

1- Embrapa Meio Ambiente- CP. 69 - Jaguariúna, SP, Brasil, CEP 13820-000. *E-mail: debora@cnpma.embrapa.br.

2- Universidade de São Paulo - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CP. 96, 13400-970, Piracicaba, SP, Brazil →

RESUMO. Visando à identificação e quantificação de dezenove (19) herbicidas supostamente presentes em águas da bacia do rio Corumbataí, estado de São Paulo, Brasil, por causa do uso de agrotóxicos no cultivo predominante da região, cana de açúcar, foi desenvolvido método multiresíduos para análise desses herbicidas. A detecção e separação dos compostos foi efetuada por cromatografia gasosa com detector específico de nitrogênio e fósforo (NPD) para 8 dos herbicidas, com a utilização de coluna DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm, a qual apresentou a melhor resposta dentre as utilizadas. Por cromatografia líquida com detector ultravioleta-visível (UV-VIS) os demais herbicidas, foram separados utilizando coluna Lichrosorb RP-18, 5µm x 250mm x 4,6mm. A intenção de estabelecer método único de extração de resíduos de herbicidas trouxe a vantagem da rapidez no processo e permitiu o uso de volumes adequados de amostras, assim como a utilização de dois sistemas de detecção facilitou a separação dos analitos.

ABSTRACT. Aiming at the identification and quantitation of nineteen (19) herbicides supposedly to be present in waters of the Corumbataí river basin located at São Paulo State, Brazil, due to the pesticide use in the sugarcane culture of the region, it was developed a multiresidue method for analysis of those herbicides. For 8 of the herbicides the detection and separation was accomplished by gas chromatography with specific nitrogen and phosphorus detector of (NPD), in a DB-5 column 30,0m x 0,25mm x 1,0µm, which presented the best performance amongst the used ones. The other herbicides were separated by liquid chromatography with ultraviolet-visible detector, using a Lichrosorb RP-18 column, 5µm x 250mm x 4,6mm. The intention to extract the herbicides residue in one method brought the advantage of quickness to the process and allowed the use of adequate sample volumes, as well as the use of two detection systems favored the compounds separation.

1.- Introdução

O estado de São Paulo possui mais de 190mil quilômetros quadrados plantados, entre culturas, pastagens e florestas destinadas ao aproveitamento econômico. A agricultura do interior paulista é a mais desenvolvida do Brasil e lidera a produção nacional de cana-de-açúcar (Agência, 2002). No Brasil, houve um crescimento nas vendas de herbicidas de 93% de 1991 a 2000. A principal cultura consumidora é a soja, responsável por 52,0% dos valores das vendas em

2000, seguida pelo milho (14,5%), cana de açúcar (10,9%), arroz (5,6%), algodão (4,3%), café (2,8%), feijão (1,7%), citrus (1,1%) e trigo (0,9%) (Ferreira et al., 2002). Devido ao uso intensivo desses compostos, há necessidade do monitoramento dos resíduos de herbicidas em rios e mananciais próximos às áreas de cultivo agrícola.

Recente trabalho de Armas et al. (2005) trouxe diagnóstico qualitativo e quantitativo do uso de agrotóxicos na sub-bacia do rio Corumbataí região de produção de cana-de-açúcar. Segundo os autores os herbicidas representam a classe de agrotóxicos mais empregada no cultivo da cana de açúcar, representando aproximadamente 85% do volume total de produtos consumidos de janeiro de 2000 a dezembro de 2003. Entre os mais utilizados estão atrazina, ametrina, 2,4-D, metribuzim, diurom e acetocloro sendo importante o monitoramento nos corpos hídricos. Outros herbicidas, apesar do baixo volume de uso, foram considerados pela frequência de utilização como o imazapir, ou pela toxicidade e mobilidade como sulfentrazone, trifloxissulfurom sódico, tebutiurrom e imazapique. Além desses foram diagnosticados como possivelmente presentes halossulfurom, simazina, trifluralina, pendimetalina, hexazinona, isoxaflutol e picloram.

