

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
BACHARELADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

CRISTIANE WITCEL

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS
EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIÓDOS
(CLAE-DAD)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA

2014

CRISTIANE WITCEL

**ESTUDOS PRELIMINARES PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS
EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIÓDOS
(CLAE-DAD)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental, do curso superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientador: Prof. Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores

MEDIANEIRA

2014

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica para determinação de pesticidas da classe dos carbamatos em água subterrânea usando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). Para o desenvolvimento da metodologia proposta utilizou-se um cromatógrafo a líquido de ultraeficiência (UHPLC) equipado com detector DAD este equipamento pode ser utilizado pois o mesmo permite que sejam verificadas as concentrações dos compostos através das áreas apresentadas nos cromatógrafos. Para amostras e soluções de referência foi necessária uma etapa preliminar de pré-concentração usando um sistema de extração em fase sólida. Para a determinação dos pesticidas por CLAE-DAD, alguns parâmetros de influência foram ajustados e estabelecidos, como por exemplo, tipo de fase móvel e vazão da fase móvel. A calibração externa resultou em linearidade apenas para os analitos Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb, Carbaryl e Methiocarb com faixas de trabalho a partir de 10,0; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção obtidos foram adequados para as determinações de pesticidas conforme os valores máximos previstos na Portaria 2914 do Ministério da Saúde.

Palavras-chave: Águas subterrâneas. Pesticidas. Cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

This research aimed to develop an analytical methodology for determination of pesticides of the carbamates class in groundwater using High Performance Liquid Chromatography technique with Diode Array Detector (HPLC-DAD). For the development of the proposed methodology was used a Ultra High Performance Liquid Chromatograph (UHPLC) equipped with DAD detector this equipment can be used as it allows the concentrations of the compounds to be checked through the areas presented in chromatographs. For sample and reference solutions a preliminary step of pre-concentration is required an extraction system using solid phase. For the determination of pesticides by HPLC-DAD, some influence parameters have been adjusted and set, for example, the type of mobile phase and the mobile phase flow. The external calibration resulted in linearity only for the analytes aldicarb sulfoxide, aldicarb, carbaryl and methiocarb with work ranges from 10.0; 10.0; 0.5 and 1.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The limits of detection obtained were suitable for pesticide determinations as the maximum permissible values of the Ordinance 2914 of the Ministry of Health.

Keywords: Groundwater. Pesticides. High Performance Liquid Chromatography.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3.1 AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE	7
3.2 CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS NO BRASIL	7
3.3 A AGRICULTURA PARANAENSE	8
3.4 POTABILIDADE	9
3.5 INSETICIDAS CARBAMATOS	11
3.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS	13
3.6.1 Os Analitos em CLAE	13
3.6.2 Fase Móvel para CLAE	13
3.6.3 Detecção em CLAE	13
3.7 FATORES QUE AFETAM A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	14
3.8 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	14
3.9 ESTUDOS REALIZADOS COM O MÉTODO CLAE	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA REGIÃO	16
4.2 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS	16
4.3 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	17
4.4 PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	18
4.5 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) ...	19
4.5.1 Procedimento Analítico	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6 CONCLUSÕES	26
7 REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com a intensificação das áreas destinadas às atividades de agricultura, a utilização de agrotóxicos foi em intensificada em diversas culturas. Com este cenário, os impactos ambientais da presença de agrotóxicos no meio ambiente vieram à tona como um dos principais problemas ambientais do século XXI. Os compartimentos ambientais solo e água (águas superficiais e subterrâneas) estão diretamente expostos a este tipo de contaminação.

Para atingir as águas subterrâneas os agrotóxicos infiltram de forma difusa, o que torna a detecção da contaminação e mitigação de impactos muito mais complicada. Em muitos países vários agrotóxicos são proibidos há anos e mesmo assim existem estudos que constataam a presença de agrotóxicos proibidos em águas subterrâneas.

Como as águas subterrâneas são locais isolados de baixa temperatura, com falta de oxigênio, ausência de luz e baixa atividade microbológica, se torna difícil a degradação das moléculas de agrotóxico que ali se encontram. Frequentemente, o uso de águas subterrâneas é destinado ao consumo humano, portanto, o uso destas águas contaminadas por populações podem ser um problema de saúde pública.

No Brasil são estabelecidos padrões de potabilidade de águas para fins de consumo humano, quem estabelece esses padrões são a resolução CONAMA nº 396/2008 e a Portaria do Ministério da Saúde nº 2914/2011, porém ambas as legislações vigentes não contemplam parâmetros para todos os agrotóxicos e, neste caso, os limites máximos permitidos vão depender de cada agrotóxico.

Para determinar a presença de agrotóxicos pode-se utilizar Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de Arranjo de Diodos (CLAE – DAD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Massas, entre outros.

No presente trabalho utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de Arranjo de Diodos (CLAE – DAD) por ser o equipamento disponível no momento para a determinação de inseticidas da classe Carbamatos em água subterrânea: 3-hidroxicarbofuram, Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb Sulfone, Carbaryl, Carbofuram, Metiocarb, Metomil, Oxamil e Propoxur.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma metodologia analítica para determinação de pesticidas da classe dos carbamatos em água subterrânea usando a técnica CLAE-DAD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram os objetivos do presente trabalho:

- Verificar os principais agrotóxicos utilizados na região;
- Identificar as condições mais apropriadas para determinação de pesticidas por CLAE-DAD;
- Ajustar e estabelecer as principais condições para determinação dos pesticidas por CLAE-DAD;
- Identificar as condições mais apropriadas para pré-concentração de pesticidas em amostras reais e ajustar as mesmas;
- Caracterizar a metodologia para determinação de pesticidas por CLAE-DAD.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 AGROTÓXICOS NO MEIO AMBIENTE

Sendo um típico representante dos países em desenvolvimento, o Brasil no ano de 2000 se apresentou como um país com grande diversidade em termos de agricultura e em constante crescimento de produção (AZEVEDO; COLOGNESE; SHIKIDA, 2000), com o aumento da produção ocorre também uma crescente preocupação com as consequências das aplicações de agrotóxicos no meio ambiente.

