



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Determinação de resíduos de agrotóxicos em água
empregando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)
e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por
arranjo de diodos (HPLC-DAD)**

Mônica Stüker

**Santa Maria – RS, Brasil
2017**

**Determinação de resíduos de agrotóxicos em água
empregando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)
e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por
arranjo de diodos (HPLC-DAD)**

por

Mônica Stüker

Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade
Federal de Santa Maria como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

10 de Julho – 2017

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Departamento de Química
Curso de Química Bacharelado**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova o Trabalho de
Conclusão de Curso:

**Determinação de resíduos de agrotóxicos em água
empregando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)
e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por
arranjo de diodos (HPLC-DAD)**

Elaborado por **Mônica Stüker**, como requisito parcial para obtenção
do grau de **Bacharel em Química**.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador)

Prof. Dr. Filipe Fagan Donato

Santa Maria, 10 de julho de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, Lotar e Cláudia,
meu irmão Eduardo, e aos amigos que estão
sempre me apoiando e incentivando.

Muito obrigada!

*“A menos que modifiquemos a nossa
maneira de pensar, não seremos
capazes de resolver os problemas
causados pela forma como nos
acostumamos a ver o mundo.”*

Albert Einstein

RESUMO

Trabalho de Conclusão de Curso
Departamento de Química – Curso de Química Bacharelado
Universidade Federal de Santa Maria

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA
EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO
DISPERSIVA (DLLME) E HPLC-DAD
AUTORA: MÔNICA STÜKER
ORIENTADOR: RENATO ZANELLA
Santa Maria, 10 de julho de 2017**

A água é um bem natural de extrema importância, dela dependem diretamente para a sobrevivência, o homem, animais e plantas. O estado do Rio Grande do Sul destaca-se no cenário nacional como grande produtor de diversas culturas agropecuárias, as quais cada vez mais demandam grande quantidade de agrotóxicos de diferentes classes químicas e toxicidades. O intenso uso destes compostos sempre esteve associado a vantagens e desvantagens para a sociedade. Como benefícios temos a alta produtividade, melhor conservação de frutos e controle de pragas de plantas, no entanto, o uso extensivo destas substâncias tem trazido malefícios à saúde humana e ao meio ambiente, como o solo, água e ar. Em virtude disso, é de extrema importância o estudo de métodos analíticos capazes de monitorar e quantificar estes compostos, fazendo com que estimule o crescimento científico nos tratamentos de águas e ajude no desenvolvimento de legislações mais efetivas no controle de resíduos de agrotóxicos em água. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação de resíduos de sete agrotóxicos em águas de rios utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) como técnica de preparo de amostra e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Na etapa de otimização do método foram avaliados diferentes solventes extratores e dispersores para a DLLME e diferentes gradientes de eluição dos compostos da coluna cromatográfica. Os melhores resultados para a microextração foram obtidos utilizando uma mistura de clorofórmio (150 μ L) e acetonitrila (2 mL) como solventes extrator e dispersor, respectivamente. Esta mistura foi adicionada de forma rápida à amostra, a qual foi agitada e centrifugada,

formando uma gota sedimentada onde se encontravam os analitos extraídos. Posteriormente, gota foi retirada com o auxílio de uma seringa e o solvente orgânico foi evaporado. Após, os analitos foram redissolvidos em metanol e o extrato foi analisado por HPLC-DAD. Para a validação do método foram avaliadas a linearidade da curva analítica, os limites de detecção do instrumento e do método, a precisão e a exatidão a partir dos ensaios de recuperação nos níveis de 10 e 50 mg L⁻¹. O método já validado foi aplicado em três amostras de águas superficiais de diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul. As curvas analíticas mostraram-se lineares de 0,5 a 50 mg L⁻¹ com coeficiente de determinação maior que 0,98. As recuperações mostraram-se dentro da faixa esperada (50 – 120%), com desvio padrão relativo (%RSD) menor que 20%. O método validado apresenta como principais vantagens o baixo consumo de solventes orgânicos e de amostra, rapidez e alto fator de concentração. Nenhuma das amostras analisadas apresentaram contaminação com os compostos estudados.

ABSTRACT

Conclusion of Course Work
Department of Chemistry – Bachelor Course in Chemistry
Federal University of Santa Maria

Determination of pesticides residues in water by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) combined with HPLC-DAD

AUTHOR: MÔNICA STÜKER

ADVISOR: PROF. RENATO ZANELLA

Santa Maria, July 10, 2017

Water is a natural resource of extreme importance, humans, animals and plants depends directly on it to survive. The state of RS stands out in national scenario as a big producer of many crops, which demand huge amounts of defensives of different chemical classes and toxicities. The intense use of these compounds was always associated to vantages and disadvantages to society. High productivity, better fruits conservation and pest control are clear benefits, however, the extensive use these substances has harm human health and the environment, like soil, water and air. Because of that, it is of extreme importance the study of analytical methods that are capable of monitor and quantify these compounds, stimulating scientific growth in water treatment and supporting more effective laws to control such substances. This work had as objective develop an analytical method for the determination of seven pesticides in surface water by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and determination by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC-DAD). During the optimization of the DLLME method, different extractor and dispersant solvents, and different gradient programs were evaluated. The best results for the extraction were obtained using chloroform (150 μL) and acetonitrile (2 mL) as extractor and dispersant solvents, respectively. The mixture of both those solvents was rapidly added to the sample, which was then shaken and centrifuged, generating a sedimented drop containing the analytes extracted. The drop was withdrawn with a syringe, and the organic solvent was evaporated, then the analytes were redissolved in methanol, and sent to analysis in the HPLC system. The method validation, was performed through the linearity of the analytical curve, the limits of detection and qualification of the instrument and the method, the precision and accuracy were evaluated by the assays in the 10 and 50 mg L^{-1} concentration levels.

Then, with the method validated, three water samples of different cities he state of form Rio Grande do Sul were analysed. The analytical curves were linear from 0,5 to 50 mg L with determination coefficient higher than 0,98. The recoveries were within the desired limits (50-120%), with relative standard deviation (RSD) lower than 20%. The validated method has as advantages the low organic solvent, and sample volume use, speed and high concentration factor. None of the samples showed contamination with the studied compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2 - Localização da água subterrânea (adaptado de Baird, 2011).....	16
Figura 3 - Ciclo hidrológico	17
Figura 4 - Etapas comuns no tratamento de efluentes.....	19
Figura 5 - Etapas da técnica DLLME	24
Figura 7 - Exemplificação de um sistema HPLC	26
Figura 8 - Representação estrutural dos compostos estudados	40
Figura 12 - Curva analíticas dos compostos estudados.....	42
Figura 16 - Cromatograma da mistura do analitos na concentração 50 mg.L ⁻¹	44
Figura 17 - Resultados da recuperação em dois níveis de fortificação	45
Figura 18 - Resultados do cálculos do desvio padrão relativo	45
Figura 19 - Cromatogramas das amostras analisadas	46

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Descrição dos grupos, classes, toxicologia e uso dos agrotóxicos estudados.....	32
Tabela 1 - Volumes de solventes e amostras utilizados na extração.....	37
Tabela 2 - Gradiente utilizado para separação dos analitos.....	41
Tabela 3 - Médias das áreas para cada analito nas diferentes concentrações da curva analítica.	41
Tabela 4 - Resultados dos cálculos de limites de determinação, quantificação e coeficiente de correlação.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Água.....	15
3.1.1. Ciclo hidrológico	16
3.1.2. O efeito antropológico sobre os recursos hídricos.....	18
3.2. Agrotóxicos.....	20
3.3. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)	21
3.3.1. Aplicações da DLLME	22
3.3.2. Etapas DLLME.....	23
3.4. Técnicas analíticas instrumentais.....	24
3.4.1. Cromatografia Líquida	24
3.4.2. Detectores	26
3.5. Validação dos métodos analíticos	27
3.5.1. Seletividade	28
3.5.2. Curva analítica e linearidade	28
3.5.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	29
3.5.4. Exatidão e precisão	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Reagentes, solventes e materiais	31
4.2. Agrotóxicos selecionados.....	32
4.3. Preparo de soluções analíticas	35
4.4. Escolha de solventes	36
4.4.1. Fase móvel	36
4.4.2. Solvente extrator e dispersor	36
4.5. Validação	36
4.5.1. Microextração líquido-líquido dispersiva.....	36
4.5.2. Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	38
4.5.3. Determinação e estimativa do LD e LQ dos instrumentos e do método	38

4.5.4. Ensaio de fortificação.....	39
4.5.5. Coleta das amostras.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1. Seleção dos analitos	39
5.2. Seleção dos solventes extrator e dispersor.....	40
5.3. Condições de operação do HPLC-DAD	40
5.4. Validação do método analítico	41
5.4.1. Determinação da linearidade das curvas analíticas.....	41
5.4.2. Determinação e estimativa do LD e LQ dos instrumentos e do método	43
5.4.3. Ensaio de fortificação.....	44
5.4.4. Aplicação do método em amostras reais:.....	45
6. CONCLUSÕES.....	47
7. PERSPECTIVAS	48

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1950, quando ocorreu a chamada Revolução Verde, o processo tradicional de produção agrícola sofreu drásticas mudanças com a inserção de novas tecnologias, tais como, sementes geneticamente alteradas, insumos industriais e mecanização de processos. A mais comum destas tecnologias envolve o uso extensivo de agrotóxicos, com a finalidade de controlar “pragas”, doenças de plantas e aumentar a produtividade.