Muitos métodos para extração de herbicidas em água utilizam a fase sólida (SPE), em cartuchos, por ser mais rápida do que a extração líquido-líquido e requerer menor quantidade de solvente. Thurman e Snaveley (2000) apresentam as vantagens do uso de discos de extração de fase sólida para análises ambientais. Os discos possuem maior superfície de contato com a amostra, aumentando assim a cinética de sorção, permitindo que sejam utilizados maiores volumes de amostra em relação aos cartuchos e que não haja perda do analito.

Destá forma este trabalho objetiva estabelecer metodologia para a extração de 19 herbicidas em água, utilizando discos de extração de fase sólida, e identificação, separação e quantificação por cromatografia gasosa (NPD) e líquida com detecção por ultravioleta.

2.- Materiais e métodos

2.1 Equipamentos e condições cromatográficas

O método de detecção e separação dos analitos simazina, pendimetalina, isoxaflutol, trifluralina, acetocloro, ametrina, atrazina e clomazona foi efetuado em um cromatógrafo gasoso HP 6890, com detector NPD. Testaram-se as seguintes colunas: J & W Scientific DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm; J & W Scientific DB-1 30,0m x 0,32mm x 1,0µm; DB-608 30,0m x 0,32mm x 0,5µm e CP-Sil 8 CB 50m x 0,32mm x 1,2µm da Varian, sob fluxo

constante de 2,0 mL min⁻¹, injetor splitless, gás hélio como gás de arraste e rampa de temperatura.

Para os herbicidas imazapir, imazapique, picloram, tebutiurum, 2,4-D, metribuzim, diurom, halossulfurom-metílico, trifloxissulfurom sódico, hexazinona e sulfentrazona a separação foi por cromatografia líquida com detector UV-VIS da Shimadzu SPD-10AV. Testaram-se as colunas da Varian Organic Acids com fase móvel H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹ e Supelco Lichrosorb RP-18, 5µm, 250mm x 4,6mm. A fase móvel foi acetonitrila e ácido acético 0,15%, com modificações no gradiente de modo a se obter as melhores separações. Os comprimentos de onda de absorção foram de 230nm para o 2,4-D e os demais foram de 254nm.

2.2 Reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau PR ou HPLC (diclorometano, acetonitrila, metanol, acetato de etila, tolueno, ácido acético, ácido clorídrico). Os padrões de herbicidas utilizados foram: simazina 97,96% (Milenia Agro), imazapir 99,6%, imazapique 99,3%, pendimetalina 99,2% (BASF Corporation), picloram 99,4%, tebutiurum 99,6%, hexazinona 99,9% (Dow Elanco), 2,4-D 99,5%, metribuzim 99%, diurom 97,5%, isoxaflutol 98,5%, trifluralina 99,5% (Dr Ehrenstorfer), halossulfurom metílico 99,5%, acetocloro 99,9% (Monsanto), trifloxissulfurom sódico 95%, ametrina 98,3% (Syngenta), atrazina 98% (Chem Service), clomazona 99,6% e sulfentrazona grau técnico 91,93% (FMC Química do Brasil).

Os padrões dos herbicidas foram diluídos nas concentrações desejadas para a construção das curvas de calibração. As diluições foram feitas em tolueno para detecção por cromatografia gasosa e acetonitrila/água (40/60) para herbicidas detectados no sistema de cromatografia líquida.

2.3 Amostras

Para a extração dos herbicidas em água utilizaram-se discos laminares de extração, speedisk® octyl (C8 p/n 8057-06) e H₂O-fóbico divinilbenzeno (DVB 8068-06) da J.T.Baker conectados a estações coletoras J.T.Baker (p/n 8093-01) adaptadores do speedisk®.

Realizou-se a fortificação com os herbicidas na concentração de 0,001µg mL⁻¹ em água de torneira. O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 3 mol L⁻¹.