A partir da 2ª Guerra Mundial, houve uma grande expansão na utilização de agrotóxicos na agricultura, isso ocorreu graças à descoberta e desenvolvimento de agrotóxicos organossintéticos (AMORO, 2003). Segundo Savoy (2011), “os agrotóxicos organossintéticos pertencem aos grupos químicos organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides”. Esse aumento de consumo também ocorreu por causa do aumento da facilidade de aplicação destes agrotóxicos, pelo aumento de apoio dos técnicos das empresas produtoras de agrotóxicos e pelo aumento de eficácia no controle de insetos e plantas indesejáveis (AMORO, 2003).

Esse crescimento traz consigo uma grande preocupação, os efeitos secundários causados pelos agrotóxicos no meio ambiente, dentre os principais efeitos são intoxicações humanas e de animais domésticos, mortalidade de componentes da fauna e também da flora, efeitos estes causados por resíduos de pesticidas em alimentos, em águas superficiais e subterrâneas (SILVA, *et al.*, 2011). No ano de 2012 o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (BELO, *et al.*, 2012).

3.2 CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS NO BRASIL

Sistemas agrícolas de produção intensiva elevam a necessidade do uso de pesticidas para o controle de pragas, porém “a utilização não criteriosa destes produtos podem comprometer a qualidade das águas superficiais e subterrâneas” (ANDRADE *et al.*, 2011).

Em cultivos de monoculturas, como milho, trigo e soja, a contaminação das águas subterrâneas pode ser determinada através do “transporte descendente, o qual pode depender de diferentes fatores como profundidade do manancial e propriedades físico-químicas dos agrotóxicos” (SILVA, *et al.*, 2011).

Segundo Amoró (2003), os contaminantes que frequentemente são detectados em águas subterrâneas são os herbicidas, isso ocorre pois os herbicidas podem ser utilizados desde o plantio até próximo da colheita, tendo tempo suficiente para se degradarem, infiltrarem o solo e chegarem até o nível onde se encontra as águas subterrâneas.

No Brasil foram realizados alguns estudos que buscaram observar possíveis resíduos de agrotóxicos em alguns tipos de monocultura. Nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estudos foram realizados em cultivos de arroz irrigado. Neste estudos, observou-se a presença de resíduos dos agrotóxicos fipronil (presença em 87% das amostras), imazethapyr (presença em 42% das amostras), clomazone (presença em 23% das amostras), imazapic (presença em 19% das amostras) e quinclorac (presença em 2% das amostras), sendo que apenas as concentrações de fipronil ultrapassaram os limites de potabilidade utilizados no estudo (potabilidade proposta pela União Europeia) (SILVA, *et al.*, 2011), porém ainda são poucos os estudos envolvendo agrotóxicos em água subterrânea.

3.3 A AGRICULTURA PARANAENSE

Entre as décadas de 60 e 70, a agricultura paranaense passou por uma fase de modernização com um aumento na utilização de máquinas, de implementos e de insumos agrícolas (AZEVEDO; COLOGNESE; SHIKIDA, 2000). Essas transformações foram sentidas particularmente na região Oeste do Paraná, sobretudo para a produção de soja e milho (AZEVEDO; COLOGNESE; SHIKIDA, 2000), que são atividades de grande importância econômica na região. Segundo dados do IBGE as atividades de milho, soja e trigo somadas totalizaram 3,82% (em área plantada, 7.619, 708 hectares) da superfície total do estado que era de 199.307,922 hectares no ano de 2007.

No ano de 2010 o Brasil era o maior produtor de soja do mundo, produzindo aproximadamente 68 milhões de toneladas por ano. Os principais estados brasileiros

produtores de soja são os estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul somando 81,55% da produção nacional (BRASIL, 2010). Segundo o Anuário Estatístico do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a produção de soja no Brasil cresceu aproximadamente 260% entre os anos de 1990 e 2005 (BRASIL, 2005), esse aumento traz consigo um aumento no consumo de herbicidas (BELO, *et al.*, 2012). No oeste do Paraná a safra de soja é regularmente praticada pelos produtores (ALBRECHT, *et al.*, 2009).

No Brasil a produção de milho tem grande importância econômica, tendo em vista que o governo possui medidas de estímulo a produção de milho, um exemplo é o Sistema Nacional de crédito Rural (SNCR) que incentiva a mecanização, à adubação racional e orientada, o uso de sementes selecionadas, à rotação de cultura, à irrigação e o uso de defensivos (SOUSA, 1999). Além disso, o milho é uma cultura doméstica que se disseminou por todo o território nacional, fazendo com que o mesmo fizesse parte da alimentação da população mais pobre, a produção do milho é realizada por uma significativa parcela de pequenos produtores (SOUSA, 1999). No Estado do Paraná a produção de milho, é uma produção já consolidada e apesar da diversidade da produção agrícola paranaense, o milho tem uma grande importância econômica e social no Estado representando cerca de 23,7% da produção agrícola do Estado (MARTIN, 2011). O desenvolvimento da cultura de milho pode ser afetada negativamente por aplicação de técnicas de manejo inadequadas, sendo assim, para realizar o controle de doenças, plantas daninhas e pragas que aparecem no local onde foram aplicados incorretamente as técnicas de manejo, é aplicado na área de cultivo de milho alguns agrotóxicos que podem vir a afetar negativamente o meio ambiente, conseqüentemente, contaminando o solo, as águas superficiais e subterrâneas e o ar (MARTIN, 2011).

3.4 POTABILIDADE

A água para ser considerada potável, deve atender aos parâmetros estabelecidos pela Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde. A Portaria estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Para Agrotóxicos, a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 determina os parâmetros apresentados na Tabela 1 para potabilidade de água utilizada para consumo.

Tabela 1. Limites permitidos pela Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 para agrotóxicos em água potável.