Um dos principais intuitos da revolução era aumentar estrondosamente a produtividade agrícola, para assim resolver o problema da fome nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Porém, além de não resolver o problema da fome, o uso agressivo de novas tecnologias aumentou a concentração fundiária e a dependência de sementes modificadas, além de ter alterado significativamente a cultura dos pequenos agricultores. O intenso crescimento da cultura agrícola moderna promoveu também a devastação de florestas, contaminou o solo e as águas além de gerar problemas de saúde para agricultores e consumidores.

Segundo a legislação vigente no Brasil, através do decreto nº 4.074, que regulamenta a lei 7802/1989 agrotóxicos são “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002) ¹.

Quando utilizados de forma inadequada, em excesso ou próximos da época de colheita, os agrotóxicos apresentam riscos à saúde dos agricultores e dos consumidores, podendo causar intoxicações e doenças crônicas como mutações genéticas e câncer. Estes compostos também são aplicados no

¹ BRASIL. Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2002.

transporte e armazenamento de alimentos, o que contribui para o aumento da possibilidade de danos à saúde.

Quando utilizados na agricultura, sendo sua aplicação diretamente na planta ou na superfície terrestre, os agrotóxicos seguem diferentes rotas no ambiente atingindo em maior intensidade o solo. As águas subterrâneas são contaminadas por estes compostos químicos através da lixiviação da água e da erosão dos solos. Essa contaminação também pode ocorrer superficialmente devido à integração dos sistemas hídricos, atingindo áreas distantes do local de aplicação, poluindo, assim, diversos lagos e rios.

Tendo em vista o mau uso de agrotóxicos e o fato de que estes podem atingir os recursos hídricos, este trabalho tem como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação de sete agrotóxicos em amostras de água por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral foi desenvolver e validar um método para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos em água utilizando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Estudar as melhores condições cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos por HPLC-DAD.
- ✓ Otimizar os principais parâmetros que afetam a extração por DLLME.
- ✓ Validar um método avaliando a curva analítica, linearidade, limites e quantificação e detecção, exatidão e precisão.
- ✓ Aplicar o método desenvolvido em águas de rios localizados nas cidades de Mata, Frederico Westphalen e Santo Antônio da Patrulha, Rio Grande do Sul, Brasil.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Água

A água é um dos bens mais valiosos para os seres humanos e também o mais abundante do planeta Terra. Nosso planeta possui cerca de 71% de sua superfície encoberta por oceanos, isso é, um volume de aproximadamente 1,4 bilhões de quilômetros cúbicos, ou seja, cerca de 97% da água existente é salgada (BEYRUTH, 2008)², 1% ainda está na forma de geleiras e outros 2% constituem rios, lagos e lençóis freáticos (WEBER, 1992)³.

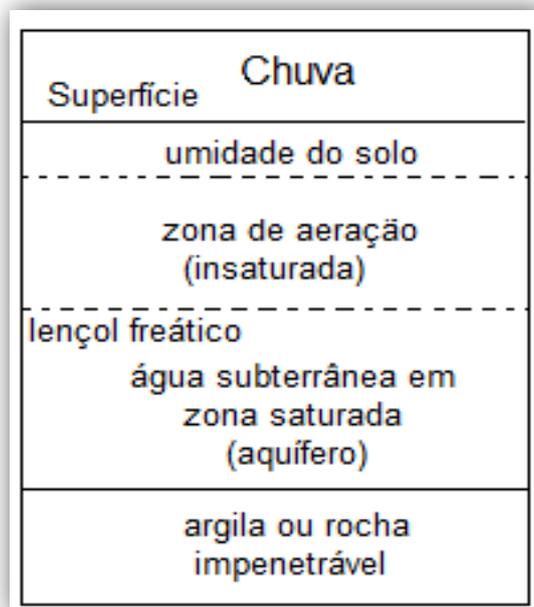
Nos lençóis freáticos a água é armazenada em uma espécie de lago subterrâneo, e abaixo destes existem ainda os aquíferos. Os aquíferos se formam com o passar dos anos devido a porosidade das rochas acima e uma camada isolante de argila ou rocha abaixo. Hoje se sabe que esses reservatórios também podem ser atingidos por poluentes, pois estes contaminantes podem ultrapassar diversas camadas protetoras, assim alcançando tanto os lençóis freáticos quanto aquíferos, como mostra a figura 2 (BAIRD, 2011)⁴.

² ZULEIKA BEYRUTH: Água, agricultura e as alterações climáticas globais. **Revista Tecnologia e Inovação Agropecuária**, Junho 2008.

³ ROLF WEBER : Sistemas costeiros e oceânicos. **Química Nova**, 1992.

⁴ BAIRD, C. **Química Ambiental**. Tradução por Grassi, M.T., 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 640-642.

Figura 1 - Localização da água subterrânea (adaptado de Baird, 2011).

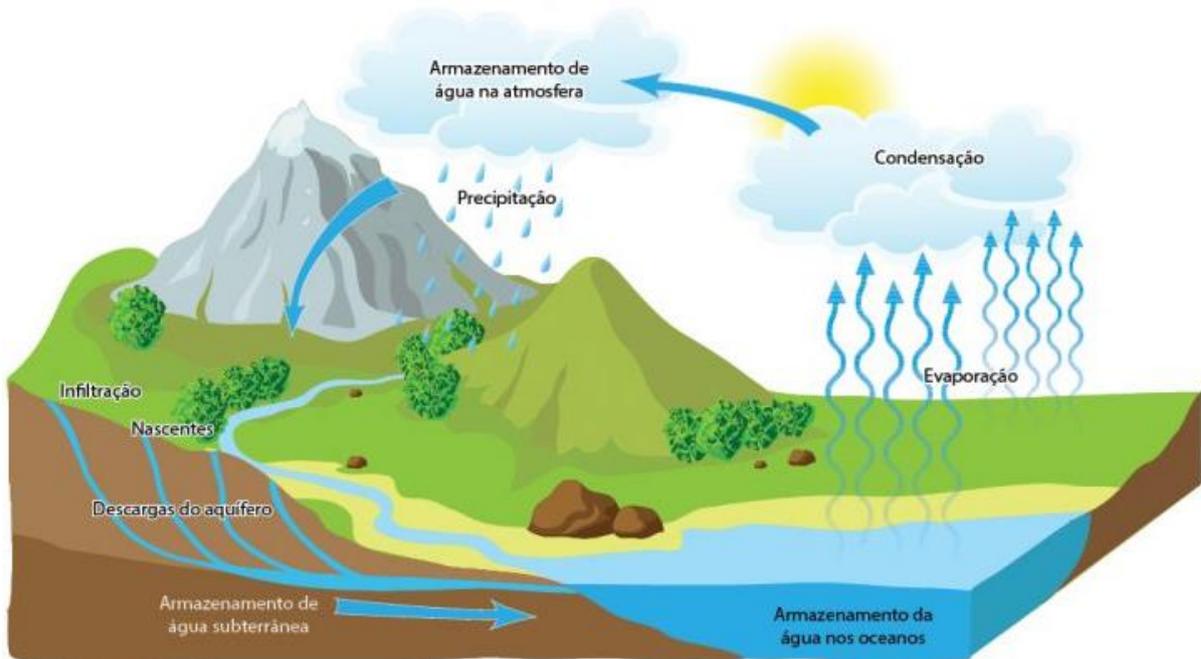


Em áreas onde é aplicado agrotóxico diretamente no solo, deve-se ter cuidado redobrado com o consumo de água oriundo de poços perfurados. A água da chuva flui pelo solo e se infiltra nas rochas, levando com ela contaminantes da superfície, ultrapassando diversas camadas rochosas e, assim, poluindo os reservatórios subterrâneos.

3.1.1. Ciclo hidrológico

Independente de seu estado físico (sólido, líquido ou vapor) a água interage com os ecossistemas das mais diversas formas, o que caracteriza o ciclo hidrológico, ou, ciclo da água (figura 3).

Figura 2 - Ciclo hidrológico ⁵



Fonte: HUBBART, J. A. Hydrologic cycle. In: The Encyclopedia of Earth. 2010

Este é um fenômeno de circulação fechada entre água, atmosfera e superfície terrestre.

Com a energia em forma de calor proveniente do Sol, as águas de rios e lagos evaporam e ao chegar à atmosfera esse vapor é resfriado formando gotículas de água e cristais de gelo que se acumulam, formando as nuvens. Com o acúmulo de água nessa forma, tem-se a precipitação de chuva, neve ou granizo, dependendo das condições atmosféricas existentes (HUBBART, 2010)

⁶

A água pluvial escoar pela superfície, uma parte infiltra-se nas camadas mais superficiais do solo ou percorre-o atingindo os aquíferos. A distribuição da água pela superfície aumenta a vazão dos rios que podem, ou não, desaguar nos oceanos.

⁵ <<https://www.infoenem.com.br/ciencias-da-natureza-resumo-completo-do-ciclo-da-agua/>>. Acessado em: 01 de Junho de 2017.

⁶ HUBBART, J. A. Hydrologic cycle. In: **The Encyclopedia of Earth. 2010**. Disponível em: <http://www.eoearth.org/article/Hydrologic_cycle>. Acessado em: 16 nov. 2011.

Levando em conta todo trajeto percorrido pela água e tendo o conhecimento de sua periodicidade ao longo dos anos, percebe-se que a influência do homem pode alterar drasticamente tanto o próprio ciclo quanto as suas propriedades e características.

3.1.2. O efeito antropológico sobre os recursos hídricos

Embora um terço da superfície terrestre esta encoberta pela água, apenas 0,008% desta é potável, servindo para o consumo humano, higiene e uso das indústrias (CONSEA, 2017) ⁷.

