

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – MATERIAL E EQUIPAMENTOS

3.1.1 – SOLVENTES E REAGENTES UTILIZADOS

Água ultrapura proveniente do sistema de ultra purificação (Milli-Q) foi utilizada no preparo de todas as soluções envolvidas no processo de otimização e validação do método.

O solvente orgânico utilizado na preparação da solução padrão estoque dos analitos e do padrão interno (pentacloronitrobenzeno) foi metanol, grau cromatográfico (SupraSolv, Merck – Alemanha).

No estudo do efeito da força iônica, realizado na etapa de otimização da extração, foi utilizado cloreto de sódio (p.a., Merck, 99%). No estudo de pH foram utilizados ácido acético (p.a., Merck) e hidróxido de sódio monohidratado (p.a., Merck, 99,99%) para o ajuste deste.

Para o estudo do teste ecotoxicológico com *Artemia salina* foi utilizado sal marinho sintético.

3.1.2 – PADRÕES UTILIZADOS

Os padrões utilizados foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich (Germany): Trifluralina lote 3223X com 99,1% de pureza; Clorpirifós lote 3027X com 99,2 % de pureza; Alfa endossulfan lote 4546X e Beta endossulfan lote 4547X , ambos com 99% de pureza; Pentacloronitrobenzeno (padrão interno) Lote UO8011 com 99% de pureza.

3.1.3 – PREPARO DAS SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com o auxílio de micro-pipeta de volume variável de 10-100 e 100-1000 µl, da LABMATE. A balança analítica utilizada para pesagem foi da marca Precisa XT 220A (precisão: 0,0001g).

3.1.3.1 – SOLUÇÃO PADRÃO ESTOQUE DOS ANALITOS

As soluções padrão estoque foram solubilizadas em metanol. As massas pesadas para os analitos foram: 0,01150g para Trifluralina, 0,01140g para Clorpirifós e 0,01280g para Alfa endossulfan e Beta endossulfan. As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL, resultando nas seguintes concentrações: Trifluralina 1150 mg L^{-1} , Clorpirifós 1140 mg L^{-1} , Alfa endossulfan e Beta endossulfan 1280 mg L^{-1} . A solução estoque do padrão Pentacloronitrobenzeno também foi preparada em metanol pela diluição de 0,01122 g e o volume elevado para 100,00 mL. A concentração do Padrão Interno (PI) foi de $111,08 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As soluções padrão estoque preparadas foram armazenadas em frascos, vedadas com teflon e conservadas em freezer.

3.1.3.2 – SOLUÇÃO PADRÃO INTERMEDIÁRIA

As soluções padrão intermediária foram solubilizadas em metanol e preparadas com concentrações de 100 mg L^{-1} a partir das soluções padrão estoque

3.1.3.3 – SOLUÇÃO TRABALHO

Soluções trabalho de 10 mg L^{-1} individuais foram preparadas para os analitos e o padrão interno para análise modo scan individual, via injeção direta. Para análise no modo scan mix, via injeção direta, foi utilizada uma solução de 100 mg L^{-1} contendo todos os analitos e o padrão interno. Para as análises com as fibras nos estudos de otimização dos parâmetros, soluções de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas. Para o estudo de validação do método, soluções de 200 - 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Alfa endossulfan, 250 - 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Beta endossulfan; 64 - 100 ng L^{-1} para Trifluralina e 80 - 120 ng L^{-1} para Clorpirifós foram preparadas. Todas as soluções foram feitas a partir da solução padrão intermediária e volume elevado com água ultrapura. A concentração da solução trabalho para o padrão interno foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.2 – LIMPEZA DA VIDRARIA

Para a limpeza das vidrarias, foram realizadas imersões destas em uma solução de água e Extran 3-5% (Ma 02 neutro, Merck) por aproximadamente 24 horas. Após esse período, foram realizados enxágües com água, água destilada e água ultrapura. Em seguida os *vials* foram secos em estufa e posteriormente aquecidos a 400 °C em mufla por 12 horas.