Parâmetro	Limite Permitido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
2,4 D + 2,4,5 T	30
Alaclor	20
Aldicarbe	10
Aldicarbessulfona	10
Aldicarbessulfóxido	10
Aldrin	0,03
Atrazina	2
Benomil	120
Carbendazim	120
Carbofurano	7
Clordano	0,2
Clorpirifós	30
clorpirifós-oxon	30
DDD	1
DDE	1
DDT	1
Dieldrin	0,03
Diuron	90
Endossulfan	20
Endrin	0,6
Glifosato	500
Lindano	2
Mancozebe	180
Metamidofós	12
Metolacloro	10
Molinato	6
Parationa Metílica	9
Pendimentalina	20
Permetrina	20
Profenofós	60
Simazina	2
Sulfato	20
Tebuconazol	180
Terbufós	1,2
Trifluralina	20

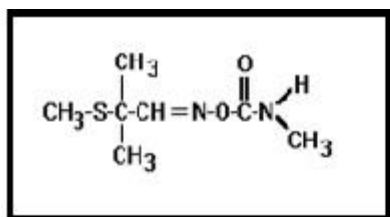
Fonte. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.

3.5 INSETICIDAS CARBAMATOS

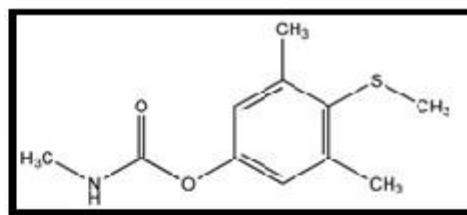
Os principais pesticidas que representam a classe química dos “carbamatos” são os seguintes: aldicarb, aldicarbsulfone, methiocarb, 3-hydroxycarbofuran, carbaryl, oxamyl, propoxur, aldicarbsulfoxide, carbofuran e methomyl. Pelo seu uso ser frequente em diversas culturas, estes pesticidas podem ocorrer como contaminantes em águas subterrâneas.

Segundo o Savoy (2011), os Carbamatos são “compostos que apresentam em comum a estrutura fundamental do ácido N-metilcarbâmico. Exemplo: carbaril (sevin), carbofuran e propoxur”.

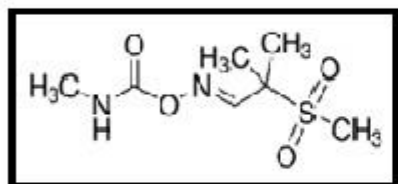
Na figura 1 esta apresentado a estrutura química dos pesticidas.



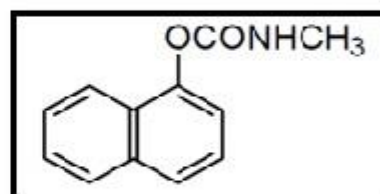
Aldicarb



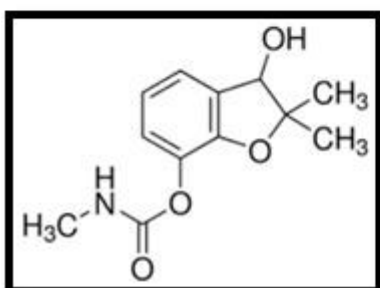
Methiocarb



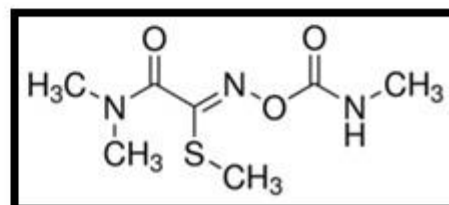
Aldicarb Sulfone



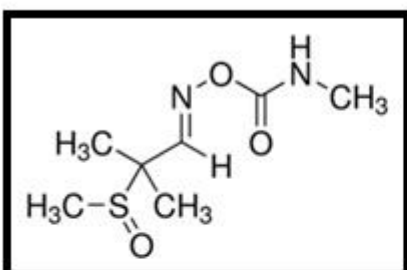
Carbaryl



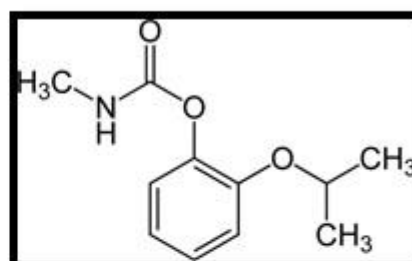
3-hydroxycarbofuran



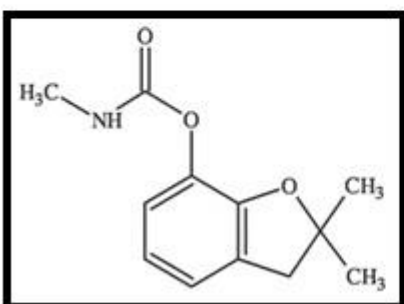
Oxamyl



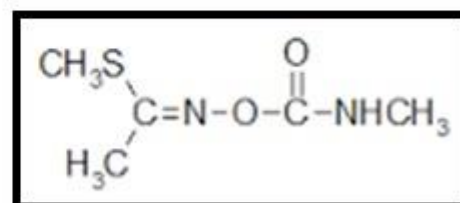
Aldicarb Sulfoxide



Propoxur



Carbofuran



Methomyl

Figura 11. Estrutura química dos pesticidas.

3.6 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS

A cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos é uma ferramenta analítica frequentemente utilizada na detecção de resíduos de agrotóxicos em amostras de água (CALDAS, 2011; SILVA, 2011).

Segundo Silva (2011) “métodos baseados no HPLC são adequados para uma variedade de compostos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica”.

3.6.1 Os Analitos em CLAE

Para evitar problemas na quantificação dos analitos, como por exemplo reações secundárias, com impurezas ou degradações na sua estrutura durante a aplicação do método analítico, é de suma importância se obter as propriedades físico-químicas dos mesmos (SILVA, 2011).

Uma propriedade físico-química muito importante é a solubilidade da amostra no solvente usado para a eluição cromatográfica (fase móvel) a ser utilizada, pois as amostras podem sofrer reações indesejáveis quando solubilizados no eluente, o solvente a ser utilizado deve ser um solvente compatível (SILVA, 2011). A escolha do solvente de eluição está relacionada com a polaridade do agrotóxico (CALDAS, 2011).

