

1- Laboratório de Dinâmica de Agroquímicos, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69 CEP 13820-000, Jaguariúna, Brasil. E-mails: sonia@cnpma.embrapa.br, veraf@cnpma.embrapa.br, gomes@cnpma.embrapa.br e gustavo@cnpma.embrapa.br

**RESUMO.** O presente trabalho apresenta um método alternativo para a determinação dos herbicidas hexazinone, tebutiuron, atrazina e diuron em água subterrânea. Os pesticidas são pré-concentrados em cartucho de extração em fase sólida tipo estireno-divinilbenzeno e posteriormente analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

**ABSTRACT.** This work presents an alternative method for determination of the herbicides hexazinone, tebutiuron, atrazine and diuron in ground water. The herbicides are preconcentrated in cartridge of solid phase extraction and the analyses are made using high performance liquid chromatography (HPLC).

## 1.- Introdução

A Bacia Sedimentar do Paraná abriga um manancial gigante de águas subterrâneas, com extensão de 1.150.000 km<sup>2</sup>, denominado Aquífero Guarani. Sua maior parte está localizada em território brasileiro (840.000 km<sup>2</sup>). No entanto, uma considerável porção do aquífero localiza-se na Argentina (355.000 km<sup>2</sup>), havendo ainda partes no Uruguai (58.500 km<sup>2</sup>) e no Paraguai (58.500 km<sup>2</sup>). O Aquífero Guarani possui água de excelente qualidade, sendo extraída através de poços semi-artesianos e utilizada no abastecimento de centenas de cidades de médio e grande porte.

As áreas de recarga se constituem nas regiões onde o aquífero se encontra mais vulnerável. O mau uso destas terras pode, ao longo prazo, comprometer a qualidade da água. Portanto, se não houver cuidado e atenção quanto à disposição de produtos tóxicos, rejeitos industriais e aplicação de pesticidas no solo das áreas de recarga, poderá haver comprometimento das águas do aquífero em questão. A gestão sustentável do Aquífero Guarani depende da identificação e controle das fontes de poluição nas áreas de recarga.

A cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil, é abastecida integralmente pela água proveniente do Aquífero Guarani, cujas porções de recarga, na região, têm sido ocupadas com atividade intensiva de cana-de-açúcar. Os pesticidas utilizados possuem diferentes estruturas e atividades biológicas, o que os tornam bastante diferenciados quanto aos seus efeitos de ordem fitossanitária. Estes, aliás, são os principais motivos pelos quais são amplamente utilizados na agricultura. Devido ao fato de serem potencialmente tóxicos aos organismos, o

destino destes produtos no ambiente deve ser investigado. Para isso torna-se necessário a disponibilização de metodologias rápidas e eficientes para a detecção e quantificação destas espécies. Assim, o presente trabalho apresenta um método para a determinação dos herbicidas hexazinone, tebutiuron, atrazina e diuron em água. Os pesticidas são pré-concentrados em cartucho de extração em fase sólida tipo estireno-divinilbenzeno e posteriormente analisados por CLAE.

## 2.- Materiais e Métodos

### 2.1 Reagentes e solventes

Os padrões de agrotóxicos utilizados foram tebutiuron (99,5%) adquirido da firma Dr. Ehrenstorfer, hexazinone (99,9%) doado pela DuPont, a atrazina (99%) e o diuron (98%) da Chem Service.

O metanol, grau cromatográfico, foi obtido da Mallinckrodt Ultimar.

### 2.2 Preparo das soluções analíticas

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol, individualmente, na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Uma solução contendo os padrões a 100 mg L<sup>-1</sup> foi preparada também em metanol a partir da diluição da solução estoque. Posteriormente, foram obtidas as soluções intermediárias e as de trabalho por meio de diluições sucessivas em fase móvel (metanol:água 50:50, v/v). Estas soluções foram utilizadas na determinação da linearidade do detector, nas fortificações das amostras e na obtenção das curvas analíticas.