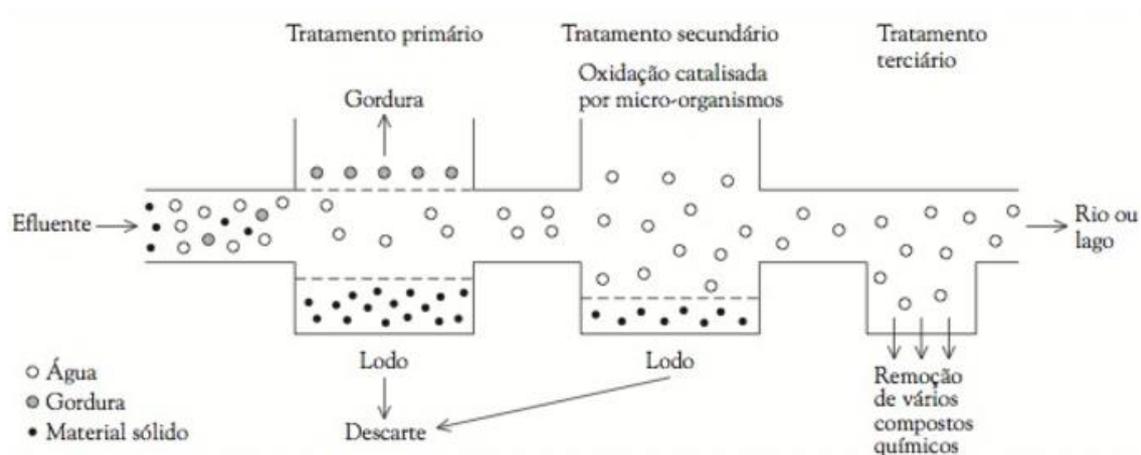
Um relatório do Conselho Mundial da Água de março deste ano revelou que 923 milhões de pessoas no mundo não possuem acesso a água potável, e, ainda, 3,5 milhões de pessoas morrem por ano devido a doenças ligadas ao consumo de água imprópria (CONSEA, 2017).

Além da poluição das águas provenientes da agricultura, os esgotos sem o devido tratamento e fossas sépticas não isoladas contribuem como as principais fontes de contaminação de águas por bactérias, vírus, produtos de limpeza, medicamentos, nitritos e detergentes. Esse problema poderia ser resolvido se os efluentes fossem tratados antes do descarte no meio ambiente, evitando, assim, doenças, contaminações e conseqüentemente protegendo rios e mares.

Já o tratamento do esgoto doméstico mais comum é constituído em três etapas: a primeira de decantação, onde se forma um lodo no fundo da lagoa de tratamento, a segunda que consiste em reações de oxidação da matéria orgânica onde é formado dióxido de carbono e água, ou convertido em lodo, e a terceira onde substâncias específicas são removidas da água parcialmente purificada antes de sua desinfecção final (figura 4) (BAIRD, 2011).

⁷ CONSEA - **CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL**. “Dia Mundial da Água: os impactos da crise hídrica na segurança alimentar e nutricional”. 22 de março de 2017.

Figura 3 - Etapas comuns no tratamento de efluentes



Fonte: Baird, C. Química Ambiental, 2011.

Mesmo com o tratamento, compostos orgânicos como agrotóxicos e fármacos podem não se degradar, havendo necessidade de um tratamento mais específico para torná-las potáveis. Com isso, percebe-se que possuir métodos de detecção e quantificação desses compostos é de grande importância para se evitar danos à saúde humana e animais que dependem desse recurso natural.

Apesar de existirem no Brasil três bacias hidrográficas (Amazonas, São Francisco e Paraná) que contem o maior volume de água doce do mundo, há áreas críticas, onde a escassez deixou de ser apenas uma ameaça.

Pela lei das águas sancionada em 1977, em situações de escassez o consumo de água humano e de animais é prioritário. Esta diz também que a água é um bem público não podendo ser privatizada, sendo sua gestão baseada em usos múltiplos (abastecimento, energia, irrigação, indústria, etc.) (BRASIL, 1997) ⁸.

No país existem alguns programas de tratamento de rios e córregos. Destacam-se também programas que estimulam o tratamento de esgotos, entre eles pode-se citar o Programa de Despoluição de Bacias Hidrográficas

⁸ BRASIL. Presidência da República - Casa Civil - Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei Nº 9.433 - **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 de janeiro de 1997.

(PRODES) lançado em 2001. O programa remunera prestadores de serviço que obtêm bons resultados na implantação de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) beneficiando estabelecimentos que investem em ampliação ou mesmo melhora da qualidade de seus sistemas.

3.2. Agrotóxicos

Com o aumento da população mundial a partir da década de 1950, houve a necessidade de elevar a produção de alimentos e, conseqüentemente isto induziu a evolução de técnicas utilizadas na agricultura, visando alta produtividade e baixo custo de produção.

Uma das mais importantes mudanças que ocorreram na produção agrícola foi o uso de agrotóxicos, o qual é amplamente utilizado objetivando o controle de insetos, doenças e plantas invasoras que prejudicam o desenvolvimento das culturas (COUTINHO *et al.*, 2005)⁹.

Os agrotóxicos utilizados em larga escala comercial geralmente são compostos orgânicos sintéticos, com baixo peso molecular, apolares e com alta atividade biológica (SILVA e FAY, 2004)¹⁰.

Estas substâncias possuem diversas classificações, sendo uma delas baseada na sua toxicologia para o ser humano, determinada pelo LD₅₀ que é a dose capaz de provocar a morte de, pelo menos 50% das espécies estudadas. Estas classes variam de I a IV, sendo I extremamente tóxico e IV pouco tóxico (LONDRES, 2011)¹¹.

Para avaliar a periculosidade ambiental dos agrotóxicos o IBAMA possui uma Portaria Normativa (nº 84, de 15 de outubro de 1996) que é atribuída a características do agrotóxico que promovem contaminação e danos ao ecossistema sendo classificadas da seguinte forma: Classe I – Altamente perigoso ao meio ambiente (DL₅₀ ≤ 5 mg kg⁻¹), Classe II – Muito perigoso ao meio ambiente (DL₅₀ = 5-50 mg kg⁻¹), Classe III – Perigoso ao meio ambiente (DL₅₀ = 50-500 mg kg⁻¹), Classe IV – Pouco perigoso ao meio ambiente (DL₅₀ ≥

⁹ COUTINHO, C.F.B. et al. Pesticidas: Mecanismos de degradação e toxidez. **Revista de eco toxicologia e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, jan/dez. 2005.

¹⁰ SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Agrotóxicos e Ambiente. **Embrapa Informações Tecnológicas** – Brasília, 2004, p. 400.

¹¹ LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil - **Um guia para ação em defesa da vida**, 2011, p. 30.

500 mg kg⁻¹). Esta classificação tem como objetivo mostrar ao usuário o perigo do produto utilizado, independente do uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) e coletivo (EPCs).

Em 2008, o Brasil se tornou o principal consumidor mundial de agrotóxicos, tendo um investimento de US\$ 7 bilhões, cerca de 350% maior do que em 2001. Já em 2016, o investimento foi ainda maior, sendo este de US\$ 9,56 bilhões. A classe de produtos mais comercializada no país é a dos fungicidas (33%), seguido dos herbicidas (32,5%) e por fim, os inseticidas (29%) (SINDIVEG, 2016) ¹².

3.3. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) baseia-se na injeção rápida de uma mistura de solventes, sendo um extrator e outro dispersor, na amostra aquosa. Com a adição turbulenta dessa mistura ocorre a formação de uma grande área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa, assim, o equilíbrio é atingido rapidamente, sendo esta uma das principais vantagens desta técnica (REZAEI, 2010) ¹³. Após a injeção, provoca-se agitação onde há a dispersão do solvente extrator na forma de micro gotas onde os analitos já se encontram pré-concentrados.

A DLLME apresenta como principais vantagens a miniaturização, baixo custo, rapidez, alta eficiência de extração e pré-concentração (MARTINS *et al.*, 2012) ¹⁴. Alguns fatores afetam a eficiência de extração da técnica, estes são (BORGES, FIGUEIREDO e QUEIROZ, 2015) ¹⁵:

- a. Tipo do solvente extrator: deve-se avaliar sua densidade, capacidade de extração dos analitos e sua solubilidade em água, a qual deve ser baixa.

Os principais solventes utilizados são: Tetracloreto de carbono,

¹² SINDIVEG. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal**, 2016. Disponível em: <<http://www.sindiveg.org.br>>. Acessado em: 28 de maio de 2017.

¹³ REZAEI M, YAMINI Y, FARAJI M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A** 2010; v.1217 p.2342-2357. <<http://www.dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>>.

¹⁴ MARTINS *et al.*, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/handle/1/4349>>. Acessado em: 29 de maio de 2017.

¹⁵ BORGES, K.B., FIGUEIREDO, E.C., QUEIROZ, M.E.C. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1ed., p.125-133. Rio de Janeiro, 2015.

monoclorobenzeno, clorofórmio, tetracloroetileno, diclorobenzeno e diclorometano.

- b. Tipo de solvente dispersor: Deve ser miscível na amostra e no solvente extrator. Os mais comuns utilizados para essa técnica são: acetona, metanol e acetonitrila, pois apresentam baixa toxicidade e baixo custo.
- c. Volume do solvente extrator: Volume capaz de garantir um alto fator de concentração dos analitos e que gere uma quantidade de fase sedimentada suficiente para ser analisada.
- d. Volume do solvente dispersor: Levam-se em conta os volumes utilizados de amostra aquosa e de solvente extrator. Um alto volume de solvente dispersor aumenta a solubilidade dos analitos na água e diminui a eficiência da extração
- e. pH da amostra: O ajuste do pH permite a permanência dos analitos na forma neutra, facilitando a partição dos mesmos nas micro gotas do solvente extrator.
- f. Força Iônica: A presença de sais pode diminuir a solvatação das moléculas do analito, pois moléculas de água tem preferência por solvatar moléculas de sal e também a adição destes compostos diminui a solubilidade do solvente extrator, resultando em um aumento da fase sedimentada.

