Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica

TESE DE DOUTORADO

APLICAÇÃO DE POLISSILOXANOS IMOBILIZADOS SOBRE SÍLICA COMO FASE ESTACIONÁRIA E COMO SORVENTE NA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA E CALDO DE CANA

Camila Rosa Moraes Vigna

Orientadora: Prof.ª Drª Carol Hollingworth Collins

Co-orientadora: Prof.ª Drª Carla Beatriz Grespan Bottoli

Campinas – SP

Junho de 2010

Laboratório de Pesquisa em Cromatografia Líquida

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

V683a

Vigna, Camila Rosa Moraes.
Aplicação de polissiloxanos imobilizados sobre sílica como fase estacionária e como sorvente na determinação de agrotóxicos em água e caldo de cana / Camila Rosa Moraes Vigna. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.
Co-orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fases estacionárias. 2. Sorventes. 3. CLAE. 4. Caldo de cana. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Bottoli, Carla Beatriz Grespan. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Application of polysiloxanes immobilized on silica as stationary phases and as sorbents in the determination of agrotoxics in water and sugar cane juice

Palavras-chaves em inglês: Stationary phases, Sorbents, HPLC, Sugar cane juice

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Carol Hollingworth Collins (orientadora), Prof. Dr. Anízio Márcio de Faria (UFU-MG), Profa. Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz (EMBRAPA-Jaguariúna), Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 02/06/2010

"O cientista não estuda a natureza porque é útil fazê-lo", escreveu Henri Poincaré, o grande cientista teórico francês, quase no fim do século XIX. "Ele a estuda porque tem prazer nisso, e ele tem prazer porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la, e a vida não valeria a pena ser vivida. Não falo, é claro, daquela beleza que atinge os sentidos, da beleza das qualidades e aparências. Longe de mim desprezá-la, mas ela nada tem a ver com a ciência. Refiro-me àquela beleza mais íntima, que vem da ordem harmoniosa das partes e que a inteligência pura pode apreender... A beleza intelectual, ao contrário, é auto-suficiente, e é por ela, talvez mais do que pelo bem futuro da humanidade, que o cientista se condena a longos e penosos trabalhos."

Trechos do livro Rivalidades Produtivas, de Michael White, página 29

"Em relação a todos os atos de iniciativa e de criação, existe uma verdade fundamental cujo desconhecimento mata inúmeras idéias e planos esplêndidos: é que no momento em que nos comprometemos definitivamente a providência move-se também. Toda uma corrente de acontecimentos brota da decisão, fazendo surgir a nosso favor toda a sorte de incidentes, encontros e assistência material que nenhum homem sonharia que viesse em sua direção. O que quer que você possa fazer ou sonhe que o possa, faça-o. Coragem contém genialidade, poder e magia! Comece agora".

Johann Wolfgang von Goethe

(Frankfurt am Main, 28 de Agosto de 1749 — Weimar, 22 de Março de 1832) – Escritor e pensador

Agradecimentos

Devo dizer que esta não foi uma caminhada breve, mas sim uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelos obstáculos profissionais e pessoais de toda ordem que me atropelaram.

Embora uma tese seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contribuições de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela concessão da bolsa de estudos e por todo o suporte financeiro.

À Profª Drª Carol Hollingworth Collins, pela valiosa orientação, dedicação, e por ter me conduzido desde a iniciação cientifica até o doutorado com a competência científica e a sabedoria necessária para me ajudar a transpor os momentos difíceis. Por sua infinita paciência, apoio, confiança e principalmente por me ensinar com prazer e dedicação parte do que sei.

À Prª Drª Carla Beatriz Grespan Bottoli, pela orientação que ultrapassa a tese, que me deu seu incentivo em momentos diversos e de forma incondicional, contribuindo para a concretização desse trabalho. A você minha eterna gratidão e admiração.

À Profª Drª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim e ao Prof Dr. Kenneth Elmer Collins, pela disponibilidade e atenção em todos os momentos que precisei, pela valiosa colaboração e pela convivência alegre.

À todos os amigos da Unicamp, e em especial aos companheiros de trabalho do LabCrom, que tive a oportunidade de conviver ao longo desses anos, pela certeza de poder sempre contar com a amizade, o constante apoio e incentivo. Obrigada!

À Bel da CPG e ao Iveraldo do Desenho pela atenção, simpatia e boa vontade em ajudar.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação científica, o meu reconhecido e carinhoso agradecimento!

CURRICULUM VITAE

1. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Sinc do Brasil Instrumentação Científica Limitada – São Paulo (SP)

Química de Aplicação na área de HPLC.

setembro de 2009 - atual

Bioagri Laboratórios – Piracicaba (SP)

Pesquisadora no laboratório de desenvolvimento e validação de métodos analíticos com degradação forçada para análise de fármacos.

novembro de 2008 a setembro de 2009

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química Analítica - Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – SP

agosto de 2002 a julho de 2004

Bacharel em Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – SP

março de 1998 a junho de 2002

Licenciada em Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – SP

março de 1998 a novembro de 2005

3. ESTÁGIO

Local: **Rigesa Papel e Celulose** - Valinhos – SP

janeiro a julho de 1997

4. ATIVIDADES CIENTÍFICAS

Bolsista de iniciação científica do Programa Institucional de Bolsas CNPq/PIBIC e SAE

Orientador: Prof Dr Carol Hollingworth Collins

Instituto de Química – Unicamp – SP

agosto de 1999 a julho de 2002

5. ATIVIDADES DIDÁTICAS

Participação no Programa de Estágio Docente II (PED II) como monitora na disciplina de Química Analítica, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

agosto a novembro de 2006 e agosto a novembro de 2003

6. CURSOS

- LC/MS& LC/MS/MS, realizado no Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (Colacro XII), 27 de outubro de 2008.
- Introdução à Espectrometria de Massas, realizado na empresa *Waters Technologies do Brasil* em Alphaville, Barueri (SP) - 06 a 10 de agosto de 2007.
- Troubleshooting in HPLC, realizado no 12° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), São Luís (MA) - 14 de outubro de 2003.
- Boas Práticas de Laboratório (GLP) – Colunas de HPLC/GPC - realizado no IQ-Unicamp, Campinas (SP) – 25 de outubro de 2002.
- Curso avançado de Cromatografia Líquida (HPLC), realizado na empresa *Waters Technologies do Brasil,* São Paulo (SP) - 18 a 21 de outubro de 2002.
- Validação de Métodos Analíticos, realizado no 11° Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), Campinas (SP) - 18 de setembro de 2001.

7. SUMÁRIO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos apresentados em congressos nacionais: 19

Trabalhos apresentados em congressos internacionais: 12

8. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM REVISTAS COM CORPO EDITORIAL

- Silva, R.G.C.; Vigna, C.R.M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Augusto, F. "Molecularly imprinted silica as a selective SPE sorbent for triazine herbicide", *Journal of Separation Science*, v.33, I9, p.1319-1324, 2010.
- Faria, A.M.; Marcos, C.A.; Vigna, C.R.M.; Collins, C.H. "Determinação da espessura da camada polimérica de fases estacionárias imobilizada para cromatografia líquida de alta eficiência por análise termogravimétrica". *Química Nova*, v. 31, p. 417-420, 2008.

- Vigna, C.R.M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "Preparation of stationary phases for RP-HPLC using thermal treatments at high temperatures". *Journal of Chromatography*", v. 1156, p. 60-67, 2007.
- Xavier, A.M.; Lima, A.G.; Vigna, C.R.M.; Verbi, F.M.; Bortoleto, G.G.; Goraieb, K.; Collins, C.H.; Bueno, M.I.M.S; "Marcas da história da radioatividade e tendências atuais". *Química Nova*, v. 30, p. 83-91, 2007.
- Vigna, C.R.M.; Moraes, L.S.; Collins, C.H.; Jardim, I.C. S. F. "Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid phase extraction of some pesticides". *Journal of Chromatography*, v. 1114, p. 211-215, 2006.
- Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fisher, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "Self-Immobilization and/or Thermal Treatment for Preparation of Silica - Poly(methyloctylsiloxane) Stationary Phases" *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 217.
- -Collins, K.E.; Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fisher, G.; Bachmann, S.; Albert, K.; Collins, C.H. "Self-Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on HPLC Silica" *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 43.

RESUMO

Título: APLICAÇÃO DE POLISSILOXANOS IMOBILIZADOS SOBRE SÍLICA COMO FASE ESTACIONÁRIA E COMO SORVENTE NA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA e CALDO DE CANA

Autora: Camila Rosa Moraes Vigna

Orientadora: Carol Hollingworth Collins

Co-orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli

Neste trabalho verificou-se a potencialidade de uso de sorventes e fases estacionárias (FE), obtidos a partir da sorção e/ou imobilização do polímero poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) sobre suportes de sílica Kromasil utilizando tamento térmico, na separação, quantificação e validação de uma metodologia para análise de agrotóxicos em amostras de água e caldo de cana-de-açúcar (garapa). Os materiais desenvolvidos foram caracterizados com testes químicos e físicos e aplicados nas etapas de concentração das amostras por extração em fase sólida nos modos *off-line* e *on-line,* com posterior separação, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV-Vis. Utilizou-se também o método QuEChERS como alternativa na etapa de extração das amostras de garapa. Os sorventes PMOS mostraram desempenho comparável aos sorventes comerciais, além de sua preparação ser simples, rápida e de menor custo. A FE Kromasil/PMOS utilizada propiciou uma boa separação entre os componentes das amostras de diversos agrotóxicos analisados, similar às fases comerciais, com boas eficiências, resolução e seletividade. A metodologia desenvolvida foi validada e mostrou bons resultados de recuperação para todos os agrotóxicos, além de precisão $< 15\%$ e coeficiente de correlação $> 0,99$. O limite de quantificação do método permitiu que os limites máximos de resíduos impostos pelas agências reguladoras para todos os compostos estudados fossem atingidos. Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados na análise de amostras de garapa do comércio local. Não foram observados níveis detectáveis dos agrotóxicos estudados nas amostras analisadas.

ABSTRACT

Title: APPLICATION OF POLYSILOXANES IMMOBILIZED ON SILICA FOR STATIONARY PHASES AND AS SORBENTS IN DETERMINATION OF AGROTOXICS IN WATER AND SUGAR CANE JUICE

Author: Camila Rosa Moraes Vigna

Supervisor: Carol Hollingworth Collins

Co-supervisor: Carla Beatriz Grespan Bottoli

This work investigated the potentiality of use of sorbents and stationary phases (SP), obtained from the sorption and/or immobilization of poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) onto the surface of a porous silica Kromasil support using heat, in the separation, quantification and validation of a methodology for analysis of agrochemicals in water and sugar cane samples. Physical-chemical characterization of the developed materials were carried out and applied in the concentration step of the samples in solid phase extraction (SPE) in off-line and on-line mode, with posterior separation, for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV-Vis detection. The QuEChERS method (Quick, Easy, Cheap, Effective and Safe) was also used as alternative in the extraction of the sugar cane samples. PMOS sorbents showed comparable performance to the commercial sorbents, with simple, fast and cheap preparation. The Kromasil/PMOS SP used demonstrated a good separation to the components of the samples of agrotoxics analyzed, similar to the commercial phases, with good efficiencies, resolution and selectivity. The developed methodology was validated and showed good results of recovery for the agrotoxics, with precision value < 15 % and correlation coefficient $> 0,99$. The limit of quantification (LQ) of the method allowed that the maximum residues limits (MRL) for the regulating agencies for all the studied compounds were reached. The developed and validated methods were applied in the analysis of sugar cane samples of the local commerce. Detectable levels of the agrochemicals studied in the analyzed samples were not detected.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS xxi

LISTA DE TABELAS xxv

LISTA DE FIGURAS xxvii

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO 01

I.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 02

I.1.1. Fases estacionárias com polímeros sorvidos ou imobilizados em suportes de sílica 03

I.1.2. Avaliação cromatográfica das fases estacionárias 06

I.2. Análise de Resíduos de Agrotóxicos 12

I.2.1 Técnicas de extração de resíduos de agrotóxicos 14

I.2.1.1 Extração líquido-líquido 15

I.2.1.2 Extração em fase sólida 15

I.2.1.3 QuEChERS 20

I.2.1.3.1. Tamanho da amostra 20

I.2.1.3.2 Escolha do solvente de extração 21

I.2.1.3.4 Adição de sais e a separação de fases 22

I.2.1.3.5 *Clean-up* ou limpeza 22

I.2.2 Modos de extração *off-line* e *on-line* 23

I.2.2.1 Princípios, desenvolvimento e aplicações da cromatografia acoplada a extração no modo *on-line* 23

I.2.2.2 Aspectos instrumentais 25

I.2.2.3. Natureza e volume de eluição 25

I.2.2.4 Quantidade de amostra 25

I.2.2.5 Efeito de memória (*carry-over*) 26

I.2.2.6 Volume de *Breakthrough* 26

I.2.2.7 Técnicas e recentes desenvolvimentos 26

I.2.3 Métodos de detecção de agrotóxicos 27

I.2.4 Análise de agrotóxicos em amostras de água 27

I.2.5 Análise de agrotóxicos em amostras de caldo de cana (garapa) 28

I.3. Validação de Métodos Analíticos 30

I.3.1 Especificidade e Seletividade 31
I.3.2 Linearidade 32
I.3.3 Faixa linear e faixa linear dinâmica 33
I.3.4 Calibração na matriz 33
I.3.5 Limite de Detecção (LD) 34
I.3.5.1 Método visual 35
I.3.5.2 Método da relação sinal-ruído 35
I3.5.3 Método baseado em parâmetros da curva analítica 35
I.3.6 Limite de Quantificação (LQ) 36
I.3.7 Exatidão 36
I.3.7.1 Materiais de referência certificados (CRM) 37
I.3.7.2 Comparação de métodos 37
I.3.7.3 Ensaios de recuperação 37
I.3.7.4 Adição padrão 38
I.3.8 Precisão 39
I.3.8.1 Repetibilidade 39
I.3.8.2 Precisão intermediária 40
I.3.8.3 Reprodutibilidade 40
I.3.9 Robustez 41
I.4.Bibliografia 41
CAPÍTULO II.OBJETIVOS 51
CAPÍTULO III. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 55
III.1. Reagentes e Solventes 53
III.2. Equipamentos 54
III.3. Preparo das fases estacionárias do tipo PMOS preparado no laboratório 55
III.3.1 Condições de imobilização térmica do PMOS no suporte de sílica 56
III.3.2 Extração do excesso de polímero após imobilização térmica 57
III.4. Preparo das colunas cromatográficas 57
III.4.1 Polimento das paredes internas das colunas 57
III.4.2 Preparo da suspensão de fase estacionária 58
III.4.3 Procedimento de recheio das colunas com a fase estacionária 58
III.4.4 Condicionamento das colunas 59

III.5. Preparo dos sorventes do tipo PMOS e confecção dos cartuchos para SPE preparado no laboratório_60
III.6. Caracterização físico-química dos sorventes_____60
III.6.1 Área superficial específica (S_{BET}), volume específico e diâmetro de poros_____60
III.6.2 Análise elementar_____61
III.7. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias PMOS preparado no laboratório_____62
III.8. Agrotóxicos estudados_____65
III.9. Determinação de agrotóxicos em amostras de água_____67
III.9.1 Procedimento de SPE-HPLC no modo *off-line*_____67
III.9.2 Procedimento de SPE-HPLC no modo *on-line*_____68
III.9.3 Avaliação cromatográfica dos agrotóxicos_____70
III.9.4 Validação da metodologia_____71
III.9.5. Análise de amostras de água de rio_____72
III.10. Determinação de agrotóxicos em amostras de caldo de cana_____72
III.10.1 Procedimento de extração usando método QuEChERS_____72
III.10.2 Avaliação cromatográfica dos agrotóxicos_____73
III.10.3 Validação da metodologia_____73
III.10.4 Análise de amostras de caldo de cana_____73
III.11. Bibliografia_____74
CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO_____75
IV.1. Caracterização cromatográfica de fases estacionárias PMOS preparado no laboratório_____75
IV.1.1 Misturas teste 1 e 2_____75
IV.1.2 Mistura teste de Engelhardt_____76
IV.1.3 Misturas teste de Tanaka_____77
IV.2. Determinação de agrotóxicos em amostras de água_____79
IV.2.1 Determinação das condições cromatográficas de separação_____79
IV.2.2 Confirmação da identidade dos agrotóxicos_____80
IV.2.3 Caracterização dos sorventes PMOS preparado no laboratório_____82
IV.2.4 Procedimento de SPE-HPLC no modo *off-line*_____83
IV.2.4.1 Avaliação do PMOS preparado no laboratório_____83
IV.2.4.2 Avaliação de diferentes lotes de cartuchos de PMOS preparado no laboratório _____85
IV.2.4.3 Validação do método analítico_____86
IV.2.4.3.1 Seletividade_____86

IV.2.4.3.2 Linearidade e faixa linear 86
IV.2.4.3.3 Limite de detecção e de quantificação 90
IV.2.4.3.4 Exatidão e precisão 90
IV.2.4.3.5 Robustez 91
IV.2.4.4 Análise de amostra de água de rio 91
IV.2.5 Procedimento de SPE-HPLC no modo *on-line* 92
IV.3. Determinação de agrotóxicos em amostras de caldo de cana 94
IV.3.1 Determinação das condições cromatográficas de separação 94
IV.3.2 Confirmação da identidade dos agrotóxicos 94
IV.3.3 Extração usando método QuEChERS 97
IV.3.4 Validação do método analítico 99
IV.3.4.1 Seletividade 99
IV.3.4.2 Linearidade e faixa linear 99
IV.3.4.3 Limite de detecção e de quantificação 102
IV.3.4.5 Exatidão e precisão 103
IV.3.4.6 Robustez 103
IV.3.4.7 Aplicação para amostra de caldo de cana 104
IV.4.Bibliografia 106
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES 109

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ρ: densidade

τ: espessura de camada polimérica

α: fator de separação

$\alpha_{B/F}$ pH 2,7: capacidade de troca iônica em meio ácido.

$\alpha_{B/F}$ pH 7,6: capacidade de troca iônica total.

$\alpha_{C/F}$: capacidade de formação de ligação de hidrogênio.

α_{CH2}: seletividade metilênica ou hidrofóbica.

$\alpha_{T/O}$: seletividade estérica ou espacial

μ: velocidade linear da fase móvel

$\mu_{ótima}$: velocidade linear ótima

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância sanitária

As: fator de assimetria a 10 % da altura do pico

C4: butil

C8: octil (C_8H_{17})

C18: octadecil ($C_{18}H_{37}$)

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

Conab: Companhia nacional de abastecimento

CRM : Certified reference material (materiais de referência certificados)

CV: coeficiente de variação

DAD: diode array detector (detecção por arranjo de diodos)

d_p: diâmetro médio de poros

ECD: electron capture detector (detecção por captura de elétrons)

FE: fase (s) estacionária (s)

FEQL: fase(s) estacionária(s) quimicamente ligada(s)

FM : fase(s) móvel(is)

FR: fase(s) reversa (s)

GARP: Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas

GC: gas chromatography (cromatografia gasosa)

h: altura do prato reduzido

H : altura de um prato

ICH: International Conference of Harmonization

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO: International Organization for Standardization

IUPAC: International Union Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

k: fator de retenção

L: comprimento da coluna

LabCrom: Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do IQ - Unicamp

LC: liquid chromatography (cromatografia líquida)

LC-NH2: Liquid Chromatography-Amino Phase

LC-SAX: Liquid Chromatography-Strong Anion Exchange

LC-SCX: Liquid Chromatography-Strong Cation Exchange

LC-WCX: Liquid Chromatography-Weak Cation Exchange

LLE: liquid-liquid extraction (extração líquido-líquido)

LMR: limite máximo de resíduos de agrotóxicos

LD: limite de detecção

LDE: limite de detecção do equipamento

LDM : limite de detecção do método

LQ: limite de quantificação

LQE: limite de quantificação do equipamento

LQM : limite de quantificação do método

MAE: microwave assisted extraction (extração assistida por micro-ondas)

MIP: molecularly imprinted polymer (materiais impressos molecularmente)

MMC: matrix-matched calibration (método de calibração na matriz)

$\overline{m}_{PMOS}$ = massa específica

$\overline{m}_{PMOS\ poros\ \ cheios}$ = quantidade mínima de PMOS necessária para preencher todos os poros da sílica

MS: mass spectrometry

MSPD: matrix solid phase dispersion (dispersão da matriz em fase sólida)

N: número de pratos ou eficiência da coluna

N/m: eficiência de coluna por metro ou números de prato por metro

PLE: pressurized liquid extraction (extração acelerada por solventes)

PMDS: poli(dimetilsiloxano)

PMODS: poli(metiloctadecilsiloxano

PMOS: poli(metiloctilsiloxano)

PSA: Primary and Secundary Amines (aminas primárias e secundárias)

PTFE: politetrafluoretileno

QuEChERS: quick, easy, cheap, effective and safe (rápido, fácil, barato, robusto)

r: coeficiente de correlação

R: fator de recuperação

RAM : restricted access materials (materiais de acesso restrito)

Rs: resolução entre dois picos adjacentes

RSD : estimativa do desvio padrão relativo

s: estimativa do erro dos efeitos

S_{BET}: área superficial específica determinada pelo método BET

SBSE: stir bar sorptive extraction (extração sortiva em barra magnética)

SFE: supercritical fluid extraction (extração por fluido supercrítico)

SPE: solid phase extraction (extração em fase sólida)

SPME: solid phase micro extraction (microextração em fase sólida)

T_F: tailing factor (fator de alargamento de pico)

t_M: tempo de retenção de um composto não retido

t_R: tempo de retenção de um composto

t'_R: tempo de retenção ajustado

US-EPA: United States-Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

USP: United States Pharmacopeia

UV-vis: região compreendida pela irradiação ultravioleta e luz visível.

V_p: volume específico de poros.

w_b: largura de um pico na linha de base

w_h: largura de um pico à meia altura

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.

TABELA 1: Principais modos de operação em SPE é suas características [90]_____18

TABELA 2: Composição do caldo de uma cana sadia e normal, para as condições do Brasil [155]. características [90]_____30

CAPÍTULO IV.

TABELA 1: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max})_____82

TABELA 2: Caracterização do sorvente PMOS preparado no laboratório e dos sorventes comerciais utilizados_____83

TABELA 3: Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do sorvente PMOS preparado no laboratório e dos sorventes comerciais usados neste estudo_____83

TABELA 4: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de torneira fortificada no modo *off-line* usando cartuchos de SPE comerciais e PMOS preparado no laboratório_____84

TABELA 5: Recuperações (%) e RSD para os agrotóxicos em água de torneira usando lotes diferentes de cartuchos PMOS preparados no laboratório_____86

TABELA 6: Parâmetros das curvas analíticas para os agrotóxicos por padronização externa sem sobreposição da matriz_____89

TABELA 7: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento e do método desenvolvido sem superposição da matriz_____90

TABELA 8: Recuperações (n = 3) e precisão (repetibilidade, n = 3 e precisão intermediária, n = 3) para os agrotóxicos em água; níveis de fortificação: F1 (1 x LQE), F2 (2 x LQE), F3 (10 x LQE), para a metodologia desenvolvida_____91

TABELA 9: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de rio fortificada usando cartuchos de SPE comerciais e PMOS preparados no laboratório no modo *off-line*_____92

TABELA 10: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de rio fortificada no modo *on-line*_____93

TABELA 11: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max})_____96

TABELA 12: Curva analítica para os agrotóxicos_____103

TABELA 13: Limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e LMR para os agrotóxicos estudados

(n=3)_____103

TABELA 14: Recuperações (n = 3) e precisão (repetibilidade, n = 3 e precisão intermediária, n = 3) para os agrotóxicos em caldo de cana; níveis de fortificação: F1 (1 x LQE), F2 (2 x LQE), F3 (10 x LQE), para a metodologia desenvolvida_____103

TABELA 15: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em amostra de caldo de cana do comércio de Campinas (SP)_____105

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.

FIGURA 1: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos. Adaptado de [60]_____7

FIGURA 2: Medidas e cálculo do fator de assimetria e do fator de alargamento do pico_____9

FIGURA 3: Curva da equação de *van Deemter* mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima [64]_____11

FIGURA 4: Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por agrotóxicos [78]_____14

FIGURA 5: Principais etapas empregadas em SPE *off-line* visando o isolamento de um composto [88]_____16

FIGURA 6: Diagrama esquemático para determinar o procedimento de SPE segundo as características da amostra [88]_____19

FIGURA 7: Fluxograma representativo do método QuEChERS original [101]_____20

CAPÍTULO III.

FIGURA 1: Estrutura do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)_____55

FIGURA 2: Esquema do forno controlador de temperatura utilizado para o tratamento térmico_____56

FIGURA 3: Esquema da coluna cromatográfica e conexões_____57

FIGURA 4: Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas [7]_____59

FIGURA 5: Diagrama esquemático da extração em fase sólida *on-line* acoplada ao HPLC utilizada neste estudo_____70

CAPÍTULO IV.

FIGURA 1: Cromatogramas da separação das misturas 1 e 2 pela FE PMOS imobilizada termicamente a 120°C por 8h. Condições cromatográficas: FM MeOH:H_2O 70:30 (v/v), vazão 0,3 mL/min para mistura 1 e 0,4 mL/min para mistura 2, volume de injeção: 5 µL, detecção UV a 254 nm, temperatura 25°C_____76

FIGURA 2: Cromatograma obtido para a FE PMOS preparada no laboratório com alguns compostos da mistura de Engelhardt. Condições cromatográficas: FM MeOH:H_2O 55:45 (v/v), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção 5 µL, detecção UV a 254 nm, temperatura 40 °C_____77

FIGURA 3: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura de Tanaka com a FE PMOS preparada no laboratório. Condições cromatográficas: fase móvel (A) MeOH:H_2O 80:20 (v/v), (B) MeOH:H_2O 30:70 (v/v), (C) MeOH:tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 0,02 mol/L pH 7,6 30:70 (v/v), (D) MeOH:tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 0,02 mol/ L pH 2,7 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV a 254 nm. (*) impureza_____78

FIGURA 4: Cromatograma da separação dos agrotóxicos a partir de uma solução padrão de 1 mg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL min^{-1}, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____82

FIGURA 5: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos na concentração de 1 mg/L_____82

FIGURA 6: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha não fortificada (a) e fortifcada (b) com os agrotóxicos em 1 μg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____85

FIGURA 7: Curvas analíticas obtidas para os cinco agrotóxicos estudados por calibração externa sem superposição de matriz_____89

FIGURA 8: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha sem fortificação (a) e fortificada (b) com 1 μg/L dos agrotóxicos. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____91

FIGURA 9: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha não fortificada (a) e fortificada (b) com os agrotóxicos em 1 μg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____93

FIGURA 10: Cromatograma da separação dos agrotóxicos a partir de uma solução padrão na concentração 15 x LQ. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____94

FIGURA 11: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos na concentração de 1 mg/L. Os espectros da simazina e atrazina já foram apresentados na Figura 5_____96

FIGURA 12: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para as amostras testemunha (a) e testemunha fortificada (b) com concentração 15 x LQ de caldo de cana. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática_____98

FIGURA 13: Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos estudados por calibração externa sem superposição de matriz_____101

FIGURA 14: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha sem fortificação (a) e fortificada (b) a 15xLQ de cada agrotóxico em caldo de cana. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática._____105

Capítulo I - Introdução

A ampla utilização de agrotóxicos em plantações trouxe para a sociedade aspectos positivos e negativos. A principal vantagem é o controle eficaz de pragas e de outros elementos nocivos às plantações, ocasionando a aceleração do crescimento da produção de alimentos, suprindo assim grande parte da demanda mundial por alimentos. Em contrapartida a este grande avanço, o seu uso contínuo e abusivo tem provocado a contaminação de águas, solos e alimentos, prejudicando a saúde dos seres humanos e poluindo o meio ambiente.

O monitoramento da qualidade das águas tem assumido grande importância nos últimos anos. Os agrotóxicos que são aplicados na lavoura, eventualmente, são transportados por diferentes rotas para as águas superficiais e/ou subterrâneas mais próximas, através de vários mecanismos. Os resíduos de agrotóxicos podem permanecer no meio ambiente, levando à sua contaminação.

Atualmente, o Brasil é o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo que o estado de São Paulo, por sua vez, responde por mais de 60% da produção nacional [1,2]. O uso de herbicidas é uma prática comum no controle de ervas daninhas e a aplicação desses agrotóxicos de forma abusiva nas lavouras de cana-de-açúcar pode acarretar na acumulação de resíduos e seus derivados. O caldo de cana ou garapa é um dos produtos apreciados da cana, obtido pela extração do suco da cana-de-açúcar no processo de moagem.

A determinação de agrotóxicos em baixas concentrações requer usualmente uma ou mais etapas de preparo de amostras utilizando técnicas de extração e concentração, que visam isolar e concentrar os analitos de interesse a serem determinados. Existem diversas técnicas de extração descritas na literatura, mas, de forma geral, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) juntamente com a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) têm sido as técnicas mais utilizadas para os mais diversos tipos de amostras [3]. Recentemente, o método de extração QuEChERS (do inglês *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) tem sido muito utilizado para análise de amostras complexas e possui inúmeras vantagens, dentre as quais: minimizar as etapas de preparo das amostras, capacidade de extrair agrotóxicos altamente polares e de elevada acidez ou basicidade, utilizar pequenas quantidades de solvente e ser relativamente mais rápido e robusto [4,5].

As técnicas instrumentais mais comumente utilizadas para quantificação de resíduos de agrotóxicos são as cromatográficas e mais recentemente a eletroforese capilar [6]. A expansão do emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) deve-se às inúmeras vantagens que ela possui em relação à cromatografia gasosa, na qual é difícil a análise de algumas classes de compostos que possuem instabilidade térmica, baixa volatilidade e alta polaridade [7]. O desenvolvimento ainda contínuo e a disponibilidade de fases estacionárias

(FE) de alta qualidade e equipamentos de alto desempenho se apresentam como fatores primordiais para o crescente interesse de pesquisas e aplicações em CLAE.

Há quase duas décadas nosso grupo de pesquisas (LabCrom, Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida [8]) vem desenvolvendo novas fases estacionárias para CLAE com ótimos resultados na análise de diversas amostras [9,10]. Estas fases são baseadas na deposição e imobilização de polímeros em suportes de sílica nua ou sílica modificada por metais [11,12]. Os bons resultados obtidos na preparação dessas FE abriram caminho também para pesquisas baseadas no desenvolvimento de sorventes para SPE obtidos a partir da sorção e imobilização térmica de polissiloxanos. Os cartuchos preparados no laboratório desenvolvidos já foram aplicados na análise de agrotóxicos em água [13], tomate [14], uva [15] e urina [16] com ótimos resultados.

I.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura por meio da distribuição deles entre duas fases, uma que permanece estática, a fase estacionária (FE), e outra que se move através dela, a fase móvel (FM). O desenvolvimento cromatográfico se dá através das interações diferentes dos componentes da amostra com a FE e, dependendo do tipo de cromatografia, com a FM. Desta forma, cada um dos componentes é seletivamente retido pela FE, resultando em migrações diferenciais destes componentes [17].

A cromatografia líquida de alta eficiência tem valor reconhecido e seu emprego em vários laboratórios é considerado indispensável. O crescimento explosivo desta técnica deve-se à detectabilidade do método, sua pronta adaptabilidade para determinações quantitativas, a possibilidade de separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis e sua aplicabilidade em vários campos da ciência e tecnologia: análises de alimentos, farmacêuticas, clínicas, toxicológicas, bioquímicas, ambientais e outras [18,19]. A única exigência da CLAE é que a amostra seja solúvel na FM. No entanto, a CLAE utiliza instrumentos caros e sofisticados. Também não se pode desprezar o custo elevado das FM (de alto grau de pureza), das FE ou das colunas prontas e da reposição periódica de componentes diversos da coluna ou do equipamento [20].

Na cromatografia líquida de fase reversa (FR) a FE tem caráter menos polar que a FM. Aproximadamente entre 70 e 80 % das separações utilizam essa modalidade da cromatografia líquida. Embora o desenvolvimento dessa modalidade da CLAE tenha iniciado há quase quatro décadas, pesquisas e aplicações envolvendo tal modalidade ainda ocupam um lugar proeminente na literatura. A grande popularidade da CLAE-FR se deve principalmente às suas inúmeras vantagens, tais como: rápido equilíbrio da coluna após a mudança de FM;

boa repetibilidade dos tempos de retenção; amplo campo de atuação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades; dentre outras [21]. Normalmente, as fases estacionárias usadas em cromatografia líquida de fase reversa são constituídas de espécies orgânicas ligadas quimicamente [22,23] ou imobilizadas [24,25] ou apenas sorvidas [26,27] em um suporte cromatográfico, convencionalmente um óxido inorgânico, tal como a sílica.

I.1.1. Fases estacionárias com polímeros sorvidos ou imobilizados em suportes de sílica

Apesar da sílica ainda ser o melhor suporte cromatográfico para o preparo das fases estacionárias, ela apresenta duas grandes limitações. A primeira restringe a sua utilização numa faixa de pH entre 2 e 8, a partir do qual ocorre sua degradação, e a segunda refere a presença dos grupos silanóis residuais, os quais causam a assimetria de pico quando amostras básicas são analisadas.