3.3 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

3.3.1 – CROMATÓGRAFO À GÁS ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM/EM)

As análises foram realizadas e otimizadas em um Cromatógrafo à Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM/EM) da Varian, CG-3900 e Saturno 2100-T/MS/MS (por coleta de íons e ionização eletrônica, com energia de 70 eV) respectivamente, equipado com um injetor automático (autoinjector CP-8410 Varian). O *software* Saturno GC/MS 5.52 *workstation* e processador de dados MS 2.0 com banco de dados da NIST foram usados para o tratamento de dados.

3.3.2 – EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS

A técnica da MEFS foi utilizada para a extração e pré-concentração dos analitos em amostras de água. Para efetuar essas análises, usou-se um *Holder* manual da SUPELCO (USA), próprio para MEFS contendo a fibra escolhida para as extrações.

A extração e pré-concentração dos analitos foi realizada em *vials* âmbar de 4,0 mL com tampa fenólica e septo de PTFE/silicone de 11mm exclusivo para MEFS da firma *SUN-Sri* (USA).

3.3.3 – OUTROS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Utilizou-se uma estufa a vácuo da *Tecnal*, modelo TE-395, equipada com bomba de vácuo *Tecnal*, modelo TE-058. Banho ultra-som da *Unic Ultrasonic*

Cleaner, modelo USC 1440. Sistema de purificação Milli-Q Gradiente, da *Millipore* (USA), na obtenção da água ultrapura. Destilador *Sieger*, série D-01-067. Compressor aspirador, modelo Cal, *Fanem* LTDA, Titulador automático *Titroline alpha* operando no modo pHmetro e agitador magnético da *Magnetic Stirrer*, HI 190M, *Hanna Instruments*.

3.4 – CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

3.4.1 – CONDIÇÕES DE ANÁLISE PARA CROMATOGRAFIA À GÁS

As condições de análise para o estudo dos analitos com a cromatografia à gás estão descritas a seguir:

▣ Coluna cromatográfica : A coluna utilizada para essas análises é uma coluna capilar de baixo sangramento (*factor Four*) da *Varian* , com fase estacionária VF-5ms, 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano, possuindo 30m de comprimento, com diâmetro interno e externo de 0,25mm e 0,39mm, respectivamente, e espessura de 0,25µm. Podendo ser utilizada nas análises com programação de temperatura de até 350 °C.

▣ *Liner*: *liner* para MEFS *single goseneck* para injetor 1177 de 0,75mm,

▣ Temperatura do injetor: 250 °C

▣ Gás de arraste: Hélio 99,999% (5.0)

▣ Fluxo gás: constante de 1,0 mL min⁻¹

▣ Injeção (manual): “*Splitless*” com tempo de amostragem de 2,0 minutos, seguido de uma razão de *split* de 50:1 por 15,0 minutos e de 20:1 no restante da corrida

▣ Programação de temperatura: Para a análise dos pesticidas a melhor programação de temperatura obtida, para o forno da coluna no Cromatógrafo à Gás, é mostrada a seguir:

«160°C (isotérmica de 2,0 min),

«160 – 180°C, com aquecimento de 15°C min⁻¹ (isotérmica de 7,0 min),

«180 – 265°C, com aquecimento de 8°C min⁻¹ (isotérmica de 2,0 min).

3.4.2 – CONDIÇÕES DE ANÁLISE PARA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As condições de análise para o estudo dos analitos com a Espectrometria de Massas estão descritas a seguir:

- ▣ Temperatura do *manifold*: 50 °C
- ▣ Temperatura do *transferline*: 250 °C
- ▣ Temperatura do *trap*: 200 °C
- ▣ Tempo de *scan*: 0,35 segundo/*scan*