3.3.1. Aplicações da DLLME

A DLLME é uma técnica de preparo de amostra bastante versátil visto que o extrato obtido com a extração pode ser utilizado em diversos métodos analíticos de análises.

Além de sua utilização para extração e concentração de analitos, essa técnica pode ser aplicada também para determinação de íons metálicos com o

auxílio de agente complexantes (FARAJZAEH; BAHRAM e VARDAST, 2010)¹⁶.

Sua maior aplicabilidade está nas amostras ambientais, para extrair analitos como fármacos e agrotóxicos, em diversas matrizes tais como água, vinho, efluente, solo, leite, ovos, chás, entre outros.

O uso de outras técnicas junto a DLLME, visando à concentração dos analitos de interesse, pode eliminar a etapa de evaporação do extrato, com isso, temos uma menor variação da eficiência do processo de extração, obtendo resultados mais precisos.

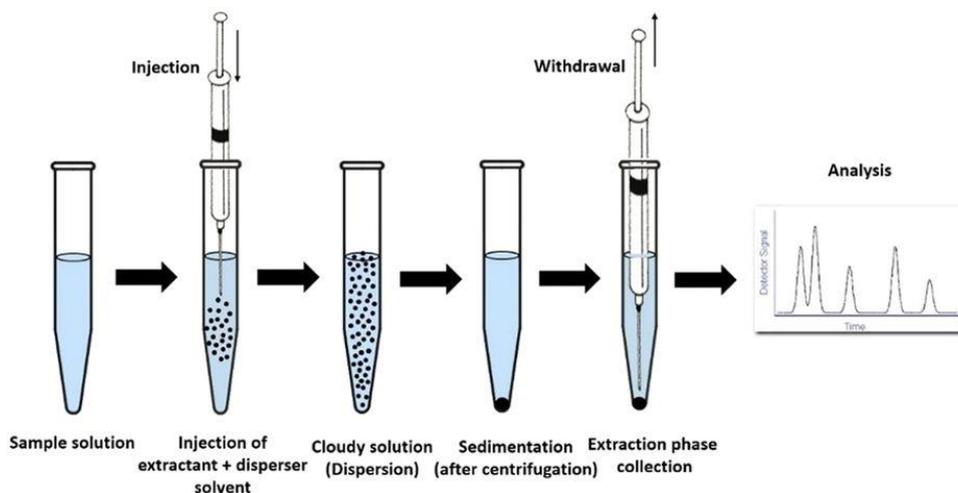
3.3.2. Etapas DLLME

A DLLME é realizada em duas etapas. A primeira etapa consiste na injeção rápida de uma mistura de solventes extrator e dispersor na amostra aquosa, formando micro-gotas do solvente extrator disperso na fase aquosa, extraíndo os analitos.

Na segunda etapa, a solução é centrifugada, fazendo com que a fase turva (orgânica) seja sedimentada na forma de gota no fundo do tubo extrator. Com o auxílio de uma seringa, a gota formada contendo os analitos é retirada para que, assim, possa ser analisada.

¹⁶ FARAJZAEH, M.A.; BAHRAM, M.; VARDAST, M.R. Central Composite Design Applied to Optimization of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Cu(II) and Zn(II) in Water Followed by High Performance Liquid Chromatography Determination. **Clean – soil, air, water**, v. 38, p.466-477, 2010.

Figura 4 - Etapas da técnica DLLME (FAKOUR, H., LO, S., LIN, T., 2016) ¹⁷.



3.4. Técnicas analíticas instrumentais

Atualmente para a determinação de diversos analitos diversos existem muitas técnicas analíticas instrumentais. O uso da cromatografia para separação dessas espécies é uma das técnicas mais comuns e utilizadas.

Ao falarmos de cromatografia existem duas possibilidades: Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (LC), com base nas características dos analitos de interesse escolhemos a técnica mais adequada para a separação.

3.4.1. Cromatografia Líquida

Normalmente, quando se fala em cromatografia líquida se está fazendo referência à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta técnica se baseia no uso de uma fase móvel líquida e pode ser utilizada de diversas formas, tais como cromatografia líquido-líquido (adsorção), líquido-sólido (partição), exclusão por volume, por afinidade, quiral e por troca iônica. Todas estas permitem a separação de misturas complexas, fazendo com que a

¹⁷ FAKOUR, H., LO, S., LIN, T. Impacts of Typhoon Soudelor (2015) on the water quality of Taipei, Taiwan. Scientific Reports 6, Article number: 25228, Tainan City, Taiwan, 2016.

cromatografia líquida seja, em geral, a opção mais utilizada para separações atualmente (COLLINS, 2006) ¹⁸. No presente trabalho será abordado mais detalhadamente apenas a cromatografia líquido-líquido (partição) a qual foi utilizada para separação dos analitos de interesse no estudo.

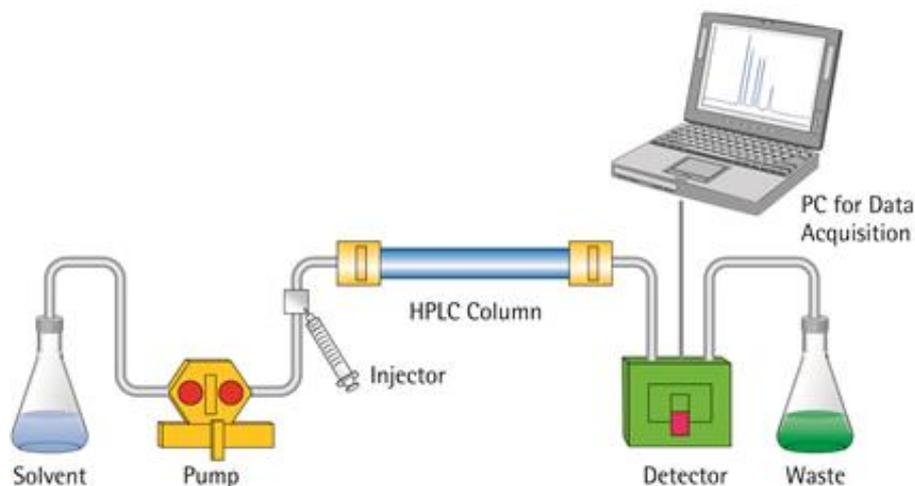
Algumas características que fazem da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) a mais comum, em relação a cromatografia gasosa, são:

- ✓ Alto poder de resolução
- ✓ Separações rápidas
- ✓ Monitoramento contínuo do eluente
- ✓ Medidas quantitativas acuradas
- ✓ Diversas análises reproduzíveis com a mesma coluna
- ✓ Automação do procedimento analítico e do processamento de dados
- ✓ Ampla escolha de fase estacionária e fase móvel

Na HPLC pode ser utilizado um só solvente ou ainda uma mistura de solventes como fase móvel, também, pode-se ter uma vazão constante de fase móvel (isocrática) ou com alteração no fluxo de diferentes solventes em função do tempo (gradiente). Para evitar alargamento de picos e problemas na detecção, as fases móveis devem ser desgaseificadas para que bolhas de ar não interfiram na injeção. A injeção pode ser realizada manualmente com o auxílio de uma seringa (figura 7), pode ser injeção do tipo válvula ou, em equipamentos mais modernos existe a injeção automática, programada no computador.

¹⁸ Carol H. Collins, Gilberto L. Braga e Pierina S. Bonato. **Introdução a métodos cromatográficos**, Campinas, SP : Editora da UNICAMP, 2006.

Figura 5 - Exemplificação de um sistema HPLC ¹⁹



A pressão do equipamento é alta devido a vazão, visto que, as partículas no interior da coluna são na ordem de micrometros.

As colunas mais populares utilizadas em HPLC são produzidas em aço inox, pois suportam pressões maiores. Elas variam de 10 a 30 cm de comprimento e possuem diâmetro interno de 2 a 5 mm. O recheio normalmente é composto de sílica recoberta por filmes finos orgânicos quimicamente ligados à superfície e suas partículas variam de 3 e 10 μm . Pode-se adicionar uma pré-coluna (2 a 5 cm) com o intuito de retirar possíveis impurezas da matriz, aumentando a vida útil da coluna.

3.4.2. Detectores

Existem diversos detectores para HPLC, os quais devem ter as seguintes características:

- ✓ Sensibilidade e seletividade adequada
- ✓ Ampla faixa linear
- ✓ Baixo volume interno, pois grandes volumes causam alargamento dos picos.

¹⁹ <<http://www.laboratory-journal.com/applications/analytical/hplc-analysis>>. Acessado em 01 de Junho de 2017.

- ✓ Resposta rápida, detectores lentos formam picos deformados (baixo e largo) e com cauda longa.
- ✓ Boa estabilidade e reprodutibilidade
- ✓ Conservação da amostra, permitindo coletar o eluato.

A escolha do detector varia com o tipo de amostra e os mais comumente utilizados são: detector por absorvância do tipo ultravioleta (UV) ou por arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FD), eletroquímico, por índice de refração, condutividade e por espectrometria de massas. Neste trabalho falaremos mais profundamente sobre o detector por arranjo de diodos (DAD), pois este foi utilizado no desenvolvimento do método analítico.

Um arranjo de diodos consiste em uma série de fotodiodos detectores posicionados lado a lado em um cristal de silício, onde todo comprimento de onda difratado atinge um ponto deste arranjo, e, assim, um detector. O detector permite determinar simultaneamente a absorvância de uma amostra em todos os comprimentos de onda (HARRIS, 2012).