Em meio ácido, em pH menor que 2, as ligações ≡Si-C, que são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície da sílica, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Dessa forma, os grupos orgânicos são mais facilmente lixiviados, quando se emprega fases móveis com pH abaixo de 2. Em meio básico, em pH acima de 8, a sílica pode solubilizar rapidamente e, como consequência, o leito cromatográfico dentro da coluna é alterado, resultando em baixas eficiências e alargamento frontal de pico [28].

O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência está diretamente associado ao desenvolvimento da tecnologia de preparo das fases estacionárias. O material idealizado por qualquer analista engajado em separações cromatográficas deveria combinar as propriedades da sílica com a versatilidade dos materiais poliméricos a serem utilizados em uma ampla faixa de pH, com considerável estabilidade química e completa ausência dos silanóis residuais [29].

Como as fases estacionárias para utilização como fase reversa devem apresentar caráter apolar e a superfície dos óxidos utilizados como suporte são polares, deve-se então introduzir grupos orgânicos apolares nas suas superfícies. Existem várias formas de se obter as camadas orgânicas apolares sobre a superfície dos diferentes óxidos. O método mais comum ocorre através da introdução de monocamadas orgânicas via reação com reagentes apropriados, produzindo as chamadas fases quimicamente ligadas. Outros envolvem o recobrimento superficial dos óxidos com polímeros orgânicos [30].

A preparação de fases reversas através da deposição e imobilização de polialquilsiloxanos sobre a superfície da sílica cromatográfica foi inicialmente desenvolvida por Schomburg e colaboradores [31], na década de 80. No início, essas fases apresentavam baixa eficiência, o que era atribuído ao total preenchimento dos poros da sílica pelo filme polimérico, afetando drasticamente a transferência de massa e, consequentemente, a eficiência durante a separação cromatográfica. Com a otimização do processo de sorção

e imobilização dos polímeros, hoje já se sabe que essas fases apresentam características semelhantes às fases quimicamente ligadas do tipo C8 e C18, inclusive quanto à eficiência cromatográfica [32].

Em princípio, as fases estacionárias recobertas com polímeros combinam as propriedades mecânicas de óxidos inorgânicos (sílica, zircônia, titânia, etc.) com a inércia química e a seletividade de polímeros orgânicos. Estas fases apresentam uma série de vantagens que as tornam extremamente atrativas para uso em CLAE-FR, tais como: melhor proteção dos silanóis residuais (sílica) ou de sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia, alumina) comparado às fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL), evitando interações indesejáveis com componentes da amostra; proteção mais eficaz da matriz do suporte inorgânico contra o ataque químico de fases móveis agressivas; maior facilidade de preparo; etc.[30]. Além disso, a seletividade destas fases depende essencialmente dos grupos funcionais do polímero imobilizado. Devido à disponibilidade de uma vasta gama de polímeros com diferentes funcionalidades, as fases recobertas com polímeros permitem o ajuste flexível da seletividade cromatográfica dentro de uma ampla faixa, dependendo apenas da escolha do polímero apropriado para a separação [33,34].

Uma grande variedade de polímeros foi empregada no preparo de fases estacionárias recobertas para CLAE-FR, dentre estes se destacam: o poli(etileno) [35]; o poli(butadieno) [36,37,38]; o poli(estireno) [39] e, principalmente, os polissiloxanos – poli(dimetilsiloxano) (PDMS) [40], poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) [12,41,42], poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) [43] e o poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) [44].

A forma mais simples de preparar o compósito suporte-polímero é pela deposição de uma camada polimérica sobre a superfície do suporte, sem promover a reticulação entre as cadeias do polímero e também sem a ligação química entre o polímero e o suporte. Neste caso ocorre uma contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e o suporte. A insolubilidade do polímero na fase móvel também é importante neste tipo de fase [30]. A sorção do polímero no suporte cromatográfico é um processo complexo governado por um balanço muito sutil entre fatores energéticos e entrópicos e deve ser controlado cuidadosamente para a obtenção de fases estacionárias confiáveis e reprodutíveis [45]. A química da superfície do suporte também tem uma influência significativa na sorção dos polímeros. Os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoragem, nos quais os polímeros podem se ligar covalentemente [46] ou apenas interagir fracamente [47].

Basicamente, o polímero sorvido pode formar um filme fino na superfície da sílica ou preencher todo volume do poro; é possível também haver uma combinação destas duas formas. Em ambos os casos, as cadeias poliméricas podem apenas recobrir (por mecanismo de adsorção) as paredes dos poros sem

entrecruzamento e sem ligação à superfície, podem formar uma camada densamente entrecruzada sem ligação química com a superfície dos poros ou então podem se ligar quimicamente às paredes dos poros [33].

Em estudos recentes em nosso laboratório, Bottoli [48] observou que a retenção do PMOS nos poros da sílica aumentava com o tempo sem a aplicação de tratamento específico para promover a imobilização. Foi sugerido que, com o tempo, modificações ou rearranjos das cadeias do polímero nos poros da sílica acontecem, tornando a cadeia do polímero insolúvel frente a FM, isto é, imobilizada. Este processo foi denominado de auto-imobilização, já que não há necessidade de um agente externo indutor como calor, peróxidos ou radiação gama para indução do entrecruzamento das cadeias poliméricas.

Para fornecer uma maior estabilidade à FE, geralmente é necessário uma etapa de imobilização posterior à sorção para o melhor rearranjo do polímero no suporte. Atualmente, as FE imobilizadas são obtidas através de reações entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, induzidas ou não por processos de entrecruzamento ou entre a fase líquida e o suporte [48]. Essas reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis, quando comparadas com as FE sorvidas, e são insolúveis nas fases móveis comumente empregadas em CLAE-FR. Vários são os métodos utilizados para que essas reações ocorram, tais como: tratamento térmico [49], radiação microondas [50], radiação gama [51,52], ou ainda por agentes químicos como peróxidos e azocompostos [53].

O tratamento térmico é uma fonte de energia empregada para as mais diversas finalidades. Este vem sendo o principal procedimento para a obtenção de fases reversas imobilizadas com [26] ou sem [12,25,48,54] o uso de agentes químicos de entrecruzamento. O princípio da imobilização térmica baseia-se no aquecimento da amostra por condução de calor, no qual o recipiente contendo a amostra é aquecido e ocorre a transferência de calor para a amostra. O tratamento térmico é empregado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes cromatográficos, auxiliando no processo de auto-imobilização [12]. A auto-imobilização é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário um longo período de tempo, dependendo do tipo de fase e de suporte, para que ocorra o rearranjo das moléculas do polímero na forma de uma camada estável sobre a superfície dos poros do suporte [48]. Bottoli *et al.* [25] prepararam fases de PMOS e de PMODS termicamente imobilizadas em partículas de sílica, empregando temperaturas na faixa de 80 a 220 °C. Os autores observaram que, em temperaturas mais baixas, 120 °C para o PMOS e na faixa de 80 a 100 °C para o PMODS, as fases apresentam melhores desempenhos cromatográficos devido à formação de uma monocamada polimérica. Em temperaturas mais elevadas, o desempenho cromatográfico é inferior, devido à formação de uma camada polimérica mais espessa, resultando em um processo mais lento de transferência de massa. A imobilização térmica foi empregada também para o preparo de fases estacionárias baseadas em

suportes de sílica metalizada, apresentando comportamento cromatográfico semelhante às fases baseadas em sílica nua [11,55].

Ainda não existe uma fase estacionária ideal, e cada tipo de fase tem seus prós e contras. A principal desvantagem das fases recobertas (sorvidas ou imobilizadas) com polímeros é a dificuldade de se obter uma camada polimérica uniforme ou bem definida na superfície dos poros do suporte cromatográfico. Nawrocki *et al.* [34] sugeriu que o recobrimento polimérico resultante, de uma forma geral, é invariavelmente retalhado e desigual (não homogêneo). Collins *et al.* [55] mostrou que a deposição na forma de um filme polimérico fino e uniforme ao longo de uma área superficial muito grande é energicamente desfavorável e que, preferencialmente, ocorrerá a formação de gotas ou *plugs* dispersos ao longo de toda extensão da superfície da sílica. Desta forma, a não homogeneidade do recobrimento resultará em exposição dos grupos silanóis residuais e, consequentemente, haverá interação indesejável do suporte com solutos da amostra e locais suscetíveis ao ataque químico de fases móveis alcalinas, acelerando a dissolução da sílica. O grande desafio do preparo de fases recobertas com polímeros hoje é a obtenção de fases estacionárias com número reduzido de sítios de interações residuais e o desenvolvimento de suporte estável em uma faixa de pH ampla.

I.1.2. Avaliação cromatográfica das fases estacionárias

Nos últimos anos, os avanços na tecnologia de preparação de FE têm disponibilizado comercialmente uma grande variedade de colunas para CLAE no modo fase reversa. Entretanto, as centenas de fases reversas, em muitos casos nominalmente idênticas, disponíveis atualmente, dificultam a seleção de uma melhor coluna para um problema específico de separação. Este problema se estende tanto às fases quimicamente ligadas quanto às fases recobertas por polímeros. Desta forma, para que a seleção da coluna contendo a fase estacionária apropriada, para a separação em questão, não se torne um problema, uma completa caracterização da fase estacionária é extremamente desejável para diferenciar características aparentemente similares [21]. Frequentemente são empregados métodos espectroscópicos [57], termogravimétricos [58] e físico-químicos para a caracterização das FE. Porém, estes métodos destroem a fase estacionária durante a análise. Uma alternativa mais apropriada é o uso de testes cromatográficos que avaliam a qualidade, as características e a viabilidade analítica das fases com base em interações intermoleculares entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel, sem a destruição da coluna [59].

O cromatograma da separação de uma determinada mistura-teste, contendo compostos previamente selecionados, pode ser utilizado para fornecer informações a respeito do desempenho de uma coluna

cromatográfica. Para isto, alguns parâmetros cromatográficos são calculados a partir de dados característicos dos compostos obtidos no cromatograma, como mostrado na Figura 1:

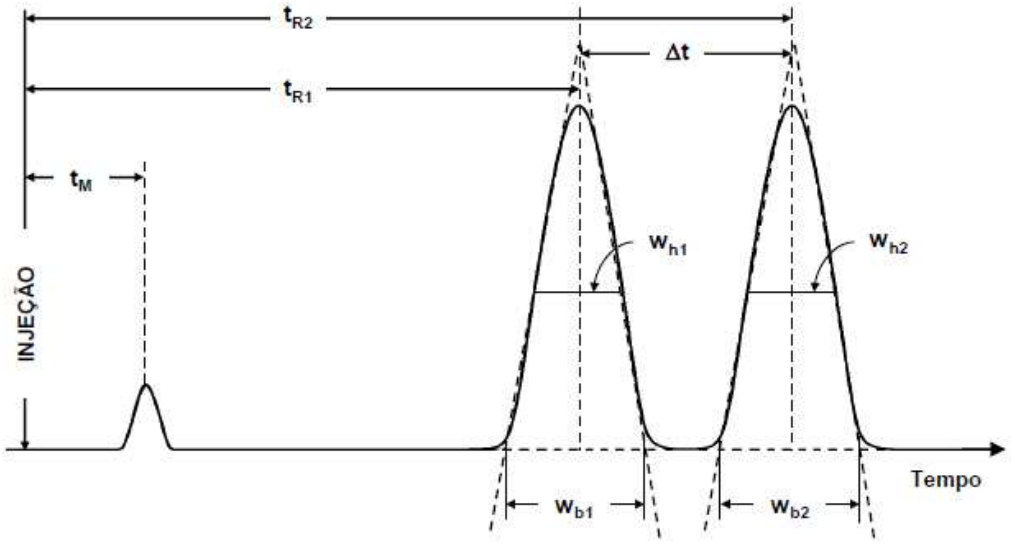


Figura 1: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos. Adaptado de [60].

A distância w_b é a largura do pico na linha de base e w_h é a largura do pico à meia altura. O tempo de retenção do analito (t_R) é o tempo que o analito leva para percorrer o sistema cromatográfico desde o momento de sua injeção até o registro do máximo de seu pico. O tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária ou tempo de retenção da fase móvel (t_M, tempo morto) é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a cela do detector. O tempo de retenção ajustado (t'_R) é o tempo real que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado por:

$$t'_R = t_R - t_M \qquad \text{(Equação 1)}$$

Outro parâmetro que também diz respeito à retenção de um soluto é o fator de retenção k, determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na FE ou percorrendo a coluna na fase móvel, de acordo com a Equação 2. Este parâmetro normalizado é bastante útil na comparação da retenção de um mesmo composto em diferentes colunas ou em diferentes composições da fase móvel [17].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \qquad \text{(Equação 2)}$$

Os valores ideais de k devem variar entre 2 a 10. Valores maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a fase estacionária e, consequentemente, um longo tempo de análise. Por outro lado, valores de k menores que 2 implicam em pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise [61].

Dois componentes em uma mistura não podem ser separados se apresentarem o mesmo valor de k. O grau de separação entre dois compostos adjacentes em um cromatograma normalmente é verificado pelo fator de separação (α) [62], conforme mostrado na Equação 3:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_{R2}} \qquad \text{(Equação 3)}$$

com $k_2 \geq k_1$. Se $\alpha = 1$, nenhuma separação ocorre porque os tempos de retenção dos compostos são idênticos. O fator de separação é uma medida do potencial do sistema cromatográfico para a separação de dois compostos, ou seja, sua seletividade, que é totalmente dependente das fases estacionária e móvel empregadas [62].

A resolução (Rs) é uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a Equação 4:

$$R_S = 2\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}\right) = 1{,}177\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}\right) \qquad \text{(Equação 4)}$$

em que t_{R1} e t_{R2} são os tempos de retenção de dois analitos e w_{b1} e w_{b2} são as larguras dos picos na base, medidas em unidades de tempo. Já w_{h1} e w_{h2} se referem às larguras dos picos a meia-altura, também em unidades de tempo. Valores de Rs acima de 1,5 são considerados ideais, indicando uma separação completa entre os picos [62].

A simetria de um pico é determinada pelo fator de assimetria (As). Esta medida é realizada a 10 % da altura do pico, evitando problemas como instabilidade da linha de base (Figura 2). Sabe-se que a assimetria distorce o pico cromatográfico, reduzindo o valor de eficiência e prejudicando a sua integração,

principalmente nas análises em que a relação sinal-ruído é muito baixa e quando os dois picos não estão bem resolvidos. Existem várias causas que podem acarretar no alargamento. Colunas danificadas pelo seu uso contínuo, assim como as colunas preparadas no laboratório, cujo enchimento não foi bem sucedido, podem resultar em picos deformados, principalmente para os compostos apolares em condições de fase reversa. Já a cauda apresentada na eluição de compostos básicos ou ionizáveis pode estar relacionada à presença dos silanóis residuais da sílica [28].

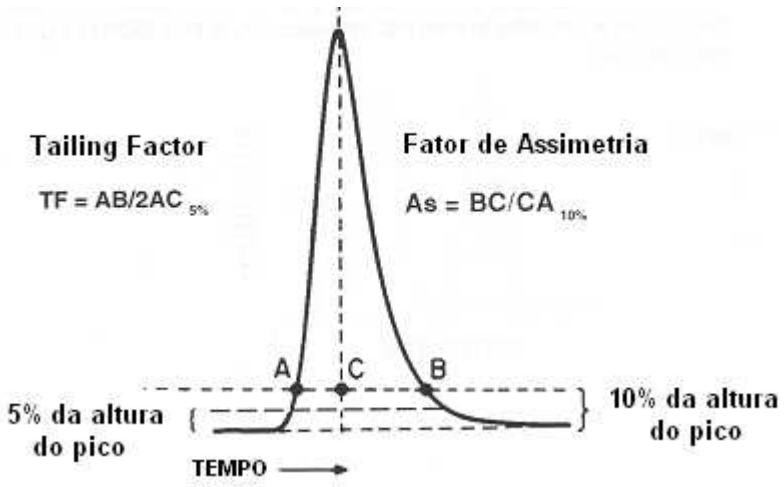


Figura 2: Medidas e cálculo do fator de assimetria e do fator de alargamento do pico.

O fator de As deve ficar no intervalo de 0,8 a 2. Quanto mais simétrico o pico, melhor a separação dos componentes da mistura analisada.

Outro parâmetro cromatográfico que pode ser empregado é o fator de alargamento de pico, denominado T_F, do inglês *Tailing Factor*. Nesta abordagem a assimetria é medida a 5 % da altura do pico [63]. Esse valor começou a ser utilizado por ter sido recomendado pela *United States Pharmacopeia* (USP) e alguns pesquisadores [28] acreditam ser uma medida mais precisa que o parâmetro As. Entretanto, teoricamente não existe nenhuma vantagem em medir o alargamento de pico com um método ou outro. O valor ideal de T_F é 1,0, indicando que o pico cromatográfico é totalmente simétrico [18].

A eficiência da coluna em uma separação pode ser expresaa pelo número de pratos. Da mesma forma que a resolução, o número de pratos é uma medida da qualidade da separação cromatográfica. Enquanto a resolução é baseada na largura e no tempo de retenção de dois picos adjacentes, o número de pratos leva em consideração um único pico. A eficiência (N) representa a medida do número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase estacionária e a fase móvel, calculado por meio da Equação 5:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

(Equação 5)

Quanto maior o número de etapas de equilíbrio em uma coluna, melhor a separação por ela apresentada. Em um cromatograma, a eficiência é observada através do formato do pico, sendo que quanto mais estreito for o pico, maior é a eficiência da coluna na análise deste soluto.

Existem diversos fatores que podem alterar o valor do número de pratos obtidos por uma dada coluna, a saber: tamanho das partículas da fase estacionária, condições de enchimento da coluna, condições de análise, tamanho da amostra, tipo de soluto e comprimento da coluna. Para efeito de comparação entre colunas, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

A medida da altura de um prato (H) é a razão entre o comprimento da coluna (L) expressa em metros e o número de pratos (N), e pode ser obtida de acordo com a Equação 6:

$$H = L/N \qquad \text{(Equação 6)}$$

Existe outro parâmetro que é denominado de altura do prato reduzido (h). Este parâmetro é um número adimensional calculado pelo quociente da altura do prato e o diâmetro médio das partículas que compõe a FE ($h = H/d_p$). Este parâmetro é útil para comparar colunas recheadas com partículas de tamanhos diferentes [63].

A eficiência de uma coluna depende da vazão que se utiliza e este comportamento pode ser verificado empregando a equação clássica de *van Deemter*, que matematicamente pode ser expressa como:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \qquad \text{(Equação 7)}$$

sendo que $\mu = \frac{L}{t_M}$ é a velocidade linear da FM. A Figura 3 mostra o formato desta curva e as várias contribuições de cada um dos termos.

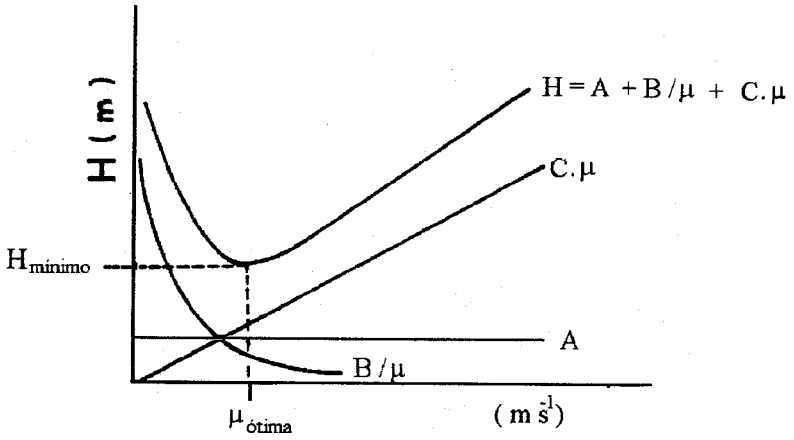


Figura 3: Curva da equação de *van Deemter* mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima [64].

O termo A, chamado de difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos caminhos múltiplos percorridos pelas moléculas do analito. Este termo pode ser minimizado usando colunas com diâmetro interno reduzido, com boa compactação do recheio cromatográfico constituído de partículas uniformes e de tamanho reduzido.

O termo B é devido à difusão longitudinal e está relacionado com a difusão molecular do soluto na FM e pode ser minimizado empregando-se maiores velocidades lineares de FM. Este termo é mais importante em cromatografia gasosa que em CLAE, já que o coeficiente de difusão no líquido é muito menor que no gás.

O termo C está relacionado com a velocidade de transferência de massa, ou seja, com a facilidade que as moléculas do soluto têm em serem transferidas da FM para a FE ou vice-versa [17]. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme polimérico ligado/imobilizado/adsorvido à superfície das partículas do suporte. Quanto menor for esta espessura, menor será o termo C e maior a eficiência da coluna.

A curva da Figura 3 mostra que existe uma vazão (F) ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{ótima}$), na qual H terá um valor mínimo e, consequentemente, a eficiência será máxima. Na prática, a definição da vazão ótima é obtida variando a velocidade do fluxo no sistema cromatográfico e medindo o N ou H em cada velocidade.

Um grande número de testes cromatográficos tem sido discutido na literatura. Apesar da maioria dos protocolos sugeridos fornecer apenas um sistema de qualificação das próprias fases, que em nada contribuem para um sistema objetivo de caracterização geral, alguns protocolos simples para avaliação de fases estacionárias reversas foram sugeridos para tal propósito. Estes protocolos permitem a comparação das

propriedades (tais como: retenção, hidrofobicidade, seletividade estérica, atividade silanofílica, capacidade de troca iônica e habilidade de formar ligações de hidrogênio, além da eficiência da coluna) de uma determinada fase em relação a outra em específico, ou em relação a valores encontrados na literatura [65]. Os mais conhecidos e frequentemente empregados foram sugeridos por Tanaka *et al.* [66], Engelhardt e Jungheim [67] e Neue *et al.* [68]. Além da simplicidade e da possibilidade de uma comparação geral entre fases aparentemente idênticas, estes testes também contribuem para um entendimento mais detalhado da retenção e seletividade em CLAE-FR.

I.2. Análise de Resíduos de Agrotóxicos

No mundo, as perdas anuais devido à ação de pragas na agricultura chegam a 1 bilhão de toneladas, correspondendo a uma redução de 20 a 30% na produção. Os agrotóxicos, desde seu desenvolvimento, desempenharam um importante papel no crescimento da agricultura moderna. A utilização destes compostos químicos que, por um lado, geram benefícios, por outro, são responsáveis pela contaminação do solo, água e alimentos [69]. Assim, a determinação de resíduos de agrotóxicos em alimentos e em amostras ambientais é importante devido aos riscos que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação.

Pode-se definir um agrotóxico como uma substância ou uma mistura de substâncias que previnem, destroem, repelem ou interrompem o crescimento de pragas e pestes [70]. Todos os agrotóxicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Assim, têm-se as definições específicas para cada um de acordo com seu uso, como a seguir: herbicidas para matar ervas, inseticidas para matar insetos, fungicidas para matar fungos, raticidas para matar roedores, moluscocidas para matar moluscos [71].

Como os agrotóxicos são compostos por diferentes substâncias ou mistura de substâncias, incluindo diferentes derivados específicos como produtos de degradação, metabólitos e impurezas, eles podem ter composições significativamente tóxicas. De acordo com a sua composição e toxicidade, os agrotóxicos são classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios [72,73].

No Brasil, o decreto federal nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a lei nº 7802/1989, estabelece que os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, híbridos ou 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, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento [74].

A aplicação de agrotóxicos sintéticos tem sido uma prática rotineira na agricultura nos últimos cinqüenta anos. A sua utilização dentro de um manejo adequado pode aumentar a produção em até 40%, mas o uso indiscriminado desses compostos pode acarretar prejuízos ambientais, muitas vezes irreparáveis, e trazer sérias consequências à saúde humana. Resíduos de agrotóxicos têm sido identificados em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas incluindo aquelas mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e zonas polares [72,75].

Atualmente, no Brasil, mais de 300 princípios ativos e mais de 4000 produtos comerciais e formulações de agrotóxicos estão no mercado e seu uso continua em crescimento, em função do aumento da área cultivada, apesar da diminuição do número de usuários. O maior emprego de agrotóxicos ocorre nas culturas de soja, seguido pelas culturas de cana-de-açúcar e algodão [76].

Depois da aplicação de um agrotóxico, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino de um agrotóxico no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação, escoamento superficial), e por interações desses processos. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por agrotóxicos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental dos agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos [77].

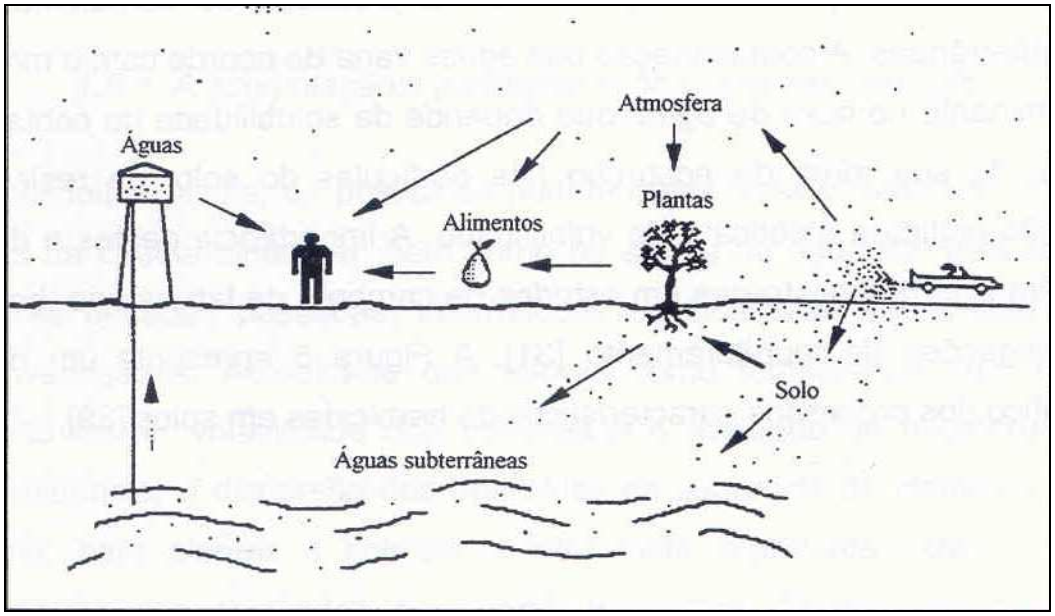


Figura 4: Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por agrotóxicos [78].

Nas últimas décadas, laboratórios públicos e privados vêm desenvolvendo métodos para a determinação de resíduos de agrotóxicos, principalmente em água e alimentos. Contudo, a maioria dos métodos oficiais de análise está longe do considerado ideal, ou seja, métodos de ampla aplicação, rápidos, sensíveis e com resultados confiáveis [79].

Produtos agrícolas como frutas, vegetais e cereais são as matrizes mais analisadas em laboratórios de rotina, apresentando frequentemente resíduos de agrotóxicos de diversas classes. Assim, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos multirresíduo de agrotóxicos para a determinação nestes tipos de alimentos. A diferença das propriedades químicas entre estes compostos e a diversidade de matrizes são algumas das adversidades a serem contornadas no desenvolvimento destes métodos, os quais frequentemente apresentam etapas laboriosas que demandam tempo, grande custo de material e geram grandes quantidades de resíduos tóxicos [80].

A análise de agrotóxicos compreende, basicamente, as etapas de extração do analito da matriz, remoção de interferentes (*clean-up* ou limpeza), concentração, identificação e quantificação das espécies de interesse [81].

I.2.1 Técnicas de extração de resíduos de agrotóxicos

A recuperação (quantitativa) e a pureza do produto isolado são as principais medidas da eficiência da extração. Um procedimento de extração ideal deve ser rápido, seletivo e produzir uma recuperação

quantitativa da espécie de interesse. Portanto, deverá ter como características principais: o mínimo de operações instrumentais, simplicidade, baixo custo e possibilidade de automação [81].

A extração continua sendo a etapa mais crítica dentro de todo o processo de análise e determinação de agrotóxicos, ocupando mais da metade do tempo de todo o processo analítico. Existem diversas técnicas de extração descritas na literatura que, dependendo da complexidade da matriz, podem ser empregadas seqüencialmente, num mesmo procedimento.

A busca por limites de quantificação cada vez mais baixos conduziu a um crescente desenvolvimento de técnicas de extração e concentração de agrotóxicos, cada vez mais eficientes, visando alcançar os limites impostos pela legislação [82]. Os métodos mais frequentemente empregados são a LLE e a SPE.

I.2.1.1 Extração líquido-líquido

A LLE, devido ao fato de ser uma técnica operacionalmente simples e estabelecida há mais tempo, ainda é muito recomendada pelos métodos padrão de análise [83,84]. Baseia-se na partição dos analitos entre uma fase aquosa e um solvente orgânico de baixa polaridade [81]. Apesar do seu grande uso, apresenta inúmeras desvantagens como a possibilidade de formação de emulsão, necessidade de grandes volumes de solventes, muitas vezes tóxicos e inflamáveis, demandar tempo longo de extração, além de ser trabalhosa e de difícil automação [85].

I.2.1.2 Extração em fase sólida

A SPE é uma técnica de extração que tem se popularizado, devido ao fato de ser rápida, de menor custo, consumir menores volumes de solvente e de amostra e ser de fácil mecanização. Permite a limpeza das amostras (*clean-up*), a extração dos analitos e a concentração de analitoa presentes em soluções muito diluídas, como água, para gerar concentrações de analito em níveis detectáveis [81]. A SPE é atualmente amplamente empregada em todo o mundo, inclusive em métodos oficiais, como os recomendados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*US-EPA*). O grande número de aplicações da SPE é possível devido à diversidade e versatilidade dos materiais contidos nos dispositivos de extração, permitindo diferentes modos de operação e diversos mecanismos de separação. Como limitações para a SPE pode ser citado o alto custo de dispositivos comerciais multi-vias (*manifolds*), a falta de homogeneidade dos sorventes de mesma característica química entre os diferentes fabricantes, a impossibilidade de reaproveitamento dos cartuchos quando aplicados a matrizes complexas e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o material correto para a aplicação desejada [86].

Na maioria das aplicações, os sorventes são recheados em cartuchos ou seringas. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, retidos no tubo através de dois filtros.

Em geral, existem quatro etapas no procedimento de SPE: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado, para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) adição da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza (lavagem) do tubo, para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 4) eluição e coleta do analito [87]. A Figura 5 mostra a sequência de um procedimento de extração em fase sólida direcionado para a concentração de analitos e o *clean-up* (limpeza, ou remoção dos interferentes) da amostra.

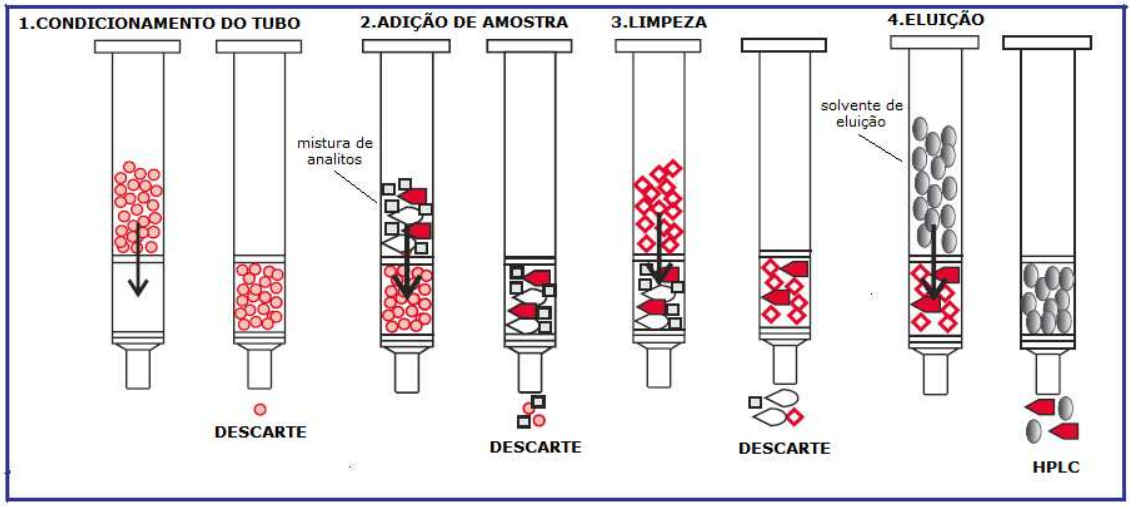


Figura 5: Principais etapas empregadas em SPE *off-line* visando o isolamento de um composto [88].

Atualmente, um grande número de sorventes encontra-se disponível comercialmente. Os materiais de recheio empregados para SPE são similares aos usados em CLAE. Dessa forma, existem cartuchos recheados com fases estacionárias quimicamente ligadas (como octadecilsilano (C18), octilsilano (C8), fenilsilano, etc.), polímeros (como o copolímero de estireno entrecruzado com divinilbenzeno), poliacrilatos substituídos com grupos polares, carvão ativado, sílica gel e silicato de magnésio (Florisil). Os grupos mais usados como sorventes à base de sílica quimicamente ligada são do tipo fase reversa, fase normal e troca iônica [89].