3.6.2 Fase Móvel para CLAE

As fases móveis utilizadas frequentemente em CLAE para separação de pesticidas são misturas de metanol:água (MeOH:H₂O) ou acetonitrila:água (ACN:H₂O) com ajuste da força cromatográfica e seletividade da fase móvel até se obter resolução suficiente para que ocorra a separação de todos os picos cromatográficos no mínimo tempo de análise. (SILVA, 2011)

3.6.3 Detecção em CLAE

Os detectores de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta e por fluorescência começaram a ser utilizados nos equipamentos de CLAE para análise de compostos que absorvem na região do ultravioleta, entretanto, os valores dos

limites de detecção alcançados para detectores de UV são bem mais altos, na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ (SILVA, 2011).

Para análises ambientais onde os limites de detecção se encontram na faixa de concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, o detector de UV pode ser utilizado desde que haja uma etapa preliminar de pré-concentração ou ainda, “quando a concentração dos analitos na matriz é mais elevada” (SILVA, 2011).

3.7 FATORES QUE AFETAM A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida exige uma diferença em retenção e uma boa eficiência na separação de substância químicas.

O primeiro requisito que deve ser cumprido em cromatografia líquida é a solubilidade das substancias em algum líquido que possa ser injetado no cromatografo, a solubilidade depende da polaridade dos compostos. O segundo requisito é a existência de uma diferença de retenção entre os analitos a serem separados, a retenção dependera da interação dos compostos com a fase móvel e com a coluna (fase estacionária) essa pode ser ajustada através dos ajuste da temperatura (HAGE & CARR, 2012).

3.8 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida começou a ser utilizada na década de 70 e começou a ser comercializada em forma de cartuchos em 1978 com o objetivo de isolar analitos presentes em uma matriz complexa (CALDAS, 2011).

Para realizar o isolamento e pré-concentração de agrotóxicos a amostra aquosa é percolada em um cartucho contendo o sorbente, onde os analitos são retidos para posterior eluição com uma pequena quantidade de solvente orgânico adequado (CALDAS, 2011).

Para escolher o sorbente a ser utilizado deve-se levar em consideração as características do analito de interesse, os sorbentes mais utilizados na extração de

agrotóxicos em água são os cartuchos C₁₈ que são utilizados na extração de herbicidas e inseticidas organoclorados (CALDAS, 2011).

3.9 ESTUDOS REALIZADOS COM O MÉTODO CLAE

Vários estudos foram realizados utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Em Bortoluzzi *et. al* (2005), realizou-se estudos para quantificar a presença de moléculas de agrotóxicos em águas superficiais de três unidades paisagísticas com diferentes configurações de uso em uma microbacia hidrográfica do município de Agudo – RS. Os compostos estudados foram o imidacloprid, atrazina, simazina e clomazone em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, os mesmos foram extraídos em cartuchos C₁₈. Os eluentes utilizados foram metanol e acetonitrila. Nos resultados da pesquisa foram detectados os compostos em pelo menos um dos três pontos analisados.

Outro estudo que foi realizado utilizando CLAE foi no município de Jaíba – MG, onde os agrotóxicos clorpirifós, λ -cialotrina, permetrina e bifentrina. As amostras de água foram coletadas em 29 canais de irrigação do município. Para o estudo foram utilizados coluna C₁₈, fase móvel acetonitrila/água, temperatura de 22 °C e comprimento de onda de 220 nm e vazão de injeção de 1,00 mL.min⁻¹. A identificação dos agrotóxicos nos extratos foi realizada por comparação com os tempos de retenção da solução padrão. Nos resultados “os limites de quantificação e detecção encontrados foram suficientemente baixos para quantificar essas substâncias a um nível inferior ao estabelecido pela legislação nacional” (SILVÉRIO *et al.*, 2012).

Outra aplicação foi realizada em Cavenaghi *et. al* (2007), o mesmo buscou estudar a “dinâmica do herbicida amicarbazone aplicado sobre palha de cana-de-açúcar deixada sobre o solo, em sistema decana crua”. A quantificação do herbicida foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Nos resultados observou-se que “quanto maior o intervalo de tempo entre a aplicação do herbicida e a primeira chuva, menor é a lixiviação total do produto” (CAVENAGHI *et al.*, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DETERMINAÇÃO DOS PRINCIPAIS AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE MEDIANEIRA - PR

Para a determinação dos principais agrotóxicos utilizados na região foram realizadas ligações e conversas informais com os principais representantes de venda de agrotóxicos da região.

4.2 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES UTILIZADOS

Para o desenvolvimento da metodologia proposta utilizou-se um cromatógrafo de ultraeficiência (UHPLC) modelo *Ultimate 3000*[®], da marca ThermoScientific, conforme mostrado na Figura 2. Este cromatógrafo é equipado com amostrador automático; sistema de bombeamento quaternário, detector DAD e sistema de termostatização da coluna.



Figura 22. Cromatógrafo de ultraeficiência (UHPLC) utilizado para a determinação de pesticidas.

Todos reagentes utilizados tinham pureza de grau cromatográfico ou espectroscópico. Os reagentes acetonitrila e metanol foram obtidos da Merck KGaA. Para lavagem de vidrarias, diluições, aferições de volumes e demais procedimentos foi utilizada água ultrapura com condutividade inferior a $0,05 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Para filtração de fase móvel e amostras, foi utilizada uma bomba de vácuo. Para a desgaseificação da fase móvel, utilizou-se um banho de ultrassom multifrequencial (37 - 80 kHz) dotado de aquecimento termostaticado na faixa de (30 – 80 °C), modelo *P-30-H*, marca Elmasonic.

Para o procedimento de pré-concentração das amostras foram usados cartuchos de extração com 500 mg de fase sílica recoberta com octadecil, modelo *Chromabond*, marca Macherey–Nagel.

O padrão analítico usado foi o padrão modelo *EPA Methods 431.1 Analytes Mix*[®], contendo os seguintes pesticidas: 3-hidroxicarbofuram, Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb Sulfone, Carbaryl, Carbofuram, Metiocarb, Metomil, Oxamil e Propoxur, na concentração de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ em metanol.