Uma varredura de massa de 40 - 450 m/z foi adotada no estudo de otimização das condições cromatográficas de separação. O Espectrômetro de Massas foi operado no modo Ionização por Impacto de Elétrons (EI), com voltagem de 70eV. O estudo EM/EM foi conduzido pela dissociação com colisão induzida (CID) no modo não-ressonante para os analitos. O método para o estudo da otimização da energia de dissociação é o AMD (*Automated Method Development*), que estabelece a energia de excitação e o nível de armazenamento de excitação para cada íon. Esse estudo de otimização foi efetuado com as energias de excitação não-ressonantes de: 0 ,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 , 90 e 100 volts, ou seja, variando em 10 unidades. Para cada intervalo de energia eficiente na dissociação, um novo estudo foi realizado com intervalos variando em 1 unidade, por exemplo, 97, 98, 99 volts.

3.5 – CONDICIONAMENTO DA FIBRA

As fibras em estudo foram condicionadas com as seguintes temperaturas do injetor, recomendado pelo fabricante, com um tempo de aquecimento de 1h:

- ▣ PDMS/DVB: 250°C
- ▣ CW/DVB: 220°C
- ▣ PDMS: 250°C
- ▣ Poliacrilato: 300°C

No método de condicionamento, a temperatura do forno da coluna foi de 250 °C e a razão de *split* de 50:1. Após o condicionamento, foi realizado o branco da fibra utilizando o método de análise.

3.6 – OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

Os parâmetros abaixo foram estudados, cada um em triplicata, para otimizar o método de análise com a Microextração em Fase Sólida. Soluções contendo os analitos a uma concentração de 1 µg L⁻¹ foram utilizadas.

Os parâmetros estudados foram:

- | | |
|--|---|
| ▣ <i>Eficiência de extração das fibras</i> | ▣ <i>Tempo de extração dos analitos</i> |
| ▣ <i>Estudo da velocidade de agitação da solução</i> | ▣ <i>Força iônica do meio</i> |
| ▣ <i>Tempo de dessorção dos analitos</i> | ▣ <i>pH da solução</i> |

▣ *EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO DAS FIBRAS*

Para o estudo da eficiência de extração das fibras, foram escolhidas quatro destas comerciais: PDMS 100µm, CW/DVB 70µm, Poliacrilato 85µm e PDMS/DVB 65µm.

▣ *ESTUDO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO DA SOLUÇÃO*

Neste estudo foi utilizado um agitador magnético ao qual foi atribuído velocidades de 20, 40 e 60% da sua velocidade máxima, para avaliar em qual velocidade a extração dos analitos pela fibra era mais eficiente.

▣ *TEMPO DE DESSORÇÃO DOS ANALITOS*

Foram estudados os tempos de dessorção dos analitos com 60, 90, 120 e 150 segundos (tempo de “válvula trancada”), tempo em que os analitos são dessorvidos termicamente do recobrimento da fibra no injetor do CG.

▣ *TEMPO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS*

Os tempos de extração 20, 30, 40, 50 e 60 minutos foram avaliados para encontrar o tempo em que ocorre a maior extração dos analitos pela fibra. Esse tempo corresponde ao tempo de imersão da fibra na solução contendo os analitos.

▮ FORÇA IÔNICA DO MEIO

O efeito da força iônica no estudo foi avaliado com as soluções contendo 10%, 20% e 30% de solução salina, usando solução de cloreto de sódio para a preparação das mesmas.

▮ pH DA SOLUÇÃO

As soluções com pH de 3, 6 e 9 foram estudadas, usando ácido acético e hidróxido de sódio para o ajuste dos mesmos. O pHmetro utilizado foi calibrado com solução tampão de calibração na faixa de pH em estudo.

Para cada parâmetro otimizado, três soluções foram analisadas utilizados *vials* com volume de 4,0 mL de solução.

3.7 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO MEFS–CG-EM/EM

Para cada parâmetro validado, três soluções foram analisadas, sendo eles: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. As soluções foram preparadas em *vials* de 4,0 mL.