### 2.3 Extração das amostras fortificadas

Extração: foi utilizada a técnica de extração em fase sólida, usando um cartucho de estireno-divinilbenzeno da Supelco, contendo 0,25 g de sorvente e um volume de 6 mL. O cartucho foi condicionado com um volume de 5 mL de metanol seguido de 5 mL de água. Após o condicionamento um volume de 750 mL da amostra foi passado, a uma vazão de 2 mL min<sup>-1</sup>, o cartucho foi seco sob vácuo durante 40 min. A extração das substâncias pré-concentradas foi efetuada usando 5 mL de metanol. O extrato foi seco sob fluxo lento de nitrogênio e ressuspenso em 1 mL da fase móvel, filtrado em membrana de 0,45 µm, sendo 100 µL analisados por CLAE.

## 2.4 Equipamento

Foi utilizado um cromatógrafo líquido da Agilent, modelo 1100 Series; constituído de uma bomba quaternária, autoamostrador, desgaseificador, e um detector espectrofotométrico de absorção no UV/Vis, de comprimento de onda variável. A coluna utilizada foi da Mallinckrodt Baker, modelo Bakerbond HPLC, C18, 4,6 x 250 mm x 5 µm. As condições de operação foram: fase móvel água: metanol (50:50, v/v), eluição isocrática, vazão 1 mL min<sup>-1</sup>, tempo de corrida de 15 minutos e detecção no UV de 0 a 15 min a 247 nm, de 15 a 22 min a 230 nm e de 22 a 35 min a 247 nm.

## 2.5 Validação

A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos parâmetros de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão.

## 3.- Resultados e Discussão

Este trabalho descreve um método analítico que está sendo utilizado no monitoramento dos herbicidas hexazinone, tebutiuron atrazina e diuron em água subterrânea proveniente do Aquífero Guarani. O monitoramento destes princípios ativos em água subterrânea é de grande relevância neste sistema hidrológico onde a vulnerabilidade é alta, especialmente porque a água subterrânea, nesse caso, é a fonte primária (ou principal) de água potável que abastece a população, particularmente no estado de São Paulo.

O método é baseado em extração em fase sólida, que possui vantagens sobre a extração líquido-líquido, uma vez que é menos trabalhoso e pode usar uma quantidade maior de amostra, diminuindo assim os valores dos limites de detecção e quantificação do método.

A resolução na linha de base dos herbicidas foi obtida, após um estudo das condições cromatográficas, utilizando uma coluna de fase reversa tipo C-18 e eluição isocrática com uma mistura de metanol/água 50:50, v/v. A Figura 1 mostra os cromatogramas das amostras testemunha (A) e da fortificada com os padrões (B). Pode-se observar que não há picos de interferentes coeluintes nos tempos de retenção dos compostos estudados.

Após a otimização das condições de extração e cromatográficas, o método foi validado. A validação é necessária para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Na validação o primeiro e mais simples parâmetro a ser avaliado é a linearidade, que é obtida plotando os valores de área versus a concentração da solução analítica. Realiza-se uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e verifica se o coeficiente de determinação,  $r^2$ , é adequado. Os desvios da linearidade muitas vezes são difíceis de serem detectados visivelmente, sendo assim a sua adequação foi verificada por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a

partir da equação de regressão. As curvas analíticas obtidas mostraram ser lineares na faixa de 50 -1000 µg L<sup>-1</sup> pois apresentaram valores de  $r^2 = 0,9999$  e os gráficos dos resíduos não demonstraram tendências

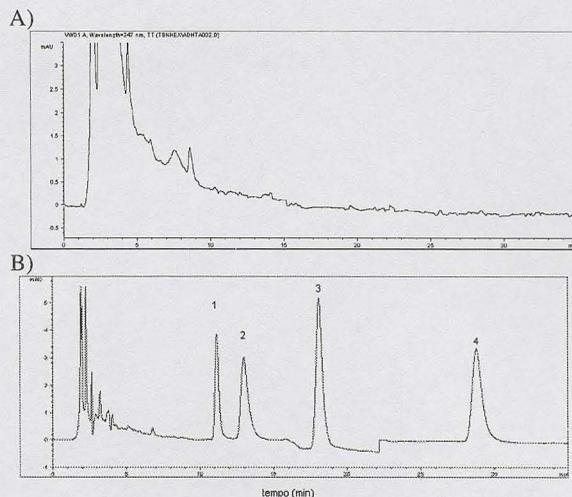


Figura 1. Cromatogramas. A) amostra testemunha. B) amostra fortificada com os padrões: 1 = tebutiuron, 2 = hexazinone, 3 = atrazina, 4= diuron.