Estes detectores possuem sensibilidades diferentes em diferentes comprimentos de onda, de modo que é necessário que se especifique no aparelho em que região do espectro se vai trabalhar.

3.5. Validação dos métodos analíticos

A validação de métodos analíticos consiste num processo de verificação que demonstra se o método escolhido atende aos objetivos desejados (ANVISA, 2007) ²⁰.

Órgãos regulamentados como o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), a Agência de vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Internacional de Padronização (ISO) tem estabelecido alguns parâmetros que devem ser obedecidos para a validação, porém não existe uma unificação quanto a isso. Os padrões mais comumente utilizados para validação são: especificidade, seletividade, linearidade, curva de calibração,

²⁰ ANVISA. **Guia para o Controle da Qualidade para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos para os laboratórios integrantes do PARA.** 2007.

limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003) ²¹.

3.5.1. Seletividade

A seletividade, também chamada de especificidade, é a capacidade do método em distinguir o analito de interesse de outras espécies presentes na amostra (HARRIS, 2012) ²².

3.5.2. Curva analítica e linearidade

A curva analítica é utilizada para quantificar os analitos. A curva nos mostra a proporção linear entre a concentração do analito e a resposta do equipamento (área/altura do pico cromatográfico).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser calculada utilizando o método matemático conhecido como regressão linear (equação 1) (INMETRO, 2010) ²³.

$$y = ax + b \quad (1)$$

Em que,

y = Resposta medida (altura ou área do pico);

a = Inclinação da curva analítica (sensibilidade);

x = Concentração;

b = intersecção com o eixo y;

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados na faixa analítica específica. Uma medida muito comum para a linearidade é o quadrado do coeficiente de determinação (r^2), este resultado deve ser o mais próximo possível de 1,0 para representar um verdadeiro ajuste linear.

²¹ ANVISA. **Guia Para Validação De Métodos Analíticos E Bioanalíticos**. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

²² HARRIS.D.C. **Análise Química Quantitativa**. 8 ed., cap. 5. Rio de Janeiro, 2012.

²³ INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 03 – Brasília, 2010.

3.5.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção pode ser expresso como a menor concentração do analito que pode ser detectada. Já o limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida (quantificada). A estimativa dos valores de LQ e LD pode ser calculada de várias maneiras, como por exemplo, o método visual, a relação sinal/ruído e se baseando na curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004) ²⁴.

3.5.4. Exatidão e precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a similaridade de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. A precisão é normalmente expressa pela repetibilidade e reprodutividade dada pelo desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores de até 20% para análise de resíduos de agrotóxicos (SILVA & ALVES, 2006) ²⁵ (GARP, 1999) ²⁶.

A repetibilidade é o quanto as medidas realizadas sucessivamente são similares para as mesmas condições, mesmo instrumento, mesmo analista e mesmo dia de ensaio. Já a reprodutibilidade é o grau de confiabilidade das medições de uma mesma amostra sob condições variáveis (diferentes laboratórios, analistas, equipamentos, condições de análise). Esta é geralmente avaliada através da participação de ensaios interlaboratoriais.

A precisão pode ser calculada por uma estimativa do desvio padrão (equação 2) (RIBANI *et al.*, 2004) ²⁷ ou pelo desvio padrão relativo (RSD) (equação 3), também conhecido como coeficiente de variação (CV).

²⁴ RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27 (2004) p. 771.

²⁵ SILVA, A.P.; ALVES, M.C. Como Iniciar a Validação de Métodos Analíticos. **ENQUALAB Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia**. São Paulo. 2006.

²⁶ GARP. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. Apostila. 1999.

²⁷ RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, P. 771-780, 2004.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Em que,

S: estimativa do desvio padrão absoluto;

x_1 : valor individual da medição;

\bar{x} : média aritmética das medições;

n : número de medições.

$$\text{RSD}(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Na qual,

RSD (%): desvio padrão relativo;

S: estimativa do desvio padrão absoluto;

\bar{x} : média aritmética das medições.

Já a exatidão representa o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como valor verdadeiro. Dentre as maneiras utilizadas para verificar a exatidão encontram-se: materiais de referência, testes interlaboratoriais e ensaios de recuperação (INMETRO, 2007) ²⁸.

A recuperação é a medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. É o método mais utilizado para a validação de métodos cromatográficos e pode ser expressa pela equação abaixo:

$$\% \text{Recuperação} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde,

C_1 – concentração do analito na amostra fortificada obtida na análise;

C_2 – concentração do analito na amostra branco;

C_3 – concentração do analito adicionada a amostra fortificada;

²⁸ INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) **DOQ-CGCRE-008** – Revisão 02 – Junho, 2007.

O intervalo aceitável de recuperação em análises de resíduos de agrotóxicos está entre 70 e 120%, com precisão $\pm 20\%$, normalmente. Porém, para amostras muito complexas do ponto de vista analítico ou mesmo do ponto de vista de matriz, pode-se aceitar valores de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2004) ²⁹.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido aplicando-se a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva e posterior determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD).

4.1. Reagentes, solventes e materiais

Solventes e reagentes:

- Acetona, p.a. (Tedia, EUA);
- Acetonitrila, grau HPLC (Sigma-Aldrich, EUA);
- Clorofórmio, p.a. (Merck, Alemanha);
- Diclorometano, p.a. (Merck, Alemanha);
- Metanol, p.a. (Merck, Alemanha);
- Tetracloroeto de carbono (Merck, Alemanha);

Materiais

- Béqueres;
- Pipeta de Pasteur;
- Frascos de 2 mL (*vials*);
- Frascos de 4 mL;
- Microseringas de 1000 μL ;
- Tubos de polipropileno de 15 mL;

Instrumentação

²⁹ RIBANI, M., *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, P. 771-780, 2004.

- Agitador Vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- Micropepitadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 3UV® (Millipore, França);
- Sistema HPLC equipado com:
 - Detector DAD modelo ProStar (Varian, EUA);
 - Bomba ternária, modelo 9010 (Varian, EUA);
 - Coluna analítica Varian Polaris 3, C18-A com 250 x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula;
- Ultrassom USC-1400 (Unique, Brasil);

4.2. Agrotóxicos selecionados

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados sete agrotóxicos de uso permitido no Brasil (com restrições da ANVISA) de diferentes classificações, grupos químicos e aplicações conforme descrito no quadro abaixo:

Quadro 1 - Descrição dos grupos, classes, toxicologia e uso dos agrotóxicos estudados.

Agrotóxico	Grupo Químico	Classe/ Classificação toxicológica	Uso agrícola autorizado no Brasil
Acetamiprido ³⁰	Neonicotinóide	Inseticida/Classe III	Aplicação foliar nas culturas de abóbora, abobrinha, algodão, arroz, aveia, batata, batata doce, berinjela, beterraba, brócolis, café, centeio, cevada, citros, chuchu, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, eucalipto, feijão,

³⁰ ANVISA. Índice monográfico: A29. Resolução RE nº 648 de 10/03/17 (DOU de 13/03/17).

			jiló, maçã, mamão, mandioca, maxixe, melancia, melão, milho, pepino, pimenta, pimentão, pinhão-manso, quiabo, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo, triticale e uva. tronco de café e citros.
Diuron ³¹	Uréia	Herbicida/Classe III	Aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, alfaça, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, seringueira e uva. Aplicação como dessecante da cultura de algodão.
Fipronil ³²	Pirazol	Inseticida,formicida e cupinicida/Classe II	Aplicação no solo nas culturas de batata, cana-de-açúcar e milho. Aplicação foliar nas culturas do algodão, arroz, eucalipto e soja. Aplicação em sementes de algodão, amendoim, arroz, cevada, feijão, girassol, milho, pastagens, sorgo, soja e trigo. Aplicação foliar em mudas de eucalipto. Aplicação no controle de formigas e cupins, conforme aprovação em rótulo e bula. Aplicação na água de irrigação para o arroz irrigado.
Imidacloprido ³³	Neonicotinóide	Inseticida/Classe III	Aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, almeirão, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, café, cana-de-açúcar,

³¹ ANVISA. Índice monográfico: D25.

³² ANVISA. Índice monográfico: F43. Resolução RE nº 1.902 de 15/07/16 (DOU de 18/07/16).

³³ ANVISA. Índice monográfico: I13. Resolução RE nº2.094, de 03/08/16 (DOU de 08/08/16).

			<p>cebola, cenoura, citros, couve, couve-flor, crisântemo, eucalipto, feijão, fumo, gérbera, goiaba, jiló, mamão, manga, maracujá, melancia, milho, palma forrageira, pastagens, pepino, pimentão, pinus, poinsettia, soja, tomate, trigo e uva. Aplicação foliar em mudas de abacaxi, abóbora, abobrinha, brócolis, chicória, couve-flor, eucalipto, melancia, melão, pepino, repolho. Aplicação no solo nas culturas de cana-de-açúcar, café, citros, eucalipto, fumo e pinus. Aplicação no tronco de café, citros, mamão, pêssigo e uva. Aplicação no controle de cupins, conforme aprovação em rótulo e bula.</p>
Piraclostrobina ³⁴	Estrobilurina	Fungicida/Classe II	<p>Aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, abobrinha, açai, alface, algodão, alho, amendoim, aveia, banana, batata, berinjela, beterraba, cacau, café, cana-de-açúcar, canola, cebola, cenoura, centeio, cevada, chalota, chuchu, citros, coco, cupuaçu, crisântemo, dendê, eucalipto, feijão, gergelim, girassol, guaraná, jiló, linhaça, macadâmia, maçã, mamão, manga, maracujá, maxixe, melão, melancia, milho, milheto, pepino, pêssigo, pimenta, pimentão, pinhão, pupunha, quiabo,</p>

³⁴ ANVISA. Índice monográfico: P46. Resolução RE nº 1.900 de 15/07/16 (DOU de 18/07/16).

			rosa, soja, sorgo, tomate, trigo, triticale e uva. Aplicação em toletes para a cultura de cana-de-açúcar no momento do plantio. Aplicação em sulco de plantio na cultura de batata.
Piridabem ³⁵	Piridazinona	Acaricida e inseticida/ Classe II	Aplicação foliar nas culturas de algodão, berinjela, café, citros, coco, crisântemo, feijão, jiló, maçã, mamão, melancia, melão, morango, pimenta, pimentão, quiabo, rosa, soja, tomate e uva.
Tiacloprido ³⁶	Neonicotinóide	Inseticida/Classe II	Aplicação foliar nas culturas de alface, algodão, alho, banana, batata, berinjela, cana-de-açúcar, cebola, citros, couve, crisântemo, feijão, gérbera, mamão, melancia, melão, pepino, pimentão, poinsettia, soja e tomate.