Na SPE empregando fase reversa, a FM apresenta maior polaridade que a fase sólida, que retém os analitos menos polares presentes em solventes polares. Em seguida, os analitos retidos serão eluídos com um

solvente de baixa polaridade. Uma vez que o aumento do tamanho das cadeias hidrocarbônicas aumenta o caráter apolar do sorvente, em muitos casos o uso de fases octadecil (C18) pode acarretar em uma retenção de analitos apolares indesejáveis. Neste caso, empregam-se sorventes contendo cadeias menores como octil (C8) ou butil (C4), diminuindo a retenção [89].

Recentemente, foram introduzidos novos tipos de sorventes à base de resinas poliméricas (Oasis HLB, Oasis MCX), que têm fornecido bons resultados para diversos tipos de análises. A Tabela 1 mostra os principais tipos de SPE e suas características. Já a Figura 6 mostra um diagrama para determinar o procedimento de SPE de acordo com as características da amostra.

Uma alternativa ao uso de cartuchos em SPE foi o desenvolvimento de discos de extração, onde as partículas ativas são imobilizadas em matriz inerte e estável de microfibrilas de politetrafluoretileno (PTFE) flexível, embebidas ou impregnadas com a fase estacionária. Um disco típico tem 47 mm diâmetro e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sorvente. Os discos possuem uma série de vantagens devido ao seu formato, tais como leito mais homogêneo, pressões menores durante a aplicação das amostras e na eluição, ausência de caminhos preferenciais e a possibilidade de utilizar vazões mais altas e menores volumes de eluentes na dessorção [91].

Os recentes desenvolvimentos em SPE estão focados na pesquisa de técnicas envolvendo extrações de vários analitos (multirresíduo) com ampla faixa de polaridade, visando alta eficiência de extração, com redução de tempo e de custo. As pesquisas nesta área têm sido direcionadas para a obtenção de sorventes mais seletivos, para novas configurações cromatográficas e automação [89].

Tabela 1: Principais modos de operação em SPE e suas características [90].

	FASE REVERSA	FASE NORMAL	TROCA IÔNICA	
Analito	polaridade moderada a baixa	polaridade baixa para alta/neutro	carregado ou ionizado	
Mecanismo de Separação	separação baseada na hidrofobicidade	separação baseada na polaridade	separação baseada na carga	
Matriz de amostra	aquosa	solvente não-polar orgânico	aquosa/força iônica baixa	
Condicionamento/ Equilíbrio do sorvente	1. solvatar com orgânico polar 2. água	orgânico não-polar	tampão com força iônica baixa	
Etapa de lavagem preliminar	aquoso/tampão	orgânico não-polar	tampão com força iônica baixa	
Etapas de eluição	aumentar a quantidade de orgânico	aumentar a força eluotrópica da mistura de solventes orgânicos	tampões mais fortes-força iônica ou pH para neutralizar a carga	
			AX [Troca aniônica]	**CX [Troca catiônica]**
Funcionalidade do sorvente	C_{18}, C_{18}, C_8, C_2, CN, NH_2, HLB, RDX, Rxn RP	sílica, alumina, Florisil, diol, CN, NH_2	Accell Plus QMA, NH_2, SAX, MAX, WAX	Accell Plus CM, SCX, MCX, WCX, Rxn CX
Polaridade da superfície do sorvente	baixa para média	alta para média	alta	alta
Intervalo de polaridade do solvente	alta para média	baixa para média	alta	alta
Solvente de carregamento de amostra	água, tampão com força baixa	hexano, clorofórmio, cloreto de metileno	água, tampão com força baixa	água, tampão com força baixa
Solvente de eluição	CH_3OH/água, CH_3CN/água	acetato de etila, acetona, CH_3CN	tampões, sais com força iônica alta, aumento do pH	tampões, sais com força iônica alta, diminuição do pH
Ordem de eluição da amostra	compostos mais polares eluem primeiro	compostos menos polares eluem primeiro	compostos mais fracamente ionizáveis eluem primeiro	compostos mais fracamente ionizáveis eluem primeiro
Mudança de solvente de fase móvel requerido para eluir os compostos	diminuir a polaridade do solvente	aumentar a polaridade do solvente	aumentar a força iônica ou aumentar o pH	aumentar a força iônica ou diminuir o pH

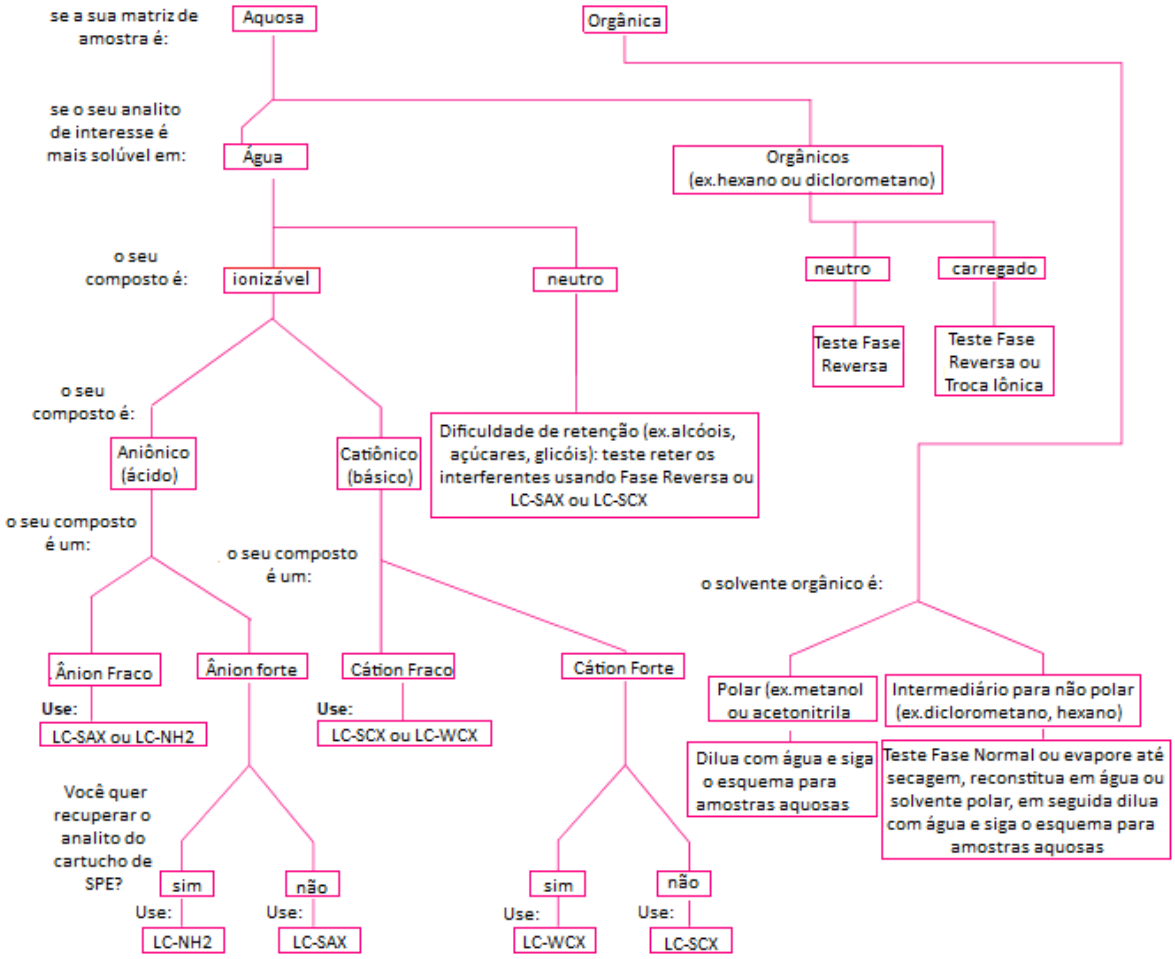


Figura 6: Diagrama esquemático para determinar o procedimento de SPE segundo as características da amostra [88].

Durante os anos 1990, outros métodos de extração também foram desenvolvidos e tinham como objetivo a simplificação de etapas como, por exemplo, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*) [92]. Em 1999, foi proposta a extração sortiva em barra magnética (SBSE, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction*), [93] que fornece baixo limite de detecção, especialmente para analitos hidrofóbicos [94]. Extração por fluido supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) [95], extração acelerada por solventes (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*) e extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês *Microwave Assisted Extraction*) são exemplos de métodos que apresentam [96], dentre outras características, elevada eficiência, entretanto geralmente demandam investimento considerável em instrumentação. Estes novos métodos que têm como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre as extrações, o que implica em um maior tempo de

análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos, podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo [97].

I.2.1.3 QuEChERS

Em 2003, Anastassiades *et al.* [98-100] com o objetivo de superar limitações práticas dos métodos multirresíduo de extração disponíveis na época, introduziram um novo método rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro de preparo de amostras para extração de resíduos de agrotóxicos, conhecido como QuEChERS. Durante o seu desenvolvimento, grande ênfase foi dada para a obtenção de um procedimento dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação das etapas como representado no fluxograma da Figura 7.

Figura 7: Fluxograma representativo do método QuEChERS original [101].

I.2.1.3.1. Tamanho da amostra

Para garantir de maneira simples uma maior eficiência do procedimento de preparo de amostra, usualmente é utilizada a menor quantidade possível de amostra, desde que esta garanta representatividade

estatística ao resultado final [98]. De maneira geral, amostras sólidas, como a maioria dos alimentos, requerem etapas mais complexas e demoradas durante seu preparo [102]. Uma das possibilidades de obterem-se amostras sólidas homogêneas é através do corte das amostras em pedaços menores seguido de processamento em homogeneizadores [103]. Entretanto, Fussel *et al.* demonstraram que a realização desta etapa à temperatura ambiente pode provocar a perda de alguns analitos como, por exemplo, bitertanol, heptenofós, isofenfós e tolilfluanida [104].

I.2.1.3.2 Escolha do solvente de extração

A seleção do solvente de extração é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. Muitos aspectos devem ser considerados, entre eles: habilidade de extração de um amplo espectro de agrotóxicos com diferentes polaridades, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza, compatibilidade com diferentes técnicas cromatográficas, baixo custo, segurança, além de observar a legislação ambiental [105].

Os solventes mais utilizados para extração multirresíduo de agrotóxicos são: acetato de etila, acetona e acetonitrila, sendo que cada um destes apresenta vantagens e desvantagens. Acetato de etila tem demonstrado ser um solvente com características universais, uma vez que possui capacidade para extrair agrotóxicos de diferentes classes em diversos tipos de amostras, porém os percentuais de recuperação de agrotóxicos com caráter básico (pKa > 4) são baixos devido à problemas de degradação, sendo necessária a adição de hidróxido de sódio para um aumento destes percentuais [106]. Acetona e acetonitrila são miscíveis com água e promovem a extração em uma fase única quando em contato com a matriz. Quando uma extração é realizada com acetona há necessidade de adição de solventes apolares para que ocorra a separação entre as fases orgânica e aquosa. O mesmo não é necessário quando se utiliza acetonitrila, uma vez que a adição de sais ao extrato faz com que ocorra tal separação [105].

A utilização de acetonitrila possibilita a extração de uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos, e proporciona a extração de uma ampla faixa de agrotóxicos com diferentes polaridades [107]. Acetonitrila, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) do que acetona e acetato de etila [105].

I.2.1.3.3 Adição de sais e a separação de fases

A adição de sais para promover o efeito *salting out* tem sido utilizada em vários métodos multirresíduo. Dependendo da natureza do solvente utilizado na etapa de partição, a adição de sais proporciona melhores percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que os sais diminuem a solubilidade destes compostos na fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa [109].

Nos métodos multirresíduo que utilizam acetona, a partição é controlada através de uma combinação de NaCl e solventes apolares, porém tem como desvantagens a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solvente [110]. Entretanto, os métodos multirresíduo que utilizam acetonitrila, desenvolvidos até então, não empregam adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição. Na extração com acetonitrila, a adição de sais é muito conveniente uma vez que é rápida, fácil, apresenta baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e proporciona a separação das fases orgânica e aquosa [111].

A utilização de sais secantes para melhorar a recuperação de agrotóxicos polares foi descrita por Andersson *et al.* [112] os quais utilizaram sulfato de sódio (Na_2SO_4).

I.2.1.3.4 *Clean-up* ou limpeza

A etapa de limpeza é essencial para promover robustez e confiabilidade aos resultados obtidos pelo sistema cromatográfico. Em cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) componentes não-voláteis da matriz podem ficar aderidos no conjunto injetor-insersor e também na coluna cromatográfica, alterando a resposta do sistema e aumentando a frequência de manutenções necessárias [113,114]. Em CLAE, alguns componentes não desejáveis podem produzir picos sobrepostos, interferindo na quantificação.

Tradicionalmente as etapas de limpeza empregam SPE. Muitos fatores afetam a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e o fluxo dos solventes. Quando o modo manual é usado, esta técnica envolve o uso de diferentes solventes para lavagem do sorvente, etapas de evaporação e secagem. Quando essa técnica é usada de forma automatizada, é necessário manutenção frequente, além dos sistemas hoje disponíveis apresentarem um custo considerável [115].

As modificações já realizadas no método QuEChERS indicam um futuro promissor na análise multirresíduo de agrotóxicos em alimentos e outros produtos agrícolas. O método tem sido aplicado com sucesso para a extração de agrotóxicos em várias outras matrizes. Lee *et al.* utilizaram o método QuEChERS para extração de 49 agrotóxicos multiclasse em folhas de fumo. Na determinação destes compostos empregou-se GC-MS/MS. Os valores de recuperação ficaram na faixa de 71,9 a 120,1%, com valores de RSD ≤

13,9% e valores de limite de quantificação (LQ) na faixa de 0,015 a 0,157 mg/kg [116]. As técnicas de GC-MS e LC-MS/MS foram utilizadas na determinação de 24 agrotóxicos em amostras de solo, que foram extraídas utilizando o método QuEChERS. Os compostos analisados apresentaram recuperação média de 72,7%, com RSD na faixa de 1,5 a 18,3%. As faixas de LQ ficaram entre 0,08 e 292,0 µg/kg [117].

O método QuEChERS possui muitas vantagens sobre os métodos tradicionais de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos, dentre elas podemos citar: altos percentuais de recuperação (>85%) são obtidos para um grande número de compostos de diferentes polaridades e volatilidades, incluindo agrotóxicos reconhecidos por sua dificuldade de análise como, por exemplo, metamidofós, ometoato, imazalil, tiabendazol, diclorvós, piretróides, entre outros; o método é exato e preciso, sendo estes itens assegurados pela utilização de padrão interno que permite que sejam feitas correções relacionadas aos diferentes teores de água presentes na amostra e, com isso, flutuações de volume em diferentes matrizes; permite o preparo de 10 a 20 amostras entre 30 e 40 min; utilização de um pequeno volume de solventes, além de não utilizar solventes clorados, a adição de acetonitrila quando realizada com dispensadores faz com que o analista tenha uma exposição mínima a este solvente; um único analista pode realizar o preparo da amostra; não requer a utilização de muitos materiais e equipamentos, bem como espaço físico durante a execução do método [101].

A principal desvantagem deste método está relacionada com a relação amostra/extrato final que é de 1 g por 1 mL. Este valor é menor quando comparado com os obtidos com outros métodos que utilizam uma etapa de concentração, apresentando relação amostra/extrato final de 2 a 5 g por 1 mL [118]. Portanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos nas análises isto pode conduzir, no método QuEChERS, a valores de LQ mais elevados, para o mesmo volume de injeção. Entretanto, considerando a alta a detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis atualmente, principalmente com GC-MS/MS e LC-MS/MS, o método QuEChERS é adequado e constitui o estado da arte para a determinação multirresíduo de agrotóxicos em diferentes alimentos [101].

I.2.2 Modos de extração *off-line* e *on-line*

I.2.2.1 Princípios, desenvolvimento e aplicações da cromatografia acoplada a extração no modo *on-line*

O pré-tratamento de amostras de forma eficiente é a chave para o sucesso de qualquer análise. Embora algumas amostras já estejam prontas para análise, na maioria dos casos os instrumentos analíticos são incapazes de analisar as matrizes diretamente, sendo que alguma forma de preparo de amostra é necessária para extrair e isolar os analitos de interesse. Amostras sólidas e semi-sólidas, em particular, tipicamente requerem preparação de amostras complexas e em várias etapas.

Nos últimos anos, muito esforços têm sido feitos no desenvolvimento e otimização de técnicas de separação, particularmente na cromatografia. Sistemas rápidos e eficientes têm sido desenvolvidos para separações em baixas concentrações e métodos com alto desempenho estão disponíveis. Porém, raramente a preparação de amostra está no mesmo nível de desenvolvimento que o método de separação. Muitos métodos de preparação de amostra vêm sendo utilizados há décadas, praticamente sem nenhuma modificação durante os anos. Sabendo-se que as etapas de amostragem e preparação de amostra são responsáveis por 80 % de todo o tempo de análise e que a qualidade destas etapas determina largamente o sucesso da análise de matrizes complexas, a melhoria na preparação da amostra deve ser considerada importante. O tratamento impróprio da amostra invalida toda a análise e mesmo um método de separação muito mais poderoso não dará um resultado válido. As tendências atuais na preparação da amostra estão claramente direcionadas para o desenvolvimento de métodos automatizados e sistemas miniaturizados, que aumentam a precisão, rendimento, reprodutibilidade e o custo [119].

A preparação da amostra para a análise cromatográfica pode ser feita no modo *off-line* ou *on-line* [120,121]. A escolha do melhor procedimento para cada situação depende de diversos fatores. Para a preparação de um número apropriado de amostras, os métodos necessitam ser selecionados não somente com base no desempenho previsto do sistema analítico, mas também de acordo com exigências gerais tais como o número e o tamanho das amostras, equipamentos do laboratório e a experiência do analista. O uso do modo *off-line* é uma boa alternativa quando o número de amostras é pequeno, onde usualmente não há necessidade de um método automatizado ou o consumo de tempo para desenvolver tal método. Nestes casos, o uso de métodos convencionais é suficiente para análise. O uso de métodos automatizados *on-line* é indicado quando o número de amostras similares a ser analisadas aumenta. A automação tipicamente melhora a qualidade dos dados, aumenta o rendimento da amostra, diminui custos e melhora a produtividade do analista e dos instrumentos [119].

Aspectos instrumentais e de metodologia tem que ser considerados no acoplamento *on-line* da etapa de extração com o instrumento analítico. Do ponto de vista instrumental, o acoplamento tende a ser relativamente simples. Entretanto, o método de extração necessita ser otimizado levando em consideração a conexão escolhida, seja cromatografia líquida ou gasosa.

A seleção de uma técnica é dependente do tipo de amostra e dos analitos de interesse. A SPE, a LLE e as técnicas usando membrana são mais utilizadas com amostras líquidas, quando as outras técnicas são tipicamente aplicadas às amostras sólidas. Para analitos voláteis, a extração térmica ou por *head-space,* destacando a SPME, são boas alternativas às técnicas baseadas em solvente.

Muitos métodos de extração para amostras líquidas são relativamente simples de usar em combinações *on-line*. A SPE é muito usada com a cromatografia líquida, sendo a SPE-LC certamente a mais comum dos sistemas combinados [121].

Frequentemente uma etapa adicional de limpeza é incluída no sistema *on-line*, sendo que o uso da SPE dentre as alternativas disponíveis para extração por solvente e cromatografia é muito comum. Há diversas razões para a escolha da SPE como a interface: o volume de solvente pode ser muito grande para transferência direta do extrato à coluna cromatográfica, o tipo de solvente não pode ser apropriado para a etapa cromatográfica, ou o extrato pode estar muito sujo, necessitando de limpeza.

I.2.2.2 Aspectos instrumentais

O acoplamento *on-line* requer algumas modificações em relação às técnicas de extração *off-line*. O acoplamento é geralmente executado com a ajuda de válvulas do tipo *multiport* e de uma ou mais bombas para a extração dinâmica ou transferência do extrato ao sistema cromatográfico.

Em sistemas *on-line*, todo o extrato é transferido à coluna cromatográfica, em contraste às técnicas *off-line* tradicionais onde somente uma parte pequena é injetada. Isto significa que a detectabilidade do método *on-line* pode ser muito melhor. Entretanto, a quantidade elevada da amostra injetada conduz facilmente a saturação da coluna analítica. Para evitar isto, recorre-se frequentemente à miniaturização do sistema de extração, que pode ser conseguido utilizando-se colunas de extração menores.

I.2.2.3. Natureza e volume de eluição

Depois que o sorvente é selecionado para uso com o cartucho, de acordo com sua eficiência de retenção para os analitos alvo, a segunda etapa consiste em determinar o melhor solvente ou a mistura de solventes para fazer a eluição dos analitos desejados [122]. Diversos estudos foram conduzidos para selecionar o solvente mais apropriado para a eluição de agrotóxicos, incluindo triazinas, de diferentes sorventes [123]. No geral, um eluente é escolhido baseando-se no seu alto desempenho, menor volume, toxicidade baixa, não-interferência com os compostos, e compatibilidade com o sistema cromatográfico usado (GC ou LC).

I.2.2.4 Quantidade de amostra

Os tamanhos de amostra necessários na análise *on-line* são freqüentemente pequenos, para evitar sobrecarga no sistema cromatográfico. Como já foi citado, tipicamente todo o extrato é transferido à coluna cromatográfica, aumentando a detectabilidade. Particularmente, se o método da extração é não-seletivo a proporção de compostos contaminantes oriundos da matriz pode ser elevada. Neste caso, o tamanho de

amostra apropriado dependerá naturalmente das concentrações dos analitos alvo e dos outros compostos da matriz, sendo que a detectabilidade pode ser melhorada aumentando a quantidade da amostra.

O volume da amostra líquida pode variar de cem microlitros a cem millilitros. No caso de amostras sólidas e semi-sólidas, tipicamente de 4-1000 mg é suficiente para a análise em baixas concentrações.

I.2.2.5 Efeito de memória (*carry-over*)

Em um sistema *on-line*, a limpeza eficiente do sistema de extração é essencial a fim de evitar efeitos de memória. Tipicamente, a limpeza é feita bombeando o solvente apropriado através da coluna de extração enquanto a análise cromatográfica prossegue. Se as amostras estiverem muito contaminadas, por exemplo, pode ser necessário mudar o cartucho entre cada análise. A recolocação automática de cartuchos de SPE é possível em alguns sistemas comerciais.

I.2.2.6 Volume de *Breakthrough*

O volume da *breakthrough* é uma das características mais importantes na determinação de uso de um adsorvente em uma análise. Ele pode ocorrer nas técnicas de SPE devido à retenção insuficiente dos analitos (dependendo de suas propriedades físico-químicas) ou por injeção de um excesso da amostra além da capacidade do sorvente. Vários estudos foram focados neste assunto, particularmente no que diz respeito às triazinas e seus produtos de degradação [124].

I.2.2.7 Técnicas e recentes desenvolvimentos

Há um grande número de artigos na literatura de métodos empregando processos *on-line* e *off-line* na determinação de agrotóxicos em água [122]. Além disso, combinações *on-line* de extração e métodos cromatográficos foram aplicados na análise de muitos tipos de amostras complexas, incluindo alimentos, combustíveis fósseis, amostras agrícolas, solos, sedimentos, tecidos animais e de plantas, plasma e urina [119].

Os métodos de SPE são facilmente convertidos em sistemas *on-line* totalmente automatizados, acoplados às técnicas de LC ou GC. Os procedimentos são essencialmente os mesmos realizados no modo *off-line*, onde inicialmente é feito o condicionamento do material antes do carregamento da amostra. Geralmente utiliza-se uma coluna pequena (10-20 mm × 1-4,6 mm de diâmetro interno) que é preenchida com o material apropriado. O uso de materiais poliméricos permite a introdução de volumes de amostra grandes, e conseqüentemente, um enriquecimento eficiente dos analitos, até mesmo daqueles que são relativamente polares.

Mais de 300 artigos que descrevem procedimentos de SPE-LC *on-line* já foram publicados, principalmente na área de bioanálises [120,121]. Vários instrumentos comerciais, tais como Prospekt-2tm e OSP-2 estão disponíveis no mercado. A maioria dos métodos de SPE-LC utiliza a cromatografia líquida em fase reversa como o método analítico final. Na prática, vários adsorventes para fase reversa como C18 [125,126], materiais de troca iônica [127], os imunosorventes [128], materiais de acesso restrito (RAM, do inglês *Restricted Access Materials*) [129] e materiais impressos molecularmente (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) [130, 131] já foram aplicados em sistemas *on-line*.

I.2.3 Métodos de detecção de agrotóxicos

A detecção feita na região do ultravioleta (UV) em um único comprimento de onda ou em vários comprimentos de onda utilizando detecção por arranjo de diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) é comumente empregada em CLAE, assim como as detecções por captura de elétrons (ECD, do inglês *Electron Capture Detector*) e espectrômetro de massas são bastante utilizadas em GC. Os limites de detecção alcançados em LC-DAD são a níveis de µg/L e normalmente comparáveis aos obtidos por GC-MS, os quais são, geralmente, mais sensíveis que os obtidos por GC-ECD [132].

Publicações mostram que há uma tendência em se utilizar, na determinação de resíduos de agrotóxicos em águas, técnicas sofisticadas como GC-MS e LC-MS [133,134].

No entanto, os fatores mais importantes na escolha da técnica para análise de agrotóxicos são: característica do analito (estrutura química, propriedade físico-química, etc), o comportamento do analito no sistema cromatográfico, a necessidade, ou não, de derivatização do analito e o trabalho necessário para isso, a disponibilidade da técnica no laboratório e o propósito geral da análise [135].

I.2.4 Análise de agrotóxicos em amostras de água

A análise de resíduos de agrotóxicos em água é dificultada pela grande variedade de compostos existentes, bem como pelos baixos níveis de concentração encontrados [136].

Rios, lagos, barragens e mananciais podem ser contaminados por agrotóxicos, que seguem distintas rotas de contaminação. Tais rotas dependem das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos bem como das propriedades do ambiente em estudo [137]. A degradação dessas classes de agrotóxicos pode resultar em metabólitos muito mais prejudiciais que o próprio agrotóxico original [138].

As maiores rotas de transferência de agrotóxicos para sistemas aquáticos são o escoamento superficial e a drenagem. O tipo de planta e a topografía do terreno têm decisiva importância na maior parte desses procesos [139]. Esses produtos, quando aplicados sobre os campos de cultivo, podem atingir os corpos d'água

diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos. Outras formas de contaminação indireta podem ocorrer através da volatilização dos compostos aplicados nos cultivos e pela formação de poeira do solo contaminado [140, 141] e/ou da pulverização de agrotóxicos, que podem ser transportados por correntes aéreas e se depositarem no solo e na água, distantes das áreas onde foram originalmente usados. Por fim, tais substâncias são capazes de interagir com o organismo vivo, causando múltiplas alterações que podem gerar graves desequilíbrios ecológicos, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição.

No Brasil, o controle da qualidade da água para o abastecimento público é regulamentado pela portaria 518, de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde [142]. Este regulamento estabeleceu procedimentos e responsabilidades relativas ao controle da qualidade da água para consumo humano, além de seu padrão de potabilidade, limites para a qualidade microbiológica, turbidez da água filtrada, presença de substâncias químicas, e constituintes radioativos, que representam risco à saúde, além do padrão de aceitação para o consumo humano [143]. Nesta mesma portaria, são estabelecidos valores máximos permissíveis para alguns grupos de agrotóxicos. Apesar disso, o número de ingredientes ativos monitorados pela legislação brasileira ainda é muito pequeno, comparado com a quantidade dos mesmos que atualmente se encontram em uso [142].

A EPA estabeleceu, em 2001, os padrões aceitáveis para água potável, com indicação do nível abaixo do qual não há risco para a saúde do consumidor e também do mais alto nível que é permitido [144]. A União Européia estabelece limites mais rígidos, segundo a Diretiva n°.98/83/ECC de 03 de novembro de 1998. Para água potável é permitida uma concentração máxima de 0,1 µg/L para agrotóxicos individuais e 0,5 µg/L para a soma de agrotóxicos, incluindo metabólitos ou produtos de degradação tóxicos. Para águas superficiais, que serão destinadas a tratamento para posterior consumo humano, este limite máximo permitido é de 1 a 5 µg/L [145].

Para avaliar o possível impacto dos agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos, métodos analíticos são requeridos para determinações simultâneas de rotina de vários compostos em concentrações extremamente diluídas em amostras de água [146].

I.2.5 Análise de agrotóxicos em amostras de caldo de cana (garapa)

A cana de açúcar é originária do norte da Índia, de onde teria ido para a China e o Oriente Médio. Os árabes a levaram para o Norte da África e para o Sul da Europa, e os chineses a levaram para Java e as Filipinas. Cristovão Colombo introduziu-a na América espanhola, trazendo-a da Ilha da Madeira [147]. No

Brasil, a cultura da cana teve início em 1522 na capitania de São Vicente, com canas provenientes da Ilha da Madeira [148].

A cana de açúcar, pertencente ao gênero *Saccharum*, constitui-se em uma das gramíneas de maior área cultivada nas regiões tropicais e subtropicais. Há pelo menos seis espécies pertencentes a este gênero, mas a espécie cultivada é o híbrido de nome *Saccharum officinarum.* No Brasil, constitui-se como matéria prima básica para as agroindústrias do açúcar, do álcool etílico e das aguardentes [149].

A cana de açúcar é uma matéria prima de grande versatilidade e viabilidade econômica; seu êxito produtivo justifica-se pela fácil adaptação ao clima e solo brasileiros, sendo cultivada em todo território nacional [150]. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção brasileira de cana de açúcar atingiu 612,2 milhões de toneladas em 2009, alta de 7,1% em relação ao período anterior. O estado de São Paulo concentrou 57,8% da produção e colheu 354,3 milhões de toneladas, 2,5% a mais do que em 2008 [151,152].

A bebida obtida da cana-de-açúcar, conhecida popularmente por garapa, é muito popular no Brasil sendo consumida por pessoas de todas as idades, especialmente nos períodos mais quentes do ano. É obtida por extração em moendas elétricas ou manuais, coada em peneiras metálicas ou plásticas e servida com gelo, podendo ser consumida pura ou adicionada de suco de frutas ácidas. A bebida é comercializada em vias públicas, parques, praças e feiras por vendedores ambulantes [153].

A garapa é constituída basicamente por água e substâncias sólidas solúveis, destacando-se entre eles, os açúcares tais como a sacarose (em maior proporção), glicose e frutose. O seu valor nutricional e energético está diretamente ligado ao seu alto teor de açúcar, uma vez que o seu conteúdo protéico é extremamente baixo, o que lhe confere a característica de ser um alimento muito desbalanceado em relação a seus nutrientes. A Tabela 2 mostra a composição centesimal do caldo de cana-de-açúcar [154].

O caldo de cana é composto também por antioxidantes: ácidos fenólicos (cafêico, sináptico e isômeros do ácido clorogênico), flavonóides (apigenina, luteolina e derivados de tricina) e outros compostos fenólicos. O consumo de apenas 250 mL poderia resultar na ingestão de 40 mg de fenólicos, representando uma importante fonte desses compostos antioxidantes na dieta [156].

Esta bebida é caracterizada como um líquido opaco, viscoso, de cor parda ao verde escuro, apresentando uma proporção de sólidos solúveis, compreendida entre 15 e 25°Brix. O pH do caldo é pouco ácido, variando entre 5 e 6, sendo mais comum o intervalo 5,2 – 5,4 [147,155].

Tabela 2: Composição do caldo de uma cana sadia e normal, para as condições do Brasil [155].

Constituinte	Teor (%)
ÁGUA	75-82 (média 78)
SÓLIDOS TOTAIS DISSOLVIDOS	18-25 (média 22)
Açúcares	15-24 (média 20)
sacarose	14,5-23,5 (média 20)
glicose	0,2-1,0 (média 0,4)
frutose	0,0-0,5 (média 0,1)
Não-açúcares	1,0-2,5
Orgânicos (matéria nitrogenada, gorduras e ceras, pectina, ácidos e matérias corantes)	0,8-1,5 (média 1,2)
Inorgânicos (cinzas) (sílica, K,P,Ca, Mg,Na,S,Fe,Al,Cl)	0,2-0,7 (média 0,3)

I.3. Validação de Métodos Analíticos

Para garantir que um novo método analítico possa gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação chamada de validação. A validação pode ser definida como sendo a comprovação, por exame e fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para um determinado uso pretendido pelo método de análise são atendidos. Deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico, incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente [157,158].

A validação faz parte de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação da União Européia, Japão, Estados Unidos e outros países, quando se pretende o registro de métodos usados para a quantificação de produtos como fármacos em fluídos biológicos e determinação de resíduos de agrotóxicos em vários tipos de matrizes [157,158].

Os parâmetros de validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais e algumas definições são diferentes entre diversos grupos. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, pela ICH (*International Conference of Harmonization*). O que se pode notar é que órgãos de credenciamento nacionais como ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), e internacionais como a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO (ISO/IEC 17025) e ICH, exigem o item "validação de métodos analíticos" como um requisito fundamental para a qualidade assegurada e demonstração da competência técnica [159-164]. Em relação às

normas, pode-se observar que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação.