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) do instrumento foram calculados utilizando a razão sinal/ruído de 3 e 10 vezes, respectivamente. Os valores do LOD e do LOQ, referentes ao método estão mostrados na Tabela 1. Estes resultados indicam que o método é suficientemente sensível para detectar a presença dos herbicidas em níveis baixos de concentração.

A exatidão do método foi determinada por meio da obtenção da % de recuperação média das amostras fortificadas em triplicatas. Os valores obtidos se encontram descritos na Tabela 2 e estão dentro da faixa de 70-110%, que é a considerada aceitável.

A precisão, Tabela 2, foi calculada por meio de repetições realizadas no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista, sendo este tipo de precisão denominado de repetitividade. Também foi avaliada em três dias diferentes a fim de determinar a precisão intermediária. Os valores obtidos foram < 18%, indicando que o método está em consonância com a literatura, onde valores < 20% são considerados aceitáveis.

Tabela 1. Valores de limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) do método, considerando um fator de pré-concentração de 750 vezes.

Pesticida	LOD µg L <sup>-1</sup>	LOQ µg L <sup>-1</sup>
Tebutiuron	0,01	0,03
Hexazinone	0,007	0,02
Atrazina	0,008	0,01
Diuron	0,01	0,03

**Tabela 2.** Recuperações e precisões (RSD %) dos herbicidas hexazinone, tebutiuron, atrazina e diuron (n=3).

Herbicida	Conc. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Rec.Médias (%)	Repet. <sup>a</sup> R.S.D. (%)	Precisão Inter. <sup>b</sup> R.S.D. (%)
Hexazinone	0,1	85	9	8
	0,5	95	5	
	1,0	95	2	
Tebutiuron	0,1	70	2	10
	0,5	86	4	
	1,0	91	2	
Atrazina	0,1	115	5	18
	0,5	95	4	
	1,0	95	2	
Diuron	0,1	94	4	8
	0,5	91	2	
	1,0	93	2	

a = Repetitividade - mesmo dia , mesmo analista e mesmo equipamento.

b = Precisão intermediária: três dias diferentes, mesmo analista e mesmo equipamento

#### 4.- Conclusão

O método proposto mostrou, por meio dos parâmetros de validação, ser eficiente e confiável para a determinação dos herbicidas tebutiuron, hexazinone, atrazina e diuron em amostras de água subterrânea. A extração em fase sólida apresenta vantagens sobre a extração líquido-líquido, pois um volume maior de amostra pode ser utilizado, diminuindo desta forma os limites de detecção e quantificação.

*Agradecimentos.* Os autores agradecem a Embrapa e a FAPESP pelo suporte financeiro do projeto.

#### Referências Bibliográficas

- Gomes, M.A.F.; Spadotto, C.A.; Lanchotte, V.L. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, 2001, 11, 65.
- Cerdeira, A. L.; Pessoa, M. C. P. Y.; Bonato, P. S.; Queiroz, R. H. C.; Lanchotte, V. L. Pesticidas: Revista de Ecotoxicol. e Meio Ambiente, 2002, 12, 99.
- Roberts, T. R.; Kearney, P. C. Environmental behaviour of agrochemicals. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 1995, 328.
- Queiroz, S. C. N. Q.; Melo, L. F. C.; Jardim, I. C. S. F. J. Chromatogr. A, 2002, 948,171.
- Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ\_CGCRE-008. Inmetro, 2003. Disponível em <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>> (Acesso em 27 maio 2004).