

Desenvolvimento do método analítico para cromatografia de alta eficiência para micropoluentes

Development of analytical method for high performance chromatography for micropollutants

RESUMO

Gabriella Paini Masceno
gabriellapmasceno@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Marcus Vinícius de Liz
marcusliz.utpr@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Com o crescimento das demandas alimentares, surgiram novas técnicas no cultivo agrícola, uma delas baseada no uso de agrotóxicos para potencializar a produção. Entretanto, o seu uso gerou impactos negativos ao meio ambiente e assim tornou-se uma necessidade o monitoramento desses compostos nas diversas matrizes ambientais. Este trabalho foi elaborado com o objetivo de desenvolver um método para determinação de um mix dos pesticidas Alaclor, Atrazina, Clorpirifós, Malation e Tebuconazol, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos. Os resultados obtidos mostraram boa resolução entre os picos dos pesticidas estudados, com linearidade superior a 0,99, LQ da ordem de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ para 4 dos analitos avaliados, exceto o Malation, da ordem de $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

PALAVRAS-CHAVE: Agrotóxicos. CLAE-DAD. Pesticidas.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ABSTRACT

The increase of food demand, new techniques had been incorporate to agricultural farm, one of them based on the use of pesticides to enhance production. However, its use can be a negative impact for the environment and because of that turned out the necessity of monitoring those substances on most of the enviromental matrices. This study aimed to develop a method to determine mixture of pesticides Alaclor, Atrazine, Chlorpyrifos, Malathion and Tebuconazole by high performance liquid chromatography coupled to a diodes arrangement detector. the results obtained showed adequate linearity were values greater than 0.99, LoQ on the order of $15 \mu\text{g L}^{-1}$ for 4 of the evaluated analytes, except Malathion on the order of $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

KEYWORDS: Agrotoxics. HPLC-DAD. Pesticides

INTRODUÇÃO

Com a necessidade de atender as crescentes demandas alimentares da população e aumentar a eficiência da agricultura, potencializando a produção, surgiu o modelo de produção agrícola baseado na utilização de agrotóxicos (VEIGA et AL., 2011), (VIEIRA et AL., 2017). Entretanto, seu uso abusivo pode causar a degradação dos recursos naturais, em alguns casos de forma irreversível, levando à ocorrência de desequilíbrios biológicos e ecológicos, entre eles a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (JARDIM et al, 2009).

O Brasil é atualmente o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Em relação a vendas, o Brasil reveza entre a primeira e segunda posição com os Estados Unidos da América, ambos com cerca de US\$ 9,5 bilhões de vendas.

Diversos resíduos de agrotóxicos permanecem no ambiente após a sua aplicação, podendo, assim, ocorrer a contaminação no solo, ar e água (VIEIRA et al., 2017). Muitos desses agrotóxicos possuem consigo um princípio ativo tóxico com potencial poluidor (NETO et al, 2017), o que causa problemas à saúde do ser humano, tanto no momento do manuseio direto, ou de forma indireta através de resíduos em alimentos e água (STEFFEN et al, 2011).

Com o consumo crescente de agrotóxicos no Brasil e os possíveis impactos negativos nos recursos naturais, tornou-se uma necessidade o monitoramento desses compostos nas diversas matrizes ambientais (VIEIRA et al., 2017). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação de uma mistura dos pesticidas Alaclor (ALC), Atrazina (ATZ), Clorpirifós (CPF), Malation (MLT) e Tebuconazol (TEB) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE –DAD). Essa técnica tem se mostrado eficiente para a análise de agrotóxicos, devido a sua alta seletividade, permitindo a separação dos diferentes analitos e a capacidade de detecção em níveis de microgramas por litro (VIEIRA et al., 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

As curvas analíticas foram preparadas a partir de soluções estoque dos padrões de cada analito grau HPLC (*Sigma Aldrich*, pureza > 98%) diluídas em Acetato de Etila na concentração de 1.000 mg L⁻¹. Foram utilizadas para preparar uma mistura dos agrotóxicos, soluções de ALC, ATZ, CPF, MLT e TEB. Utilizou-se alíquotas de 0,1 mL de cada composto de interesse e os misturou com 1,5 mL de solvente orgânico Acetato de Etila, obtendo-se 2 mL do “mix” em concentração de 50 mg L⁻¹. A partir dessa solução foi preparada uma solução mãe utilizada na preparação das curvas analíticas, diluindo-se 0,5 mL desse mix em 24,5 mL de Acetato de Etila, resultando em solução de 25 mL a 1.000 µg L⁻¹. As alíquotas necessárias para realizar diferentes concentrações do “mix” de pesticidas foram secas em fluxo suave de nitrogênio gasoso comum e, então, reconstituídas em água ultrapura (H₂O_{up}) e Acetonitrila (ACN) grau HPLC na proporção de 90:10 (H₂O_{up}:ACN, v/v). As curvas analíticas foram realizadas em triplicata com faixa linear de trabalho entre 10 e 1.000 µg L⁻¹.