No Brasil, só há uma resolução específica de validação de metodologia analítica para resíduos de agrotóxicos, porém com objetivos que diferem ao desenvolvimento de uma metodologia. A resolução enfatiza os procedimentos para a condução de ensaios de campo e para o estudo de ensaios de laboratório específicos e alguns critérios mínimos para quantificar os agrotóxicos presentes ou ausentes, resultados de estudos experimentais no campo. Os agrotóxicos quantificados serão avaliados para fins de registro e estabelecimento de LMR (limite máximo de resíduos) para determinada cultura [165].

A validação total de um método pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento e amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados [157,158].

A seguir, são definidos os principais parâmetros geralmente envolvidos no procedimento de validação dos métodos analíticos.

I.3.1 Especificidade e Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse [166]. O mesmo significado tem sido freqüentemente utilizado para o termo especificidade [164,167]. Para alguns autores um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo [168]. Desde que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, como sugerido pela IUPAC [161]. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra [164,167]. Uma segunda maneira é através da avaliação com

detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro [169]. Estas duas maneiras são as mais utilizadas.

I.3.2 Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração da espécie em análise, em uma dada faixa de concentração [160].

Para a maioria das técnicas analíticas cromatográficas, uma relação linear de primeira ordem é observada entre a resposta do detector (y) e a concentração ou massa (x) do analito em estudo. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, descrita pela equação 8 da regressão linear:

$$y = ax + b \qquad \text{(Equação 8)}$$

onde:

b é o coeficiente linear (intersecção da curva analítica)

a é o coeficiente angular (inclinação da reta).

Idealmente, a deve ser reprodutível e b não deve ser estatisticamente diferente de zero [157,158]. O coeficiente angular da curva (a) representa a sensibilidade do método. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração e maior será a sensibilidade do método.

Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r [170]. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão [167,169]. A ANVISA [159] recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO [160] um valor acima de 0,90.

I.3.3 Faixa linear e faixa linear dinâmica

A faixa linear dinâmica de um método corresponde ao intervalo entre os níveis superior e inferior da concentração do analito que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade exigidas, ou seja, é o intervalo onde a curva analítica segue uma relação linear [171]. Já a faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para o qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho e ser linearmente correlacionada às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho possam ser distinguidos do branco do método [160]. Várias recomendações são encontradas na literatura para a escolha desse intervalo. Por exemplo, a ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas [159]. Para resíduos, o GARP (Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas) [172] recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quíntuplo da concentração do limite de quantificação. A IUPAC especifica que os pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que esta faixa compreenda 0–150% ou 50–150% do valor esperado, dependendo de qual destas duas opções for mais adequada [173]. Para produtos formulados, a ICH, entre outros, recomenda uma variação de ± 20% do valor declarado ou esperado [164,167]. As diretrizes da ICH [164] e da ANVISA [159] especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O GARP também sugere cinco concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5%. A IUPAC recomenda seis ou mais níveis de concentração [173].

As curvas analíticas podem ser construídas utilizando-se os seguintes métodos:

(A) Padronização Externa: o método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão;

(B) Padronização Interna: consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado de padrão interno;

(C) Adição Padrão: é realizada adicionando-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo [157].

I.3.4 Calibração na matriz

O método de calibração na matriz (MMC, do inglês *matrix-matched calibration*) consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e

construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. O método de superposição de matriz pode ser utilizado para calibração, tanto com a padronização interna como com a padronização externa. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse. Sua principal vantagem sobre o método de padronização externa é que fornece uma melhor correspondência com a composição da amostra. Apesar de se obter uma calibração confiável com o método de calibração na matriz, ele é somente uma forma para compensar efeitos da matriz, mas não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra. Assim, em amostras nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância de interesse para utilizar o método de calibração na matriz, deve-se utilizar o método de adição padrão [174].

O uso da calibração na matriz em métodos cromatográficos é recente. Um dos primeiros trabalhos foi descrito por Johnson *et. al* [175], onde é avaliada a variação nos resultados de análise multirresíduo de herbicidas em vegetação, por GC-MS, comparando a calibração convencional (ou calibração com padrões externos) com a calibração na matriz. Recentemente, têm sido publicados na literatura estudos envolvendo calibração na matriz, aplicada à análise multirresíduo de agrotóxicos em frutas e vegetais por CLAE [176].

I.3.5 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração ou quantidade do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por um método analítico com um intervalo de confiança especificado, ou ainda, que pode ser estatisticamente diferente do ruído. É o ponto onde o valor da medida é maior que a incerteza a ela relacionada [160,164].

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento [160].

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança que a concentração do analito é maior que zero [160].

O LD pode ser determinado de três maneiras diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído e pelo método baseado em parâmetros da curva analítica.

I.3.5.1 Método visual

O LD é determinado através da adição de concentrações conhecidas da substância de interesse à matriz, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

I.3.5.2 Método da relação sinal-ruído

Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. É feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz [172] e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção. Podemos usar a equação 9 para esse cálculo:

$$LD = C \times \frac{3}{S/R} \qquad \text{(Equação 9)}$$

onde:

C é a concentração do composto

S é o sinal obtido (uAbs)

R é o ruído (uAbs)

3 é a razão S/R mínima para um pico ser detectado com segurança.

I.3.5.3 Método baseado em parâmetros da curva analítica

O limite de detecção (LD) pode ser expresso como:

$$\mathrm{LD} = 3{,}3 \times \frac{s}{\mathrm{S}} \qquad \text{(Equação 10)}$$

onde:

s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação

S é a inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

I.3.6 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser determinada em um nível aceitável de precisão e exatidão [160].

O limite de quantificação do equipamento (LQE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de seis a dez vezes a razão sinal/ruído do equipamento [160].

O limite de quantificação do método (LQM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança que a concentração do analito pode ser quantificada com precisão e exatidão. O LQM é determinado a partir do LQE e do número de vezes que a amostra é concentrada durante o processo de extração [177].

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal-ruído ou pelo método baseado na curva analítica, conforme a equação 11:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \qquad \text{(Equação 11)}$$

onde:

s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação

S é a inclinação da curva ou coeficiente angular da curva analítica.

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído não é trivial e às vezes subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. Além disso, a determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna. O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. A curva analítica deve conter a concentração correspondente ao LQ [157].

I.3.7 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro [160].

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH estabelece que um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de fortificação deve ser obedecido [164]. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA [159].

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão [157].

I.3.7.1 Materiais de referência certificados (CRM)

Os CRM são materiais de referência de laboratórios credenciados que contém um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) da mesma amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método [157].

I.3.7.2 Comparação de métodos

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida. As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos em separado (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras, em uma faixa de concentrações em que se pretende validar o método [157].

I.3.7.3 Ensaios de recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação) (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada [178].

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação

pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises em nível de resíduos, o GARP recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação [172]. Para componentes em maiores concentrações, os níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150% do nível esperado para a substância [18].

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 15% [172]. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 20% [172]. A recuperação nada mais é que uma medida da eficiência do procedimento de extração do soluto a partir de uma matriz que tenha a substância fortificada.

A recuperação é expressa em termos de porcentagem de analito quantificado em relação à quantidade acrescentada na etapa de fortificação, em um determinado número de ensaios.

$$\textbf{Recuperação (\%)} = C_1 / C_2 \times 100 \qquad \text{(Equação 12)}$$

onde:

C1 é a concentração determinada na amostra fortificada

C2 é a concentração adicionada à amostra (concentração inicial do analito)

I.3.7.4 Adição padrão

Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse. No método de adição padrão, quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância [179]. A concentração da substância de interesse na amostra original pode ser determinada gráfica e matematicamente. Em geral, para adição padrão, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz [18]. A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada.

I.3.8 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas [164]. A precisão é avaliada usualmente pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecida como coeficiente de variação (CV), em um número estatisticamente significativo de amostras.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad \text{(Equação 13)}$$

onde:

s é a estimativa do desvio padrão das medições

$\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações)

x_i é o valor individual de uma medição

n é o número de medições

$$\text{RSD (\%) ou CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \qquad \text{(Equação 14)}$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20%, dependendo da complexidade da amostra [168]. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

A precisão é determinada para condições específicas de medição e é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

I.3.8.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento de extração, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de

tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia [180], sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade [159].

A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio [167] ou intra-corrida [159]. Ela pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). O INMETRO [160] recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A ICH [164] e ANVISA [159] sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

I.3.8.2 Precisão intermediária

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores [164].

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH [164] e ANVISA [159] para o cálculo de repetitividade. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

I.3.8.3 Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas de medição, como mudança de operador, local, equipamentos, etc. [180].

A reprodutibilidade não é avaliada em validações rotineiras realizadas em um único laboratório. Elas são requeridas em estudos de colaboração entre laboratórios para a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX Alimentarius, etc. Estudos colaborativos não são somente indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, eles também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão do método [181]. A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual [173].

I.3.9 Robustez

É a medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método.

Embora não faça parte de alguns procedimentos de validação, como do ICH [164], a robustez deve ser incluída em um procedimento completo de validação, uma vez que ela mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. A influência dos fatores na resposta da análise pode ser verificada individualmente (método univariado) ou simultaneamente (método multivariado).

No caso da cromatografia, os vários parâmetros experimentais, como temperatura da coluna, vazão da fase móvel, composição da fase móvel, entre outros, devem ser variados dentro de uma faixa de valores realista, e a variação da resposta deve ser conhecida. Assim, pode-se especificar a faixa de tolerância para cada parâmetro do método, dentro do qual o mesmo é considerado robusto [182].

Finalmente, é importante esclarecer que a validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução. A estratégia de validação é específica e é influenciada pelo procedimento analítico utilizado, pela natureza e concentração do composto de interesse e pela matriz. Correlacionando-se o desenvolvimento, otimização e validação de métodos de uma maneira lógica e organizada, os laboratórios podem gerar resultados bastante eficientes e produtivos. A validação de métodos pode ser um processo tedioso, mas a qualidade dos resultados gerada está diretamente relacionada com a qualidade deste processo [182].

I.4. Bibliografia

[1] FAOSTAT, base de dados online disponível em http://www.fao.org, acessado em fevereiro de 2010.

[2] Dados e cotações – Estatísticas, disponível em http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/, acessado em fevereiro de 2010.

[3] Biziuk; M.; Przyjazny, A.; Czerwinski, J.; Wiergowishi, M.; **J. Chromatogr. A** 754 (1996) 103.

[4] Kirchner, M.; Húšková, R.; Matisová, E.; Mocák, J.; **J. Chromatogr. A**, 1186 (2008) 271.

[5] Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A.; **Anal. Bioanal. Chem**., 389 (2007) 1697.

[6] El Rassi, Z.; **Electrophoresis** 18 (1997) 245.

[7] Tadeo, J.L.; Sánchez-Brunete, C.; Pérez, R.A.; Fernándes, M.D., **J. Chromatogr.A**, 882 (2000) 175.

[8] Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida, disponível em http://labcrom.iqm.unicamp.br/

[9] Jardim, I.C.S.F.; Anazawa, T.A., **J. Liq. Chromatogr**, 17 (1994) 1265

[10] Jardim, I.C.S.F.; Collins, K. E.; Collins, C.H., **Microchem. J.** 77 (2004) 191.

[11] Faria, A.M.; Jardim,. I.C.S.F.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; **J. Sep. Sci.**, 29 (2006) 782.

[12] Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fisher, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 217-223.

[13] Vigna, C.R.M.; Morais, L.S.M.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1114 (2006) 211.

[14] Melo, L.C.F.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 75.

[15] Melo, L.C.F.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.;, **J. Chromatogr. A** 1032 (2004) 51.

[16] Pozzebon, J.M.; Queiroz, S.C.N.;, Melo, L.F.C.; Kapor, M.A.;, Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 987 (2003) 381.

[17] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S., coordenadores, **Fundamentos de Cromatografia**, 1ª ed., Editora da Unicamp, Campinas (SP) 2006.

[18] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L.; **Practical HPLC Method Development**, 2nd ed., Wiley, New York, 1997.

[19] Majors, R.E.; **LC-GC,** 10 (1992) 229.

[20] Anazawa, T.A., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1996.

[21] Claessens, H.A.; **Trends Anal. Chem**. 20 (2001) 563-583.

[22] Engelhardt, H.; Ahr, G.; **Chromatographia** 14 (1981) 227-233.

[23] Kirkland, J.J.; Henderson, J.M.; **J. Chromatogr. Sci.** 32 (1994) 473-480.

[24] Petro, M.; Berek, D.; **Chromatographia** 37 (1993) 549-561.

[25] Bottoli, C.B.G.; Chaudhry, Z.F.; Fonseca, D.A.; Collins. K.E.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 121-128.

[26] Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z.; **Chromatographia** 28 (1989) 19-23.

[27] Hanson, M.; Unger, K.K.; **Trends Anal. Chem**. 11 (1992) 368-373.

[28] Neue, U. D.; **HPLC Columns, Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.

[29] Silva, C.R.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; Airoldi, C.; **Química Nova** 27 N 2 (2004) 270-276.

[30] Tonhi, E.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, C.H.; **Química Nova** 25 N 4 (2002) 616-623.

[31] Schomburg, G.; Köhler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U.; **Chromatographia** (1984) 18 265.

[32] Anazawa, T. A.; Jardim, I. C. S. F.; **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol**. (1998) 21 645.

[33] Petro, M.; Berek, D.; **Chromatographia** 37 (1993) 549-561.

[34] Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; McNeff, C.V.; McCormick, A.; Carr, P.W.; **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 31-62.

[35] Nasal, A.; Haber, P.; Kaliszan, R.; Forgács, E.; Cserháti, T.; **Chromatographia** 43 (1996) 484-490.

[36] Dunlap, C.J.; Mcneff, C.V.; Stoll, D.; Carr, P.W.; **Anal. Chem**. 73 (2001) 598A-607A.

[37] Xiang, Y.; Yan, B.; Yue, B.; McNeff, C.V.; Carr, P.W.; Lee, M.L.; **J. Chromtogr. A** 983 (2003) 83-89.

[38] Lopes, N.P.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 225-229.

[39] Kurganov, A.; Trüdinger, U.; Isaeva, T.; Unger, K.K.; **Chromatographia** 42 (1996) 217-222.

[40] Tonhi, E.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 1075 (2005) 87-94.

[41] Fonseca, D.A.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 209-215.

[42] Silva, R.B.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 845 (1999) 417-422.

[43] Bien-Vogelsang, U.; Deege, A.; Figge, H.; Köhler, J.; Schomburg, G.; **Chromatographia** 19 (1984) 170-179.

[44] Maldaner, L.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Sep. Sci**. 33 (2010) 174-181.

[45] Claessens, H.A.; van Straten, M.A.; **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 23-41.

[46] Köhler, J.; **Chromatographia** 21 (1986) 573-582.

[47] Silva, M.C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol**. 21 (1998) 2447-2458.

[48] Bottoli, C.B.G.; **Tese de Doutorado**, Instituto de Química da Unicamp, Campinas, SP, 2002.

[49] Collins, K.E.; Sá, A.L.A.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H., **J. Chromatogr. A**, 53 (2001) 661.

[50] Morais, L.S.R., **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003.

[51] Anazawa, T.A., **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1992.

[52] Lopes, N.P.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F., **J. Chromatogr. A**. 987 (2003) 77.

[53] Reeder, D.H.; Li, J.; Carr, P. W.; Flickinger, M. C.; McCormick, A. V., **J. Chromatogr. A** 760 (1997) 71.

[54] Bottoli, C.B.G.; Collins, K.E.; Collins, C.H.; **J. Chromatogr. A** 987 (2003) 87-92.

[55] Faria, A.M.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Braz. Chem. Soc.** 20 (2009) 1385.

[56] Collins, K.E.; Granja, M.L.M.M.; Pereira Filho, R.G.; Anazawa, T.A.; Jardim, I.C.S.F.; **Chromatographia** 45 (1997) 99-103.

[57] Doyle, C.A.; Vickers, T.J.; Mann, C.K.; Dorsey, J.G.; **J. Chromatogr. A** 779 (1997) 91-112.

[58] Lumley, B.; Khong, T.M.; Perrett, D.; **Chromatographia** 60 (2004) 59-62.

[59] Krupczynska, K.; Buszewski, B.; Jandera, P.; **Anal. Chem**. 14 (2004) 226A-234A.

[60] Scott, R.P.W.; **Principles and Practice of Chromatography**, Chrom-Ed Book Series (2003), disponível em http://www.library4science.com/

[61] Poole, C.F.; Poole, S.K. **Chromatography Today,** Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991.

[62] Meyer, V.R.; **Practical high-performance liquid chromatography**, 2ª ed., Wiley, New York, 1996.

[63] Poole, C.F.; Schuette, S. A., **Contemporary Practice of Chromatography**, Elsevier, New York, 1984.

[64] Braithwaite, A.; Smith, F.J.; **Chromatography Methods**, 4ª ed., Chapman and Hall, London, 1985.

[65].Cruz, E.; Euerby, M.R.; Johnson, C.M.; Hackett, C.A.; **Chromatographia** 44 (1997) 151-161.

[66] Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N.; **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721-728.

[67] Engelhardt, H.; Jungheim, M.; **Chromatographia** 29 (1990) 59-68.

[68] Neue, U.D.; Serowik, E.; Iraneta, P.; Alden, B.A.; Walter, T.H.; **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 87-100.

[69] Pang, G. F.; Cao, Y.; Zhong, Zhang, J. J.; Fan, C. L.; Liu, Y. M.; Li, X. M.; Jia, G. Q.; Li, Z. Y.; Shi, Y. Q.; Wu, Y. P.; Guo, T. T.; **J. Chromatogr., A** 1125 (2006) 1.

[70] US-EPA (United States Environmental Protection Agency), disponível em http://www.epa.gov, acessado em dezembro de 2009.

[71] Bizuik, M.; Przyjazny, A.; Czerwinski, J.; Wiergowski, M.; **J. Chromatogr. A** 754 (1996) 103-123.

[72] Baird, C.; **Química Ambiental**, 2ª ed. Bookman, Porto Alegre, 2002, 622

[73] Caldas, E.D.; Souza, L.C.K.R.; **Revista da Saúde Pública** 34 n°5 (2000) 529-537.

[74] Decreto nº 4074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989. Diário Oficial da República Federativa da Brasil, Brasília, DF, 08 de janeiro de 2002. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm, acessado em dezembro de 2009.

[75] Spadotto, C.A. e colaboradores; Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações, 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2004 29 p. Disponível em http://www.cnpma.embrapa.br, acessado em outubro de 2009.

[76] Sindag; Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php, acessado em novembro de 2009.

[77] Spadotto, C.A.; Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002.

[78] Gonçalves, F.F. **Tese de Doutorado**, Centro de Ciências Naturais e Exatas da UFSM, Santa Maria, RS, 2007.

[79] Martinez-Vidal, J. L.; Arrebola-Liëbanas, F. J.; Gonzalez-Rodriguez, M. J.; Garrido-Frenich, A.; Fernández-Moreno, J. L.; **Rapid Commun. Mass Spectrom**. 20 (2005) 365.

[80] Lehotay, S.; **J. AOAC Int.** 85 (2002) 1148.

[81] Das, K.G., **Pesticide Analysis**, Marcel Dekker, New York, 1981.

[82] Kuster, M.; **Mass Spectrometry Reviews** 25 (2006) 900-916.

[83] Brondi, S.H.G.; Lanças, F.M.; **J.Braz. Chem. Soc.,**16, (2005) 650.

[84] Psillakis, E.; Kalogerakis, N.; **Trends Anal. Chemi.,** 22 N°10 (2003) 565.

[85] Balinova, A. **J. Chromatogr. A,** 728 (1996) 319.

[86] Melo, L.F.C., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003.

[87] Pozzebon, J.M., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2002.

[88] Guide to Solid Phase Extraction, Sigma-Aldrich, disponível em http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t197910.Par.0001.File.tmp/t197910.pdf Acessado em novembro de 2009.

[89] Queiroz, S.C.N., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2001.

[90] SPE Method Development Summary, disponível em http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10083883. Acessado em novembro de 2009.

[91] Lanças, F.M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**, Rima, São Carlos, 2004.

[92] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; **Anal. Chem**. 62 (1990) 2145.

[93] Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Janssen, H. G.; Cramers, C.; **Anal. Chem**. 71 (1999) 5213.

[94] Hernandez-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; Rodríguez-Delgado, M. A.; Cifuentes, A.; **J. Chromatogr. A** 1153 (2007) 214.

[95] Mendiola, J. A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E.; **J. Chromatogr. A** 1152 (2007) 234.

[96] Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez; J.; **J. Chromatogr. A** 1089 (2005) 1.

[97] Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A.; **Anal. Bioanal. Chem**. 389 (2007) 1663.

[98] Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; **J. AOAC Int**. 83 (2003) 83 412.

[99] Majors, R. E.; **LC GC Eur.** 25 (2007) 436.

[100] Disponível em http://www.allbusiness.com/agriculture-forestry-fishing-hunting/9537271.html, acessada em novembro de 2009.

[101] Prestes, O.D.; Friggi, C.A.; Adaime, M.B.; Zanella, R.; **Quím. Nova** 32 (2009) 1620-1634.

[102] Čajka, T.; Hajšlová, J.; **J. Chromatogr. A** 1058 (2004) 251.

[103] Hercegová, A.; Dömötörová, M.; Matisová, E.; **J. Chromatogr. A** 1153 (2007) 54.

[104] Fussel, R. J.; Addie, K. J.; Reynolds, S. L.; Wilson, M. F.; **J. Agric. Food Chem**. 50 (2002) 441.

[105] Maštovská, K.; Lehotay, S. J.; **J. Chromatogr. A** 1040 (2004) 259.

[106] Pihlström, T.; Blomkvist, G.; Friman, P.; Pagard, U.; Österdahl, B. G.; **Anal. Bioanal. Chem**. 389 (2007) 1773.

[107] Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Harman-Fetcho, J. A.; Donoghue, D. J.; **J. Agric. Food Chem**. 49 (2001) 4589.

[108] Cook, J.; Becket, M. P.; Reliford, B.; Hammock, W.; Engel, M.; **J. AOAC Int.** 82 (2001) 1419

[109] Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs, General Inspectorate for Health Protection, 6th ed., The Hage, 1996.

[110] Pizzutti, I. R.; Kok, A.; Zanella, R.; Adaime, M. B.; Hiemstra, M.; Wickert, C.; Prestes, O. D.; **J. Chromatogr. A** 1142 (2007) 123.

[111] Schenck, F. J.; Brown, A. N.; Podhorniak, L. V.; Parker, A.; Reliford, M.; Wong, J. W.; **J. AOAC Int**. 91 (2008) 422.

[112] Andersson, A.; Pålsheden, H.; **Fresenius J. Anal. Chem**. 339 (1991) 365.

[113] Saito, Y.; Kodama, S.; Matsunaga, A.; Yamamoto, A.; **J. AOAC Int**. 87 (2004) 1356.

[114] Ueno, E.; Oshima, H.; Saito, I.; Matsumoto, H.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; **J. AOAC Int**. 87 (2004) 1003.

[115] Hyötyläinen, T.; **J. Chromatogr. A** 1186 (2008) 39.

[116] Lee, J. M.; Park, J. W.; Jang, G. C.; Hwang, K. J.; **J. Chromatogr. A** 1187 (2008) 25.

[117] Lesueur, C.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M.; **Talanta** 75 (2007) 284.

[118] Hiemstra, M.; Kok, A.; **J. Chromatogr. A** 1154 *(*2007) 3.

[119] Hyötyäinen, T.; **J. Chromatogr. A** 1153 (2007) 14

[120] Pyrzynska, K.; Pobozy, E.; **Crit. Rev. Anal. Chem**. 32 (2002) 227.

[121] Hennion, M.C.; **J. Chromatogr. A** 856 (1999) 3.

[122] Sabik, H.; Jeannot, R.; Rondeau, B.; **J. Chromatogr. A** 885 (2000) 217.

[123] Sabik, H.; Int. J. Environ. **Anal. Chem**. 72 (1998) 113.

[124] Chiron, S.; Fernandez Alba, A.; Barcelo, D.; **Environ. Sci. Technol.** 27 (1993) 2352.

[125] Kuklenyik, Z.; Needham, L.L.; Calafat, A.M.; **Anal. Chem**. 77 (2005) 6085

[126] Famiglini, G.; Trufelli, H.; Pierini, E.; De Simoni, E.; Mangani, F.; Cappiello, A.; J. AOAC Int. 86 (2003) 941.

[127] Visser, N.F.C.; Lingeman, H.; Irth, H.; **J. Pharm. Biomed. Anal**. 32 (2003) 295.

[128] Schoenzetter, E.; Pichon, V.; Thiebaut, D.; Fernandez-Alba, A.; Hennion, M.C.; **J. Microcol. Sep**. 12 (2000) 316.

[129] Christiaens, B.; Fillet, M.; Chiap, P.; Rbeida, O.; Ceccato, A.; Streel, B.; De Graeve, J.; Crommen, J.; Hubert, Ph.; **J. Chromatogr. A** 1056 (2004) 105.

[130] Koeber, R.; Fleischer, C.; Lanza, F.; Boos, K.S.; Sellergren, B.; Barceló, D.; **Anal. Chem**. 73 (2001) 2437.

[131] Hogenboom, A.C.; Handman, M.P.; Jolly, D.A.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.Th.; **J. Chromatogr. A** 885 (2000) 377.

[132] Simpson, N.J.K. **Solid-phase extraction: principles, techniques and applications**. Marcel Dekker, New York, 2000, 97-123.

[133] Beceiro-González, E.; **J. Chromatogr. A** 1141 (2007) 165-173.

[134] Barceló, D.; Petrovic, M.; **Trends Anal. Chem**., 26 (2007) 2-11.

[135] Liska, I.; Slobodnik, J.; **J. Chromatogr. A** 733 (1996) 235-258.

[136] Brondi, S.H.G.; Lanças, F.M.; **J.Braz. Chem. Soc.,**16, N°3B (2005) 650.

[137] Dores, E.F.G.C.; Lamonica-Freire, E.M. **Pesticidas: R. Ecotox. E Meio Ambiente**, Curitiba, v. 9, p. 1-18, jan./dez. 1999.

[138] Barceló, D.; Hennion, M.C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water.** Elsevier, Amsterdan, 1997.

[139] Traubeberhard, U.; **Pestic. Sci**. 43 (1995) 121-129.

[140] Cooper, C.M.; **J. Environ. Qual**. 22 *(*1993) 402-408.

[141] Gilliom, R.J., Barbash, J.E., Crawford, C.G., Hamilton, P.A., Martin, J.D., Nakagaki, Naomi, Nowell, L.H., Scott, J.C., Stackelberg, P.E., Thelin, G.P., and Wolock, D.M., 2006, The quality of our Nation's waters—Pesticides in the Nation's streams and ground water, 1992–2001: U.S. Geological Survey Circular 1291, 172

[142] Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. Disponível em http://www.portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf Acessado em novembro de 2009.

[143] Oliveira, W.E.; Gaglianone, S.; Yassuda, E.R.; Nogami, P.S.; Pereira, B.E.B.; Martins, J.M. Técnicas de abastecimento e tratamento de água, 2ª ed., CETESB, São Paulo, 1978, v1.

[144] Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Standards, 2001. Disponível em http://www.epa.gov/safewater. Acessado em outubro de 2009.

[145] Kuster, M.; **Mass Spectrom. Rev**. 25 (2006) 900-916.

[146] Buchelli, D.T.; Grubler, F.C.; Muller, S.R.; Schwarzenbach, R.P. **Anal. Chem**. 69 (1997) 1569-1573.

[147] Martucci, E. T. **Tecnologia do açúcar de cana**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, Campinas, 1983, 164 p.

[148] Júnior, J.L.; Borges, J.M. **Açúcar de cana**. Viçosa: Imprensa Universitária Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1965.

[149] Cesar, M.A.A.; Silva, F.C.; **A cana-de-açúcar como matéria-prima para a indústria sucroalcooleira.** ESALQ/Depto de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Piracicaba, 1993, 107 p.

[150] Demattê, J.L.I.; Modernizada, canicultura é líder em produção. Visão Agrícola. (Piracicaba) nº1 (2001) 60-67.

[151] Disponível em http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=1216. Acessado em janeiro de 2010.

[152]Disponível em http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor. Acessado em janeiro de 2010.

[153] Soccol, C.R.; Schwab, A.; Katsoka, C.E.; Avaliação microbiológica do caldo de cana na cidade de Curitiba. Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos. Curitiba, 6 n°2 (1990) 116-125.

[154] Pratti, P.; **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, SP, 2004.

[155] Delgado, A.A.; Tecnologia dos Produtos Agropecuários I. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz/USP, Piracicaba, 1975b, 7-14.

[156] McGhie, T.K.; **J. Chromatrogr.** 634 (1993) 107-112.

[157] Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Melo, L.F.C.; **Quím. Nova** 27 (2004) 771-780.

[158] Comission of the European Communities (2003). Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 3ª ed. Bruxelas. 31/10/2007.

[159] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde; Resolução RE nº 869, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em http://www.anvisa.gov.br. Acessado em setembro de 2009.

[160] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

[161] International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem**. 74 (2002) 835-855.

[162] International Standard Organization. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

[163] International Conference on Harmonization (ICH); Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

[164] International Conference on Harmonization (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

[165] Kussumi, T.A.; **Tese de Doutorado**, IPEN, USP, São Paulo, 2007.

[166] United States Pharmacopeia Convention; US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 1999

[167] Shabir, G. A.; **J. Chromatogr., A** 987 (2003) 57.

[168]. Huber, L.; **LC-GC Int**. 11 (1998) 96.

[169] Jenke, D. R.; **Instrum. Sci. Technol**. 26 (1998) 1.

[170] Chui, Q. S. H.; Zucchini, R. R.; Lichtig, J.; **Quim. Nova** 24 (2001) 374.

[171]. Swartz, M. E.; Krull, I. S.; **Pharm. Technol.** 2 (1998) 12.

[172] Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP); Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999.

[173] Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; **Pure Appl. Chem**. 74 (2002) 835.

[174] Cuadros-Rodríguez, L.; Garcia-Campaña, A. M.; Almansa-López, E. M; Egea-González, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Martinez-Vidal, J. L.; **Anal. Chim. Acta** 478 *(*2003) 281.

[175] Johnson, P.D.; Rimmer, D.A.; Brown, R.H. **J. Chromatogr. A** 765 (1997) 3.

[176] Krull, I.; Swartz, M.; **LC-GC** 16 *(*1998) 464.

[177] Maldaner, L.; **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2010.

[178] Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgelj, A.; Willetts, P.; Wood, R.; Pure Appl. Chem. 71 (1999) 337.

[179] de Andrade, J. C.; **Quim. Nova** 10 *(*1987) 159.

[180]. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, 2ª ed., 2000.

[181]. Vial, J.; Jardy, A**.; Chromatographia** 53 (2001) S-141.

[182] Barros Neto, B.; Pimentel, M. F.; Araújo, M. C. U.; **Quim. Nova** 25 *(*2000) 856.

Capítulo II - Objetivos

Verificar a potencialidade dos sorventes de SPE e das fases estacionárias preparadas com PMOS imobilizado por tratamento térmico na sílica, na extração, separação e quantificação de diversos agrotóxicos em matriz água e caldo de cana por cromatografia líquida em fase reversa.