2.4 Procedimento

Adaptaram-se os discos de extração em erlenmeyer para realizar o condicionamento com 10mL de acetato de etila para o C₈ e diclorometano para DVB. Após secagem dos discos, foram adicionados 10mL de metanol PR e 2 vezes (10mL) de ácido clorídrico (pH 2,0).

Foram passados pelos discos de extração 500mL de amostra de água. Os discos foram secos aplicando-se vácuo.

O disco de extração foi retirado do erlenmeyer e conectado à estação coletora. Adicionaram-se 2x (10mL) de acetato de etila, solvente de eluição para o disco C₈ e 2x (10mL) de diclorometano para o de DVB. Antes de aplicar vácuo, deixou-se os solventes em contato com os discos por no mínimo 2min aplicando-se em seguida vácuo a uma pressão de 5-10 cm Hg. Recolheu-se os eluatos em tubos do tipo Nessler e levou-se para evaporação a 35°C sob fluxo de nitrogênio. Evaporou-se até aproximadamente 4mL transferindo-se para tubo concentrador de 5mL, evaporando até o volume de 2mL. Com pipeta transferiu-se o volume de 1mL para outro tubo concentrador de 5mL. As amostras foram retomadas em tolueno para injeção no cromatógrafo gasoso e o outro tubo em acetonitrila/água (40/60) para injeções no HPLC.

Para verificar se os analitos ficariam retidos nos discos, a amostra de 500mL passada no disco de C₈ foi posteriormente passada pelo disco DVB, seguindo-se o procedimento acima descrito.

3.- Resultados e discussão

Para determinar as condições cromatográficas, soluções padrão dos compostos foram injetadas em cromatógrafo líquido com detector UV-VIS, em coluna Organic Acids da Varian, com fase móvel 0,005mol L⁻¹ de H₂SO₄. Não houve detecção dos picos dos herbicidas 2,4-D, picloram, imazapir e imazapique.

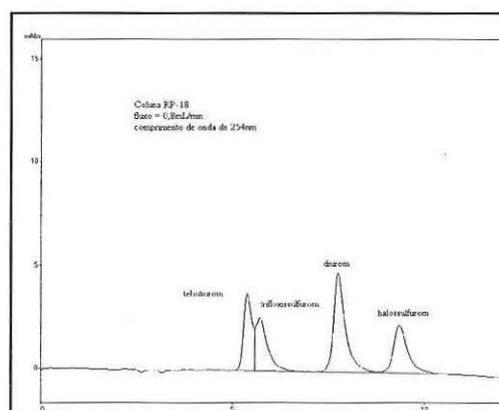


Figura 1. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas tebutiurum, trifloxissulfurom, diurom e halossulfurom.

A coluna Supelco Lichrosorb RP-18, 5µm x 250mm x 4,6mm com fase móvel acetonitrila 100% (solvente A) e ácido acético 0,15% (solvente B) foi testada, com fluxo de 0,8mL min⁻¹. A composição inicial da fase móvel, nos primeiros 5 minutos de corrida foi de 40% de solvente B, sendo feita a programação linear para 80% deste solvente entre 5 e 20 minutos, e mantida esta concentração por 10min. O cromatograma apresentou os picos de trifloxissulfurom e tebutiurum sem boa resolução como mostrado na Figura 1.

Modificação na composição da fase móvel foi utilizada

visando separação dos picos dos herbicidas. A composição durante os primeiros 5 minutos foi de 60% de solvente B, programada linearmente para 20% deste solvente entre 5 e 20 minutos de corrida, mantida por 10min e nova programação linear para 60% do solvente B de 30 a 37 minutos de corrida. As Figs. 2 e 3 mostram os cromatogramas obtidos com as melhores separações dos picos. O 2,4-D foi detectado em comprimento de onda de 230nm não absorvendo em 254nm como os demais herbicidas (Fig. 3).