4.3. Preparo de soluções analíticas

Para o preparo das soluções analíticas dos agrotóxicos citados acima foram utilizadas soluções estoque que se encontravam na concentração 1000 mg L⁻¹. A partir destas foram feitas soluções na concentração 10 mg L⁻¹.

Foram feitas também duas soluções contendo a mistura de todos os analitos, uma na concentração 10 mg L⁻¹ e outra na concentração 50 mg L⁻¹. A solução de 10 mg L⁻¹ foi preparada utilizando 100 µL de cada composto e no preparo da de 50 mg L⁻¹ foram utilizados 500 µL de cada composto na concentração 1000 mg L⁻¹. Essas misturas foram feitas em balões volumétricos de 10 mL aferindo o menisco com acetonitrila.

A partir das soluções contendo a mistura dos analitos foram preparadas curvas analíticas de calibração.

³⁵ ANVISA. Índice monográfico: P35. Resolução RE nº 159 de 20/01/17 (DOU de 23/01/17).

³⁶ ANVISA. Índice monográfico: T49. Resolução RE nº 3.329 de 09/12/16 (DOU de 12/12/16).

4.4. Escolha de solventes

Para este trabalho foram analisadas as proporções ideais de solventes para a eluição e separação dos compostos de interesse no HPLC-DAD e para a extração dos compostos na DLLME.

4.4.1. Fase móvel

A escolha dos solventes de fase móvel foi baseada nos estudos desenvolvidos pelos autores Jovanov e colaboradores (2015)³⁷. Para escolher as melhores condições de eluição, para isso foram realizadas corridas com padrões contendo todos os analitos na concentração 10 mg L⁻¹ até encontrar o gradiente com melhor separação dos compostos.

4.4.2. Solvente extrator e dispersor

Os solventes extrator e dispersor foram escolhidos a partir de testes com diferentes solventes os quais estavam disponíveis no laboratório. Para escolher os mais adequados foram utilizados três diferentes opções de solvente extrator e também três diferentes solventes dispersores, resultando em nove testes experimentais.

Esses testes foram realizados utilizando água ultrapura fortificada com os compostos e estudo de modo que a concentração para análise fosse equivalente a 10 mg L⁻¹.

4.5. Validação

4.5.1. Microextração líquido-líquido dispersiva

Inicialmente foram preparadas soluções contendo a mistura dos solventes extrator (150 µL) e dispersor (2 mL). Usou-se água ultra pura fortificada (8 mL) e acidificada (pH= 3) com ácido fosfórico (1% v/v) em tubos

³⁷JOVANOV *et al.*, Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 106-113, 2015.

de polipropileno de 15 mL como amostra para a realização dos testes iniciais, conforme pode-se observar na tabela 1:

Tabela 1 - Volumes de solventes e amostras utilizados nos testes de extração.

Teste	Solvente Extrator	Volume Solvente Extrator (μL)	Solvente Dispensor	Volume solvente dispensor (μL)	Volume de amostra (mL)
1		150	Acetonitrila	2000	8
2	Diclorometano	150	Metanol	2000	8
3		150	Acetona	2000	8
4		150	Acetonitrila	2000	8
5	Clorofórmio	150	Metanol	2000	8
6		150	Acetona	2000	8
7		150	Acetonitrila	2000	8
8	Tetracloroeto de Carbono	150	Metanol	2000	8
9		150	Acetona	2000	8

Com o auxílio de uma seringa a mistura de solventes foi adicionada rapidamente à amostra formando uma dispersão de microgotas. Os tubos foram então agitados por um minuto e centrifugados por 8 minutos a 3400 rpm.

Nos testes realizados com diclorometano como solvente extrator não houve a formação da gota sedimentada. Já nos demais testes onde houve a formação da gota, esta foi retirada com uma seringa e os solventes orgânicos, por serem muito apolares, foram evaporados e os analitos extraídos foram dissolvidos em metanol, solvente pouco polar, fazendo com que os analitos permaneçam retidos por mais tempo na coluna cromatográfica.

Após a redissolução dos analitos em metanol, o extrato foi injetado no equipamento (HPLC-DAD) e os dados gerados foram analisados. Observou-se que houve uma extração mais eficiente utilizando clorofórmio como solvente extrator e acetonitrila como solvente dispensor.

4.5.2. Determinação da linearidade das curvas analíticas

Para determinar a linearidade das curvas analíticas foram preparadas soluções nas concentrações: 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 e 50 mg L⁻¹. Todos os pontos foram preparados a partir das soluções analíticas, (conforme descrito no item 4.4.) e diluídos na fase móvel. Cada ponto da curva foi injetado três vezes no sistema cromatográfico e a partir dessas injeções, realizou-se o cálculo da média das áreas, equação da curva analítica, coeficiente de determinação (r²), desvio médio relativo RSD (%) e faixa de linearidade para cada composto.

4.5.3. Determinação e estimativa do LD e LQ dos instrumentos e do método

A partir dos dados obtidos através da curva analítica de cada composto, pode-se estimar o limite de detecção do instrumento (LDi) e do método (LDm) bem como o limite de quantificação do instrumento (LQi) e do método (LQm).

A equação 5 apresenta como se pode calcular o limite de detecção do instrumento (LDi) com dados do RSD% médio e a concentração analítica em seu menor ponto linear:

$$\mathbf{LDi = 3 \times RSD \times C} \quad (5)$$

Onde,

RSD: Desvio padrão relativo das áreas obtidas;

C: Concentração da solução analítica.

O limite de detecção do método pode ser obtido multiplicando/dividindo o valor do LDi pelo fator de diluição/concentração da amostra. Já o limite de quantificação do instrumento é calculado multiplicando o LDi por 3,33, conforme a equação 6:

$$\mathbf{LQi = LD_i \times 3,33} \quad (6)$$

Como na DLLME os analitos da amostra são concentrados, o LDm e o LQm do método foram calculados apenas dividindo o LDi e o LQi, respectivamente, pelo fator de concentração do método.

4.5.4. Ensaio de fortificação

Foram realizados dois testes de fortificação, um com concentração 0,15 mg L⁻¹ e outra com 0,75 mg.L⁻¹. Também foram preparados extratos “branco”, ou seja, sem a adição dos analitos. Em estudo cada nível de concentração foi extraído e analisado em triplicata.

A extração destes foi realizada conforme já descrito no item 4.5.1. deste trabalho.

4.5.5. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de diferentes bacias hidrográficas localizadas nas cidades de Mata, Frederico Westphalen e Santo Antônio da Patrulha, cidades localizadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Após a coleta as amostras foram armazenadas em frascos âmbar de 200 mL mantidos sobre refrigeração.

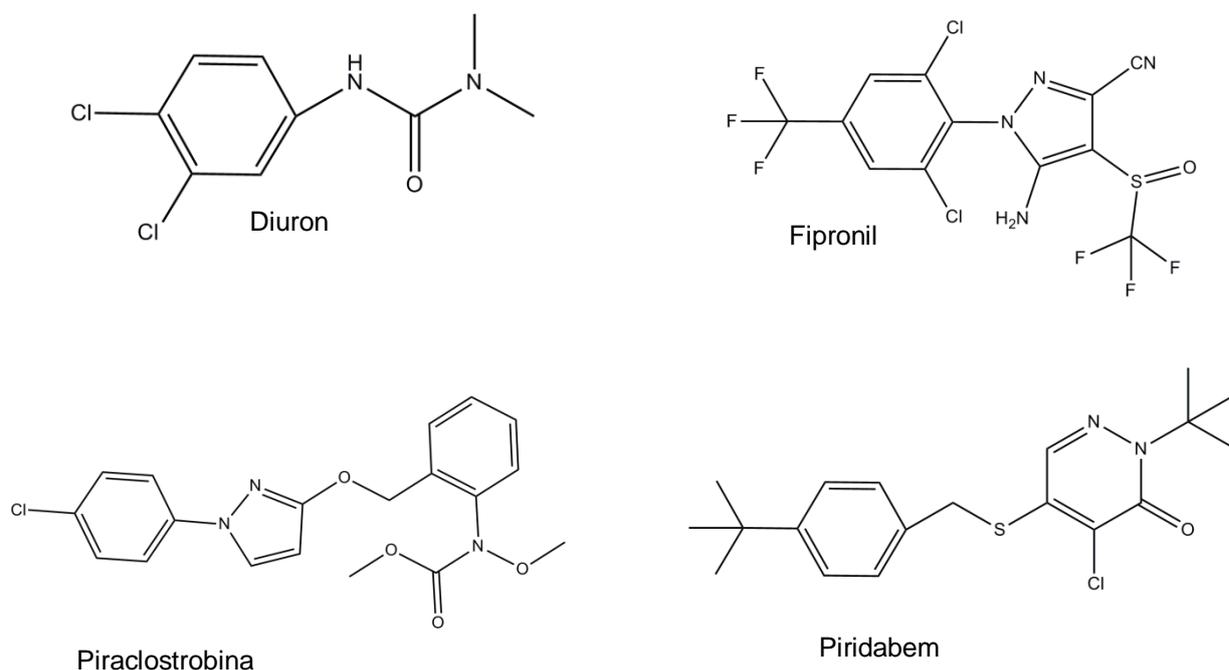
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Seleção dos analitos

De acordo com os testes realizados na otimização da técnica de extração deste trabalho, foram realizados cálculos de recuperação, conforme a equação 3 descrita no item 3.5.4., e com estes observou-se que três analitos obtiveram valores de recuperação fora da faixa aceitável, estes são: Acetamiprido, Imidacloprido e Tiacloprido, compostos da classe dos neonicotinóides, com maior polaridade, explicando a baixa recuperação, visto que se trabalhou com solventes apolares para a extração dos analitos.