Para alcançar o objetivo proposto, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

(a) preparar os sorventes e as FE SiO_2(PMOS);

(b) caracterizar os sorventes e as FE por meio de testes cromatográficos;

(c) aplicar os sorventes e FE SiO_2(PMOS) na determinação de agrotóxicos em água por SPE-HPLC no modo *off-line.*

(d) aplicar os sorventes e FE SiO_2(PMOS) na determinação de agrotóxicos em água por SPE-HPLC no modo *on-line.*

(e) aplicar o método QuEChERS de preparação de amostra e as FE SiO_2(PMOS) na determinação de agrotóxicos em caldo de cana por HPLC;

(f) validar os métodos desenvolvidos através dos parâmetros de seletividade, linearidade, faixa linear, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

Capítulo III – Procedimento Experimental

III.1. Reagentes e Solventes

- Acenafteno 99%, Aldrich
- Acetato de etila, Tedia
- Acetona p.a., Merck
- Acetonitrila grau HPLC, Tedia
- Ácido fórmico, Merck
- Ácido fosfórico, Merck
- Ácido nítrico p.a, Nuclear
- Água deionizada, sistema Milli-Q Plus, Millipore
- Aldicarbe, Riedel-de-Haën Pestanal
- Amitriptilina, Aldrich
- Anilina p.a., Merck
- Atrazina 98%, Chem Serv
- Benzeno p.a., Synth
- Benzilamina 99% Merck
- Benzonitrila p.a., Riedel-de Haën
- Butilbenzeno 99%, Aldrich
- Butilparabeno, Aldrich
- Cafeína, Aldrich
- Carbofurano, , Riedel-de-Haën Pestanal
- Cianazina, Supelco
- Citrato de trissódio diidratado, Sigma
- Cloreto de sódio, Vetec
- Clorofórmio grau HPLC, Mallinckrodt ChromAR
- Diclometano, grau HPLC, Tedia
- Dihidrogenofosfato de potássio, Merck
- Dipropilftalato, Aldrich
- Diurom 99,3%, Dupont
- Etilbenzeno, Aldrich
- Fenol, 99%, Aldrich Chemical Company

- Hexano, Mallinckrodt ChromAR HPLC
- Hidrogenocitrato de disódio sesquiidratado, Sigma
- Imidacloprido, , Riedel-de-Haën Pestanal
- Linurom 99,3%, Dupont
- Metanol, Mallinckrodt ChromAR HPLC
- Naftaleno, p.a. Carlo Erba
- N,N-Dimetilanilina, 98%, Fluka
- O-terfenil, Merck
- Pentano, Merck
- Pentilbenzeno 99%, Aldrich
- Propazina, Supelco
- Propranolol, Aldrich
- Simazina, , Riedel-de-Haën Pestanal
- Sulfato de magnésio anidro, Synth
- Tebutiurom 99%, Chem Serv
- Tolueno, Merck
- Trifenilieno, Fluka
- Uracil 98%, Aldrich Chemical Company

III.2. Equipamentos

- Agitador magnético, Corning modelo PC-351
- Agitador Roto Torque, Cole-Parmer Instruments Company, Model nº 7637-01
- Agitador vortex, Phoenix, modelo AP 56
- Analisador elementar, Perkin Elmer, modelo 2400 Series II
- Analisador Micromeritics ASAP 2010.
- Balança analítica, Fischer Scientific, modelo A-250
- Banho de Ultra-som, Thornton, modelo T14
- Bomba a vácuo, Marconi
- Bomba de alta pressão LC-10AD Shimadzu (Kyoto, Japão)
- Bomba de enchimento de colunas, marca Haskel, com faixa de pressão disponível entre 0-50000 psi, modelo nº 51769

- Centrífuga, Fisher Scientific, modelo 225
- Cromatógrafo a líquido utilizado para avaliar o desempenho das colunas, constituído por bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Waters modelo 510; detector UV/Visível, de comprimento de onda variável entre 190 a 600 nm, com cela de caminho ótico de 10 mm, Waters, modelo 486; injetor do tipo Rheodyne 7725i (Cotati, CA, EUA); microcomputador tipo Pentium, 90 MHz, com sistema de aquisição e tratamento de dados *Chrom Perfect* e *Report Write Plus*, Justice Innovations.
- Estufa a vácuo, Yamato modelo ADP 21
- Forno controlador de temperatura e processo, tipo tubular, EDG 10 P-S, EDG Equipamentos e Controles (São Carlos, SP) dotado com sistema construído no laboratório para controlar a atmosfera nos tubos.
- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters, modelo 510, acoplada a um forno de coluna, Eldex, modelo CH-150
- Sistema para extração em fase sólida (Manifold) Supelco.
- Sistema purificador de água, Millipore, modelo Milli Q-Plus.

III.3. Preparo das fases estacionárias do tipo PMOS

A fase estacionária utilizada nesse estudo foi o poli(metiloctilsiloxano)(PMOS) (United Chemical Technologies) que é um líquido apolar de massa molar média 16000 Da (Figura 1).

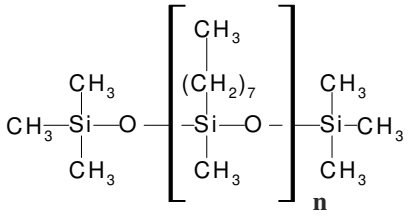


Figura 1: Estrutura do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS).

O suporte cromatográfico escolhido foi a sílica Kromasil (fabricante Akzo Nobel, Bohus, Sweden), forma esférica, tamanho de partícula 5 μm, tamanho de poro 11,1 nm, volume de poro 0,88 $cm^3\ g^{-1}$ e área superficial específica S_{BET} de 320 $m^2\ g^{-1}$.

As FE sorvidas foram preparadas pela adição de quantidades apropriadas de PMOS em diclorometano, de maneira a obter uma solução 10 % (m/v) do polímero. A esta solução, foram adicionadas quantidades apropriadas da sílica, previamente ativada a 150 °C por 24 h, obtendo uma carga de polímero (massa de polímero em relação à massa do suporte) de 44 % (m/m). Esta carga foi escolhida partir do cálculo da quantidade mínima de PMOS necessária para preencher todos os poros da sílica ($\overline{m}_{PMOS_{poros\ cheios}}$). O valor

de $\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios}$ é obtido a partir da equação $\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios} = v_p \times \rho_{PMOS}$, onde v_p é o volume total de poros da sílica (0,88 cm^3/g) e ρ_{PMOS} é a densidade do PMOS (0,91 g/mL).

O béquer com a suspensão foi fechado com papel alumínio contendo pequenos furos para facilitar a evaporação do solvente e impedir a contaminação de pequenas partículas. Em seguida, a suspensão foi agitada por 3 h à temperatura ambiente e deixada em repouso, na capela, para evaporação do solvente, resultando em uma fase (fase sorvida), na qual o PMOS se encontra adsorvido à superfície e poros do suporte cromatográfico.

III.3.1 Condições de imobilização térmica do PMOS no suporte de sílica

As fases estacionárias sorvidas Kromasil/PMOS foram mantidas à temperatura ambiente por 6 dias na capela, para que ocorresse o processo de auto-imobilização, e, em seguida, submetidas ao tratamento térmico por 8h à 120 °C. Utilizou-se um forno controlador de temperatura, Figura 2, como fonte geradora de calor, contendo uma coluna de aço inox preenchida com a amostra. Tal coluna foi acoplada diretamente a um tubo pelo qual passava um fluxo de nitrogênio, fazendo com que todo o processo de tratamento térmico da fase ocorresse em atmosfera não-oxidante.

A temperatura foi escolhida dentro da faixa (80 – 120 °C) onde são obtidas espessuras do polímero do tipo monocamada nos poros da sílica [2] e baseando-se nos melhores resultados de outros trabalhos [3].

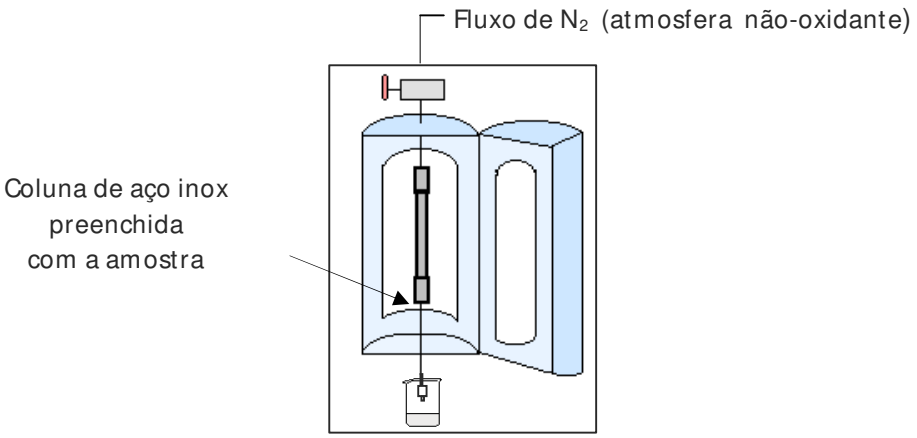


Figura 2: Esquema do forno controlador de temperatura utilizado para o tratamento térmico.

III.3.2 Extração do excesso de polímero após imobilização térmica

Após a imobilização, todas as FE foram extraídas para retirar o excesso de polímero não-imobilizado, utilizando-se tubos de aço inox, dentro de um forno de coluna à 50 °C, acoplado a uma bomba cromatográfica. O solvente de extração hexano foi bombeado através do material contido no tubo por 3 horas a 1,0 mL/min e o eluato foi coletado num béquer [4]. A extração foi realizada sempre no dia seguinte aos tratamentos térmicos. Após a extração, transferiu-se a FE contida no tubo para um béquer, o solvente residual foi evaporado na capela e o material foi seco em estufa a 45 °C por 2 h. Em seguida, estas fases foram usadas no enchimento de colunas.

A quantidade de polímero extraído da sílica foi calculada a partir dos resultados da análise elementar de carbono (% C) do material contido no tubo antes e após a extração.

III.4. Preparo das colunas cromatográficas

III.4.1 Polimento das paredes internas das colunas

Foram usados tubos de aço inoxidável 316 L, sem costura, de formato cilíndrico, com comprimento de 60 mm e 3,9 mm de diâmetro interno. A superfície interna do tubo foi polida segundo um procedimento desenvolvido no LabCrom [5]. O procedimento consiste na passagem, através do interior do tubo de aço, de uma haste de metal giratória envolvida em palha de aço e pasta de polimento, fixada em uma furadeira de bancada.

Após o polimento, os tubos foram lavados com ácido nítrico 50 % (v/v), água e etanol. Este processo foi feito até se obter uma superfície interna altamente polida e livre de imperfeições.

O acabamento e confecção dos terminais da coluna (Figura 3) foram realizados na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp.

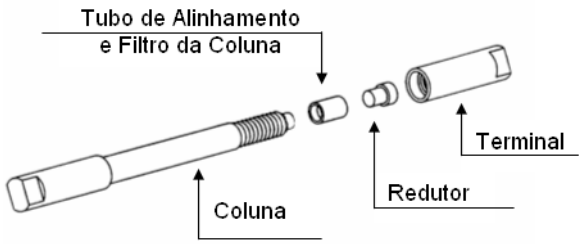


Figura 3: Esquema da coluna cromatográfica e conexões.

III.4.2 Preparo da suspensão de fase estacionária

O material obtido após a extração foi utilizado para preparar uma suspensão da fase estacionária em um solvente de densidade e viscosidade apropriadas para o subseqüente recheio da coluna cromatográfica. As concentrações ideais de suspensão ainda são polêmicas e variam entre 1 e 30 % massa/volume (m/v). Muitos pesquisadores preferem suspensões diluídas, entre 1 e 10 % (m/v), para evitar o risco da formação de aglômeros das partículas. Baseado em trabalhos anteriores [6], escolheu-se a concentração de 10 % (m/v) das fases estacionárias para o preparo das suspensões no solvente clorofórmio. Dessa forma, pesaram-se 0,90 g de FE em um tubo de ensaio com tampa e adicionaram-se 9 mL do solvente clorofórmio previamente filtrado. Em seguida, o tubo de ensaio contendo a suspensão foi colocado em um agitador roto-torque por um período aproximado de 16 horas, antes do enchimento da coluna cromatográfica. A massa de FE utilizada para o preparo da suspensão foi a quantidade necessária para o enchimento de uma coluna cromatográfica (60 × 3,9 mm de d.i.) acrescentando 20 % deste valor para garantir um excesso de FE no enchimento da coluna.

III.4.3 Procedimento de recheio das colunas com a fase estacionária

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o método de suspensão à alta pressão, representado na Figura 4, que consiste de coluna, reservatório de suspensão de 32 mL, bomba de enchimento Haskel e cilindro de nitrogênio.

Antes de iniciar o procedimento de enchimento, todo o sistema é passado por uma vistoria, para se certificar que não há vazamentos na linha e nem a presença de resíduos no interior do reservatório de suspensão e conexões. Vazamentos podem gerar variação da pressão, causando um enchimento não homogêneo da coluna, resultando na perda de sua eficiência.

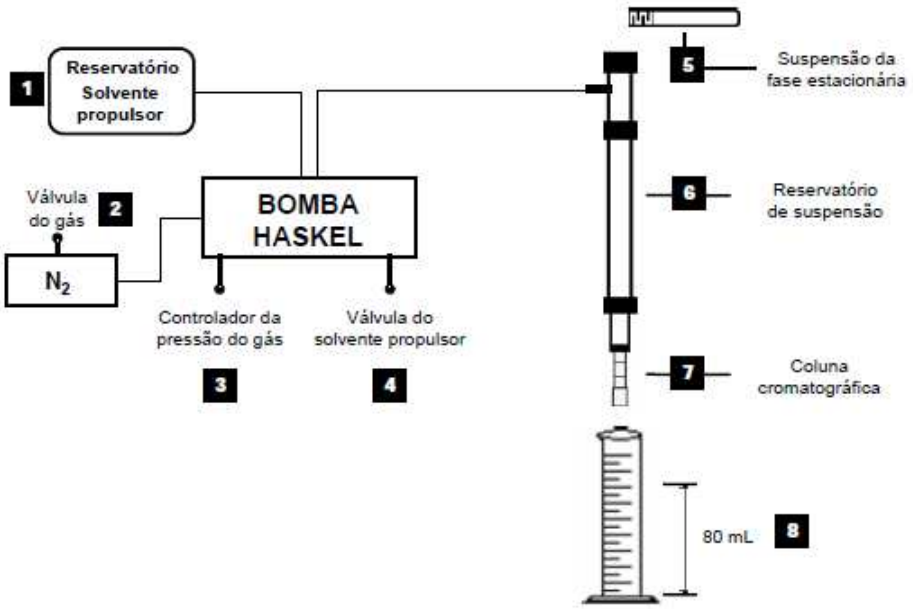


Figura 4: Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas [7].

O procedimento de enchimento consiste em preencher o reservatório de solvente (1) com metanol previamente filtrado (solvente propulsor) e ajustar a pressão da bomba (2 e 3) em um valor fixo de 5500 psi (34,5 MPa) (1 e 2). Em seguida, conecta-se a coluna cromatográfica (7) ao reservatório de suspensão (6), transfere-se a suspensão (5) para o reservatório e completa-se o seu volume com clorofórmio filtrado. Logo após, a válvula do solvente propulsor (4) é aberta e a pressão exercida pelo gás nitrogênio empurra inicialmente a suspensão para o interior da coluna e em seguida o solvente propulsor metanol pela fase estacionária, que fica retida graças à presença de um filtro (diâmetro de poro de 2 μm) ao final da coluna (7). O sistema é mantido sob pressão até se coletar 80 mL de solvente (8). A pressão constante durante todo o procedimento de recheio da coluna irá resultar em um leito bem compactado e homogêneo, ideal para as separações cromatográficas. Terminado o enchimento, o sistema é despressurizado e a coluna é desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com as conexões um filtro, redutor e porca terminal.

III.4.4 Condicionamento das colunas

Após o enchimento, a coluna deve ser condicionada para que seja atingido o equilíbrio entre a FE e a FM na composição a ser empregada nas análises e para eliminar os resíduos do solvente de propulsão. O

condicionamento da coluna foi feito sem acoplá-la ao detector para evitar que partículas que porventura pudessem sair da coluna obstruíssem a tubulação de entrada ou saída do detector ou, principalmente, a cela de detecção. As colunas foram condicionadas por no mínimo 1 h em diferentes fases móveis e vazões, dependendo do estudo realizado. Todos os solventes usados como FM foram filtrados em membrana de 0,45 μm e degaseificados em banho ultrassônico por 15 minutos para eliminar bolhas de ar que podem prejudicar o processo cromatográfico.

III.5. Preparo dos sorventes do tipo PMOS e confecção dos cartuchos para SPE

Os sorventes foram preparados baseando-se em estudos anteriores previamente descritos [8-10], utilizando a sílica Acros Organics, de partículas irregulares de 0,035-0,070 mm (200-400 mesh) com tamanho de poro de 5 nm e a fase estacionária PMOS.

Queiroz desenvolveu sorventes através de imobilização térmica do PMOS sobre sílica a 120°C por 4h à pressão atmosférica, com carga do polímero de 40 % (m/m) [11]. Neste estudo, os sorventes foram obtidos seguindo o mesmo procedimento descrito para as fases estacionárias, porém em atmosfera inerte, e utilizando-se uma carga do polímero de 35 % (m/m).

Os cartuchos de SPE preparados no laboratório utilizados no modo *off-line* foram confeccionados utilizando seringas tipo hipodérmica de 3 mL, com corpo de polipropileno e preenchida com 500 mg do sorvente (enchimento a seco), retidos por dois filtros de polietileno, com tamanho de poro de 20 μm.

Os cartuchos comerciais usados foram Supelclean ENVI-8 e Supelclean LC-8, ambos da Supleco.

III.6. Caracterização físico-química dos sorventes

Os materiais desenvolvidos foram analisados por área superficial específica (S_{BET}), volume específico, diâmetro de poros e análise elementar.

III.6.1 Área superficial específica (S_{BET}), volume específico e diâmetro de poros

As amostras de sorvente foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram obtidas pela adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. Porém, antes das medidas, as amostras foram degaseificadas a 100 °C por 24 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET [12] a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressão de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poro foi determinado empregando o método do ponto único, pela conversão do volume de nitrogênio

adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi determinado a partir dos valores de volume total de poro e área superficial S_{BET} ($4\ v_p/S_{BET}$).

III.6.2 Análise elementar

Na análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio é utilizado o método de combustão para converter os elementos da amostra em gases simples como CO_2, H_2O e N_2. A amostra é primeiramente oxidada em uma atmosfera de oxigênio puro usando reagentes clássicos. Os gases resultantes são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume e, então, despressurizados através de uma coluna, separados, detectados em função de suas condutividades térmicas e convertidos em porcentagem de C, H e N na amostra [13].

A análise elementar foi calculada para os sorventes e para as fases estacionárias antes e após a extração. A partir dos resultados de porcentagem de carbono obtidos foram calculadas as quantidades adsorvidas e/ou extraídas de polímero, após a imobilização térmica e/ou extração aplicadas.

Foram utilizadas as seguintes equações, sabendo-se que 62 % da massa de PMOS é referente a carbono e, utilizando o termo massa específica ($\overline{m}_{PMOS}$), isto é, massa de polímero por grama de sílica:

$$\overline{m}_{PMOS} = \frac{m_{PMOS}}{m_{Si}} = \frac{\%\,C}{62 - \%\,C} \qquad \text{(Equação 1)}$$

$$\textbf{\% PMOS}_{\textbf{retido}} = \frac{\overline{m}_{PMOSretido}}{\overline{m}_{PMOSinicial}} \times 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

Os valores de $\overline{m}_{PMOSretido}$ e $\overline{m}_{PMOSinicial}$ foram obtidos da equação 1, após as medidas de % C para o material residual da extração e para o material não extraído, respectivamente e, finalmente, a % extraída foi calculada:

$$\textbf{\% PMOS}_{\textbf{extraída}} \textbf{ = 100 - \% PMOS}_{\textbf{retido}} \qquad \text{(Equação 3)}$$

Através dos resultados obtidos de massa específica, pôde-se calcular também a espessura da camada de polímero depositado nos poros da sílica (τ), conforme a equação 4.

$$\tau = -\left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \qquad \text{(Equação 4)}$$

onde F é a fração auto-imobilizada ou imobilizada termicamente [2] e d é a medida do diâmetro médio de poro da sílica. Para este cálculo, assume-se que os poros da sílica têm um diâmetro uniforme e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros da sílica.

A fração F é obtida a partir da equação 5:

$$F = \frac{\overline{m}_{PMOS\,retido}}{\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios}} \qquad \text{(Equação 5)}$$

A massa específica de PMOS necessária para encher os poros da sílica, $\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios}$, é obtida a partir do volume de poro específico da sílica (v_p = 0,88 cm^3/g para a Kromasil), e da densidade do PMOS, ρ = 0,91 g/mL, segundo a equação 6:

$$\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios} = vp_{sílica}(mL/g) \times \rho_{polímero}(g/mL) \qquad \text{(Equação 6)}$$

Dessa forma, temos para a Kromasil $\overline{m}_{PMOS\,poros\ cheios}$ = 0,80 g PMOS/ g sílica.

Cálculos da espessura da camada de polímero vêm sendo feitos para muitas FE desenvolvidas no laboratório, a partir dos polímeros polissiloxanos C-8 [14-16], C-18 [16] e polibutadienos [17] imobilizados sobre a sílica por tratamento térmico ou por radiação gama. Esses estudos consideram que são formadas estruturas de monocamadas de ~ 1,1 nm e bicamadas de 2,2 nm. Consideram ainda que a camada formada cobre toda a superfície do poro e a cadeia do polímero fica estendida diretamente para o espaço vazio do poro.

III.7. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias PMOS preparadas no laboratório

Inicialmente, todas as colunas foram avaliadas cromatograficamente com base na separação dos compostos de duas misturas-teste comumente empregadas no LabCrom:

- Mistura-teste 1: uracila (1 mg/L), benzonitrila (30 m /L), benzeno (25 mg/L), e), tolueno (30 mg/L) e acenafteno (30 mg/L) [2];

É constituída de compostos neutros de polaridades variadas e foi empregada para avaliação da seletividade, expressa pelo valor de resolução (Rs), e a hidrofobicidade das fases estacionárias ou o grau de recobrimento da sílica através do fator de retenção (k).

- Mistura-teste 2: uracila (1 mg/L), fenol (20 mg/L), N,N-dimetilanilina (20 mg/L), naftaleno (30 mg/L) e acenafteno (50 mg/L) [2];

É constituída de compostos ácidos, básicos e neutros e foi empregada para avaliação da interação dos analitos, principalmente o de caráter básico, com o suporte cromatográfico. Estas informações são obtidas pelo tempo de retenção e pela simetria de pico destes compostos, obtida através do valor de fator de assimetria a 10 % (As_{10}). Além disso, o desempenho das colunas foi analisado também pelo valor de eficiência (expressa em números de pratos por metro, N/m).

As duas misturas foram dissolvidas em fase móvel metanol:água (70:30, v/v) e armazenadas na geladeira. A uracila foi adicionada às misturas para se obter o valor do t_M, tempo necessário para que a fase móvel passe através de toda a extensão do sistema cromatográfico, desde o momento da injeção até o registro do máximo do pico da uracila pelo sistema de detecção. O t_M é usado nos cálculos do parâmetro cromatográfico fator de retenção (k) e fator de separação (α).A avaliação cromatográfica foi feita em vazão de fase móvel de 0,2 mL/min para a mistura teste 1 e 0,4 mL/min para a mistura teste 2.

Outras misturas citadas na literatura foram usadas na avaliação das colunas:

- Mistura-teste de Engelhardt: uracila (1 mg/L), anilina (15 mg/L), fenol (20 mg/L), N,N dimetilanilina (20 mg/L), tolueno (30 mg/L) e etilbenzeno (30 mg/L) [18].

Para a avaliação da mistura foi empregada fase móvel metanol:água (55:45, v/v), a uma vazão ótima de 0,3 mL/min, temperatura de análise de 40 °C e detecção a 254 nm. As principais informações fornecidas por este teste são:

- Seletividade hidrofóbica: esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH2} = k_{etilbenzeno}/kt_{olueno}$), que diferem entre si por um grupo CH_2, também denominada de seletividade metilênica. O valor de αCH_2 fornece informações a respeito da hidrofobicidade das fases estacionárias.
- Atividade silanofílica: medida pelo fator de assimetria do pico da N,N-dimetilanilina a10 % de sua altura e também pela ordem de eluição dos compostos básicos (anilina e N,N-dimetilanilina). Para uma coluna com baixa atividade silanofílica, a anilina deve eluir antes do fenol. Em alguns casos pode haver a co-eluição destes

dois compostos: A N,N-dimetilanilina deve ser eluída antes do tolueno. Além disso, a razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol deve ser inferior a 1,3 [7].

- Misturas-teste de Tanaka

No teste de Tanaka e colaboradores [19], quatro misturas-teste foram avaliadas empregando uma determinada composição de fase móvel para cada uma destas misturas. Todas as misturas foram analisadas a 40 °C, empregando uma vazão de fase móvel ótima de 0,3 mL/min e detecção a 254 nm. As misturas e suas respectivas fases móveis utilizadas foram:

Mistura A: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenila e trifenileno. Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v).

Mistura B: uracila, cafeína e fenol. Fase móvel: metanol:água (30:70, v/v).

Mistura C: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: metanol:0,020 mol/L de KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 7,6 (30:70, v/v).

Mistura D: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: metanol:0,020 mol/L de KH_2PO_4/H_3PO_4 pH 2,7 (30:70, v/v).

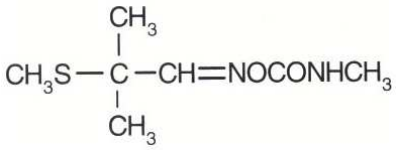
Com a realização deste teste foi possível avaliar cinco diferentes propriedades cromatográficas das fases PMOS preparadas no laboratório:

- **Hidrofobicidade ou seletividade hidrofóbica (αCH_2):** medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha CH_2 = k_{pentilbenzeno}/k_{butilbenzeno}$. Esta é uma forma de se analisar o recobrimento superficial da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH2, é dependente da quantidade de polímero imobilizado.
- **Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$):** medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_{trifenileno} / k_{o\text{-}terfenila}$. O $\alpha_{T/O}$ é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.
- **Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$):** esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_{Cafeína}/k_{fenol}$. O $\alpha_{C/F}$ é uma indicação do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra (grau de capeamento da FE).
- **Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6):** propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 = $k_{benzilamina}/k_{fenol}$. O resultado obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da fase estacionária.

- **Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7):** Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 2,7 = $k_{benzilamina}/k_{fenol}$. O resultado obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais [7].

III.8. Agrotóxicos estudados

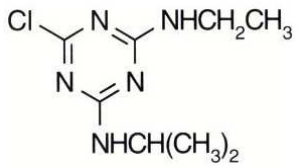
- Aldicarbe



Grupo químico: metilcarbamato de oxima

Classe: inseticida, acaricida e nematicida

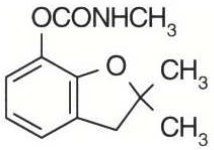
- Atrazina 98%



Grupo químico: triazina

Classe: herbicida

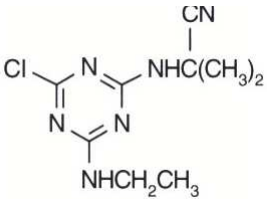
- Carbofurano



Grupo químico: metilcarbamato de benzofuranila

Classe: inseticida, cupinicida, acaricida e nematicida

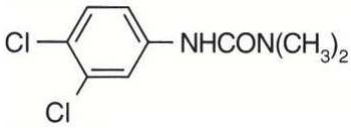
- Cianazina



Grupo químico: triazina

Classe: herbicida

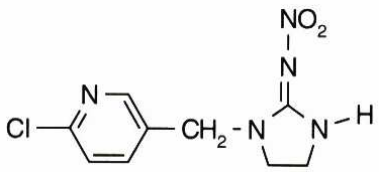
- Diurom 99,3%



Grupo químico: uréia

Classe: herbicida

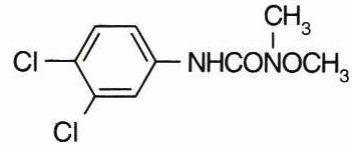
- Imidacloprido



Grupo químico: neonicotinóide

Classe: inseticida

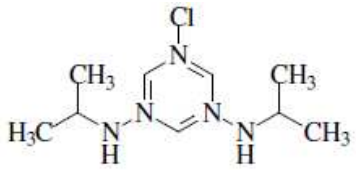
- Linurom 99,3%



Grupo químico: uréia

Classe: herbicida

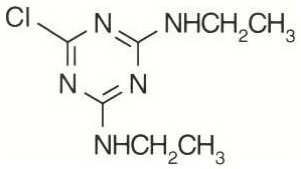
- Propazina



Grupo químico: triazina

Classe: herbicida

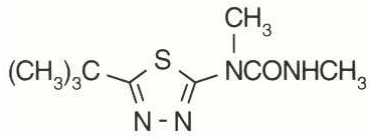
- Simazina



Grupo químico: triazina

Classe: herbicida

- Tebutiurom 99%



Grupo químico: uréia

Classe: herbicida

III.9. Determinação de agrotóxicos em amostras de água

III.9.1 Procedimento de SPE-HPLC no modo *off-line*

Inicialmente, a etapa de concentração dos agrotóxicos atrazina, propazina, simazina, linurom e diurom em água de torneira fortificada foi feita no modo *off-line*.

As soluções estoque dos agrotóxicos individuais foram preparadas na concentração de 1000 mg/L em acetonitrila, solvente no qual os agrotóxicos têm boa solubilidade. Estas soluções foram armazenadas em geladeira a 4 °C. A partir dessas soluções foram feitas as diluições para se obter as soluções de trabalho usadas

para construir a curva analítica e para fortificar as amostras, preparadas em fase móvel a 50 e 10 mg/L, respectivamente.

As etapas usadas na extração em fase sólida estão descritas a seguir:

1. Condicionaram-se os cartuchos PMOS preparados no laboratório passando 5 mL de metanol, seguido por 5 mL de água deionizada.

2. Ajustou-se o pH das amostras de água para 3 com ácido fosfórico. Em seguida, fortificou-se as amostras na concentração de 1 μg/L.

3. Percolou-se 100 mL de amostra acidificada a pH 3 (volume de *breakthrough*) através dos cartuchos a uma vazão de 5 mL/min e descartou-se o filtrado.

4. Efetuou-se a secagem do cartucho, sob vácuo, durante 20 min.

5. Eluiu-se os extratos com 1 mL de metanol.

6. Coletou-se o extrato que foi seco sob fluxo de nitrogênio e redissolvido em 1 mL de fase móvel.

O mesmo procedimento foi realizado com uma amostra de água não-fortificada (amostra testemunha), para identificação dos compostos interferentes provenientes da matriz. Denomina-se amostra testemunha uma amostra que não tenha sido submetida ao tratamento com o ingrediente ativo que será determinado.

O volume de *breakthrough* é o volume máximo de amostra que pode ser percolado através da coluna de concentração ou do cartucho, para um dado analito, sem que haja prejuízos nas recuperações das amostras. Neste estudo, vários volumes de amostra, entre 50 e 500 mL, foram concentrados. Construiu-se uma curva da área do pico *versus* o volume de amostra e, o ponto onde a curva declinou da linearidade foi considerado ser o volume de *breakthrough*.

A etapa de concentração também foi reproduzida utilizando os cartuchos comerciais Supelclean ENVI-8 e Supelclean LC-8 da Supelco, ambos contendo 500 mg de sorvente em seringas de 3 mL. As recuperações obtidas para todos os cartuchos foram comparadas.

III.9.2 Procedimento de SPE-HPLC no modo *on-line*

O sistema cromatográfico adaptado em laboratório para extração *on-line* consistiu em duas bombas de alta pressão, um detector UV-vis e uma válvula tipo injeção de seis vias [11,20]. A extração foi realizada conectando uma coluna cilíndrica de aço inoxidável de 40 mm x 3,9 mm d.i. chamada de coluna de enriquecimento, preenchida a seco com 300 mg do sorvente PMOS preparado no laboratório, no lugar do *loop* do injetor.

O procedimento de extração foi o mesmo descrito no item 9.1, porém foi utilizada vazão de 1 mL/min e as etapas 4, 5 e 6 foram eliminadas. A fase móvel acetonitrila:água em pH 3 ajustado com ácido fosfórico 20:80 v/v foi utilizada tanto para a eluição dos componentes do coluna de como para a separação cromatográfica na vazão de 0,3 mL/min. Um diagrama do sistema de SPE *on-line* acoplado a um HPLC adaptado no laboratório é mostrado na Figura 9.

Uma solução de amostra de água fortificada com a mistura de agrotóxicos é introduzida na coluna de enriquecimento a uma vazão de 1 mL/min pela Bomba 1 durante 20 min, enquanto a válvula do injetor se mantém na posição 'carregar' (Figura 5a). Dessa forma, 20 mL de amostra são concentrados pela coluna e o solvente após e extração é descartado para o lixo. Em seguida, os analitos sorvidos na coluna de enriquecimento são eluídos para a coluna de separação utilizando a Bomba 2 mudando a válvula do injetor para a posição 'injetar' (Figura 5b). Logo após a análise, a válvula do injetor é redirecionada novamente para a posição inicial 'carregar' e a coluna de enriquecimento é lavada com metanol por 10 minutos na mesma vazão para minimizar qualquer possível efeito de *carry over* antes da próxima concentração de amostra.

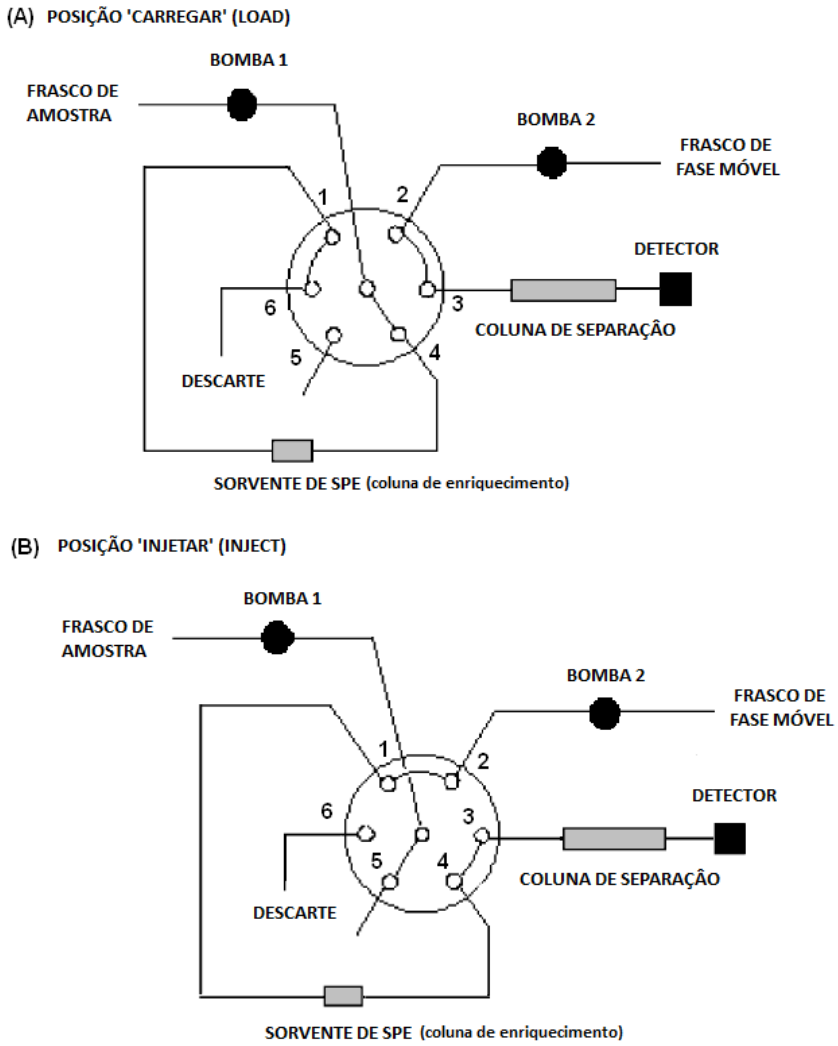


Figura 5: Diagrama esquemático da extração em fase sólida *on-line* acoplada ao HPLC utilizada neste estudo.

