

## IV-165 - INSTRUMENTOS E TESTES DE VALIDAÇÃO DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

**Francisco Mauricio de Sá Barreto<sup>(1)</sup>**

Geólogo pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia civil/Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutor em Engenharia Civil/Saneamento Ambiental pela UFC. Professor do Departamento da Construção Civil do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE. Campus Benfica – Fortaleza-/CE.

**José Carlos de Araújo<sup>(2)</sup>**

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Engenharia Civil pela Universität Hannover, U.H., Alemanha. Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP). Pós-Doutorado pela University of Birmingham, BIRMINGHAM, Inglaterra. Professor da Universidade Federal do Ceará (UFC) – e-mail: jcaraujo@ufc.br

**Ronaldo Ferreira do Nascimento<sup>(3)</sup>**

Químico Industrial pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Doutor em Química Analítica pela Universidade de São Paulo (USP). Professor da Universidade Federal do Ceará (UFC) – e-mail: Ronaldo@ufc.br

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Lauro Maia, 1390 – Apto. 901– Bairro de Fátima - Fortaleza – CE - CEP: 60055-210 - Brasil - Tel: (85) 3472-1226 – e-mail: barreto@ifce.edu.br

### RESUMO

Este trabalho faz parte de uma pesquisa desenvolvida no município de Tianguá, Ceará a cerca do estudo investigatório e quantitativo da contaminação da água subterrânea, pertencente ao Aquífero Serra Grande, por pesticidas a partir do monitoramento de uma bateria de poços.

Os pesticidas analisados foram: atrazina, simazina e metil paration. Para a determinação e quantificação dos pesticidas utilizou-se o método de Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV). Os testes de validação do método para a determinação dos pesticidas foram realizados na Central de Análises Químicas (CAQ) do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP, no período de outubro e novembro de 2005. Para a realização dos testes foi empregado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu (LC-10AD) equipado com um detector UV-VIS Diode array (SPD-10AVP), com duas bombas SL-10AVP, operando com dois solventes. Os resultados dos testes cromatográficos: repetibilidade, recuperação e estabilidade bem como os limites de detecção e quantificação mostraram-se satisfatórios, confirmando a eficiência do método para a determinação dos pesticidas nas amostras de água subterrânea.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cromatografia Líquida, Testes de validação, Pesticidas, Água Subterrânea, Tianguá.

### INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, houve um aumento significativo no desenvolvimento da agricultura no Brasil, resultante do aumento de área cultivada, da produtividade e da utilização de fertilizantes e agrotóxicos (ANA, 2005). O uso de fertilizantes nas áreas agricultáveis do Brasil, para o período de 1992 a 2002, cresceu duas vezes e meia. Em relação aos agrotóxicos, o Brasil está entre os maiores consumidores do mundo. Os herbicidas figuram como os mais utilizados (58% do total), seguidos dos inseticidas (13 %) e fungicidas (11%). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG, a venda total de agrotóxicos, em 2004, atingiu US\$ 4,49 bilhões, 43% a mais em faturamento do que em 2003.

Como em outras regiões do Brasil, pesticidas são usados rotineiramente para aumentar produções agrícolas nos diversos tipos de culturas desenvolvidas na Serra da Ibiapaba, Ceará. O uso de pesticidas no município de Tianguá é considerado como um dos maiores do Estado e tem sido alvo de preocupação (NOROESTE, 2002). Este fato torna-se relevante, uma vez que pode estar havendo comprometimento da qualidade das águas subterrâneas da região, sobretudo no que se refere aos riscos à saúde da população. Além dos problemas de saúde associados à utilização e à manipulação dos agrotóxicos, a aplicação indiscriminada desses compostos em áreas de intensa atividade agrícola pode resultar em graves problemas de contaminação das águas

subterrâneas. A transferência desses compostos do solo para as águas subterrâneas ocorre, principalmente, pelo processo de lixiviação.

O controle dos usos e da qualidade das águas subterrâneas é ainda insatisfatório, dada a dispersão e a falta de articulação legal e institucional. O uso intensivo dos recursos naturais subterrâneos e de agrotóxicos, associado à elevada produção de resíduos na sociedade, freqüentemente causa ameaça à qualidade das águas subterrâneas. A degradação da qualidade das águas subterrâneas pode ocorrer em grandes áreas a partir de fontes difusas como percolação profunda de áreas intensamente cultivadas (WADE, 1998).