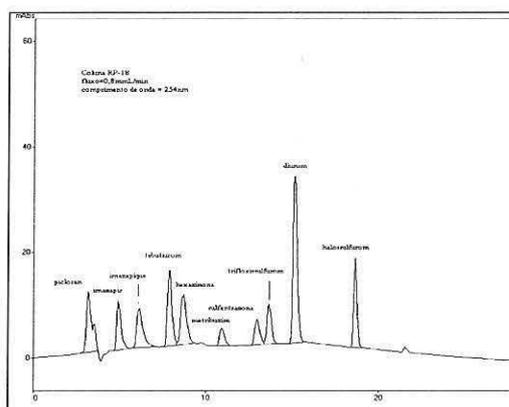


Figura 2. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas picloram, imazapir, imazapique, tebutiurum, hexazinona, metribuzim, sulfentrazone, trifloxissulfurom, diurom e halossulfurom, em comprimento de onda de 254nm.

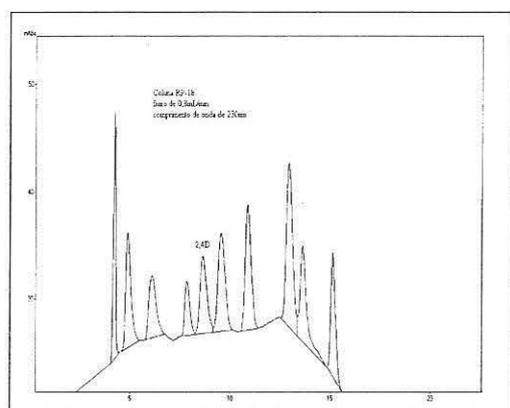


Figura 3. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas para detecção do herbicida 2,4-D, em comprimento de onda de 230nm.

Os tempos de retenção obtidos na melhor condição encontrada estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Tempos de retenção dos herbicidas detectados no sistema de cromatografia líquida com detector UV-VIS.

Herbicida	Tempo de retenção (minutos)
picloram	3.1
imazapir	4.7
imazapique	6.1
tebutiurum	7.8
hexazinona	8.6
2,4-D	9.5
metribuzim	10.9
sulfentrazone	12.9
trifloxissulfurom	13.6
diurom	15.1
halossulfurom	18.6

Os demais herbicidas, oito, foram detectados por cromatografia gasosa com detector específico de nitrogênio e fósforo. Foram testadas diferentes colunas e rampas de temperatura. O uso da coluna capilar DB-1 30,0m x 0,32mm x 1,0µm mostrou baixa resolução dos picos da ametrina e acetocloro como evidenciado no cromatograma da Fig. 4.

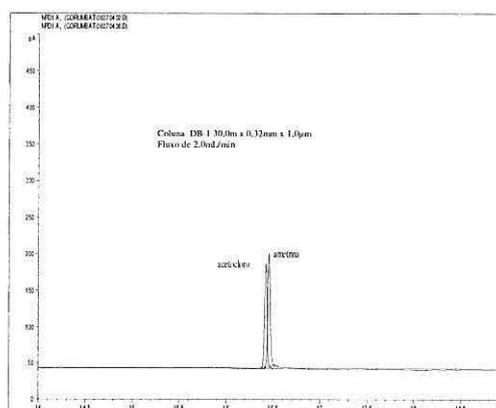


Figura 4. Cromatograma dos padrões dos herbicidas acetocloro e ametrina utilizando coluna capilar DB-1.

A coluna CP-Sil 8 CB 50m x 0,32mm x 1,2µm (Fig. 5) apresentou diferenças nos tempos de retenção do acetocloro e ametrina de apenas 0,06 segundos, o que não permite uma boa identificação, pois qualquer alteração no equipamento poderá mascarar resultados.

Já a coluna HP-608 30,0m x 0,53mm x 0,5µm separou os picos da simazina e atrazina (diferença de $t_r = 0,17$ min), porém, englobou os picos da clomazona e atrazina (Fig. 6). Desta forma, nova coluna foi testada.