Neste caso, também foi determinado o melhor volume de extração (volume de *breakthrough*) para a análise testando-se volumes entre 20 e 200 mL.

III.9.3 Avaliação cromatográfica dos agrotóxicos

A separação cromatográfica dos extratos foi realizada utilizando-se a coluna PMOS preparada no laboratório de 60 x 3,9 mm d.i. desenvolvida [3].

As condições cromatográficas de análise foram:

- Fase móvel acetonitrila : água deionizada com pH ajustado em 3 com ácido fosfórico (30:70 v/v) para o modo de SPE *off-line e* fase móvel acetonitrila : água deionizada com pH ajustado em 3 com ácido fosfórico (20:80 v/v) para o modo de SPE *on-line.*

Em HPLC de fase reversa, quanto mais hidrofóbico for o analito, mais ele é retido. Quando o analito se torna ionizado, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Por isso, para garantir uma maior interação dos agrotóxicos em estudo com a FE utilizada é necessária a acidificação da fase móvel. Dessa forma, utilizou-se uma FM onde a fase aquosa foi acidificada com ácido fosfórico. Escolheu-se o ácido fosfórico porque esse apresenta uma baixa absorção na região do UV.

- Vazão 0,3 mL/min (eluição isocrática)
- Detecção UV-vis a 220 nm

O comprimento de onda de trabalho de 220 nm foi selecionado após a análise dos padrões de agrotóxicos na concentração de 1 mg/L em espectrofotômetro, obtendo o espectro de absorção no ultravioleta de cada composto no intervalo de 180 a 800 nm. Como os comprimentos de onda de absorção máxima variaram, foi escolhido um comprimento de onda intermediário, no qual todos os compostos apresentam absorbância.

- Volume de injeção de 5 μL

Todas as separações foram conduzidas à temperatura ambiente e em triplicata.

Cada agrotóxico também foi injetado separadamente e seu tempo de retenção (t_R) foi comparado ao tempo de retenção obtido na mistura, para confirmar sua identidade.

III.9.4 Validação da metodologia

Os métodos foram avaliados seguindo os parâmetros analíticos descritos na seção 3 do capítulo I.

Os parâmetros de LD e LQ foram determinados baseados na razão sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente, tomado pela medida da instabilidade da linha de base antes e após cada sinal do agrotóxico, usando injeções individuais. As curvas analíticas foram obtidas a partir da injeção dos padrões puros usando oito níveis de concentrações, com três replicatas cada. A linearidade foi estimada pela análise da regressão linear, com o auxílio do programa Origin 6.1.

A exatidão foi determinada como o percentual de recuperação, em três diferentes níveis de fortificação. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, também em três diferentes níveis de concentração e em triplicata. O resultado foi apresentado como RSD das medidas em triplicata dos analitos.

III.9.5. Análise de amostras de água de rio

Amostras de água foram coletadas num lago localizado no *campus* da Unicamp na cidade de Campinas, Brasil (95 km ao noroeste de São Paulo) para estudo da matriz. Os frascos de vidro usados para guardar as amostras foram lavados com detergente, água, metanol e água deionizada
e secados antes do uso. As amostras foram filtradas através de filtros de 0.45 µm e armazenadas em geladeira a 4 °C.

III.10. Determinação de agrotóxicos em amostras de caldo de cana

III.10.1 Procedimento de extração usando método QuEChERS

Os agrotóxicos selecionados para análise em caldo de cana são: imidacloprido, aldicarbe, tebutiurom, simazina, cianazina, carbofurano e atrazina. Eles foram escolhidos entre os 64 ingredientes ativos cuja utilização é permitida para a cana-de-açúcar. A escolha considerou o fato de os agrotóxicos selecionados serem sistêmicos, ou seja, penetrarem na seiva da cana, e não ficarem apenas na superfície.

As etapas seguidas para o método QuEChERS de extração foram baseadas no método desenvolvido para amostras com baixa porcentagem de gordura [21], conhecido como QuEChERS modificado.

ETAPA 1: Preparação da amostra e extração

- fortificou-se 15 mL de amostra testemunha (isenta de agrotóxicos) na concentração de 15xLQ de cada agrotóxico, homogeneizou-se e deixou-se em repouso por 1 hora;
- adicionou-se 15 mL de acetato de etila e agitou-se por 1 minuto no agitador vortex;
- adicionou-se à mistura 6 g de sulfato de magnésio anidro, 1,5 g de cloreto de sódio, 1,5 g de citrato de sódio, 0,75 g de hidrogenocitrato sesquiidratado de disódio e agitou-se por mais 1 minuto no agitador vortex;
- centrifugou-se a 10 000 rpm por 15 minutos e transferiu-se a fase orgânica para outro frasco;

ETAPA 2: Limpeza do extrato

- adicionou-se 0,375 mg de Bondesil-PSA (40 µm, da marca Varian) , 2,25 g de sulfato de magnésio anidro e agitou-se por 1 minuto no agitador vortex;

ETAPA 3: Análise da amostra

- centrifugou-se a 10 000 rpm por 15 minutos e transferiu-se a fase líquida para outro frasco ao qual foi adicionado 150 µL de uma solução 5 % de ácido fórmico em acetato de etila;
- o extrato foi levado à secura utilizando-se um fluxo contínuo de gás nitrogênio, ressuspendido em 1 mL de acetonitrila utilizando-se o banho de ultra-som e injetado no sistema cromatográfico.

O método QuEChERS foi inicialmente desenvolvido para ser utilizado com as técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas em série, isto é, GC-MS-MS e LC-MS-MS [22], mas neste trabalho propôs-se utilizá-lo com a HPLC com detecção por UV (CLAE-UV).

III.10.2 Avaliação cromatográfica dos agrotóxicos

A separação cromatográfica dos extratos foi realizada utilizando-se a coluna PMOS preparada no laboratório de 60 x 3,9 mm d.i. desenvolvida [3].

As condições cromatográficas de análise foram:

- Fase móvel acetonitrila : água deionizada com pH ajustado em 3,5 com ácido fosfórico (20:80 v/v)
- Vazão 0,3 mL/min (eluição isocrática)
- Detecção UV-vis a 220 nm
- Volume de injeção de 5 µL

III.10.3 Validação da metodologia

Os métodos foram avaliados seguindo os parâmetros analíticos descritos na seção 3 do capítulo I.

III.10.4 Análise de amostras de caldo de cana

A cana de açúcar utilizada isenta de agrotóxicos foi adquirida numa pequena plantação pessoal, localizada na região de Arthur Nogueira. O caldo de cana ou garapa, obtido após a moagem da cana, foi filtrado com papel de filtro comum e filtros de 20 µm e 0,45 µm.

Pratti mostrou que o suco de cana de açúcar fresco, quando estocado à 5°C, mantêm sua qualidade apenas por 9 dias. Dessa forma, as amostras foram conservadas em geladeira à -4°C e utilizadas após no máximo 7 dias [23].

Para a aplicação do método e determinação de possíveis resíduos de agrotóxicos, amostras de caldo de cana foram obtidas no comércio de Campinas, em barracas de ambulantes. O caldo de cana foi condicionado em frascos de vidro com tampa e mantidos em freezer a cerca de - 4 ^{o}C até o momento de serem utilizados. Antes

de ser utilizado, o suco foi mantido no frasco tampado sobre uma bancada do laboratório até que entrasse em equilíbrio térmico com o ambiente.

III.11. Bibliografia

[1] Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 697 (1995) 159.

[2] Bottoli, C.B.G.; **Tese de Doutorado**, Instituto de Química da Unicamp, Campinas (SP) 2002.

[3] Vigna, C.R.M.; **Tese de Mestrado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas (SP) 2004.

[4] Kirkland, J.; **Chromatographia** 10 (1975) 661.

[5] Collins, K.E.; Franchon, A.C.; Jardim, I.C.S.F.; Radovanovic, E.; Gonçalves, M.C., **LC-GC** 18 (2000) 106.

[6] Anazawa, T.A., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas (SP) 1996.

[7] Faria, A. M., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas (SP) 2006.

[8] Vigna, C.R.M.; Morais, L.S.M.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1114 (2006) 211.

[9] Melo, L.C.F.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 75.

[10] Pozzebon, J.M.; Queiroz, S.C.N.;, Melo, L.F.C.; Kapor, M.A.;, Jardim, I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 987 (2003) 381.

[11] Queiroz, S.C.N. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas (SP) 2001.

[12] Gregg, S.J.; Sing, K.S.W.; **Adsorption, Surface Area and Porosity**, 2ª ed., London: Academic Press, 1982.

[13] Perkin Elmer. User's Manual Elemental Analysis. Perkin Elmer, Norwalk, 1996.

[14] Cabrera, K.; Arras, R.; R.; Lubda, D.; Krebs, K. F.; Wieland, G.F., ***Am. Lab.*** 29 (1997) 44.

[15] Claessens, H.A.; Van Straten, M. A.; Kirkland, J.J., ***J. Chromatogr. A*** ., 728 (1996) 259.

[16] Tonhi, E.; Bachmann, S.; Albert, K.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, K.E.; Collins, C.H. ***J. Chromatogr. A*** 948 (2002) 97.

[17] Lopes, N. P., **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas (SP) 2004.

[18] Engelhardt, H.; Jungheim, M.; **Chromatographia** 29 (1990) 59-68.

[19] Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N.; **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721-728.

[20] Pinto, G.M.F.; **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas (SP) 2002.

[21] QuEChERS - A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. Disponível em http://www.quechers.com/docs/quechers_en_oct2005.pdf. Acessado em 10/03/2008.

[22] Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Scheck, F. J.; **J. OAOC Int**., 86 (2003) 412.

[23] Pratti, P.; **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, SP, 2004.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

IV.1. Caracterização cromatográfica de fases estacionárias PMOS preparadas no laboratório

Um grande número de testes cromatográficos tem sido discutido na literatura. Estes testes possibilitam a avaliação de qualquer fase estacionária reversa e são desenvolvidos para medir e especificar interações discretas entre compostos simples, a fase estacionária e a fase móvel. Alguns destes testes foram desenvolvidos por Engelhardt e Jungheim [1] e Tanaka *et al.* [2]. Estes autores propuseram misturas-teste bastante simples, que, quando analisadas em fases móveis adequadas, fornecem informações relevantes sobre as propriedades e a conveniência analítica da fase estacionária.

Além da simplicidade e da possibilidade de uma comparação geral entre fases aparentemente idênticas, estes testes também contribuem para um entendimento mais detalhado da retenção e seletividade em HPLC.

IV.1.1 Misturas teste 1 e 2

Inicialmente, a FE PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente foi avaliada com base na separação dos compostos de duas misturas-teste comumente empregadas no LabCrom (Figura 1). A primeira mistura (Mistura teste 1) constituída de compostos neutros de polaridades variadas, foi empregada para avaliação da seletividade e hidofobicidade das FE. A segunda mistura (Mistura teste 2), constituída por compostos ácidos, básicos e neutros foi empregada para avaliação da interação dos analitos, principalmente o de caráter básico, com o suporte cromatográfico.

Foi observado um bom desempenho cromatográfico da FE, com valor de eficiência de coluna de 65000 N/m e fator de retenção de 3,0, mostrando que houve interação do soluto com a fase estacionária. O fator de assimetria para o naftaleno da mistura 1 foi de 1,3, dentro dos limites aceitáveis para compostos apolares, entre 0,8 e 2,0 [3]. Observou-se separação e resolução também para os compostos da mistura 2, com valor de eficiência de 72000 N/m para o composto acenafteno. Porém, o composto básico N,N-dimetilanilina apresentou valor de assimetria de 1,8, um pouco maior do que o recomendado (> 1,6) [4], indicando que não houve uma completa cobertura dos grupos silanóis pelo polímero desta FE, de forma uniforme.

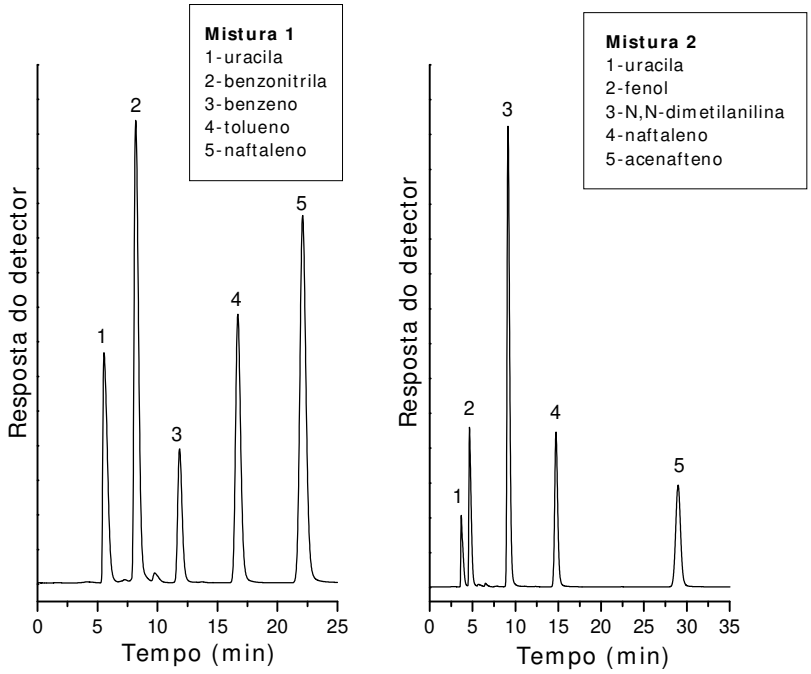


Figura 1: Cromatogramas da separação das misturas 1 e 2 pela FE PMOS imobilizada termicamente a 120°C por 8h. Condições cromatográficas: FM MeOH:H_2O 70:30 (v/v), vazão 0,3 mL/min para mistura 1 e 0,4 mL/min para mistura 2, volume de injeção: 5 μL, detecção UV a 254 nm, temperatura 25°C.

IV.1.2 Mistura teste de Engelhardt

O teste sugerido por Engelhardt e Jungheim [1] pode ser utilizado pra fornecer informações a respeito da atividade silanofílica da FE (atividade dos grupos silanóis residuais), medida pelo fator de assimetria do pico da N,N-dimetilanilina e, a sua seletividade hidrofóbica obtida pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH2} = k_{etilbenzeno}/k_{tolueno}$). A Figura 2 apresenta o cromatograma da separação dos compostos pela FE PMOS preparada no laboratório.

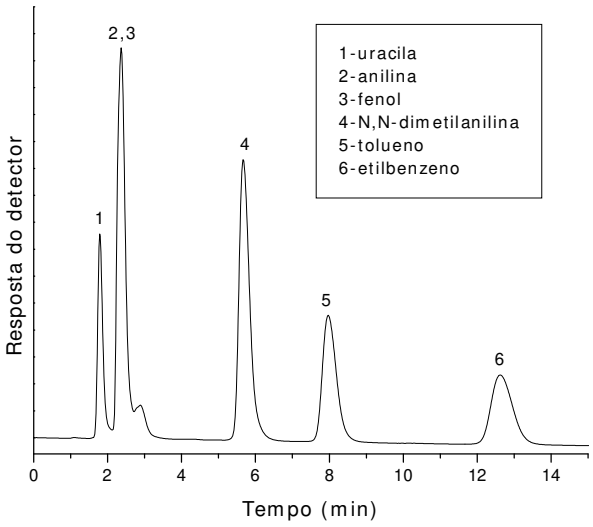


Figura 2: Cromatograma obtido para a FE PMOS preparada no laboratório com alguns compostos da mistura de Engelhardt. Condições cromatográficas: FM MeOH:H_2O 55:45 (v/v), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção 5 µL, detecção UV a 254 nm, temperatura 40 °C.

O fator de assimetria mais acentuado para o pico da N,N-dimetilanilina (1,8) confirma a maior atividade silanofílica, ou seja, a maior atividade dos grupos silanóis residuais nesta fase. De acordo com Engelhardt, a assimetria de pico de solutos básicos pode ser correlacionada com a cobertura da superfície da sílica pelo polímero, já que o aumento da quantidade de carbono imobilizado geralmente produz picos mais simétricos. A co-eluição da anilina e do fenol também demonstra atividade silanofílica da FE. Para uma coluna com baixa atividade silanofílica, a anilina deve eluir antes do fenol. A razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol ($As_{anilina}/As_{fenol}$) foi de 1,2, inferior ao valor de 1,3 recomendado.

O valor da seletividade hidrofóbica calculada foi de α_{CH2} = 1,9 e a hidrofobicidade (valor do fator de retenção do etilbenzeno) foi igual a 6.

Esses resultados indicam que o grau de recobrimento polimérico (15,3 %C) alcançado, comparável às FE comerciais, ainda não foi suficiente para melhorar o desempenho cromatográfico diante de compostos básicos, sugerindo a presença de sítios residuais.

IV.1.3 Misturas teste de Tanaka

O protocolo de caracterização desenvolvido por Tanaka [2], é um método bem estabelecido, o qual tem sido estudado por diversos grupos acadêmicos e muitos fabricantes para avaliar a qualidade de suas FE. Dentre as propriedades avaliadas incluem-se: o recobrimento superficial, a seletividade hidrofóbica, a seletividade

espacial e a capacidade de ligação de hidrogênio e a capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6. Os resultados encontrados para estas FE foram comparados com base em outros trabalhos publicados sobre caracterização de FE comerciais. Os cromatogramas obtidos para as FE PMOS preparada no laboratório utilizando as quatro misturas de Tanaka são apresentados na Figura 3.

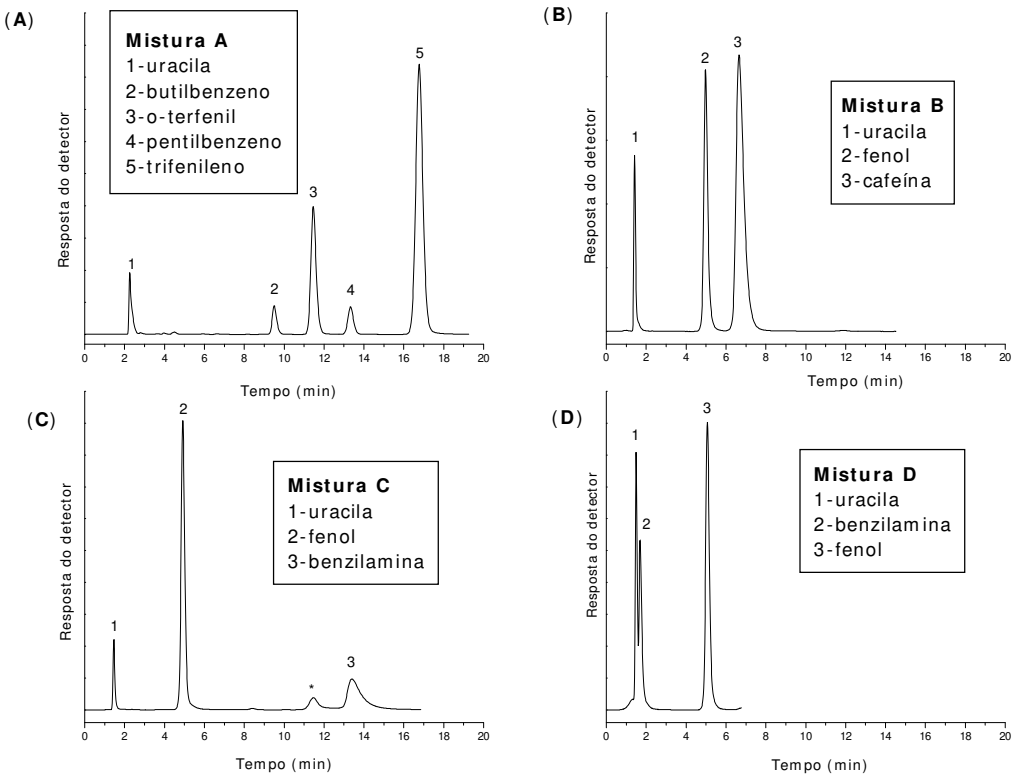


Figura 3: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura de Tanaka com a FE PMOS preparada no laboratório. Condições cromatográficas: fase móvel (A) MeOH:H_2O 80:20 (v/v), (B) MeOH:H_2O 30:70 (v/v), (C) MeOH:tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 0,02 mol/L pH 7,6 30:70 (v/v), (D) MeOH:tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 0,02 mol/ L pH 2,7 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, volume de injeção: 5 μL, detecção: UV a 254 nm. (*) impureza.

A hidrofobicidade ($k_{pentilbenzeno}$), a seletividade hidrofóbica ($\alpha_{CH2}= k_{pentilbenzeno}/k_{butilbenzeno}$) e a seletividade espacial ($\alpha_{T/O}= k_{trifenileno}/k_{o\text{-}terfenil}$) foram obtidas pela eluição da mistura A do protocolo de Tanaka, ilustrada no cromatograma da Figura 3A. Observa-se que os compostos foram separados com boa resolução, fornecendo uma seletividade hidrofóbica foi de 1,5. O valor do fator de retenção do pentilbenzeno (4,9) obtido indica que a quantidade de polímero imobilizado foi satisfatório, resultando em uma boa separação entre os compostos

hidrofóbicos. Os valores obtidos se encontram dentro da faixa determinada para fases estacionárias comerciais à base de C8 e C18 quimicamente ligadas à superfície de sílica nua [5,6].

A FE PMOS preparada no laboratório apresentou boa seletividade espacial (1,5), devido à ótima resolução entre os picos do 0-terfenil e trifenileno. Engelhardt *et al.*[2] propuseram que um amplo diâmetro de poros é essencial para que as fases estacionárias obtenham resolução para o *o*-terfenil e o trifenileno.

A capacidade de formar ligação de hidrogênio da fase foi obtida pela razão dos fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/F} = k_{cafeína}/k_{fenol}$) empregando a mistura B do protocolo de Tanaka (Figura 3B). Este teste mostra possíveis interações de ligação de hidrogênio entre a cafeína e grupos silanóis residuais na superfície da sílica. O valor de $\alpha_{C/F} = 1,5$ calculado demonstra uma alta capacidade de formar ligação de hidrogênio, resultando na inversão da ordem de eluição dos picos do fenol e da cafeína. Este resultado é atribuído à atividade silanofílica da FE: a cafeína, de caráter básico, formou ligação de hidrogênio com os silanóis residuais presentes, aumentando a retenção deste composto na coluna durante a corrida.

A misturas 3C do protocolo de Tanaka foi usada para a determinação da atividade sulanofílica total da FE, através do cálculo da capacidade de troca iônica em valor de pH>7 ($\alpha_{B/F\ pH\ 7,6} = k_{benzilamina}/k_{fenol}$). Já a mistura 3D avalia a acidez dos grupos silanóis residuais, através do valor da capacidade de troca iônica em valor de pH<3 ($\alpha_{B/F\ pH\ 2,7} = k_{benzilamina}/k_{fenol}$). O valor calculado de $\alpha_{B/F} = 3,4$ em meio básico indica uma atividade silanofílica total elevada, fato que pode ser confirmado pelo alto tempo de retenção do composto básico benzilamina. Em valor de pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis residuais se encontram na forma desprotonada (SiO^-) e podem interagir através do mecanismo de troca iônica com aminas (que se encontram protonadas nesta condição).

Em meio ácidoa pH 2,7, a benzilamina não é muito retida e praticamente co-elui com a uracila, resultando num valor quase nulo de $\alpha_{B/F} = 0,1$. Este dado aponta a baixa acidez dos grupos silanóis residuais, o que já era esperado, devido à pureza do suporte de sílica utilizado. Em valor de pH 2,7, os grupos silanóis se encontram na forma protonada (SiOH) e não interagem muito com benzilamina.

IV.2. Determinação de agrotóxicos em amostras de água

IV.2.1 Determinação das condições cromatográficas de separação

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos agrotóxicos, buscou-se o uso das condições mais simples, utilizando eluição isocrática e detecção UV-vis.

A fase móvel foi testada inicialmente sem ajuste do pH. Porém, alguns compostos apresentam baixa ou nula retenção na coluna cromatográfica nessa condição. Isto está associado às características ácidas

apresentadas pela maioria dos agrotóxicos usados neste estudo que, em contato com a fase móvel, permanecem na forma dissociada, tendo pouca interação com a fase estacionária. Dessa forma, passou-se a trabalhar com fase móvel onde o pH da fase aquosa foi acidificada para 3, usando ácido fosfórico.

Otimizaram-se as condições de separação testando algumas proporções de fase móvel acetonitrila: água (acidificada a pH 3), sendo que a melhor separação foi obtida na proporção 30:70 (v/v). O cromatograma da solução padrão encontra-se na Figura 4.

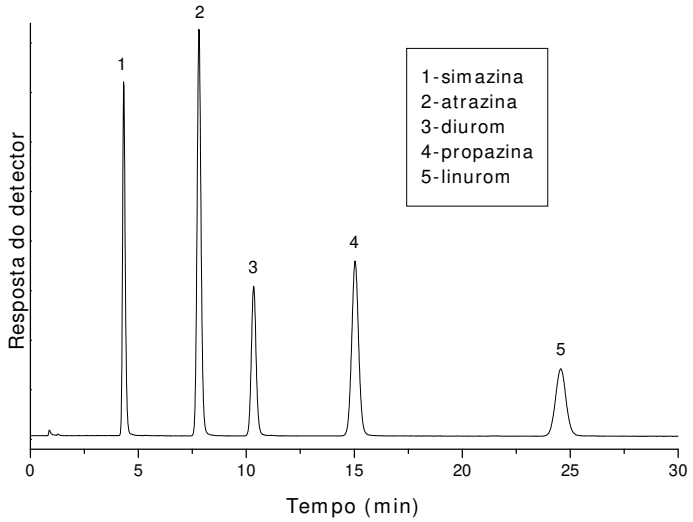
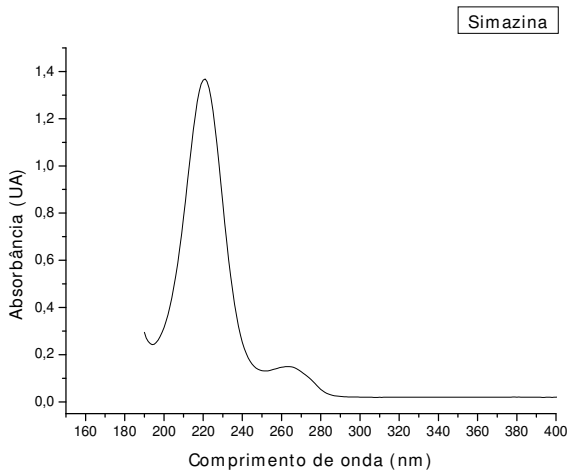


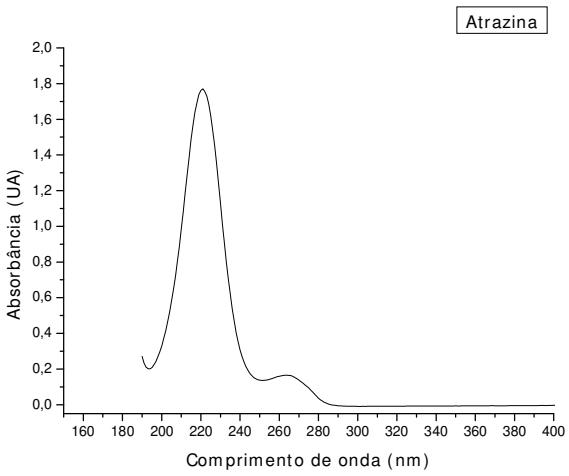
Figura 4: Cromatograma da separação dos agrotóxicos a partir de uma solução padrão de 1 mg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL min^{-1}, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática.

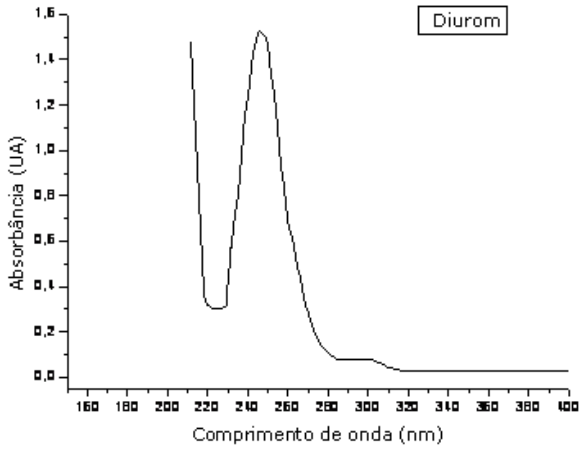
IV.2.2 Confirmação da identidade dos agrotóxicos

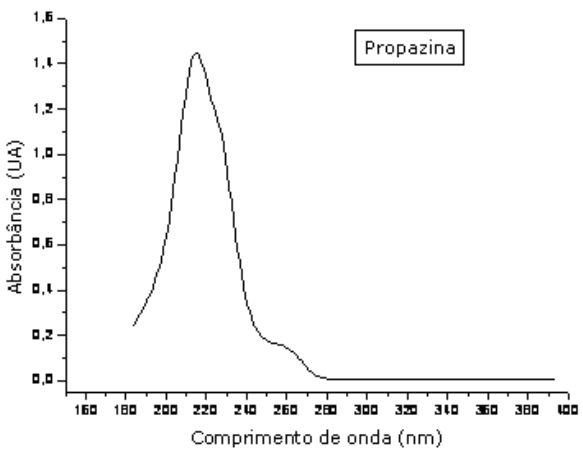
Após serem definidas as condições cromatográficas de separação, realizou-se a identificação dos agrotóxicos estudados injetando-se soluções individuais de cada um deles. Os tempos de retenção foram utilizados para identificação dos agrotóxicos quando estes estavam presentes em misturas e nas matrizes estudadas.

Na Figura 5 se apresentam os espectros de absorção no UV que fornecem os comprimentos de onda de absorção máxima de cada um dos agrotóxicos.


Simazina
Absorbância (UA)
Comprimento de onda (nm)


Atrazina
Absorbância (UA)
Comprimento de onda (nm)


Diurom
Absorbância (UA)
Comprimento de onda (nm)


Propazina
Absorbância (UA)
Comprimento de onda (nm)

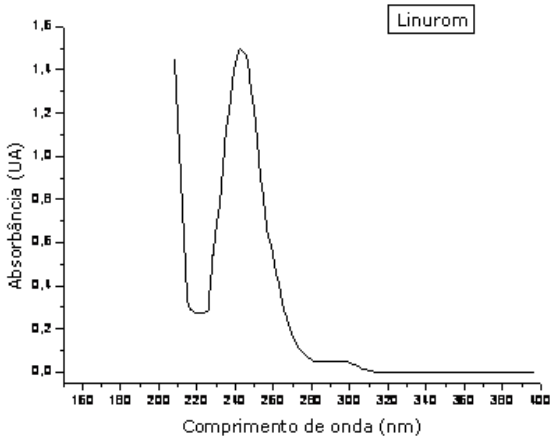


Figura 5: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos na concentração de 1 mg/L.

Na Tabela 1 encontram-se os tempos de retenção dos agrotóxicos injetados separadamente e seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}).

Tabela 1: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}).

agrotóxico	t_R (min)	λmax (nm)
simazina	4,4	222
atrazina	7,7	222
diurom	10,6	212
propazina	14,7	214
linurom	24,4	210

Foi escolhido o comprimento de onda de 220 nm para análise da mistura de agrotóxicos.

IV.2.3 Caracterização dos sorventes PMOS preparado no laboratório

A Tabela 2 mostra as características do sorvente PMOS preparado no laboratório e dos sorventes comerciais usados neste estudo, além da %C obtida para esse material.

O sorvente PMOS preparado no laboratório apresentou % C similar ao sorvente comercial Supelclean ENVI-8, indicando que o método proposto para obter PMOS imobilizado termicamente sobre a sílica resulta num material com características similares aos materiais disponíveis no mercado.

Tabela 2: Caracterização do sorvente PMOS preparado no laboratório e dos sorventes comerciais utilizados.