A determinação e quantificação de resíduos de agrotóxicos nos mananciais subterrâneos tem sido alvo de inúmeras pesquisas no Brasil e no mundo. Metodologias baseadas em cromatografia tem sido freqüentemente adotadas como instrumento de detecção e medição desses insumos em amostras de água subterrânea. Os instrumentos e testes para validação de métodos cromatográficos, utilizados na determinação de pesticidas em amostras de água, são essenciais para garantir a confiabilidade do método, como também gerar resultados seguros que possam subsidiar políticas de prevenção e recuperação dos recursos hídricos suscetíveis à contaminação ou já contaminados, principalmente, em áreas de intensa atividade agrícola.

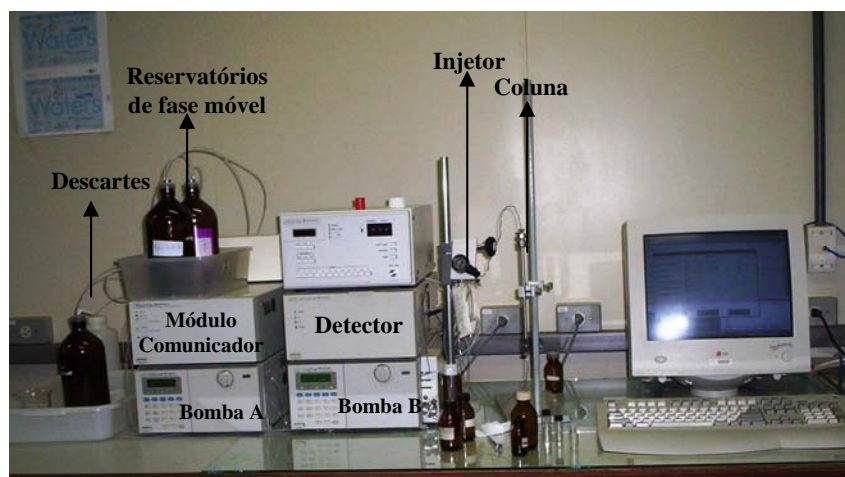
## MATERIAIS E MÉTODOS

### Validação do método de determinação de pesticidas nas amostras de água subterrânea

Para a determinação e quantificação dos pesticidas: atrazina, simazina e metil paration nas amostras de água subterrânea de uma bateria de poços monitorados no município de Tianguá-CE (Brasil), foi utilizado o método de Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE/UV).

Os testes de validação do método para os pesticidas citados, foram realizados na Central de Análises Químicas (CAQ) do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo – USP no período de outubro e novembro de 2005.

Para a realização dos testes cromatográficos foi empregado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Shimadzu (LC-10AD) equipado com um detector UV-VIS Diode array (SPD-10AVP), com duas bombas SL-10AVP, operando com dois solventes. A Figura 1 mostra a estrutura cromatográfica utilizada para determinação dos pesticidas e validação do método a partir de testes cromatográficos.



**Figura 1 – Estrutura cromatográfica utilizada para a detecção dos pesticidas e validação do método na Central de Análises Químicas do Instituto de Química de São Carlos – USP.**

A separação dos compostos foi realizada após a injeção de 20 µL da amostra concentrada em uma coluna da Supelco C18 (25 cm x 4,6 mm DI; partículas de 5 µm) nas seguintes condições de eluição:

- Atrazina e simazina: fase móvel composta por água (A) e acetonitrila (B) com fluxo constante de 0,8 mL/min com a seguinte programação: de 0 a 2,00 min 50% de B; em 5,00 min 80% de B; em 10,00min 50% de B até 11,00min.



- Metil paration: fase móvel composta por água (80%) e acetonitrila, com fluxo de 0,8 mL/min, detectados por absorção na região UV a 270nm. Nas Figuras 3, 4 e 5 são mostrados os espectros ultravioleta da atrazina, simazina e metil paration, respectivamente.