▮ Seletividade

A seletividade do método usando MEFS-CG-EM/EM foi analisada utilizando solução isenta das substâncias de interesse (água ultrapura do sistema Milli-Q), soluções padrão dos analitos com concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e uma amostra enriquecida com os analitos.

▮ Linearidade do método

O comportamento linear do método foi avaliado estudando a faixa de concentração com soluções de 200 - 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Alfa endossulfan, 250 – 700 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Beta endossulfan; 64 – 100 ng L^{-1} para Trifluralina e 80 – 120 ng L^{-1} para Clorpirifós.

O gráfico de calibração relaciona a razão de área (área da substância/área do padrão interno) com a concentração da substância. A equação da reta é obtida pelo

método dos mínimos quadrados e a linearidade avaliada pelo coeficiente de correlação (r).

▣ Precisão e exatidão

O estudo da precisão foi realizado avaliando a repetitividade para os tempos de retenção e a repetitividade das áreas dos analitos, analisando três soluções padrão contendo os analitos. Os valores médios obtidos do tempo de retenção e da área dos analitos foram usados para calcular o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação percentual (CV). A precisão do método foi avaliada usando os coeficientes de variação percentual dos testes de recuperação.

A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação realizados em três níveis de concentração. Os testes de recuperação dos pesticidas foram efetuados pela adição de padrão a amostra nas concentrações de 64, 80 e 100 ng L⁻¹ para a Trifluralina, 80, 95 e 120 ng L⁻¹ para Clorpirifós, 250, 400 e 700 µg L⁻¹ para Beta endossulfan e 200, 400 e 700 µg L⁻¹ para Alfa endossulfan. O ensaio de recuperação efetuado em triplicata teve o objetivo de verificar possíveis interferentes presente na amostra que pudessem interferir na resposta do analito frente ao detector. Os resultados encontrados foram expressos em porcentagem de recuperação das quantidades conhecidas do analito adicionado e posteriormente encontrado.

▣ Limite de detecção (LD) e Limites de quantificação (LQ)

Os limites de detecção foram determinados analisando as soluções padrão com baixas concentrações até obter a detecção dos picos, para cada analito, com três vezes a relação sinal/ruído. A concentração resultante foi considerada como a mínima detectável. Os limites de quantificação foram determinados do mesmo modo para o limite de detecção, até a obtenção do pico cromatográfico com dez vezes a relação sinal/ruído. A concentração resultante foi considerada como a mínima quantificável.

3.8 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO

Os ensaios ecotoxicológicos existentes para avaliar o efeito de substâncias químicas em corpos de água doce podem ser realizados através de bioensaios utilizando *Daphnia magna Straus*, por exemplo, que é um microcrustáceo planctônico de água doce com tamanho médio de 5 a 6 mm, sendo vulgarmente conhecido como pulga d'água. Este se encontra entre os mais difundidos, devido a sua praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade. Entretanto, o efeito de uma única substância sobre os organismos difere entre espécies e níveis de organização biológica e tem sido alvo de muitos estudos (Radix *et al.*, 2000). Diante deste fato, propusemos um estudo de ecotoxicologia com *Artemia salina*. A *Artemia salina* também é um microcrustáceo, possuindo ainda tamanho médio similar ao do microcrustáceo *Daphnia magna Straus*, e a simplicidade do seu bioensaio favorece a sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (Siqueira *et al.*, 1998).

3.8.1 – AVALIAÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE E DEGRADAÇÃO PARA OS ANALITOS

O teste de toxicidade para os agrotóxicos foi avaliado pelo teste de letalidade contra *Artemia salina*, de acordo com o método proposto por Meyer *et al* (1982). Para a realização do teste, ovos de *Artemia* foram colocados em água de mar artificial, preparada com sal marinho (38 gramas do sal marinho para 1 litro de água, seguido da filtração dessa solução salina), em temperatura ambiente durante 48 horas, exposto a um leve aquecimento por uma lâmpada. Primeiramente foi realizado um estudo do solvente para observar a letalidade deste contra *Artemia salina*, para depois então preparar as soluções contendo os agrotóxicos no solvente que menos se mostrou agressivo para a mesma. Foram preparadas diversas soluções, variando as concentrações, para Trifluralina, Clorpirifós, Alfa e Beta endossulfan e um mix, contendo todos os agrotóxicos. Os microcrustáceos (10 indivíduos) foram expostos a essas soluções e após 24 horas de exposição, era realizada a contagem do número de mortos e vivos, visando o cálculo do DL₅₀ utilizando o método *Próbitos* de análises. O estudo foi realizado em triplicata.