Nome comercial	Fornecedor	% C	Tipo de ligação
PMOS preparado no laboratório	LabCrom	14	PMOS imobilizado termicamente sobre sílica
Supelclean LC-8	Supelco	7*	C8 ligado à sílica capeada (indicado para extração de compostos não-polares a polares)
Supelclean ENVI-8	Supelco	14*	C8 ligado à sílica capeada (mais indicado para extração de compostos não polares; maior resistência à condições extremas de pH)

* dados oferecidos pelo fabricante.

Os valores de área superficial específica (S_{BET}), volume específico de poros (v_p) e diâmetro médio de poros (d_p) foram realizadas pelas medidas de adsorção e dessorção de N_2 a -195,5 °C. Os resultados obtidos para o sorvente PMOs preparado no laboratório em comparação com os sorventes comerciais, estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do sorvente PMOS preparado no laboratório e dos sorventes comerciais usados neste estudo.

	S_{BET} (m^2/g)	v_p (cm^3/g)	d_p (nm)
sorvente PMOS preparado no laboratório	310	0,3	5
Supelclean LC-8	475*	0,8*	6*
Supelclean ENVI-8	475*	0,8*	6*

* dados oferecidos pelo fabricante.

IV.2.4 Procedimento de SPE-HPLC no modo *off-line*

IV.2.4.1 Avaliação do PMOS preparado no laboratório

Vários eluentes, incluindo metanol, acetonitrila, acetato de etila e diclorometano, foram avaliados para eluição dos agrotóxicos usando os cartuchos preparados.

A capacidade de retenção dos cartuchos foi avaliada para determinação do volume de *breakthrough*. Amostras contendo a mesma quantidade de analito foram testadas com diferentes volumes (50 a 500 mL), resultando em concentrações cada vez menores de acordo com o aumento do volume de amostra. Quando o volume de *breakthrough* é alcançado, a quantidade de amostra extraída é reduzida [7]. Os resultados indicam que o volume de *breakthrough* do linurom ocorre acima de 100 mL de solução de agrotóxicos para todos os cartuchos usados. Para todos os outros agrotóxicos, o volume de *breakthrough* ficou acima de 250 mL. Dessa forma, 100 mL foi selecionado como volume de amostra para a validação da metodologia.

Os valores das recuperações foram calculados através da razão entre as áreas dos picos após a etapa de concentração e as áreas obtidas pela injeção direta dos padrões (concentrações conhecidas). A Tabela 4 mostra as recuperações obtidas usando o cartucho PMOS preparado no laboratório e os cartuchos comerciais em um mesmo nível de fortificação (1 μg/L). De acordo com a US-EPA [8], valores de recuperação de agrotóxicos aceitáveis devem estar entre 70 e 130 %.

Tabela 4: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de torneira fortificada no modo *off-line* usando cartuchos de SPE comerciais e PMOS preparados no laboratório.

Agrotóxico	Recuperação (%)		
	PMOS preparado no laboratório	Supelclean ENVI-8	Supelclean LC-8
simazina	99	98	85
atrazina	87	92	80
diurom	86	89	82
propazina	89	89	84
linurom	79	90	85

[a]concentração de 1 μg/L para cada agrotóxico em 100 mL de água.

Os resultados indicaram valores de recuperação aceitáveis (entre 79 e 99%) para todos os agrotóxicos com os cartuchos utilizados. Como já era esperado, os cartuchos PMOS preparados no laboratório e Supelclean ENVI-8 apresentaram desempenhos similares já que possuem cadeias de hidrocarbonetos semelhantes para interagir com os agrotóxicos. A análise elementar indica que ambos os materiais possuem a

mesma quantidade de carbono (14 %) [24], sendo que a diferença encontra-se na maneira como os grupos PMOS foram incorporados na sílica. Estes resultados confirmam que a imobilização do PMOS na sílica pode promover uma boa cobertura do suporte e proporcionar materiais úteis e fáceis de serem preparados para uso em extração em fase sólida. O cartucho Supelclean LC-8 apresentou menores valores de recuperação, o que pode ser atribuído a menor quantidade de carbono presente no material (8 %) [9].

Na Figura 6 estão ilustrados os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de amostra de água de torneira fortificada e não-fortificada (testemunha).

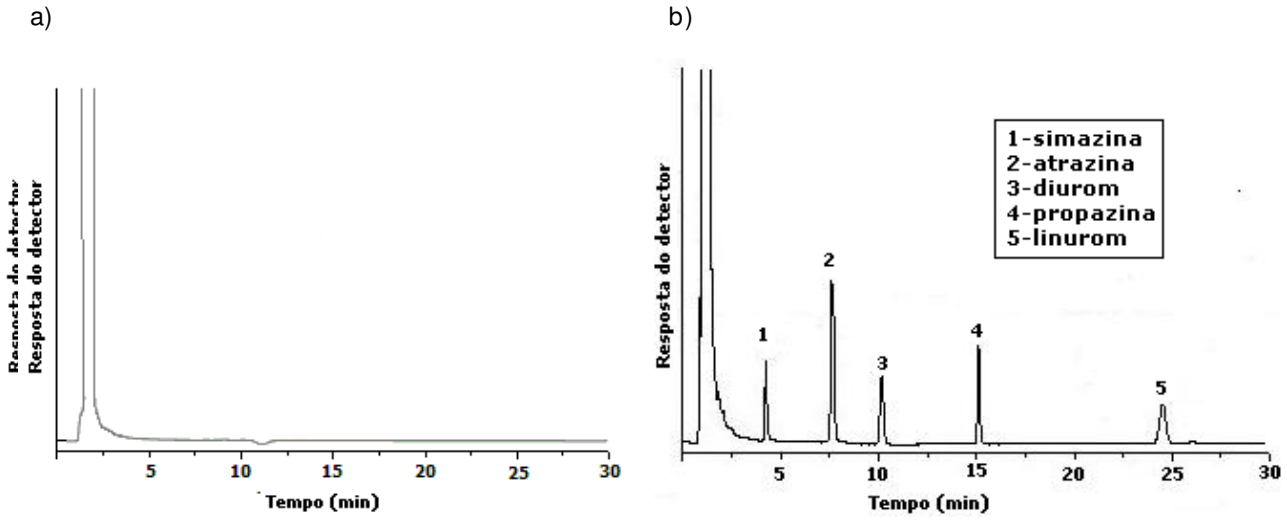


Figura 6: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha não fortificada (a) e fortifcada (b) com os agrotóxicos em 1 μg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de injeção 5 μL, eluição isocrática.

IV.2.4.2 Avaliação de diferentes lotes de cartuchos de PMOS preparados no laboratório

Um dos grandes inconvenientes dos cartuchos comerciais é a baixa repetibilidade dos valores de recuperação quando diferentes lotes de cartucho são usados. Pesquisadores que trabalham com SPE geralmente têm a preocupação de garantir que haverá cartuchos suficientes do mesmo lote para completar e terminar sua pesquisa. Em alguns casos, quando o lote de cartucho precisa ser mudado durante o estudo, é necessário repetir a otimização do método de SPE e até mesmo executar uma nova revalidação do método analítico [10,11]. Essa desvantagem resulta no aumento do tempo e do consumo de solvente, aumentando desse modo o custo da análise.

A Tabela 5 apresenta as recuperações dos agrotóxicos obtidas para quatro diferentes lotes de cartuchos PMOS preparados no laboratório testados. Os lotes de sorventes e os cartuchos resultantes foram preparados

em dias diferentes, mas as extrações de SPE foram realizadas no mesmo dia. A repetibilidade foi expressa como a estimativa do RSD do número de amostras estatisticamente significativas.

Tabela 5: Recuperações (%) e RSD para os agrotóxicos em água de torneira usando lotes diferentes de cartuchos PMOS preparados no laboratório.

Agrotóxico	Recuperação (%)				RSD (%)[a]
	A[b]	B[b]	C[b]	D[b]	
simazina	101	102	87	89	5,5
atrazina	96	92	91	89	3,8
diurom	92	96	93	87	3,0
propazina	100	101	89	95	4,1
linurom	89	86	91	85	2,3

[a] n = 4
[b] lotes

Todas as recuperações ficaram dentro do intervalo aceito (70 - 130%). Os valores de RSD para todos os agrotóxicos foi < 5,5 %, mostrando que o sorvente PMOS preparado no laboratório apresenta boa repetibilidade e que, quando necessário, pode-se utilizar diferentes lotes para completar um estudo analítico. Dessa forma, a validação do método neste estudo foi feita com diferentes lotes de sorvente PMOS preparado no laboratório.

IV.2.4.3 Validação do método analítico

IV.2.4.3.1 Seletividade

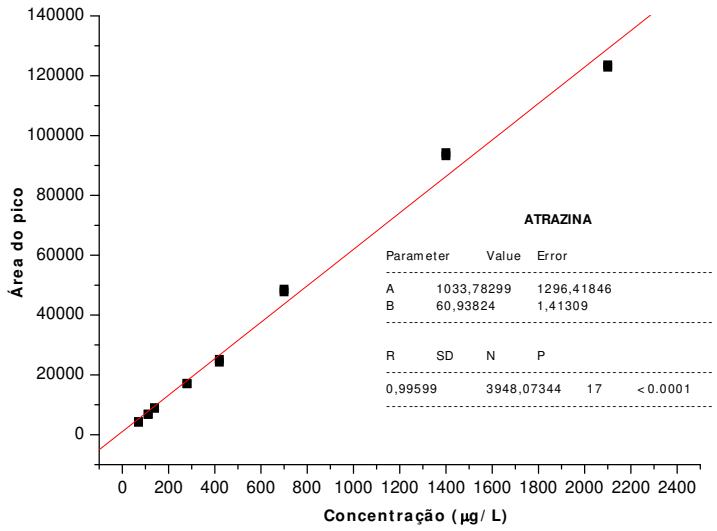
No desenvolvimento de metodologias que envolvem a separação de vários compostos, como em métodos multirresíduos, pode-se afirmar que o método é seletivo quando não há sobreposição de picos ou a co-eluição de interferentes com o composto de interesse.

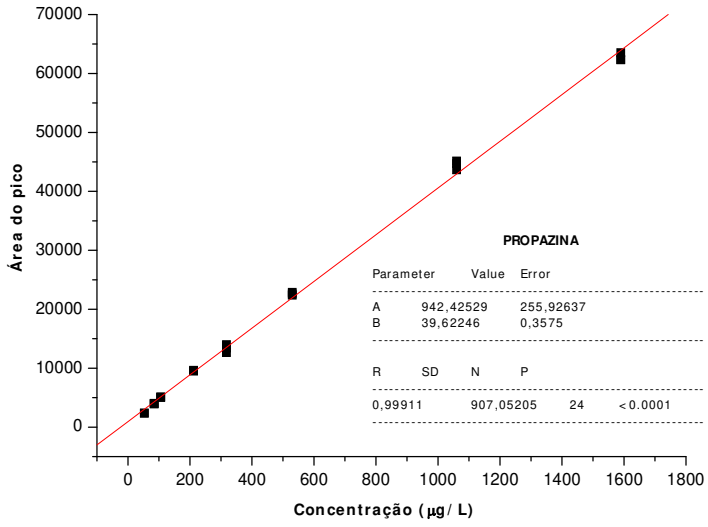
Comparando-se os cromatogramas obtidos para a amostra testemunha e a amostra testemunha fortificada com os agrotóxicos (Figura 6) pode-se afirmar que a metodologia desenvolvida para a determinação dos cinco agrotóxicos é seletiva na matriz água.

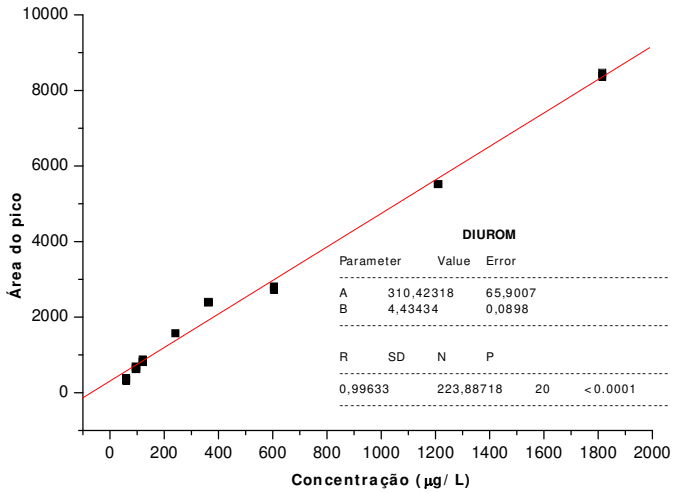
IV.2.4.3.2 Linearidade e faixa linear

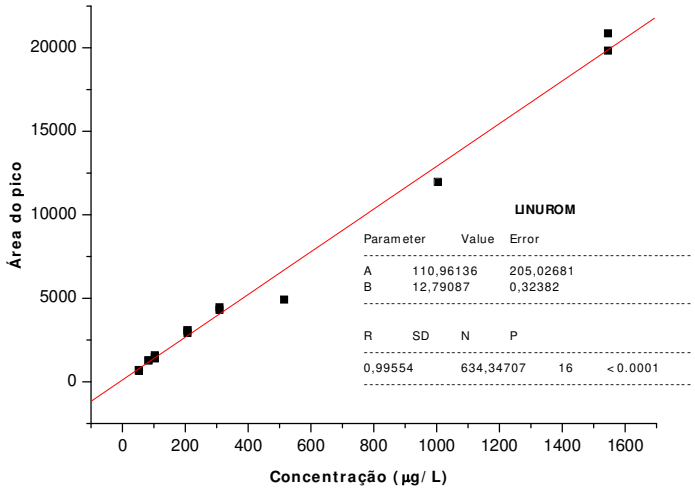
Foram construídas as curvas analíticas a partir de padrões puros dos agrotóxicos, ou seja, por padronização externa sem superposição de matriz, as quais se encontram na Figura 7. Neste caso, como a

matriz de estudo não é complexa, optou-se por não usar método de padronização externa com superposição de matriz, indicado para corrigir efeitos da matriz provocados por interferentes coextraídos.






Área do pico
Concentração (µg/ L)
DIUROM
Parameter Value Error
A 310,42318 65,9007
B 4,43434 0,0898
R SD N P
0,99633 223,88718 20 < 0.0001


Área do pico
Concentração (µg/ L)
LINUROM
Parameter Value Error
A 110,96136 205,02681
B 12,79087 0,32382
R SD N P
0,99554 634,34707 16 < 0.0001

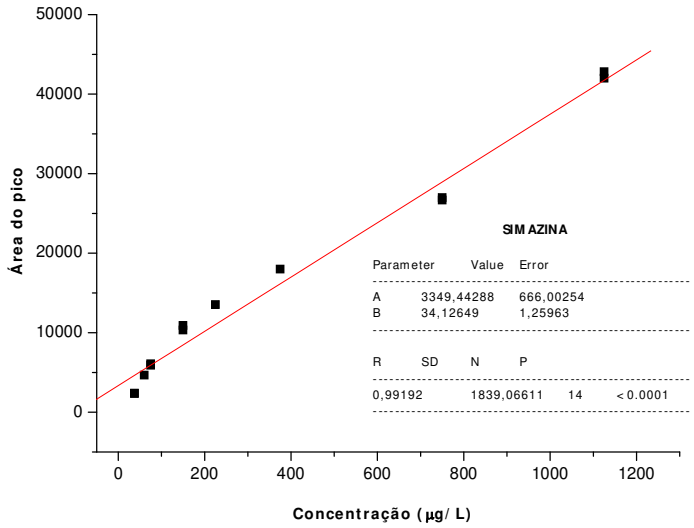


Figura 7: Curvas analíticas obtidas para os cinco agrotóxicos estudados por calibração externa sem superposição de matriz.

A partir das curvas analíticas construídas foram obtidos os parâmetros da regressão linear e os coeficientes de correlação (*r*) que se encontram descritos na Tabela 6. Todos os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método e estão de acordo com as normas da ANVISA [12].

As faixas lineares foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado.

Tabela 6: Parâmetros das curvas analíticas para os agrotóxicos por padronização externa sem sobreposição da matriz.

Agrotóxico	Curva analítica			Faixa linear (µg/ L)
	a (intercepto)	b (slope)	Coeficiente de correlação (*r*)	
simazina	3349	34	0.9919	75-1125
atrazina	963	61	0.9962	124-1860
diurom	310	4	0.9963	121-1815
propazina	942	40	0.9991	106-1590
linurom	111	13	0.9955	103-1545

IV.2.4.3.3 Limite de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação descritos na Tabela 7 foram obtidos através do método da razão sinal/ruído 3:1 e 10:1, respectivamente. Os valores de LDE e LQE mostram que os agrotóxicos estudados têm boa detectabilidade no sistema cromatográfico. Levando-se em consideração que na etapa de extração os agrotóxicos foram concentrados 100 vezes, os valores de LQM obtidos foram satisfatórios para a análise destes agrotóxicos em águas de superfície, pois atendem aos LMR impostos pela legislação (1 - 5 μg/L) [13].

Tabela 7: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento e do método desenvolvido sem superposição da matriz.

Agrotóxico	LDE[a] (μg/L)	LQE[a] (μg/L)	LQM[b] (μg/L)
simazina	25	75	0,75
atrazina	40	124	1,24
diurom	32	121	1,21
propazina	28	106	1,06
linurom	27	103	1,03

[a] sem concentração (valores do instrumento)

[b] após a concentração com SPE (fator de concentração = 100).

IV.2.4.3.4 Exatidão e precisão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi determinada por meio de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração (1 x LQ, 2 x LQ e 10 x LQ) e em triplicatas, resultando num total de nove determinações conforme sugerido pela ICH [14] e pela ANVISA [12]. Os resultados dos ensaios de recuperação apresentados na Tabela 8 encontram-se dentro do intervalo permitido para análise de resíduos nos três níveis de concentração avaliados (70 a 120%).

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em dias diferentes para verificar se a metodologia desenvolvida apresenta o mesmo comportamento quando mudam algumas variáveis como temperatura, umidade, fase móvel, entre outras. Tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária, determinada em três dias consecutivos, foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 15 % (Tabela 8), comprovando que a metodologia é repetitiva não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece constante mesmo com a mudança de algumas variáveis.

Tabela 8: Recuperações (n = 3) e precisão (repetibilidade, n = 3 e precisão intermediária, n = 3) para os agrotóxicos em água; níveis de fortificação: F1 (1 x LQE), F2 (2 x LQE), F3 (10 x LQE), para a metodologia desenvolvida.

Agrotóxico	Recuperação (%)			Repetibilidade RSD (%)			Precisão intermediária RSD (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
simazina	80	75	79	7,0	5,8	4,5	4,6	5,7	3,1
atrazina	93	86	93	4,6	3,8	2,8	5,1	2,4	3,6
diurom	81	98	88	5,9	4,8	3,7	1,4	1,9	2,6
propazina	95	92	89	2,4	1,7	1,4	2,0	2,9	3,6
linurom	100	98	91	3,3	2,1	1,9	4,0	3,2	2,8

IV.2.4.3.5 Robustez

A metodologia desenvolvida pode ser considerada robusta por não ter sido afetada quando pequenas mudanças, como variações no pH da fase móvel em ± 0,05 e variações na temperatura da coluna foram introduzidas.

IV.2.4.4 Análise de amostra de água de rio

Na amostra de água de rio analisada não foram detectados resíduos de nenhum dos agrotóxicos em estudo e a matriz teve o mesmo comportamento apresentado pela amostra testemunha, como pode ser verificado na Figura 8, na qual está apresentado um cromatograma da amostra e um cromatograma dessa mesma amostra fortificada com os agrotóxicos, mostrando a eficiência do método desenvolvido.

a) b)

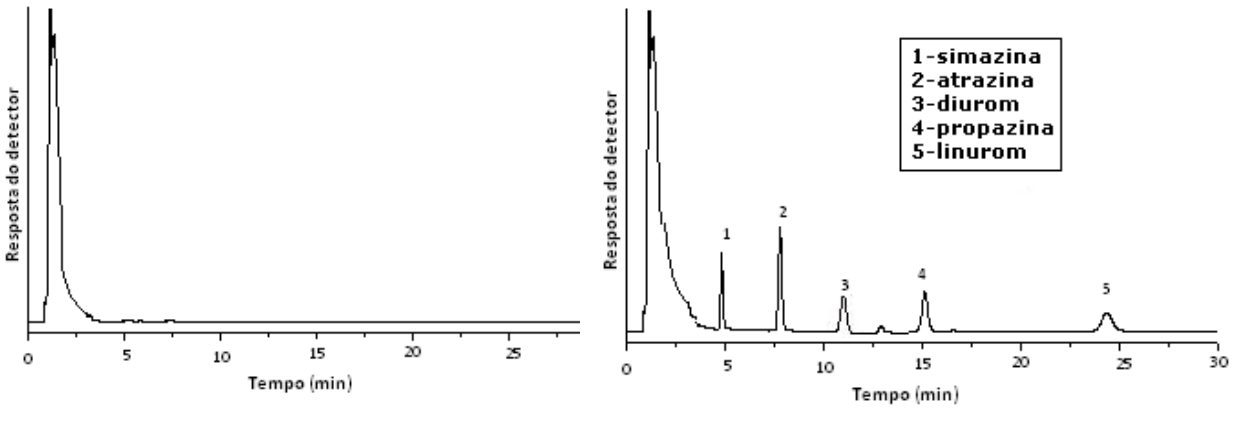


Figura 8: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha sem fortificação (a) e fortificada (b) com 1 μg/L dos agrotóxicos. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática.

Os resultados de recuperação se apresentam na Tabela 9:

Tabela 9: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de rio fortificada usando cartuchos de SPE comerciais e PMOS preparados no laboratório no modo *off-line*.

Agrotóxico	Recuperação (%)		
	PMOS preparado no laboratório	Supelclean ENVI-8	Supelclean LC-8
simazina	102	105	81
atrazina	96	93	86
diurom	95	96	88
propazina	108	109	86
linurom	89	92	80

[a]concentração de 1 μg/L para cada agrotóxico em 100 mL de água.

Os valores de recuperação ficaram dentro dos limites aceitáveis, indicando que não foram afetados pelas impurezas da amostra de água de rio.

IV.2.5 Procedimento de SPE-HPLC no modo *on-line*

Em determinações utilizando SPE no modo *off-line*, as recuperações podem ser conhecidas desde que sejam feitas análises quantitativas com curvas analíticas construídas independentemente com valores obtidos por injeção direta. Com sistemas de SPE no modo *on-line*, não é aconselhável realizar análises quantitativas por comparação com injeções diretas, pois se introduz o erro associado à alça de amostragem e há o problema da ocorrência de dispersão do pico cromatográfico [15]. Portanto, as recuperações obtidas e apresentadas na Tabela 10 devem ser analisadas com cautela. O ideal seria construir a curva analítica com base em áreas de picos obtidos a partir de injeções de padrões no sistema *on-line* também.

Dessa forma, a Tabela 10 mostra as recuperações obtidas para os agrotóxicos em uma amostra de água de rio usando a coluna de enriquecimento preenchida com o sorvente PMOS preparado no laboratório, adaptada para ser usada em um sistema de extração no modo *on-line*.

Tabela 10: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em água de rio fortificada no modo *on-line*.

Agrotóxico	Recuperação (%)
	coluna de enriquecimento (PMOS preparado no laboratório)
simazina	**81**
atrazina	**80**
diurom	**86**
propazina	**94**
linurom	**79**

[a]concentração de 1 μg/L para cada agrotóxico em 20 mL de amostra.

Os resultados indicaram valores de recuperação aceitáveis (entre 79 e 94%) para todos os agrotóxicos, comparáveis aos obtidos para a etapa de extração realizada no modo *off-line*. Na Figura 9 estão ilustrados os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de amostra de água de rio fortificada e não-fortificada (testemunha).

a) b)

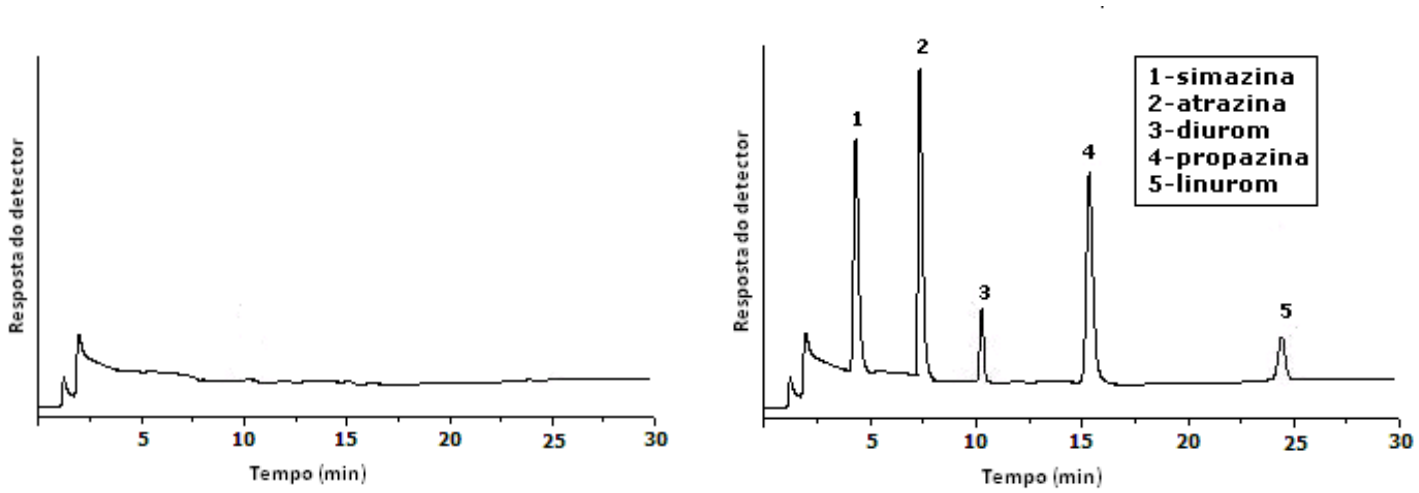


Figura 9: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha não fortificada (a) e fortificada (b) com os agrotóxicos em 1 μg/L. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5μm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 30:70 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 μL, eluição isocrática.

IV.3. Determinação de agrotóxicos em amostras de caldo de cana

IV.3.1 Determinação das condições cromatográficas de separação

Inicialmente, otimizou-se as condições cromatográficas de separação para os 7 agrotóxicos estudados, variando-se a proporção e o pH da fase móvel. O cromatograma com a melhor condição de separação para a solução padrão encontra-se na Figura 10.

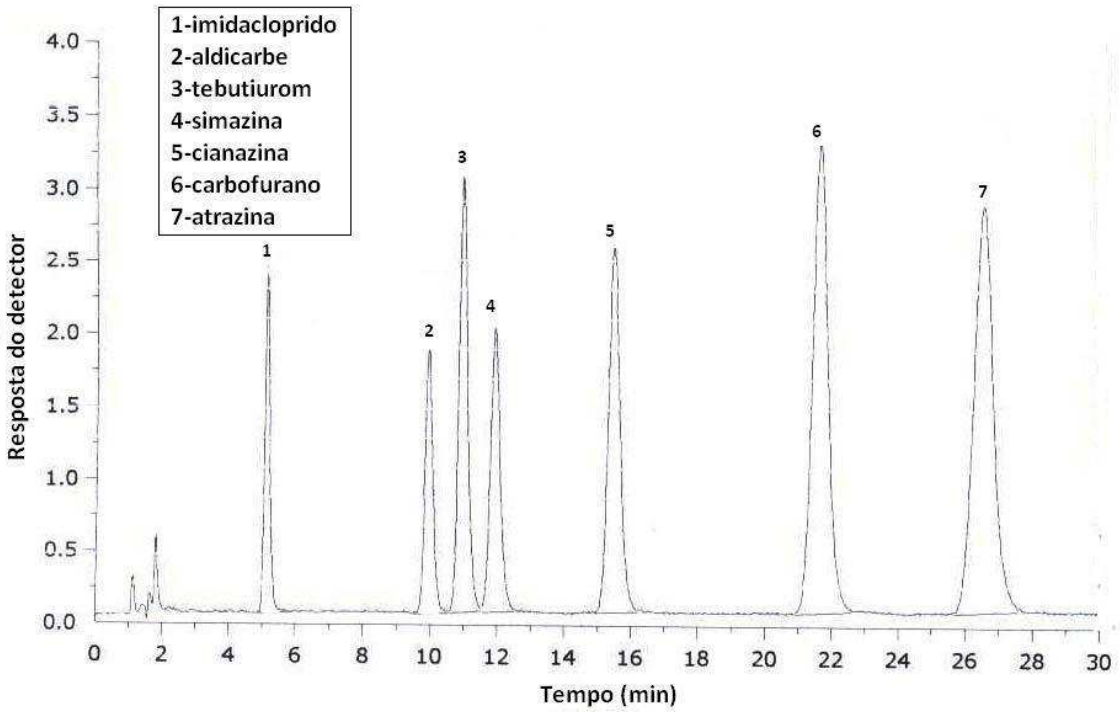


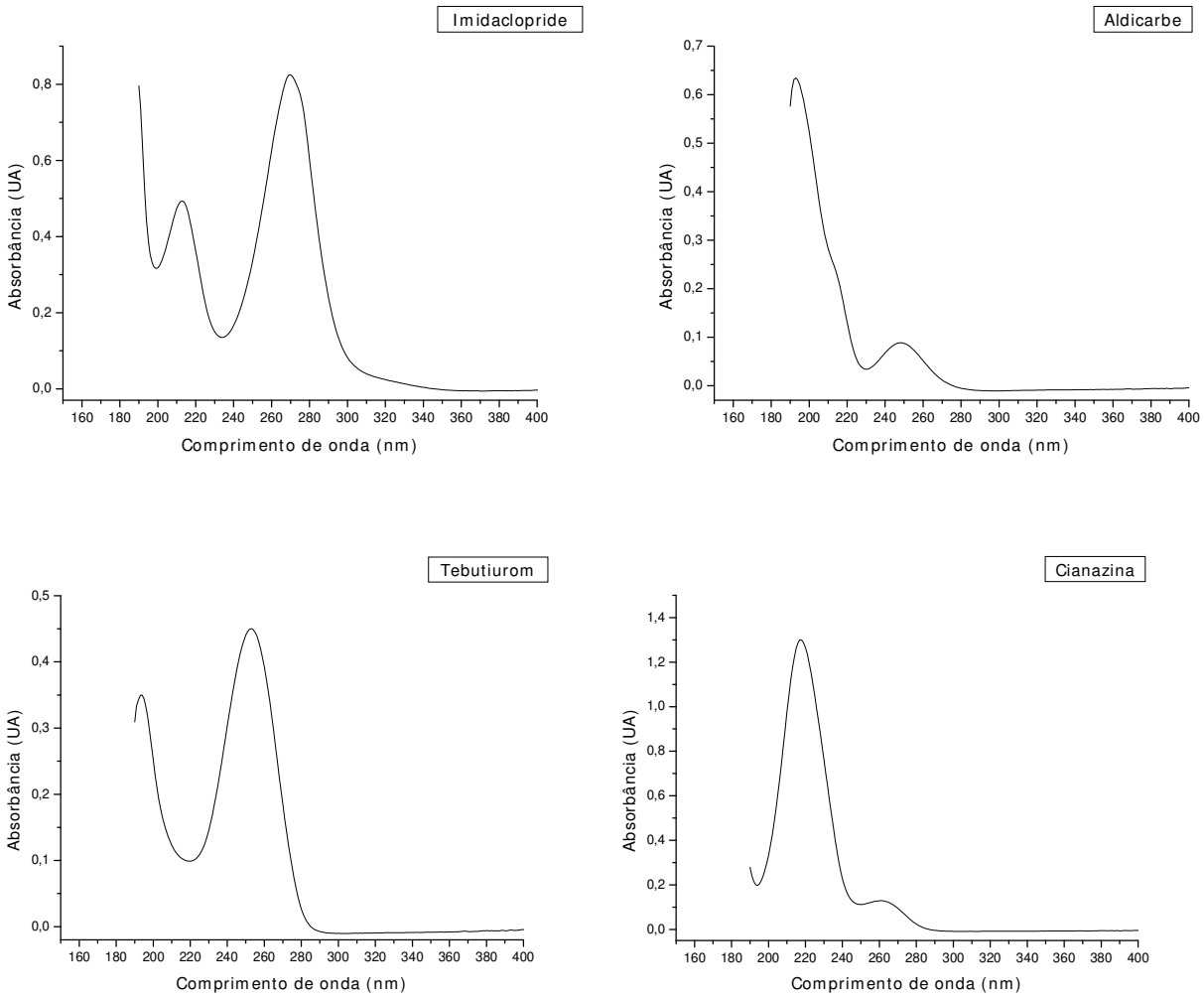
Figura 10: Cromatograma da separação dos agrotóxicos a partir de uma solução padrão na concentração 15 x LQE. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 µm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 µL, eluição isocrática.

IV.3.2 Confirmação da identidade dos agrotóxicos

Após serem definidas as condições cromatográficas de separação, realizou-se a identificação dos agrotóxicos estudados injetando-se soluções individuais de cada um deles. Os tempos de retenção foram

utilizados para identificação dos agrotóxicos quando estes estavam presentes em misturas e nas matrizes estudadas.

Na Figura 11 se apresentam os espectros de absorção no UV que fornecem os comprimentos de onda de absorção máxima de cada um dos agrotóxicos.