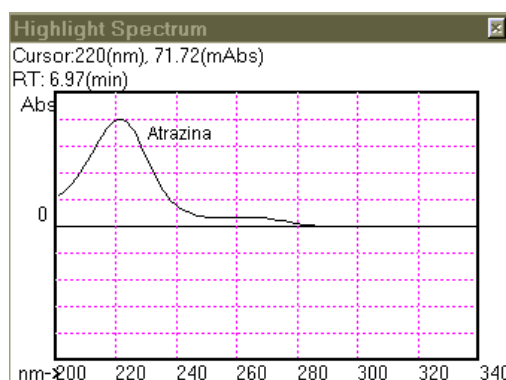


Figura 2 – Espectro UV da atrazina.

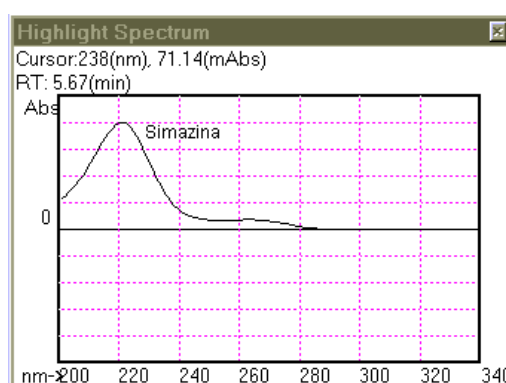


Figura 3 – Espectro UV da simazina.

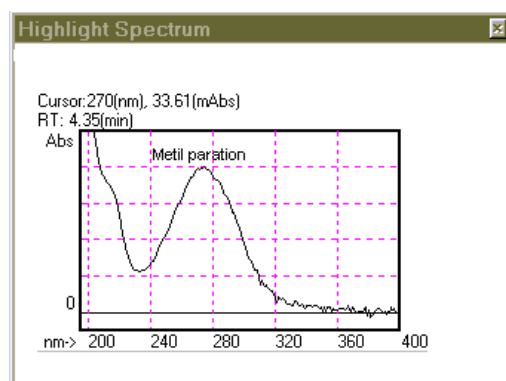


Figura 4 – Espectro UV do metil paration.

A quantificação da concentração dos pesticidas analisados foi realizada pelo método do padrão externo, de modo que a curva de calibração foi obtida a partir da regressão linear das áreas das soluções padrão contendo 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 mg/L de simazina e atrazina, 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg/L de metil paration, injetados em triplicata e preparados por diluição de uma solução estoque 100 mg/L de cada padrão em água/acetonitrila 50%.

A eficiência e validação do método cromatográfico utilizado foram avaliadas utilizando os seguintes testes cromatográficos: repetibilidade, recuperação e estabilidade dos pesticidas analisados assim como, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).



O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato e o limite de quantificação (LQ), corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão (LANÇAS, 2004). O limite de detecção para cada analito foi determinado por injeção de diluições sucessivas da solução estoque dos padrões analíticos, até que a área obtida fosse o triplo do valor da variação do ruído da linha de base. O limite de quantificação foi o dobro do limite de detecção, o qual foi avaliado pela constância da área relativa dos padrões de atrazina, simazina e metil paration.

O teste de *repetibilidade* expressa a fidelidade obtida nas mesmas condições operacionais (analista, equipamento, etc.) aplicadas em um curto intervalo de tempo. Em análises cromatográficas, é importante conhecer a repetibilidade do composto analisado, visto que ela é utilizada para confirmar a sua identidade (análise quantitativa). Este teste foi realizado usando injeções sucessivas de dez amostras de uma mesma solução-padrão de cada analito. As concentrações iniciais foram de 0,05 mg/L para a atrazina e simazina e de 0,75 mg/L para o metil paration. Segundo Lanças (2004), não há uma regra geral para valores máximos de desvio aceitável, entretanto, uma repetibilidade no desvio padrão de até um no tempo de retenção e na área (ou altura) tem sido considerada aceitável.