Para a separação cromatográfica dos analitos foi utilizada uma coluna de separação analítica modelo *Acclaim Polar Advantage C16*[®], marca ThermoScientific (Estados Unidos da América).

Para realização dos testes com amostra real, foi coletada uma amostra de água subterrânea de um poço artesiano localizado na UTFPR – Campus Medianeira. A coleta da amostra de água foi feita usando um frasco de vidro âmbar com capacidade de 1 L. A coleta era feita no mesmo dia em que foram realizados os procedimentos de pré-concentração e posterior determinação dos analitos.

4.3 PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Foi preparada uma solução estoque com concentração de 1 mg L^{-1} de cada pesticida a partir da diluição do padrão *EPA Methods 431.1 Analytes Mix*, sendo diluída em metanol a 20% (v/v). A partir da solução estoque, foram preparadas soluções de referência dos pesticidas com concentrações de 0,5; 1,0; 10,0; 15,0 e $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em água ultrapura com condutividade inferior a $0,05 \mu\text{S.cm}^{-1}$. As soluções foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas para o procedimento de calibração.

4.4 PROCEDIMENTO DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO COM EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O procedimento de pré-concentração, conforme mostrado na Figura 3, consistiu da passagem de 250 mL de amostra soluções de referência e branco em cartuchos de extração em fase sólida contendo 500 mg de fase sílica recoberta com octadecil. A passagem de cada solução foi acelerada com aplicação de vácuo de forma que a solução fluía através do cartucho com uma vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. O cartucho usado para extração em fase sólida está mostrado na Figura 4. O mesmo procedimento foi aplicado nas soluções de referência e no branco. Todas as amostras, soluções de referência e branco foram pré-concentradas em triplicata.



Figura 3. Sistema para pré-concentração dos pesticidas presentes em água subterrânea por extração em fase sólida.

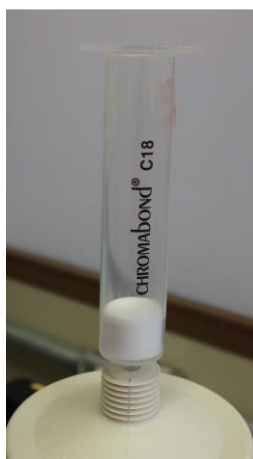


Figura 4. Cartucho para pré-concentração com extração em fase sólida.

Após o procedimento de pré-concentração com extração em fase sólida, os analitos foram eluídos do sorbente pela passagem forçada de 1,5 mL de acetonitrila pura com o auxílio de um êmbulo de seringa encaixado na parte superior do cartucho.

4.5 DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

4.5.1 Procedimento Analítico

Inicialmente, foram preparadas as soluções usadas na fase móvel (acetonitrila grau HPLC e água deionizada), sendo que as mesmas foram filtradas em um sistema de filtração de vidro borossilicato com bomba a vácuo, conforme mostrado na Figura 5 e colocadas em frascos de 800 mL e 500 mL, respectivamente.



Figura 5. Filtração das soluções usadas na fase móvel.

Em seguida, as fases móveis foram degaseificadas com a imersão dos frascos em banho de ultra-som por 15 min (Figura 6). Posteriormente, os frascos foram posicionadas no rack do cromatógrafo (Figura 7).



Figura 6. Desgaseificação das amostras no banho de ultra-som.



Figura 7. Rack para fases móveis do UHPLC.

Para a determinação dos pesticidas por CLAE-DAD, alguns parâmetros de influência foram ajustados e estabelecidos, como por exemplo, tipo de fase móvel, vazão da fase móvel.

Os analitos que eram separados e eluídos da coluna analítica foram monitorados com detector DAD em quatro comprimentos de onda: 196 nm, 203 nm, 210 nm e 213 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram determinados os principais agrotóxicos que são utilizados na região e através deste dados foi determinado qual das classes verificadas seriam possíveis de serem analisadas no laboratório. A classe determinada foi a classe carbamatos: 3-hidroxicarbofuram, Aldicarb, Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb Sulfone, Carbaryl, Carbofuram, Metiocarb, Metomil, Oxamil e Propoxur

Após a determinação dos agrotóxicos foram determinados os principais parâmetros de influência sobre a separação cromatográfica dos analitos e após foram ajustados para obter a melhor resolução possível para o sinal de cada um dos dez analitos. Para estes ajustes, foi utilizada uma solução de referência contendo os dez analitos a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, cada, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Ensaios teste realizados

CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DOS ANALITOS			
VARIÁVEIS	1º TENTATIVA	2º TENTATIVA	3º TENTATIVA
Temperatura (°c)	30	25	25
Fase móvel	acetonitrila/água	acetonitrila/água	acetonitrila/água
Gradiente (%acn inicial-%acn final)	0-50	10-90	30-70
Tempo de corrida (minutos)	30	40	40

Pelos ensaios realizados observou-se que as condições da segunda tentativa expressavam resultados melhores.

A coluna utilizada para separação foi a *Acclaim Polar Advantage C16*[®] por ser adequada ao método. Para a separação dos analitos seguiu-se as condições recomendadas pelo fabricante (ThermoScientific, Estados Unidos da América). Neste caso, a temperatura do forno da coluna foi fixada em 25 °C e a fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e água. Foram feitos testes exploratórios para o ajuste da melhor fase móvel, foi necessário a eluição no modo gradiente, ou seja, com variação da composição da fase móvel durante a separação. Para a eluição

com gradiente, a composição da fase móvel foi variada gradativamente e o tempo de separação foi de 40 min. Foram feitas corridas cromatográficas com eluição com gradientes iniciando com 0 e 10 e 30% (v/v) de acetonitrila e finalizando com 50, 90 e 70% (v/v) de acetonitrila, respectivamente.

Conforme pode ser observado na Figura 8, a condição mais adequada para separação dos analitos foi iniciando em 10% (v/v) de acetonitrila e finalizando a eluição com 90% (v/v) de acetonitrila.