Para o estudo da degradação dos agrotóxicos, soluções individuais destes e uma solução mix foram preparadas baseadas na concentração limite, DL_{50} , previamente estudadas no estudo da toxicidade. Essas soluções ficaram em repouso, em temperatura ambiente, simulando um ambiente da natureza. O objetivo desse estudo foi observar se essas soluções com concentração limite, com o passar dos dias, ficavam menos tóxicas, mais tóxicas ou permaneciam com a mesma toxicidade para a *Artemia salina*. Uma outra etapa do estudo da degradação foi analisar a degradação propriamente dita, analisando a área de cada agrotóxico utilizando a técnica MEFS-CG-EM/EM. Para esse estudo, uma solução mix com concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada. As análises, em triplicata, começaram no dia em que foi feita a solução e a cada sete dias. A cada semana então eram realizadas as análises e o estudo da área de cada agrotóxico.

3.9 – AMOSTRAGEM

3.9.1 – CARACTERÍSTICAS DA CIDADE DE AMOSTRAGEM

Sidrolândia fica situada a $20^{\circ} 55' 55''$ de Latitude Sul e $54^{\circ} 57'41''$ de Longitude Oeste, com uma contagem de população em 2007 de 38.147 habitantes com área territorial de 5.286 km^2 (IBGE, 2008). A cidade faz limites com: Campo Grande, Terenos, Nova Alvorada do Sul, Rio Brilhante, Maracajú e Dois Irmãos do Buriti. Tem como distrito Quebra-Côco e Capão Seco. A história de Sidrolândia é o relato da evolução das atividades agro-pastoris na região. A agricultura e o comércio são as principais atividades econômicas da cidade. Um terço de sua população reside na zona rural (Citybrasil, 2008). O Censo Agropecuário mostrou que em 2006 foram 45.788 hectares de lavouras plantadas na região de Sidrolândia (IBGE, 2008).

Sidrolândia está a 64 km de distância da capital do estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. A localização da cidade é representada na FIGURA 7.



FIGURA 7 – Localização geográfica da cidade de Sidrolândia

3.9.2 – LOCAL DE AMOSTRAGEM

Foram coletadas duas amostras de água superficial, córrego, no dia 13 de janeiro de 2008. As amostras foram coletadas, depois de um dia de chuva, no córrego Imbirussú. Esse córrego faz a divisão das cidades: Sidrolândia - Campo Grande. Nesse ponto o córrego fica a uma distância de 36 km do centro de Sidrolândia. Nesse local foi realizada uma coleta. Uma segunda coleta foi realizada a uma distância de 47 km a frente do primeiro ponto de coleta, na outra extremidade da cidade. Ambos os pontos de coleta no córrego Imbirussú possuem matas ciliares, caracterizando um córrego não assoreado, com atividades agrícolas ao redor. As amostras foram coletadas em frascos de polietileno de 1000 mL. As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,25 μm com 47mm de diâmetro da *Poretics Corporation* (USA). Depois de filtradas, as amostras foram armazenadas em geladeira e analisadas após doze horas.

4.0 – ANÁLISE DAS AMOSTRAS

As análises dos agrotóxicos nas amostras reais foram efetuadas pelo método MEFS-CG-EM/EM validado. As extrações dos analitos com a fibra foram em *vials* com volume de 4,0 mL de amostra. Foram realizadas três extrações da solução amostra para a aplicação do método.