O teste de *recuperação* é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz no qual se encontra presente. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de 70 a 120% são aceitas (LANÇAS, 2004). O teste de recuperação foi efetuado por meio da dopagem de uma amostra previamente analisada. A amostra escolhida para a realização da dopagem não apresentou nenhum dos analitos de interesse em concentrações acima do limite de detecção estabelecido experimentalmente, e ocorreu antes da etapa de passagem das mesmas pelo cartucho (SPE) visando avaliar os procedimentos de concentração e quantificação por completo. As concentrações dos padrões escolhidas para a dopagem foram de 1,00 mg/L para os pesticidas: simazina, atrazina e metil paration. Teoricamente, a etapa de concentração promoverá um acréscimo de cinco vezes na quantidade do analito existente na amostra, ocasionando uma concentração final esperada do analito correspondente à média da faixa utilizada na construção das curvas de calibração.

De acordo com Lanças (2004), o teste de *estabilidade* de um analito refere-se ao tempo durante o qual as soluções-padrão e da amostra contendo o analito podem ser utilizadas sem que haja decomposição apreciável dentro das condições experimentais fixadas. Neste estudo, este teste foi realizado com o objetivo de conhecer o decaimento dos pesticidas estudados.

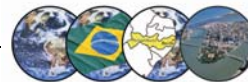
## RESULTADOS

As melhores condições cromatográficas para identificação dos pesticidas foram obtidas usando um sistema isocrático para metil paration e um sistema de solvente gradiente para atrazina e simazina, na qual a variação da composição da fase móvel permitiu obter a separação dos picos sem o alargamento dos mesmos. Isto foi obtido diminuindo-se a polaridade da fase móvel (acetonitrila:água), neste caso variando a concentração de acetonitrila de 50 a 80%. Nestas condições os compostos foram eluídos da coluna com tempo de retenção entre 4 e 11 minutos.

Estes analitos foram monitorados nos comprimentos de onda de 220nm (atrazina), 238nm (simazina) e 270nm (metil paration), para os quais os compostos apresentaram melhor absorvidade sem a interferência de outros compostos orgânicos presentes nas matrizes investigadas.

A escolha do método de análise dos pesticidas nas amostras de água subterrânea teve como base a grande aceitação, de acordo com a literatura consultada, do método Extração em Fase Sólida com cartuchos C-18. Quanto à técnica instrumental, a cromatografia líquida (HPLC/UV), empregada neste trabalho, é bastante eficiente e oferece limites de detecção compatíveis com outras técnicas utilizadas.

Os limites de detecção medidos foram suficientemente baixos (Tabela 1), sendo possível comparar as medidas dos pesticidas nas amostras de água com os limites dessas substâncias estabelecidos na legislação brasileira ou seja, 2,00 µg/L para atrazina e simazina, segundo a Portaria 518/2004 do MS/2004 para água destinada ao abastecimento público e 0,04 µg/L (classe 2) para paration, de acordo com a Resolução do CONAMA 357/2005.

**Tabela 1 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos pesticidas analisados.**

Limites	Simazina	Atrazina	Metil paration
LD (ppm)	0,05	0,05	0,50
LQ (ppm)	0,10	0,10	1,00

Os valores do limite de detecção de atrazina e simazina, quando comparados com aqueles encontrados por Dorez (2004), ficaram bem próximos, mesmo que a técnica utilizada pela autora tenha sido baseada em cromatografia gasosa com detector de nitrogênio e fósforo (CG/DNP). Os limites de detecção encontrados nesta pesquisa estiveram na mesma ordem de grandeza daqueles encontrados por Pinto; Jardim (2000), que empregaram técnica HPLC/UV com extração em fase sólida e cartuchos C-18, ou seja, semelhante à utilizada nesse trabalho.

Os resultados do teste de repetibilidade, apresentados na Tabela 2, mostraram valores de desvio padrão de 0,003 para os herbicidas atrazina e simazina, respectivamente, e 0,007 para metil paration. Esses resultados estão dentro da faixa tolerada que, segundo Lanças (2004), a repetibilidade com desvio padrão de até um no tempo de retenção e na área (ou altura), tem sido considerada aceitável. Comparando o valor de concentração real, ou seja, 0,05 mg/L tanto para atrazina quanto para simazina e 0,75 mg/L para metil paration observa-se que as concentrações médias medidas de 0,048 mg/L para atrazina e simazina e 0,753 mg/L para metil paration se encontram bem próximas da concentração real.

