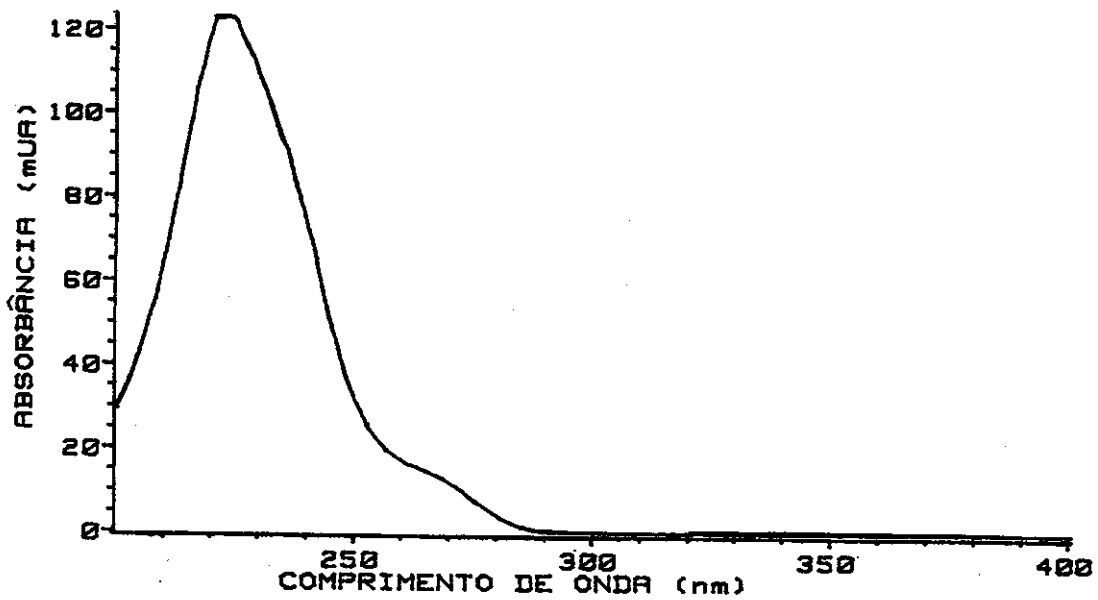
D) Atrazina



E) Diuron



F) Ametrina



APÊNDICE C

Planilha de custo dos cartuchos

Ítem	Preço/quantidade (R\$)	Quantidade por cartucho	Preço por Cartucho (R\$)
Filtros	187,00 (60 unidades)	02 unidades	6,23
Seringa	10,00 (100 unidades)	01 unidades	0,10
Sílica	1.501,00 (1 kg)	0,5g	0,75
PMODS	400,00 (1 kg)	0,5g	0,20
Pentano	85,00 (1 L)	6 mL	0,51
Hexano	40,00 (1 L)	13 mL	0,52
Metanol	30,00 (1 L)	18 mL	0,54
Total por cartucho			8,85

Obs: o cartucho comercial similar (Supelco LC-18) tem o preço de aproximadamente US\$65,00 (pacote/30). Considerando os impostos de importação, o produto é vendido no mercado nacional ao preço de aproximadamente R\$546,00 (pacote c/30), o que equivale a R\$18,00 a unidade (cotação agosto de 2001).