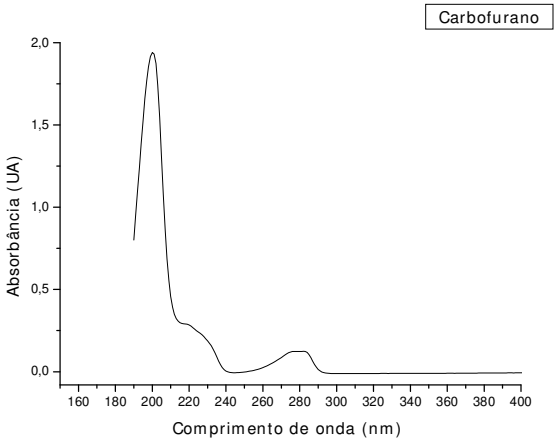


Figura 11: Espectros de absorção no UV dos agrotóxicos na concentração de 1 mg/L. Os espectros da simazina e atrazina já foram apresentados na Figura 5.

Na Tabela 11 encontram-se os tempos de retenção dos agrotóxicos injetados separadamente e seus respectivos comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}).

Tabela 11: Valores de tempos de retenção (t_R) obtidos para cada agrotóxico estudado e seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}).

agrotóxico	t_R (min)	λmax (nm)
imidacloprido	5,1	270
aldicarbe	9,9	192
tebutiurom	10,9	251
simazina	11,9	222
cianazina	15,5	218
carbofurano	21,6	200
atrazina	26,5	222

Foi escolhido o comprimento de onda de 220 nm para análise da mistura de agrotóxicos.

IV.3.3 Extração usando método QuEChERS

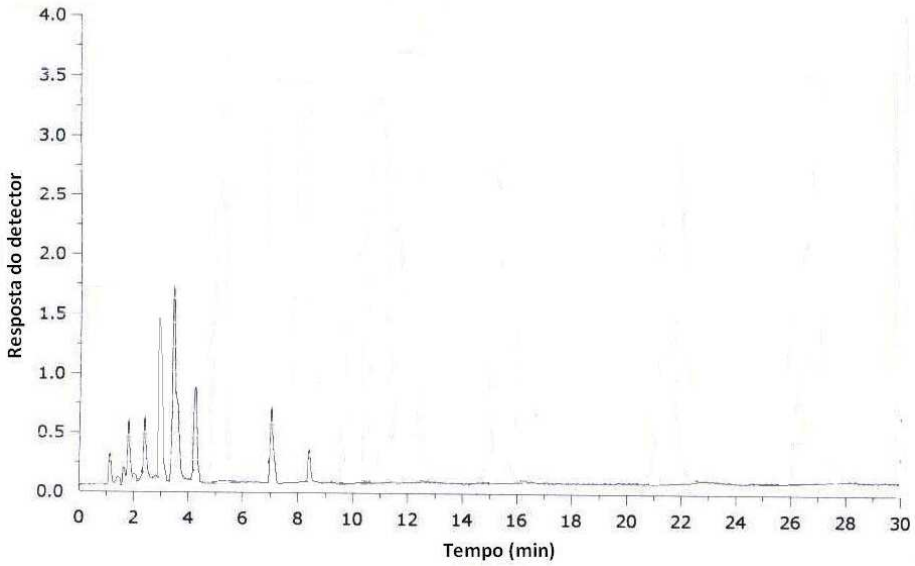
QuEChERS trata-se de uma técnica de extração que minimiza o número de etapas de preparo de amostra, uma vez que envolve apenas 2 etapas, sendo uma de extração com acetonitrila com partição, utilizando-se uma mistura de sais, e outra de limpeza do extrato por EFS dispersiva, empregando um sorvente que possui aminas primárias e secundárias em sua estrutura (PSA). Esta técnica é capaz de extrair agrotóxicos altamente polares, assim como aqueles de caráter ácido e básico a partir de matrizes complexas [16].

Neste estudo, o método QuEChERS foi empregado no preparo de amostra de caldo de cana na tentativa de se obterem extratos mais limpos, com boa recuperação para os agrotóxicos e de forma mais rápida. Alguns estudos preliminares foram realizados testando os cartuchos PMOS preparados no laboratório na etapa de concentração da amostra de caldo de cana. Porém, sempre ocorria entupimento dos cartuchos após a passagem de um certo volume de amostra, devido às características do caldo de cana que, apesar e ser constituído basicamente de água (78%), também contêm vária substâncias sólidas solúveis [17]. Dessa forma, julgou-se interessante aplicar o método QuEChERS na matriz em estudo neste trabalho, pois, apesar de ser um método relativamente novo, tem sido amplamente aceito pela comunidade internacional de analistas de resíduos de agrotóxicos. Em um estudo recente no LabCrom, aplicou-se o método QueChERS na extração de amostras de laranja e tangerina, com resultados bastante satisfatórios [16]. Além disso, apesar dos vários trabalhos publicados empregando QuEChERS em diferentes matrizes [18-20], ainda não há estudos recentes da aplicação deste método na análise de caldo de cana (garapa) usando HPLC. Furlani *et al.* usaram QuEChERS na análise de trifluralina, atrazina, endossulfamalfa, endossulfam beta, endossulfam sulfato, acetocloro e alacloro em caldo de cana, porém, neste caso os extratos obtidos foram analisados por GC [21].

A acetonitrila, utilizada na primeira etapa deste método de extração, foi substituída por acetato de etila. Testes preliminares indicaram o acetato de etila como sendo um solvente extrator mais eficiente que a acetonitrila para a matriz em estudo.

Na Figura 12 estão os cromatogramas dos extratos obtidos utilizando-se o método QuEChERS para as amostras testemunha e testemunha fortificada de caldo de cana. Os cromatogramas apresentados na Figura 15 mostram que o método foi capaz de gerar extratos mais limpos e conseguiu uma boa recuperação dos agrotóxicos estudados com esta metodologia de extração.

a)



b)

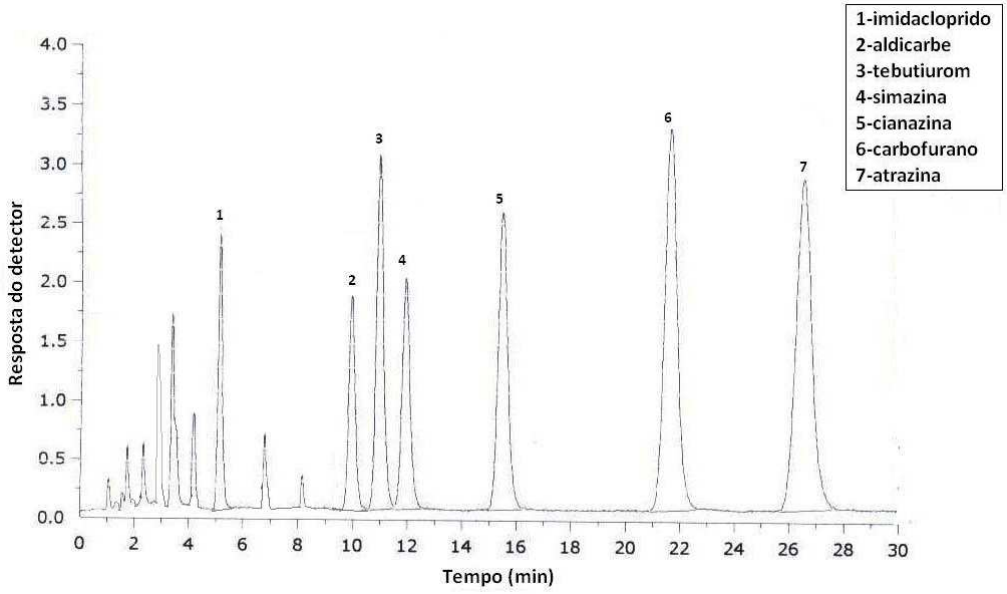


Figura 12: Cromatogramas dos extratos obtidos usando o método QuEChERS para as amostras testemunha (a) e testemunha fortificada (b) com concentração 15 x LQ de caldo de cana. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5 µm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 µL, eluição isocrática

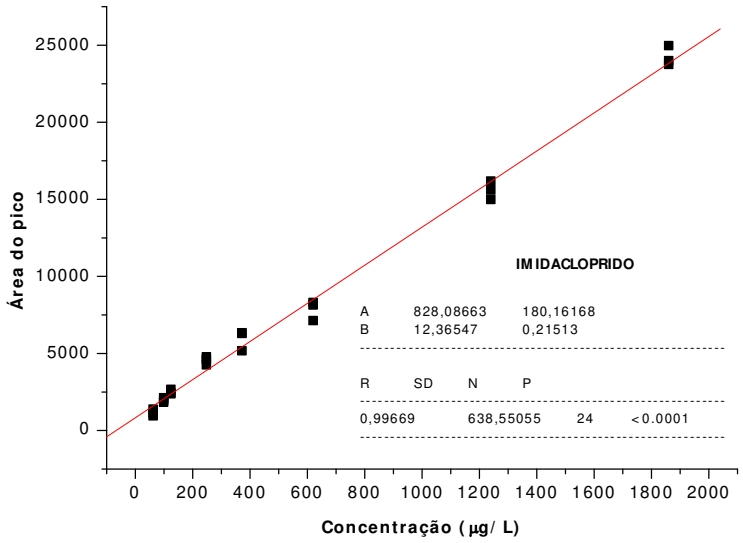
IV.3.4 Validação do método analítico

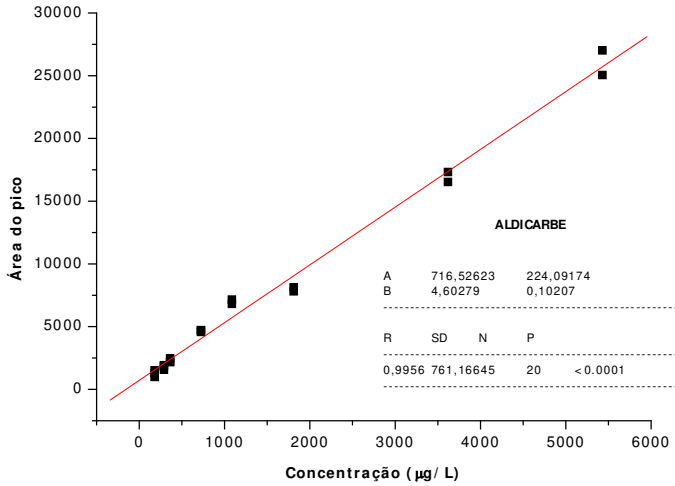
IV.3.4.1 Seletividade

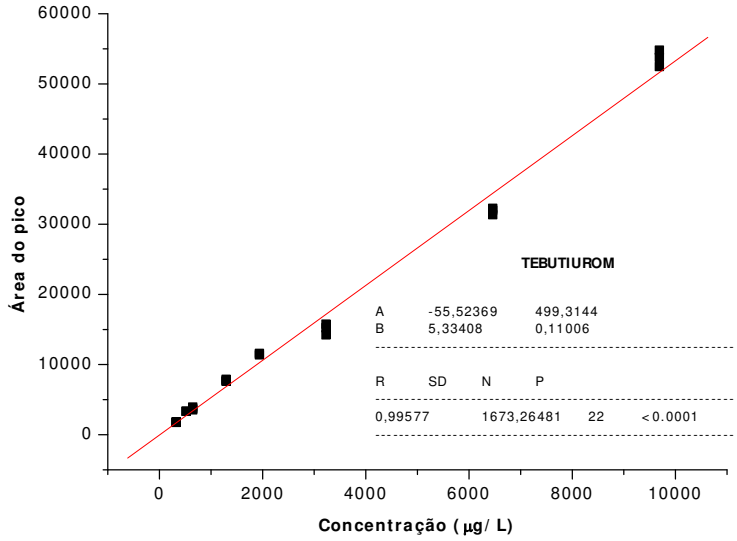
Comparando-se os cromatogramas obtidos para a amostra testemunha e a amostra testemunha fortificada com os agrotóxicos (Figura 12) pode-se afirmar que a metodologia desenvolvida para a determinação dos sete agrotóxicos é seletiva na matriz caldo de cana, já que não houve sobreposição de picos ou a co-eluição de interferentes com os compostos de interesse.

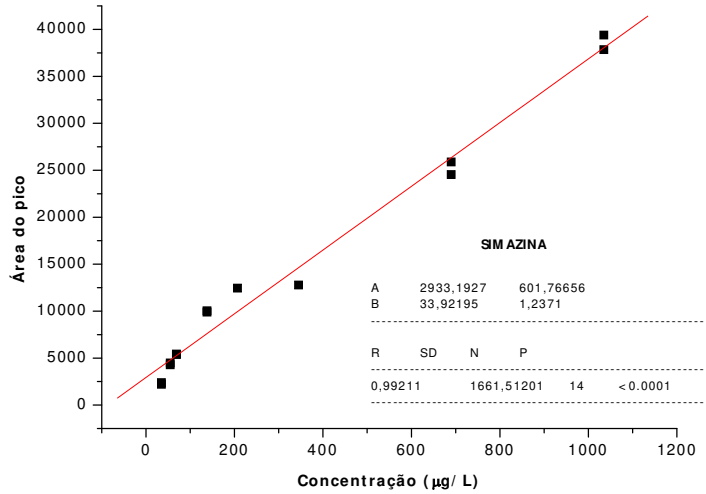
IV.3.4.2 Linearidade e faixa linear

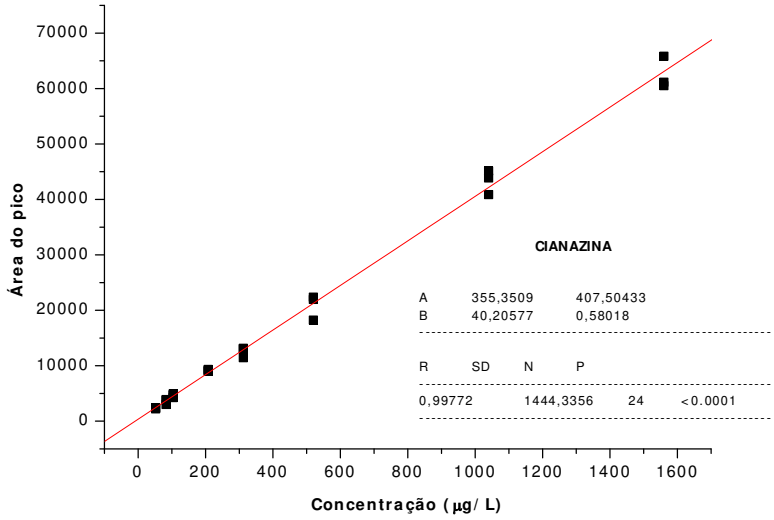
Foram construídas as curvas analíticas a partir de padrões puros dos agrotóxicos, ou seja, por padronização externa sem superposição de matriz, as quais se encontram na Figura 13.






Área do pico
Concentração (µg/ L)
TEBUTIUROM
A -55,52369 499,3144
B 5,33408 0,11006
R SD N P
0,99577 1673,26481 22 <0.0001


Área do pico
Concentração (µg/ L)
SIMAZINA
A 2933,1927 601,76656
B 33,92195 1,2371
R SD N P
0,99211 1661,51201 14 <0.0001


Área do pico
Concentração (µg/ L)
CIANAZINA
A 355,3509 407,50433
B 40,20577 0,58018
R SD N P
0,99772 1444,3356 24 <0.0001

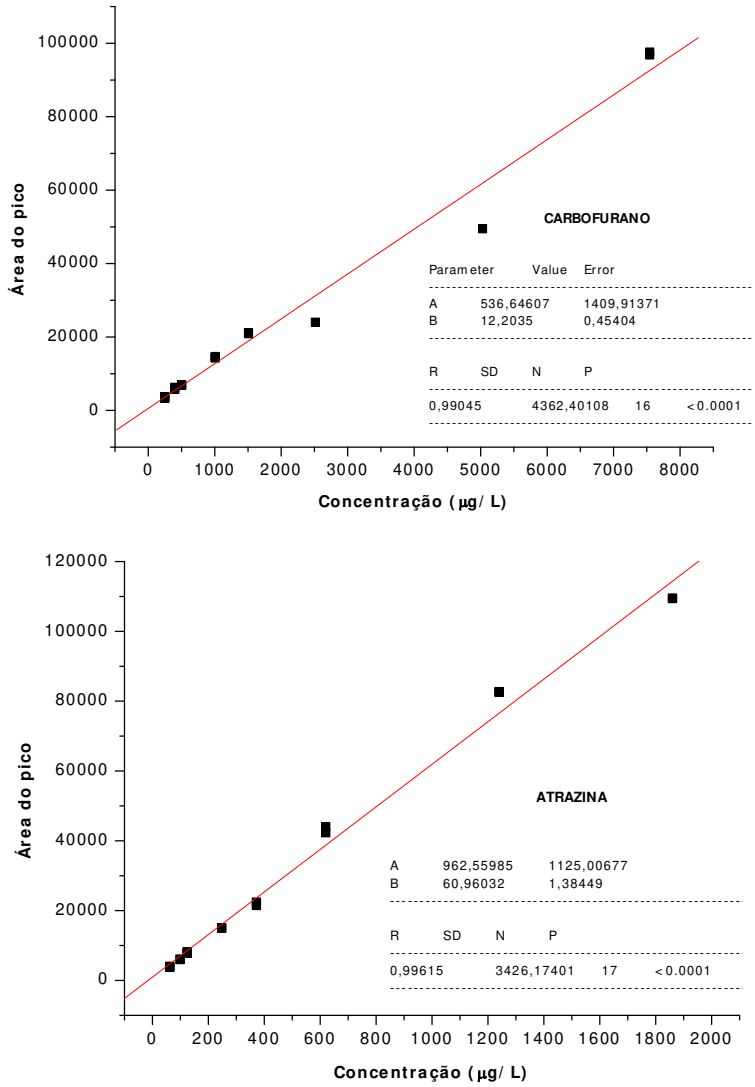


Figura 13: Curvas analíticas obtidas para os sete agrotóxicos estudados por calibração externa sem superposição de matriz.

A partir das curvas analíticas construídas foram obtidos os parâmetros da regressão linear e os coeficientes de correlação (*r*) que se encontram descritos na Tabela 12. Todos os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método e estão de acordo com as normas da ANVISA [16].

As faixas lineares foram consideradas satisfatórias, uma vez que abrangem um amplo intervalo de concentração, no qual o método pode ser aplicado.

Tabela 12: Curva analítica para os agrotóxicos.

Agrotóxico	Curva analítica			Faixa linear (µg/L)
	a (intercepto)	b (slope)	Coeficiente de correlação(r)	
imidacloprido	828	12	0.9967	124-1860
aldicarbe	717	5	0.9956	300-5430
tebutiurom	-56	5	0.9958	646-9690
simazina	2933	34	0,9921	69-1035
cianazina	355	40	0,9977	104-1560
carbofurano	537	36	0.9996	503-7545
atrazina	12	21	0.9905	124-1860

IV.3.4.3 Limite de detecção e de quantificação

Na Tabela 13 são apresentados os resultados de LD e LQ, antes e após a concentração, e os LMR designados pela ANVISA para os agrotóxicos em cana-de-açúcar. Estes valores de LMR foram utilizados para a realização deste trabalho porque as principais agências reguladoras não definem LMR para agrotóxicos em caldo de cana especificamente [21].

Os valores de LQ obtidos para todos os agrotóxicos, após a concentração, estão bem abaixo dos valores de LMR estabelecidos para esses agrotóxicos em cana-de-açúcar [12].

Tabela 13: Limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e LMR para os agrotóxicos estudados (n = 3).

Agrotóxico	LDE[a] (µg/L)	LQE[a] (µg/L)	LQM[b] (µg/L)	LMR[c] (µg/L)
imidacloprido	19	124	8,3	50
aldicarbe	150	300	20	20
tebutiurom	204	646	43	1000
simazina	21	69	4,6	20
cianazina	31	104	6,9	20
carbofurano	157	503	33,5	100
atrazina	43	124	8,3	250

[a] sem concentração (valores do instrumento)

[b] após a concentração com SPE (fator de concentração =15)

[c] limite máximo de resíduos para cana-de-açúcar (ANVISA 2008).

IV.3.4.5 Exatidão e precisão

A exatidão da metodologia desenvolvida foi determinada por meio de ensaios de recuperação realizados em três diferentes níveis de concentração (1 x LQ, 2 x LQ e 10 x LQ) e em triplicatas, resultando num total de nove determinações conforme sugerido pela ICH [14] e pela ANVISA [12]. Os resultados dos ensaios de recuperação apresentados na Tabela 14 encontram-se dentro do intervalo permitido para análise de resíduos nos três níveis de concentração avaliados (70 a 120%).

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de fortificação e em triplicatas. A precisão intermediária foi avaliada realizando-se ensaios em dias diferentes para verificar se a metodologia desenvolvida apresenta o mesmo comportamento quando mudam algumas variáveis como temperatura, umidade, fase móvel, entre outras. Tanto para a repetibilidade quanto para a precisão intermediária, determinada em três dias consecutivos, foram obtidos coeficientes de variação inferiores a 15 % (Tabela 14), comprovando que a metodologia é repetitiva não só quando os ensaios são realizados no mesmo dia, mas permanece constante mesmo com a mudança de algumas variáveis.

Tabela 14: Recuperações (n = 3) e precisão (repetibilidade, n = 3 e precisão intermediária, n = 3) para os agrotóxicos em caldo de cana; níveis de fortificação: F1 (1 x LQE), F2 (2 x LQE), F3 (10 x LQE), para a metodologia desenvolvida.

Agrotóxico	Recuperação (%)			Repetibilidade RSD (%)			Precisão intermediária RSD (%)		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
imidacloprido	79	87	102	3,9	4,5	4,3	4,6	5,7	5,9
aldicarbe	78	89	103	2,9	6,1	2,2	3,1	2,5	3,9
tebutiurom	90	97	98	3,2	5,0	5,9	5,0	4,0	4,0
simazina	98	94	90	2,5	5,8	2,0	2,9	1,9	5,0
cianazina	87	100	99	1,8	4,9	2,5	2,4	5,0	3,0
carbofurano	96	89	100	3,0	3,9	2,0	4,1	4,9	2,7
atrazina	78	90	88	2,0	1,9	1,0	4,9	3,9	3,0

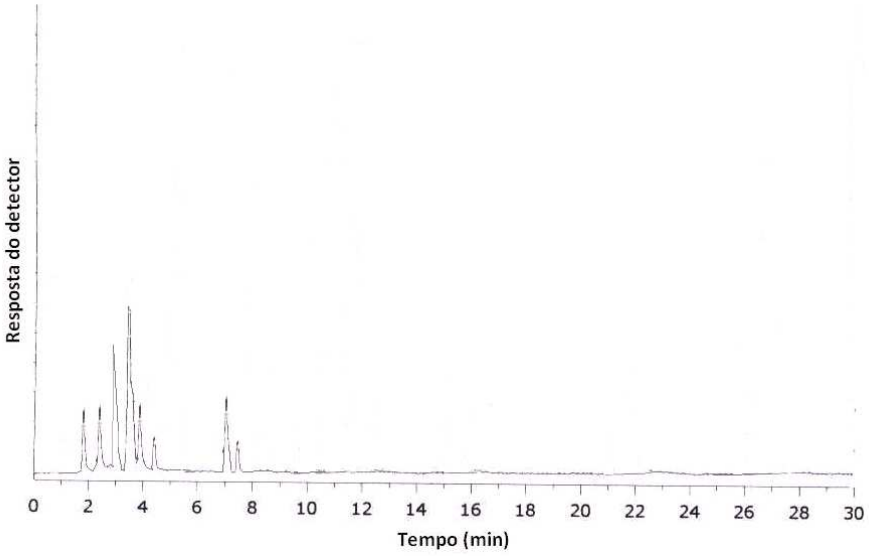
IV.3.4.6 Robustez

A metodologia desenvolvida pode ser considerada robusta por não ter sido afetada quando pequenas mudanças, como variações no pH da fase móvel em ± 0,05 e variações na temperatura da coluna foram introduzidas.

IV.3.4.7 Aplicação para amostra de caldo de cana

Não foram detectados resíduos de nenhum dos agrotóxicos em estudo nas 5 amostras de caldo de cana analisadas. Na Figura 14 estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de amostra de caldo de cana fortificado e não-fortificado (amostra testemunha).

a)



b)

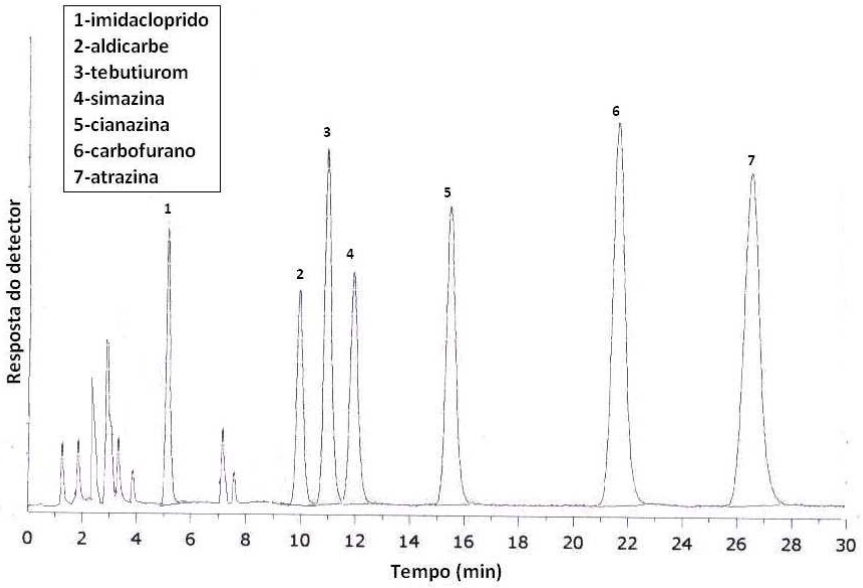


Figura 14: Cromatogramas dos extratos obtidos para a amostra testemunha sem fortificação (a) e fortificada (b) a 15xLQ de cada agrotóxico em caldo de cana. Condições cromatográficas: coluna PMOS preparada no laboratório imobilizada termicamente 60x3,9 mm d.i., diâmetro de partícula 5µm, FM ACN: H_2O ajustada a pH 3 com H_3PO_4 20:80 (v/v), vazão 0,3 mL/min, detecção UV a 220 nm, volume de amostra 5 µL, eluição isocrática.

Os resultados de recuperação se apresentam na Tabela 15:

Tabela 15: Porcentagens de recuperações dos agrotóxicos[a] em amostra de caldo de cana do comércio de Campinas (SP).

Agrotóxico	Recuperação (%)
imidacloprido	89
aldicarbe	83
tebutiurom	79
simazina	91
cianazina	87
carbofurano	95
atrazina	83

[a]concentração de 15xLQ para cada agrotóxico em 15 mL de amostra.

As amostras analisadas estão de acordo com a regulamentação brasileira para cana-de-açúcar em relação aos agrotóxicos estudados.

IV.4. Bibliografia

[1] Engelhardt, H.; Jungheim, M.; **Chromatographia** 29 (1990) 59-68.

[2] Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N.; **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721-728

[3] ***United States Pharmacopeia***, USP27-NF22 (2004) 1358-1359.

[4] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S., coordenadores, **Fundamentos de Cromatografia**, 1ª ed., Editora da Unicamp, Campinas (SP) 2006.

[5] Cruz, E.; Euerby, M.R.; Johnson, C.M.; Hackett, C.A.; **Chromatographia** 44 (1997) 151.

[6] Euerby, M.R.; Petersson, P.; **J. Chromatogr. A** 994 (2003) 13.

[7] Topuz, S.; Ozhan, G.; Alpertunga, B.; **Food Control** 16 (2005) 87.

[8] US-EPA (United States Environmental Protection Agency), disponível em http://www.epa.gov, acessado em dezembro de 2009.

[9] Vigna; C.R.M.; Morais; L.S.R.; Collins; C.H.; Jardim I.C.S.F.; **J. Chromatogr. A** 1114 (2006) 211.

[10] Majors, R.E.; **LC-GC Eur**. 16 (2003) 2.

[11] Maurer, H.H.; **Comb. Chem. High Throughput Screen** 3 (2000) 467.

[12] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde; Resolução RE nº 869, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em http://www.anvisa.gov.br. Acessado em setembro de 2009.

[13] Kuster, M.; **Mass Spectrom. Rev**. 25 (2006) 900-916.

[14] International Conference on Harmonization (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

[15] Edwards, C.A.; **Environmental Pollution by Pesticides**, Plenum Press, London 1973.

[16] Nardi, M.C.; **Tese de Doutorado**, Instituto de Química, Unicamp, Campinas (SP) 2009.

[17] Pratti, P.; **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, SP, 2004.

[18] Kirchner, M.; Húšková, R.; Matisová, E.; Mocák, J.; **J. Chromatogr. A** 1186 (2008) 271.

[19] Banerjee, K.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Savant, R.; Adsule, P. G.; **J. OAOC Int**., 91 (2008) 1435.

[20] Hernández-Borges, J.; Cabrera, J. C.; Rodríguez-Delgado, A.; Hernández-Suárez, E. M.; Saúco, V. G.; **Food Chem**., 113 (2009) 313.

[21] Furlani, R.P.Z.; Marcilio, K.M.; Tfouni, S.A.V.; **Toxicology Letters** 1805 (2008) S32-S246.

Capítulo V – Conclusões

Podemos dizer que os resultados obtidos vêm para ressaltar e complementar outros trabalhos já reportados na literatura em nosso grupo de pesquisa. O processo de deposição do polímero num suporte e posterior imobilização com tratamento térmico é um método alternativo promissor para preparação de sorventes e fases estacionárias baseadas em sílica, em substituição aos materiais ligados disponíveis atualmente. A preparação dos sorventes preparados no laboratório é simples, rápida e de menor custo. Além disso, todos os materiais usados para a preparação e imobilização são facilmente adquiridos e seu custo final é significativamente menor que os cartuchos comerciais. A FE PMOS utilizada propiciou uma boa separação entre os agrotóxicos estudados nas matrizes de água e de caldo de cana, similar às fases comerciais, com boas eficiências e resolução.

No método de SPE proposto para extração dos agrotóxicos simazina, atrazina, diurom, propazina e linurom em amostras aquosas, o cartucho PMOS preparado no laboratório apresentou valores de recuperação similares aos cartuchos comerciais Supelclean ENVI-8 e LC-8 avaliados. Bons resultados também foram obtidos quando extrações foram feitas com lotes diferentes do sorvente PMOS preparado no laboratório. A repetibilidade ficou entre 2,3 e 5,5 %, indicando que o processo para obter os sorventes PMOS é reprodutível.

O sorvente PMOS também foi utilizado para rechear pequenas colunas para uso em extração *on-line*. Este tipo de extração apresenta uma série de vantagens: aumento da detectabilidade, contaminação mínima da amostra e a possibilidade de obtenção de um sistema analítico totalmente automatizado. A detectabilidade melhorada faz com que seja possível diminuir a quantidade de amostra necessária para a análise. O sistema SPE-HPLC *on-line* testado demonstrou ser viável, mais rápido, de menor custo, com menor número de etapas em relação ao modo *off-line*, resultando em uma alternativa interessante a ser usada na determinação de agrotóxicos em águas e outras matrizes em análises de rotina.

A validação da metodologia desenvolvida apresentou recuperações entre 75 % e 100 % e coeficientes de variação inferiores a 7 % para todos os agrotóxicos estudados, de forma que o método foi considerado exato e preciso, uma vez que estes valores estão dentro da faixa indicada na literatura, para análise de resíduos de agrotóxicos. Verificou-se, também, que o método é linear, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os LQ obtidos para o método permitiram que os LMR impostos pelas agências reguladoras fossem atingidos.

O método QuEChERS aplicado às amostras de caldo de cana gerou extratos, resultando em uma boa eficiência de extração dos agrotóxicos. Aliando-se este resultado à rapidez e ao menor número de etapas do método QuEChERS, ele foi considerado o mais eficiente para a extração dos agrotóxicos das matriz estudada.

Desenvolveu-se um método para a determinação de sete agrotóxicos (imidacloprido, tebutiurom, aldicarbe, atrazina, carbofurano, cianazina, simazina) dentre os apontados como os mais empregados na cultura de cana-de-açúcar.

A validação da metodologia desenvolvida apresentou recuperações entre 78 % e 102 % e coeficientes de variação inferiores a 6 % para todos os agrotóxicos estudados, de forma que o método foi considerado exato e preciso, uma vez que estes valores estão dentro da faixa indicada na literatura, para análise de resíduos de agrotóxicos. Verificou-se, também, que o método é linear, com coeficientes de correlação superiores a 0,99. Os LQ obtidos para o método permitiram que os LMR impostos pelas agências reguladoras fossem atingidos.

As amostras de caldo de cana analisadas, obtidas no comércio local, não continham resíduos dos agrotóxicos estudados em quantidades detectáveis, mas apresentaram um comportamento semelhante ao das amostras testemunha fortificadas, demonstrando que o método desenvolvido é eficiente.

Os resultados apresentados mostram a eficiência dos métodos desenvolvidos e indicam que os objetivos propostos para este trabalho foram alcançados de maneira satisfatória, uma vez que os métodos desenvolvidos e validados puderam ser aplicados para a determinação dos agrotóxicos estudados em água e caldo de cana (garapa).