Testes preliminares indicaram as condições da eluição dos compostos por gradiente, adotado no presente estudo. As análises foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos da marca *Agilent Technologies*®, modelo 1260 *Infinity*, equipado com bomba quaternária G1311B, injetor automático 40 G1329B e detector DAD

G4212B. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa *Poroshell 120 EC-C18* (4,6 × 150 mm; 2,7 μm, *Agilent Technologies*[®]). Os componentes da fase móvel foram H₂O_{up} e ACN grau HPLC.

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram determinados a partir de parâmetros da curva de regressão, sendo o LD a menor quantidade do analito que pode ser detectado em uma amostra, entretanto, não necessariamente quantificad, e o LQ a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017). Para o cálculo do LD e LQ usou-se a equação (1) e (2) respectivamente

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{CA} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{CA} \quad (2)$$

Em que CA é o coeficiente angular da curva e σ é o desvio padrão do coeficiente linear.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes iniciais demonstraram a coeluição dos picos cromatográficos dos compostos de interesse, portanto, realizaram-se diversos testes com as proporções e rampas do gradiente da fase móvel. As condições cromatográficas definidas para as análises podem ser observados na Tabela 1, bem como o gradiente utilizado para separação dos pesticidas estudados na Tabela 2.

Tabela 1 – Características do método cromatográfico empregado na análise da mistura dos pesticidas ALC, ATZ, CPF, MLT e TEB.

Idade	Percentual(%)
Fase Móvel	H ₂ O _{up} :ACN
Tipo de eluição	Gradiente
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹
Volume de injeção	50 μL
λ (nm)	205 nm (ALC e MLT), 220 nm (ATZ e TEB) e 230 nm (CPF)
Tempo de retenção(min)	9,8 (ATZ); 18,2 (TEB); 20,9 (MLT); 22,0(ALC) e 42,8 (CPF)
Tempo do análise (min)	65 min

Fonte: Aatoria Própria (2019).

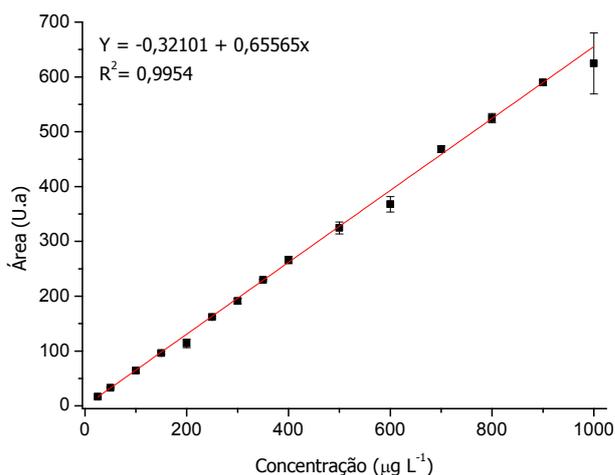
Tabela2 – Gradiente de eluição do mix de pesticidas estudado. A corresponde à água ultrapura e B corresponde à Acetonitrila.

Percentualtempofd(%)	Percentual(%)	Percentual(%)
Tempo (minutos)	A (%)	B (%)
0	50	50
20	40	60
30	40	60
40	0	100
50	0	100
52	50	50
65	50	50

Fonte: Autoria própria (2019).

A curva de regressão para o Alaclor pode ser observada na Figura 1. A concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi retirada do cálculo inicial por ter ficado abaixo do LQ e o cálculo de regressão foi realizado novamente sem este valor.

Figura 1. Regressão Linear do Alaclor.



Fonte: Autoria própria (2019).

Dados das curvas analíticas dos analitos estudados podem ser vistos na Tabela 3, enquanto alguns parâmetros de mérito obtidos com base nos parâmetros da curva de regressão linear podem ser visualizados na Tabela 4.

As curvas apresentaram regressões lineares satisfatórias, com coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, conforme exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA para validação de métodos analíticos, definidos na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

Na literatura há estudos que demonstram resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo. Para a Atrazina têm-se LD de $2,25 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (CAO et al., 2017). Estudos sobre o CPF mostraram valores para o LD e LQ similares aos encontrados, de $5,11 \mu\text{g L}^{-1}$ e $15,48 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (LIMA et al., 2017).