Os valores mostrados na Tabela 2 resultaram de 10 injeções para os três compostos estudados. O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO, (2003) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, (2003) sugere que a repetibilidade seja realizada a partir de um mínimo de nove determinações.

Com base nas considerações feitas, pode-se admitir que os resultados do teste de repetibilidade expressaram fidelidade obtida sob as mesmas condições operacionais, como por exemplo, para o mesmo analista e equipamento.

**Tabela 2 – Teste de repetibilidade dos pesticidas presentes em amostras de água subterrânea do município de Tianguá.**

Teste de repetibilidade do método						
Injeções	Atrazina C <sub>0</sub> = 0,05 (mg/L)		Simazina C <sub>0</sub> = 0,05 (mg/L)		Metil paration C <sub>0</sub> = 0,75 (mg/L)	
	C. medida	Erro	C. medida	Erro	C. medida	Erro
1	0,044	-0,120	0,049	-0,020	0,748	-0,003
2	0,045	-0,100	0,046	-0,080	0,746	-0,005
3	0,049	-0,020	0,049	-0,020	0,771	0,028
4	0,052	0,040	0,044	-0,120	0,756	0,008
5	0,051	0,020	0,045	-0,100	0,751	0,001
6	0,047	-0,060	0,045	-0,100	0,747	-0,004
7	0,050	0,000	0,052	0,040	0,762	0,016
8	0,049	-0,020	0,054	0,080	0,749	-0,001
9	0,045	-0,100	0,048	-0,040	0,750	0,000
10	0,044	-0,120	0,049	-0,020	0,753	0,004
MD	0,048	-0,048	0,048	-0,038	0,753	0,004
CV(%)	6,3	-	6,3	-	0,1	-
DP	0,003	0,057	0,003	0,061	0,007	0,010
EMA	-	-0,120	-	-0,012	-	0,064

MD – média; CV – coeficiente de variação; DP – desvio padrão; EMA – erro máximo absoluto.

Para a avaliação da recuperação dos pesticidas analisados, uma amostra foi fortificada com 1,0 mg/L da solução padrão de cada composto, resultando em uma concentração final de 5,0 mg/L, conforme as técnicas de pré-concentração.



Os valores de recuperação dos pesticidas analisados encontram-se na Tabela 3. Cada amostra foi injetada em triplicata e o valor da recuperação para cada analito foi calculado em função da média das concentrações obtidas para cada um. Os valores de recuperação para atrazina, simazina e metil paration foram, respectivamente, 96,6; 97,2 e 95,5%. Estes resultados são satisfatórios uma vez que, na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de 70 a 120% são consideradas satisfatórias (LANÇAS, 2004).

Com base nos resultados apresentados na Tabela 3, pôde-se concluir que o teste de recuperação realizado a fim de avaliar a eficiência do processo de isolamento do analito de interesse e dos procedimentos de extração dos compostos presentes na matriz investigada, mostrou recuperações adequadas.

**Tabela 3 – Teste de recuperação para os pesticidas analisados em amostras de água subterrânea no município de Tianguá.**

Teste de Recuperação			
Compostos	Dados	Concentração (mg/L)	Recuperação (%)
Atrazina	Valor real	5,000	96,6
	Valor medido 1	4,870	
	Valor medido 2	4,720	
	Valor medido 3	4,910	
	MD	4,830	
	DP	0,100	
Simazina	Valor real	5,000	97,2
	Valor medido 1	4,890	
	Valor medido 2	4,930	
	Valor medido 3	4,770	
	MD	4,860	
	DP	0,080	
Metil paration	Valor real	5,000	95,2
	valor medido 1	4,750	
	valor medido 2	4,910	
	valor medido 3	4,630	
	MD	4,760	
	DP	0,140	

MD – média; DP – desvio padrão.

Na Tabela 4 são mostrados os dados relativos ao teste de decaimento dos pesticidas analisados. Foi constatado decaimento em todos os níveis dos compostos mesmo tendo sido tomadas as devidas precauções nas etapas de coleta, acondicionamento, transporte e preparação das amostras de água subterrânea. Observa-se que o decaimento foi maior para as menores concentrações.