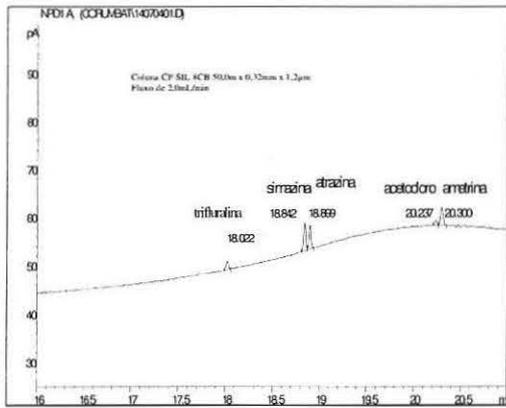


Figura 5. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas trifluralina, simazina, atrazina, acetocloro e ametrina utilizando coluna capilar CP-SIL 8CB 50,0m x 0,32mm x 1,2µm.

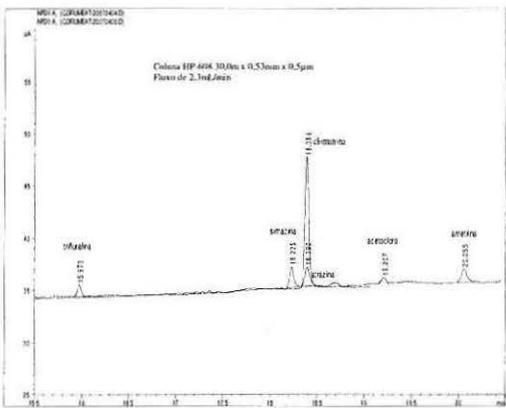


Figura 6. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas trifluralina, simazina, clomazona, atrazina, acetocloro e ametrina utilizando coluna capilar HP608 30,0m x 0,53mm x 1,0µm.

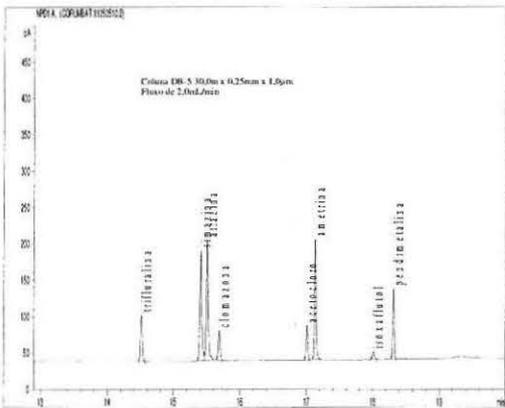


Figura 7. Cromatograma da solução padrão dos herbicidas trifluralina, atrazina, simazina, clomazona, acetocloro, ametrina, isoxaflutol e pendimetalina utilizando-se coluna capilar DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm.

A coluna DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm com fluxo de 2,0 mL min⁻¹, apresentou diferença de tempo de retenção para simazina e atrazina de 0,1s, menor do que o tempo de 0,17s da coluna DB-1 mas, clomazona e atrazina com boa resolução. Dessa forma, optou-se pela coluna DB-5 por ter sido a que melhor resolveu os picos de interesse deste trabalho (Fig. 7).

Os tempos de retenção obtidos na melhor condição encontrada estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Tempos de retenção dos herbicidas detectados no sistema de cromatografia gasosa com detector NPD e coluna cromatográfica DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm da J & W Scientific.

Herbicida	Tempo de retenção (minutos)
trifluralina	14,5
simazina	15,4
atrazina	15,5
clomazona	15,7
acetocloro	17,0
ametrina	17,1
isoxaflutol	18,0
pendimetalina	18,3

Estabelecido o sistema de detecção dos analitos, testou-se a extração e recuperação dos herbicidas de interesse utilizando-se amostras de água de torneira, fortificadas no nível de 0,001µg mL⁻¹.