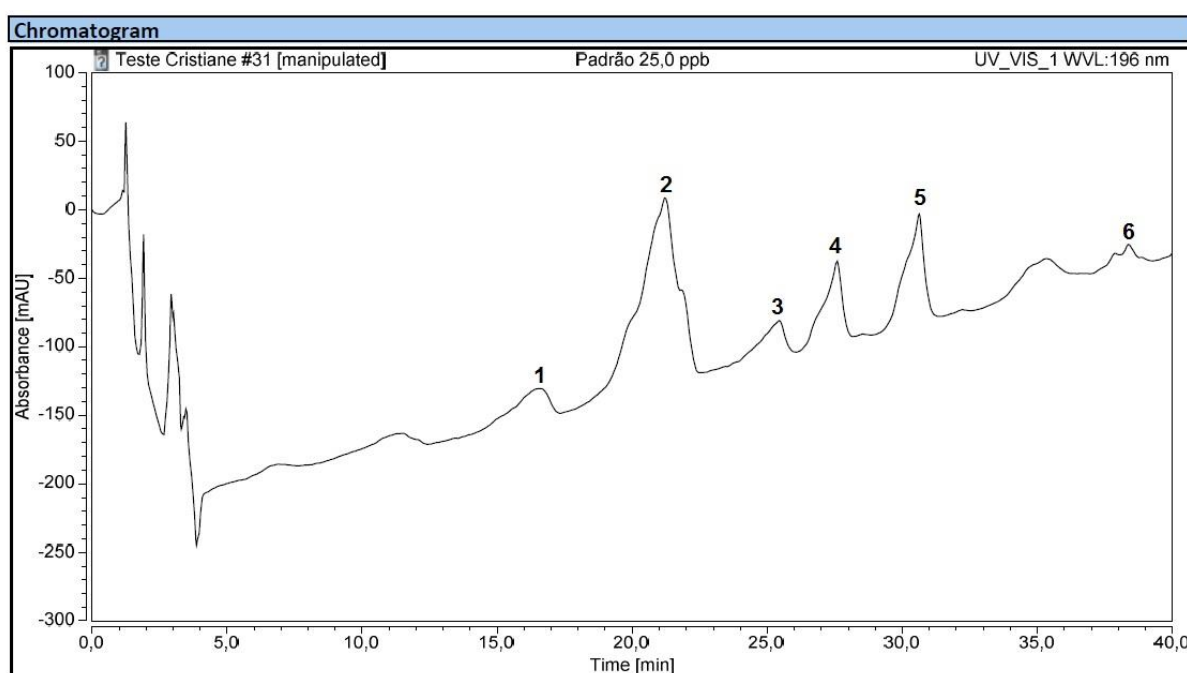


Figura 8. Cromatograma da solução de referência contendo $25,0 \mu\text{g l}^{-1}$ dos pesticidas. Identificação dos analitos: 1- Aldicarb sulfoxide; 2 – Aldicarb sulfone, Oxamyl, Methomyl e 3-Hydroxycarbofuran; 3 – Aldicarb; 4 – Propoxur e Carbofuran; 5 – Carbaryl e 6 – Methiocarb

Pode-se observar no cromatograma da Figura 8 e nos tempos de retenção dos analitos mostrados na Tabela 3 que os analitos Aldicarb sulfone, Oxamyl, Methomyl e 3-hydroxycarbofuran (segundo pico) não foram separados nestas condições. No quarto pico, o mesmo problema ocorreu, não sendo possível a separação dos analitos Propoxur e Carbofuran. A ordem de eluição foi comparada segundo informações do fabricante mesmo nas condições ajustadas, foi possível integrar as áreas apenas dos analitos Aldicarb sulfoxide, Aldicarb, Carbaryl e Methiocarb.

Tabela 3. Tempo de retenção dos pesticidas determinados por CLAE-DAD.

Pesticidas	Tempo de Retenção (min)
Aldicarb Sulfoxide	16,6
Aldicarb Sulfone	20,3
Oxamyl	21,1
Methomyl	21,2
3-Hydroxycarbofuran	21,7
Aldicarb	25,4
Propoxur	27,3
Carbofuran	27,5
Carbaryl	30,6
Methiocarb	38,3

Para a calibração do instrumento, foi utilizado o método de calibração externa, com soluções de referência de 0,5; 1,0; 10,0; 15,0 e 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos analitos. Todas as soluções de referência foram submetidas ao processo de pré-concentração com extração em fase sólida e após os analitos retidos no sorbente foram eluídos com 1,5 mL de acetonitrila diretamente para os *vials* de amostra. Conforme mostrado na Tabela 4, a calibração externa foi possível para apenas para os analitos que foram separados e eluídos com resolução adequada, sendo possível a integração da suas áreas. Para a etapa de pré-concentração, usou-se 250 mL de cada solução de referência.

Tabela 4. Equações de regressão linear obtidas com o método de calibração externa.

Pesticidas	Equação	R ²
Aldicarb Sulfoxide	*1y = 0,9196x* - 3,3422	0,9998
Aldicarb	*1y = 1,0182x* - 3,2495	0,9938
Carbaryl	*1y = 2,1173x* + 3,5831	0,9993
Methiocarb	*1y = 0,0734x* + 0,6346	0,9680

*x: Concentração do pesticida

*1y: área do pico

Para os analitos em que foi possível a calibração externa, foram obtidos coeficientes de correlação acima de 0,96 mostrando que o método de calibração utilizado resultou em resposta linear para os quatro analitos (Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb, Carbaryl e Methiocarb). Entretanto, as faixas de trabalho em que houve

linearidade foram distintas para os quatro analitos: Aldicarb Sulfoxide e Aldicarb: 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$; Carbaryl: 0,5 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Methiocarb: 1,0 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Após a calibração do instrumento a amostra real e a amostra fortificada foram analisadas usando as condições cromatográficas previamente estabelecidas. Na Tabela 5 estão mostrados os valores obtidos para os quatro analitos em que foi possível a calibração.

Tabela 5. Concentração dos pesticidas nas amostras analisadas. Valores médios e desvios-padrão para 3 replicatas de cada amostra.