Tabela 3 – Dados das curvas de regressão dos analitos de interesse

Parâmetro	ALC	ATZ	CPF	MLT	TEB
1	0,00378	0,00484	0,00308	7.24E-4	0,00143
2	0,93739	2,05126	0,26782	0,41746	0,48726
3	0,9954	0,99982	0,99495	0,99936	0,99964
4	Y = - 0,32101 + 0,65565x	Y = - 2,2493 + 1,40359x	Y = 1,0194 + 0,1618x	Y = 0,36213 + 0,09925x	Y = 0,53198 + 0,28218x

1 – Desvio padrão do coeficiente angular; 2 – Desvio padrão do coeficiente linear; 3- Coeficiente de determinação (r^2); 4 – Equação de regressão.

Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 4 – Parâmetros de mérito.

Analito	FLT ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ALC	25 a 1.000	4,72	14,30
ATZ	25 a 1.000	4,82	14,61
CPF	25 a 1.000	5,46	16,55
MLT	100 a 1.000	13,88	42,06
TEB	25 a 1.000	5,70	17,27

Fonte: Autoria própria (2019).

Pesquisas sobre o Malation demonstraram LD e LQ de $17 \mu\text{g L}^{-1}$ e $51 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, valores superiores aos encontrados no presente estudo (COLEONE et al., 2017). Por outro lado, Caldas e colaboradores obtiveram para o pesticida Tebuconazol LD de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, um LQ aproximadamente três vezes superior aos determinados neste trabalho (CALDAS et al., 2019).

De maneira geral, o método cromatográfico desenvolvido nesta pesquisa apresentou separação satisfatória dos pesticidas estudados. Segundo Collins et al. (2017), diferenças podem ser atribuídas às especificidades cromatográficas.

CONCLUSÕES

O método cromatográfico desenvolvido apresentou valores de LD e LQ satisfatórios para a determinação dos agrotóxicos estudados. Os níveis de Limite de Detecção e Limite de Quantificação empregados são condizentes com análises ambientais e as figuras de mérito avaliadas corroboram para a validação da metodologia desenvolvida nessas análises.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a UTFPR pelo suporte financeiro. Ao Laboratório Multiusuário – LAMEAA, pela disponibilização dos equipamentos que permitiram a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24/07/2017 . Guia para validação de métodos analíticos - Julho, 2017.

CALDAS, S. S.; ARIAS, J.L.O.; ROMBALDI, C.; MELLO, L.L.; CERQUEIRA, M.B.R.; MARTINS, A.F.; PRIMEL, E.G. Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring. **J. Braz Chem. Soc**, São Paulo, v. 30, n. 1, p 71-80, jan 2019. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-50532019000100071&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em 10 ago 2019.

COLEONE, A.C.; SILVA, F.S.; MACHADO, A.A.; NETO, J.G.M.; PAGANINI, W.S.; Validação de método analítico e de extração do malation em água e solo após nebulização de combate ao *Aedes aegypti*. **Ambiente & Água**, Taubaté, v. 12, n. 3, p. 426-434, mai 2017. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-993X2017000300426&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 07 ago 2019.

CAO, W.; YANG, B.; QI, F.; QIAN, L.; LI, J.; LU, L.; XU, Q. Simple and sensitive determination of atrazine and its toxic metabolites in environmental water by carboxyl modified polyacrylonitrile nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1491, p. 16-26, mar 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731730273X>. Acesso 01 ago 2019.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**, 7ª edição, 1997.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000400031&script=sci_abstract&tlng=ES. Acesso em : 22 jul. 2019.

LIMA, R.M. **Avaliação da radiação uv, processos uv/h2o2 e fotofenton na degradação do agrotóxico clorpirifós com acompanhamento da ecotoxicidade**. 2017. Dissertação (mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2985>. Acesso 05 ago 2019.

NETO, M.G.A.; REIS., R.B.S. Agrotóxicos em água para o Consumo Humano. **Id on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v.10, n.3, p. 274-282, jan 2017. Disponível em: <https://idonline.emnuvens.com.br/id/article/view/621>. Acesso em: 04 ago 2019.

STEFFEN, G.P.K.; STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-Lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 15, n. 1, p. 15-21, jan 2011. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/tecnologica/article/view/2016>. Acesso 03 ago 2019.

VEIGA, M.M.; SILVA, D.M.; VEIGA, L.B.E.; FARIA, M.V.C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2391-2399, nov 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2006001100013. Acesso em: 06 ago. 2019.

VIEIRA, M. G.; STEINKE, G.; ARIAS, J. L. O.; PRIMEL, E. G.; CABRERA, L. C. C. Avaliação da Contaminação por Agrotóxicos em Mananciais de Municípios da Região Sudoeste do Paraná. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 5, p. 1800-1812, ago 2017. Disponível em: <http://rvq.sbgq.org.br/imagebank/pdf/MarcosNoPrelo.pdf>. Acesso em: 06 ago 2019.