Os compostos que apresentaram bons valores de recuperação no método foram: Diuron, Fipronil, Piraclostrobina e Piridabem, suas estruturas estão exibidas abaixo:

Figura 6 - Representação estrutural dos compostos estudados



5.2. Seleção dos solventes extrator e dispersor

De acordo com os resultados obtidos na validação do método observou-se que a mistura do solvente extrator clorofórmio (150 μL) junto com o solvente dispersor acetonitrila (2 mL) apresentou os melhores resultados. Além dos dados obtidos a partir do equipamento, o volume da fase sedimentada também foi levado em conta, visto que a injeção no equipamento em que o trabalho foi realizado foi feita manualmente, e com volumes menores que 100 μL havia a formação de bolhas na seringa as quais impossibilitavam a injeção.

5.3. Condições de operação do HPLC-DAD

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de C18-A com diâmetro de partícula de 5 μm e dimensões 250 x 4,6 mm. Coluna de fase reversa utilizada quando a fase estacionária é menos polar que a fase móvel.

Para melhor separação dos compostos de interesse utilizou-se o sistema gradiente de fase móvel. Após diversas alterações nas proporções dos solventes, visando a melhor separação dos picos na corrida cromatográfica,

obteve-se a uma proporção tida como ideal a qual está representada na tabela 2:

Tabela 2 - Gradiente utilizado para separação dos analitos.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água acidificada (pH= 3) (%)
0	25	75
5	25	75
10	30	70
15	100	0
20	100	0
35	25	75

Tempo total de corrida: 35 minutos
Vazão: 1,0 mL.min⁻¹

Foram utilizados 100 µL de amostra para cada injeção que foi feita manualmente com o auxílio de uma seringa. Os analitos foram analisados primeiramente na faixa e 200 a 300 nm, com isso, pode-se observar uma melhor análise dos compostos de interesse no comprimento de onda fixo em 260 nm.

5.4. Validação do método analítico

5.4.1. Determinação da linearidade das curvas analíticas

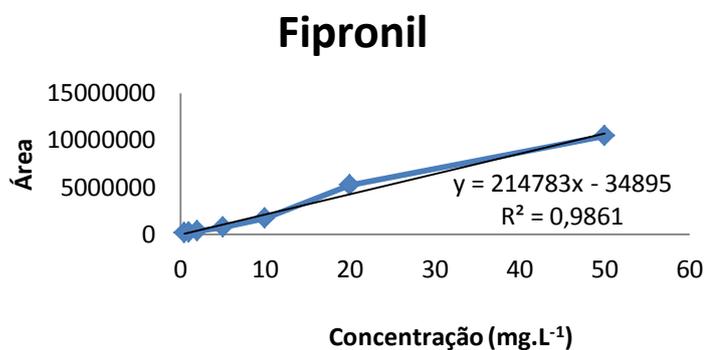
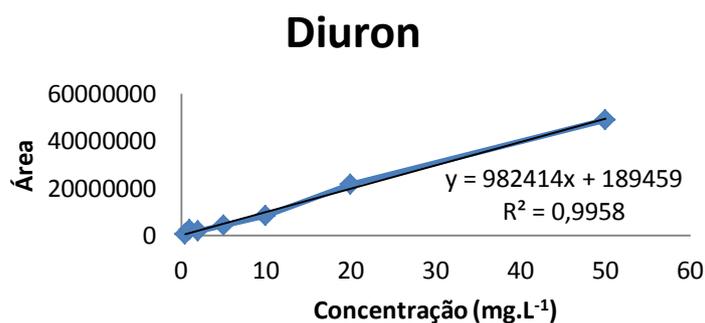
A curva analítica apresentou-se linear entre 0,5 e 50 mg L⁻¹. Com um coeficiente de determinação maior que 0,98 para todos os compostos.

Tabela 3 - Médias das áreas para cada analito nas diferentes concentrações da curva analítica.

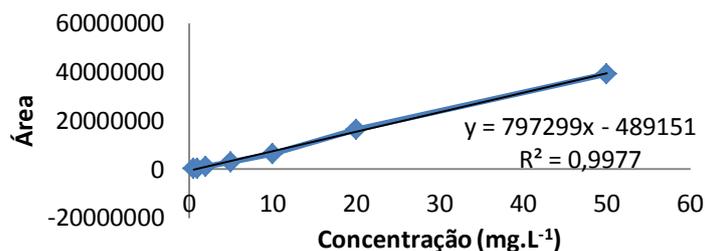
Concentração mg.L ⁻¹	Área média			
	Diuron	Fipronil	Piraclostrobina	Piridabem
0,5	494202,3	142237	386297	98735,33
1,0	2476565	199169,33	400600	163448,3
2,0	1962054	360544	1253641,66	288303,7
5,0	4371760	740136,33	3039241,66	783682,7
10	8438931	1672608,66	6353136,66	1540496
20	21516211	5204208	16476764,33	3661810
50	49010170	10445086	39227242	8715854

Os resultados podem ser melhor observados nas figuras a seguir:

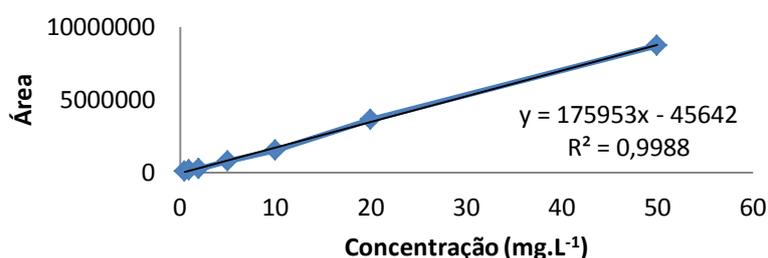
Figura 7 - Curva analíticas dos compostos estudados



Piraclostrobina



Piridabem



5.4.2. Determinação e estimativa do LD e LQ dos instrumentos e do método

Na tabela 4, estão representados os limites de detecção e o limite de quantificação do instrumento, os limites de detecção e o limite de quantificação do método para DLLME, bem como, os coeficientes de correlação do método. Na determinação do LOQ foi considerado um fator de concentração de 53 vezes. Os cálculos foram realizados conforme item 3.5.4. do presente trabalho.

Tabela 4 - Resultados dos limites de quantificação e detecção do instrumento e do método

Compostos	LODi (mg.L ⁻¹)	LODm (mg.L ⁻¹)	LOQi (mg.L ⁻¹)	LOQm (mg.L ⁻¹)
Diuron	3,62	0,06	12,08	0,22
Fipronil	6,50	0,12	21,65	0,40
Piraclostrobina	2,27	0,04	7,57	0,14
Piridabem	4,05	0,07	13,49	0,25

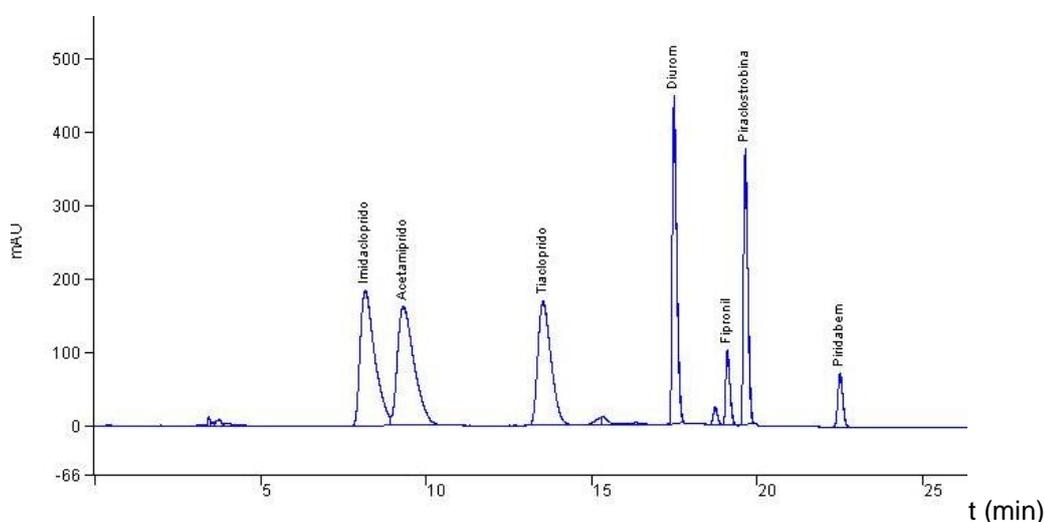
5.4.3. Ensaios de fortificação

Os ensaios de fortificação mostraram-se satisfatórios para os compostos diuron, fipronil, piraclostrobina e piridabem pois ficaram dentro da margem esperada (50-120%), porém, para acetamiprido, imidacloprido e tiacloprido esses valores ficaram um pouco abaixo do esperado (figura 17). Essa recuperação inferior a 50% pode ser explicada pela polaridade dos compostos, os quais são mais polares não possuindo tanta efetividade na extração com compostos orgânicos apolares.