Pesticidas	Amostra real de água subterrânea ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostra fortificada de água subterrânea ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Aldicarb Sulfoxide	3,63 \pm 0,3	39,91 \pm 3	214,2
Aldicarb	<LD \pm 0,3	16,60 \pm 3	110,7
Carbaryl	1,70 \pm 0,3	29,22 \pm 3	175,0
Methiocarb	0,63 \pm 0,3	-	-

Conforme pode ser observado na Tabela 5, para a amostra real de água subterrânea foram detectados os analitos Aldicarb Sulfoxide, Carbaryl e Methiocarb. Porém, o valor determinado para Aldicarb Sulfoxide está abaixo dos limites máximo permissível (VMP) previsto na Portaria 2914 do Ministério da Saúde. Para os pesticidas Carbaryl e Methiocarb não há VMP previsto nesta resolução, mas os valores podem ser considerados como relativamente baixos quando comparados aos VMP previstos para os outros pesticidas constantes na Tabela 1.

Nos testes de recuperação de analitos foram obtidos valores bastante elevados para Aldicarb Sulfoxide e Carbaryl. Para o Methiocarb, o valor para o teste de recuperação foi superior a 500%, não sendo considerado. A possível causa para esses valores elevados deve-se a erros aleatórios na etapa de pré-concentração dos analitos e/ou problemas de contaminação em procedimentos preliminares à etapa de determinação. Entretanto, para o pesticida Aldicarb, o teste de recuperação foi adequado.

Na Figura 9 está mostrado o cromatograma para amostra fortificada. Pode-se observar que os picos dos quatro analitos determinados apresentaram boa resolução cromatográfica, sendo possível a integração das áreas dos sinais com boa exatidão.

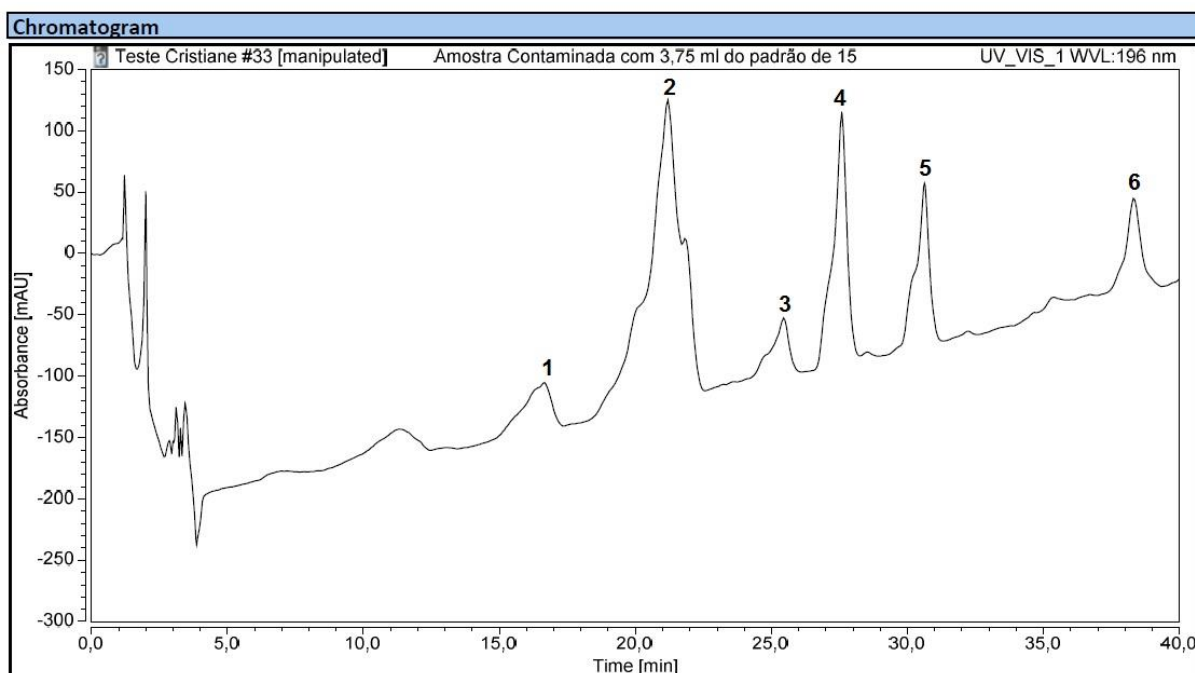


Figura 9. Cromatograma da amostra fortificada para uma concentração de $15,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Identificação dos analitos: 1- Aldicarb sulfoxide; 2 – Aldicarb sulfone, Oxamyl, Methomyl e 3-Hydroxycarbofuran; 3 – Aldicarb; 4 – Propoxur e Carbofuran; 5 – Carbaryl e 6 – Methiocarb

Os desvios-padrão para 3 replicatas de amostras e das soluções de referência foram inferiores a 4% para os analitos determinados, podendo-se considerar que as determinações por CLAE-DAD apresentaram boa precisão, mesmo considerando as concentrações relativamente baixas para os analitos na amostra real.

Os limites de detecção (LD) obtidos para os analitos Aldicarb Sulfoxide, Aldicarb, Carbaryl e Methiocarb foram de 3,3; 3,3; 0,2 e $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Dessa forma, a determinação destes pesticidas por CLAE-DAD com a etapa preliminar de pré-concentração com extração em fase sólida é possível, considerando que os valores de LD estão bem abaixo dos VMP previstos na Portaria 2914 do MS. Além disso, as faixas de trabalho obtidas com calibração externa também contemplam os VMP para Aldicarb Sulfoxide e Aldicarb previstos nesta Portaria.

6 CONCLUSÕES

Nesta pesquisa dentre os dez analitos que compõem a solução de referência utilizada, apenas quatro (Aldicarb sulfoxide, Sldicarb, Carbaryl e Methiocarb) apresentaram uma resposta linear para a calibração externa. Possivelmente, erros no processo de pré-concentração, como por exemplo, a baixa eficiência de extração dos analitos com o sorbente utilizado, a eluição incompleta dos analitos a partir do sorbente e outros erros aleatórios podem ter ocorrido.