Tabela 3. Recuperações obtidas para os herbicidas extraídos de amostras de água de torneira fortificadas a 0,001µg mL⁻¹ em diferentes discos de extração

Herbicidas	Disco/eluição		
	C ₈ / acetato de etila Rec %	DVB/ dcm Rec %	C ₈ */acetato etila DVB/dcm Rec %
tebutiurum	91,7	91,1	0
hexazinona	71,3	77,5	0
metribuzim	139,5	160,8	0
sulfentrazona	113,4	110,1	0
trifloxissulfurom	91,6	49,3	0
diurom	102,7	87,2	0
halossulfurom	101,2	36,84	0
picloram	0	98,15	64,7
2,4-D	82,2	95,7	0
imazapir	36,6	14,7	44,9
imazapique	100,9	95,2	93,3
trifluralina	58,8	57,8	0
simazina	99,3	82,7	0
atrazina	97,2	84,4	0
clomazona	83,5	76,2	0
acetocloro	90,9	87,9	0
ametrina	86,1	44,8	0
pendimetalina	89,0	79,7	0
isoxaflutol	152,2	99,9	0

*amostra inicialmente passada em disco C₈.

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 3, para os diferentes tipos de discos de extração utilizados. As recuperações mostraram que o uso de disco C₈, eluído com acetato de etila apresenta boa recuperação, sendo esta

acima de 50% excetuando-se o picloram (0%) e o imazapir (36,6%). O picloram é recuperado no disco de DVB com diluição por diclorometano (98%). Já o imazapir teve como recuperação total 81,5% (36,6% retidos no disco C₈ e 44,9% retido no disco DVB) Observa-se pela Tabela III que houve alguma falha na determinação do imazapir, pois se ficou 100,9% retido em C₈, não poderia ter recuperação de 93,3% quando a amostra foi passada pelos 2 discos. Pode ter havido alguma contaminação e esta está sendo investigada. O disco de DVB com eluição por diclorometano apresenta recuperação abaixo de 50% para quatro herbicidas, mas estes, com exceção do imazapir, são extraídos em C₈. No caso da mesma amostra, quando passada em disco C₈ e disco DVB pode-se verificar quais herbicidas ficaram retidos em disco C₈.

O método com uso do disco C₈ seguido pelo disco DVB, respectivamente com eluição por acetato de etila e diclorometano, parece funcionar para a maioria dos analitos de interesse deste trabalho. A fortificação e subsequente análise devem ser rápidas, visto que há herbicidas, como o metribuzim que, sofrem rápida decomposição em água e herbicidas como picloram, trifluralina, ametrina que são decompostos por irradiação UV.

4.- Conclusão

A grande vantagem desta metodologia é ser um procedimento simples e rápido. O uso da cromatografia gasosa com detector NPD utilizando coluna capilar DB-5 30,0m x 0,25mm x 1,0µm e a cromatografia líquida com o uso de coluna Lichrosorb RP-18, 5µm, 250mm x 4,6mm em condições de gradiente permitiram o estabelecimento do método de detecção para 19 herbicidas diagnosticados como possivelmente presentes em águas do rio Corumbataí. O processo de extração utilizando discos de extração do tipo speedisk® C₈ seguido por divinilbenzeno (DVB) apresentou os melhores resultados de recuperações para a maioria dos herbicidas. Esta metodologia será validada nos dois sistemas de detecção utilizados no trabalho.

Agradecimentos. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo 01/02954-4.

Bibliografia

- Agência Interior: Número um do Brasil. Disponível: <<http://www.aginterior.com.br/agricultura.php>> Consultado em: 10 fev.2003.
- Armas, Eduardo Dutra; Monteiro, Regina Teresa Rosim; y Amâncio, Armando Valler; Correa, Rui Marcos Lopes; Guercio, Miguel Antonio. *Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica.* Química Nova, Aceito para publicação em 08 de março de 2005. (Manuscrito QN236/04)
- Ferreira, C.R.R.P.T.; Silva, J.R.; y Assumpção, R. *Distribuição territorial das vendas de herbicidas no Brasil, 1991-2000.* Informações Econômicas, v.32, n.6, 2002.
- The Pesticide Manual, 2000, twelfth editions.
- Thurman, E.M y Snaveley, K; *Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry, trends in analytical chemistry* vol. 19, nº 1, 2000. pg 18