Os valores dos desvios padrões relativos se mostraram dentro do esperado para todos os compostos no branco fortificado 10 mg.L^{-1} com exceção do fipronil, que teve valores acima de 20% (figura 18).

Um cromatograma de 50 mg L^{-1} pode ser visto na figura 16, exibindo picos simétricos e separados.

Figura 8 - Cromatograma da mistura do analitos na concentração 50 mg.L^{-1}



Neste cromatograma também pode ser constatada a maior polaridade dos compostos da classe dos neonicotinóides, pois são os primeiros compostos a serem eluidos em uma coluna de fase reversa, onde a fase estacionária é apolar.

Figura 9 - Resultados da recuperação em dois níveis de fortificação

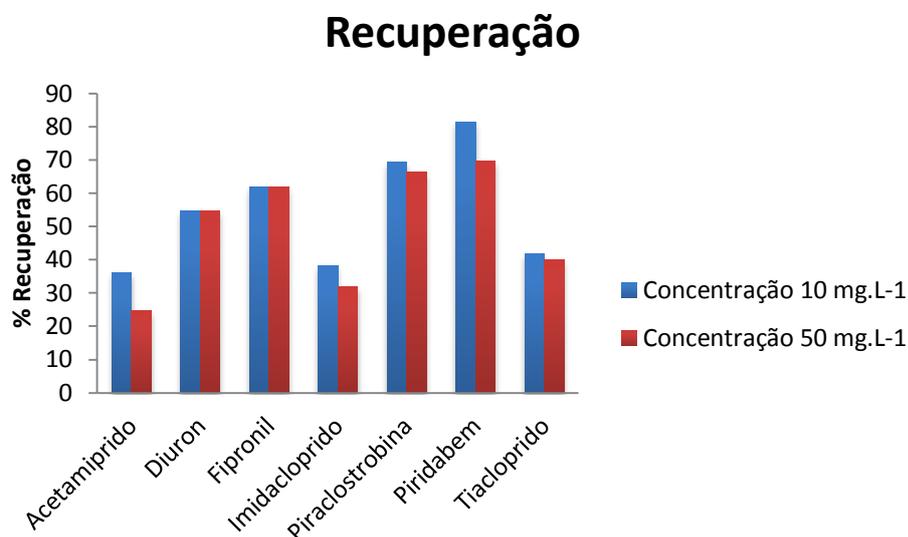
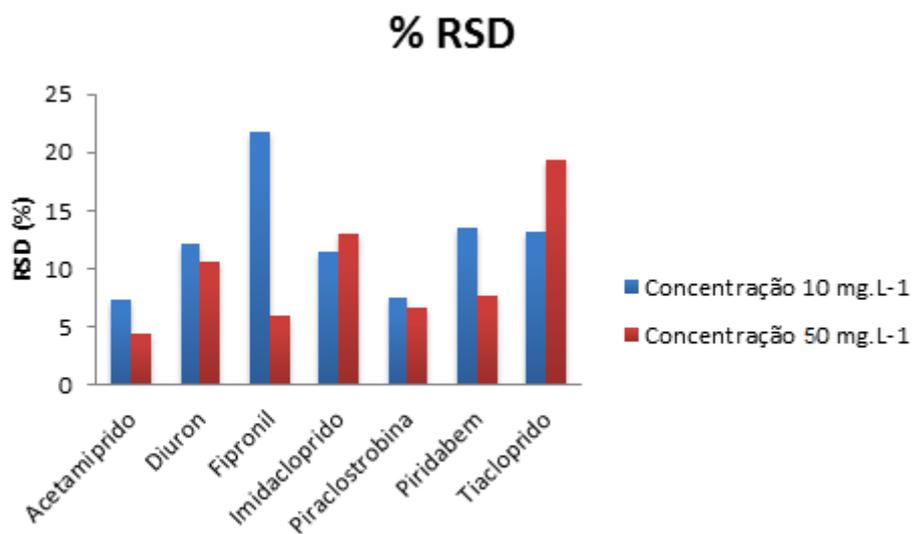


Figura 10 - Resultados do cálculos do desvio padrão relativo

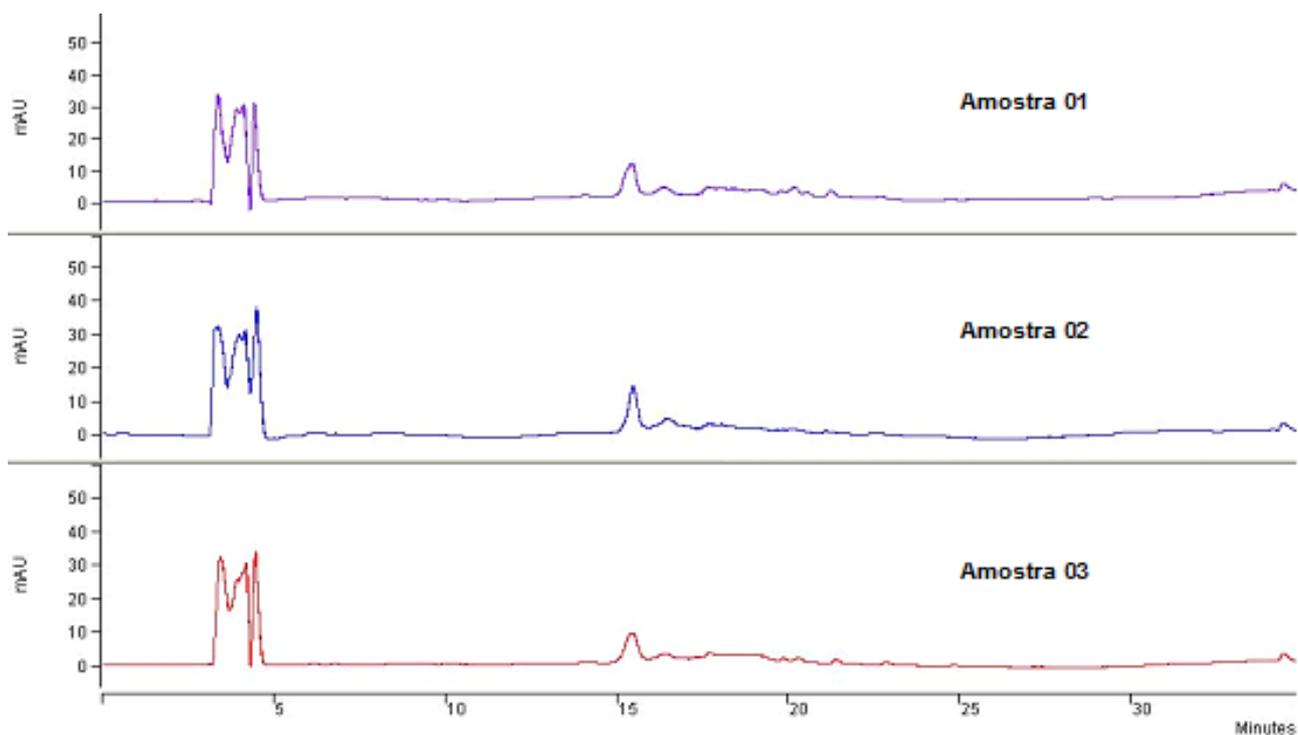


5.4.4. Aplicação do método em amostras reais:

Nas amostras analisadas, de Mata (amostra 01), Santo Antônio da Patrulha (amostra 02) e de Frederico Westphalen (amostra 03) não foram

encontrados nenhum resíduo dos agrotóxicos estudados. Devido a baixa detectabilidade do instrumento utilizado, estes resultados poderiam ser confirmados, em trabalhos futuros, utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, que possui baixos valores de LOQ e LOD.

Figura 11 - Cromatogramas das amostras analisadas



6. CONCLUSÕES

Manter as águas em condições adequadas ao uso é um dever de todos, visto que, dependemos diretamente deste bem natural.

O desenvolvimento de métodos analíticos capazes de distinguir entre uma água de boa qualidade (em aspectos químicos e microbiológicos) e outra de má qualidade, são imprescindíveis para garantir a saúde dos que a utilizam.

Além da aplicação em uma matriz de grande importância, o método estudado e aplicado mostrou-se prático e rápido para a determinação de resíduos de diuron, fipronil, piraclostrobina e piridabem em água. A análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) mostrou-se eficiente na separação dos picos cromatográficos.

A técnica de DLLME além de ser rápida, exibiu a vantagem de permitir a grande concentração dos analitos, o que possui grande importância, já que, estes compostos geralmente se encontram em nível de traço no ambiente. Todos os parâmetros cromatográficos foram otimizados no decorrer do estudo, encontrando o melhor gradiente e comprimento de onda para separação e detecção dos analitos.

A linearidade das curvas analíticas manteve-se entre 0,5 e 50 mg L⁻¹ com coeficiente de correlação maior que 0,98. A recuperação mostrou-se entre 50 e 120%, com desvio padrão relativo (%RSD) menor que 20%.

As três amostras avaliadas não apresentaram sinais referentes aos compostos estudados.

7. PERSPECTIVAS

Posterior ao desenvolvimento e aplicação do método proposto, pretende-se além de ampliar o método para mais compostos, estudar diferentes solventes extratores, com o intuito de melhorar a extração dos analitos que possuem maior polaridade.