Para a amostra real de água subterrânea, apenas três pesticidas foram detectados e determinados (Aldicarb sulfoxide, Carbaryl e Methiocarb). O Aldicarb teve concentração abaixo do LD do método.

Nos testes de recuperação usando amostra fortificada, foram obtidos valores bastante elevados, que foram provavelmente resultantes devido a erros aleatórios durante o processo de preparo das amostras.

Nesta pesquisa, foram estabelecidas condições iniciais para a determinação cromatográfica usando CLAE-DAD e verificada a capacidade instrumental para detecção e quantificação de parte dos analitos. A etapa de pré-concentração com extração em fase sólida foi, possivelmente, a etapa mais sujeita a erros. Entretanto, algumas condições da etapa de pré-concentração podem ser melhoradas com pesquisas mais prolongadas e com um número maior de repetições, de forma a possibilitar a determinação de todos os dez analitos com uma metodologia mais exata.

REFERÊNCIAS

ALBRECHT, Leandro Paiola; BRACCINI, Alessandro de Lucca e; ÁVILA, MarizangelaRizzati; SCAPIM, Carlos Alberto; BARBOSA, Mauro Cezra; STULP, Marcibela. **Sementes de Soja Produzidas em Épocas de Safrinha na Região peste do Estado do Paraná**. Maringá – PR, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Agronomia. Actasciagron, Vol. 31, Nº 1, p. 122, 2009.

AMORO, Pedro. **A Redução dos Riscos dos Pesticidas pela Protecção Integrada**. Lisboa – Portugal, Instituto Superior de Agronomia, Deperatamento de Protecção das Plantas e Fitoecologia, Projeto Agro 13 – Série Divulgação Agro 13: 1/02, p. 5 - 99, 2003.

ANDRADE, André Santana; QUEIROZ, Vagner Tebaldi de; LIMA, Diego Tolentino de; DRUMOND, Luis César Dias. **Análise de Risco de Contaminação de Águas Superficiais e Subterrâneas por Pesticidas em Municípios do Alto Parnaíba – MG**. MG – Brasil, Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Parnaíba, Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Quim. Nova, Vol. 34, Nº. 7, p. 1129, 2011.

AZEVEDO, Paulo Roberto; COLOGNESE, Silvio Antônio; SHIKIDA, Pery Francisco Assis. **Agroindústrias Familiares no Oeste do Paraná: Um Panorama Preliminar**. Cascavel – PR, Organizações Rurais e Agroindustriais: Revista de Administração da UFLA, v. 2, n. 1, p. 4, jan./jun. 2000.

BELO, Mariana Soares da Silva Peixoto; PIGNATI, Wanderlei; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MOREIRA, Josino Costa; PERES, Frederico. **Uso de Agrotóxicos na Produção de Soja do Estado do Mato Grosso: Um Estudo Preliminar de Riscos Ocupacionais e Ambientais**. São Paulo – SP, Revista Brasileira de Saúde Ocupacional, p. 79, 2012.

BORTOLUZZI, Edson C.; RHEINHEIMER, Danilo dos S.; GONÇALVES, Celso S.; PELLEGRINI, João B. R.; ZANELLA, Renato; COPETTI, André C. C. **Contaminação de Águas Superficiais pro Agrotóxicos em Função do Uso do Solo numa Microbacia Hidrográfica de Agudo – RS**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande – PB, vol.10, nº 4, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília – DF, Agricultura brasileira em números – Anuário 2005, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília – DF, Agricultura brasileira em números – Anuário 2005, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011.** Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res05/res37505.pdf>. Acesso em: 18 set. 2012.

CALDAS, Sergiane Souza; GONÇALVES, Fábio Ferreira; PRIMEL, Ednei Gilberto; PRESTES, Osmar Damian; MARTINS, Manoel Leonardo; ZANELLA, Renato. **Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas.** Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Química Nova, vol. 34, nº 9, 2011.

GAVENAGHI, A. L.; ROSSI, C. V. S.; NEGRISOLI, E.; COSTA, E. A. D.; VELINI, E. D.; TOLEDO, R. E. B. **Dinâmica do Herbicida Amicarbazone (Dinamic) Aplicado Sobre Palha de Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).** Revista Planta Daninha, Viçosa-MG, vol. 25, nº 4, 2007.

MARTIN, Thomas Newton; VENTURINI, Tiago; API, Ivandro; PAGNONCELLI, Andrei; JÚNIOR, Pedro Abel Vieira. **Perfil do Manejo da Cultura de Milho no Sudoeste do Paraná.** Viçosa – MG, Revista Ceres, Vol. 58, Nº1, p. 1-8, 2011.

SAVOY, Vera Lúcia Todeschi. **Palestra – Classificação dos Agrotóxicos.** São Paulo - SP, Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Proteção Ambiental, Vol. 73, N º 1, p. 91, 2011.

SILVA, Carla Grazieli Azevedo da; COLLINS, Carol H. **Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes.** Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Química Nova, vol. 34, nº 4, 2011.

SILVA, Diecson Ruy Orsolin da; AVILA, Luis Antonio de; AGOSTINETTO, Dirceu; BUNDT, Angela Da Cas; PRIMEL, Ednei Gilberto; CALDAS, Sergiane Souza. **Ocorrência de Agrotóxicos em Áreas Adjacentes a Lavouras de Arroz Irrigado.** Pelotas – RG, Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Campus de Capão do Leão; Rio Grande - RS, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Química Nova, v. 34, n. 5, p. 748, 2011.

SILVÉRIO, Flaviano Oliveira; SILVA, Joyce Grazielle Siqueira; AGUIAR, Maria Clara Santana; CACIQUE, Ane Patrícia; PINHO, Gevany Paulino de. **Análise de Agrotóxicos em Água Usando Extração Líquido-Líquido com Partição em Baixa Temperatura por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros - MG, Química Nova, vol. 35, Nº 10, 2012.

SOUSA, Eduardo Luis Leão de; SAES, Maria Sylvia Macchione; NUNES, Rubens. **Mudanças Institucionais e Desempenho da Produção de Milho e Soja no Brasil e na Argentina**. São Paulo – SP, Gestão e Produção, Vol. 6, Nº 3, p. 190, 1999.