Embora haja decaimento com o tempo na concentração dos pesticidas, para uma faixa de 0,1 a 1,00 mg/L de concentração inicial a persistência dos compostos após 3 meses, aproximadamente, ficará entre 40 e 83%. Sendo assim, pode-se concluir que será possível medir a ordem de grandeza dos compostos em até 3 meses, aproximadamente.



**Tabela 4 – Teste de decaimento dos pesticidas presentes nas amostras de água subterrânea no município de Tianguá no intervalo de 46 dias**

Município de Fátima no intervalo de 48 dias							
Compost o	Número de amostras	Concentração (mg/L)					Coeficiente de decaimento dia <sup>-1</sup>
		Co	C. média Medida (25/10/05)	Desvio padrão	C. média Medida (10/12/05)	Desvio padrão	
Atrazina	3	0,1	0,089	0,010	0,053	0,008	0,011
	3	1,0	0,918	0,008	0,766	0,112	0,004
	3	10,0	9,813	0,176	9,217	0,143	0,001
Simazina	3	0,1	0,089	0,002	0,069	0,006	0,006
	3	1,0	0,903	0,015	0,822	0,103	0,002
	3	10,0	10,403	0,383	9,884	0,229	0,001
Metil paration	3	1,0	0,888	0,197	0,808	0,169	0,002
	3	5,0	5,022	0,224	4,641	0,262	0,002
	3	10,0	9,760	0,263	9,199	0,263	0,001

## CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa pôde-se concluir que:

As análises dos pesticidas investigados nas amostras de água subterrânea indicaram que as melhores condições cromatográficas foram obtidas usando um sistema isocrático para metil paration e um sistema de solvente gradiente para atrazina e simazina com tempo de retenção entre 4 e 11 minutos.

Os limites de detecção foram suficientemente baixos permitindo comparar as medidas dos pesticidas nas amostras de água com os limites dessas substâncias estabelecidos na legislação brasileira.

Os resultados do teste de repetibilidade indicaram correlação com a faixa tolerada, mostrando fidelidade obtida sob as mesmas condições operacionais, como por exemplo, para o mesmo analista e equipamento.

Os valores de recuperação dos pesticidas analisados mostraram-se recuperações adequadas a fim de avaliar a eficiência do processo de isolamento do analito de interesse e dos procedimentos de extração dos compostos presentes na matriz investigada.

Para o teste de decaimento dos pesticidas analisados, constatou-se decaimento em todos os níveis dos compostos. Embora haja decaimento com o tempo na concentração dos pesticidas a persistência dos compostos após 3 meses, aproximadamente, ficará entre 40 e 83%. Sendo assim, pode-se concluir que será possível medir a ordem de grandeza dos compostos em até 3 meses, aproximadamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Ministério do Meio Ambiente. Panorama da qualidade das águas subterrâneas no Brasil. Cadernos de recursos hídricos. ZOBY, J. L. G.; OLIVEIRA de, F. R. (eq. técnica). Brasília, 2005. 74 p.
2. BRASIL. Portaria no 518 de 25 de março de 2004. Aprova a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, que dispõe sobre procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano, estabelece o padrão de potabilidade da água para consumo humano, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. Publicação DOU: 26/03/2004. Seção I, p. 266.
3. BRASIL. Resolução no. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente de 18 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. Publicação DOU: 18/03/2005.
4. BRASIL. Resolução no. 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos de Medicamentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília. Publicação DOU: 02/06/2003.



5. DORES, E.F.G.C. Contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2004. 281 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
7. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**: métodos cromatográficos de análise. São Carlos: RiMa, 2004. n. 6, 62p.
8. NOROESTE, jornal. Uso de agrotóxico na Serra grande. Sobral, p. 5, ago. 2002.
9. PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method **J. Chromatogr. A**, v. 869, p. 463–469, 2000.
10. SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Notícias. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/new/noticias/interna.php?cod=856>. Acesso: 3 mar. 2005.
11. WADE, H.F. The impact of pesticide use on groundwater in North Carolina. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 27, n. 5, p. 439-444, 1998.