

# Determinação de resíduos de herbicidas em águas de lavoura de arroz irrigado empregando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos

Fábio Ferreira Gonçalves, Fábio da Silva de Matos, Renato Zanella\*

*Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas, Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Cep 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil  
e-mail: larp\_rz@yahoo.com.br*

## Resumo

Os herbicidas aplicados nas lavouras são, em geral, persistentes e podem poluir os mananciais hídricos. Portanto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento e a validação de um método para a determinação de resíduos dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir em água de lavoura de arroz irrigado. O método envolve o preparo de amostra empregando Extração em Fase Sólida, para permitir um fator de concentração adequado, e a quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de Diodos. Após otimização dos parâmetros de extração e análise, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão. Os resultados mostraram excelente linearidade para todos os compostos ( $r^2 > 0,99$ ) na faixa entre o limite de quantificação e  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ . O método apresentou recuperações entre 81% e 107%, com RSD  $< 9\%$ , e foi aplicado na determinação de resíduos dos herbicidas em água de lavoura irrigada, com limites de quantificação (LOQ) de  $0,12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para imazapique e imazetapir, e de  $0,25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para clomazona.

## Palavras-chave

Agrotóxicos; água de superfície; SPE; HPLC-DAD.

## Determination of herbicide residues in rice paddy water by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection

## Abstract

The herbicides used on crops are generally persistent and can pollute water supplies. Therefore, this study aimed to develop and validate a method for the determination of residues of the herbicides clomazone, imazethapyr and imazapic in rice paddy water. The method involves sample preparation using Solid Phase Extraction, to allow an appropriate concentration factor, and quantification by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. After optimization of the extraction and analysis parameters, the method was validated by evaluating analytical curve, linearity, limits of detection and

quantification, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy. The results showed excellent linearity for all compounds ( $r^2 > 0.99$ ) in the range between the limit of quantification and  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$ . The method showed recoveries between 81 and 107%, with  $\text{RSD} < 9\%$ , and was applied for the determination of residues of herbicides in rice paddy water with limits of quantification (LOQ) of  $0.12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for imazapic and imazethapyr, and of  $0.25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for clomazone.

### Keywords

Pesticides; surface water; SPE; HPLC-DAD.

## 1 Introdução

A determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras ambientais tem atraído a atenção de pesquisadores devido ao amplo uso de tais compostos, bem como seu impacto ambiental<sup>[1]</sup>. O uso intensivo de agrotóxicos pode levar à sua retenção nas culturas e no solo e, assim, principalmente por escoamento ou lixiviação, eles podem atingir as águas superficiais e subterrâneas<sup>[2]</sup>. As concentrações baixas de agrotóxicos permitidas pela legislação fazem com que aumente a busca por limites de quantificação cada vez menores, com o desenvolvimento de métodos de extração cada vez mais sensíveis<sup>[3]</sup>.

O preparo de amostra é fundamental para o desenvolvimento de um método analítico. A Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction, SPE) tem se tornado uma das técnicas de concentração e limpeza de extratos mais empregada em métodos analíticos, principalmente no preparo de amostras de água visando a determinação de compostos orgânicos<sup>[4]</sup>. A SPE apresenta as vantagens de baixo consumo de solvente, altos fatores de concentração e boas recuperações. Apesar de ser a técnica mais empregada para compostos com ampla faixa de polaridade em amostras aquosas<sup>[5-8]</sup>, Pichon et al.<sup>[9]</sup> descreveram a dificuldade de trabalhar com analitos que apresentam polaridades muito diferentes, principalmente em relação à eluição e fortes retenções.

Segundo Caldas et al.<sup>[10]</sup>, os sorventes mais usados na SPE para extração de agrotóxicos em água são: C18, usado na extração de herbicidas<sup>[11,12]</sup>, inseticidas<sup>[13,14]</sup> e para diversas classes químicas<sup>[15,16]</sup>, bem como os sorventes poliméricos que são empregados para diferentes classes de agrotóxicos<sup>[17,18]</sup>. Uma das principais vantagens da SPE é a vasta gama de sorventes disponíveis, que abrange uma ampla gama de propriedades de analitos, inclusive analitos polares e apolares<sup>[19,20]</sup>.

Os agrotóxicos retidos nos cartuchos de SPE são eluídos com um pequeno volume de solvente adequado para a análise. É importante a escolha do solvente de eluição, pois ele deve eluir os analitos e minimizar a eluição de interferentes, principalmente de moléculas com alta massa molar, que podem afetar a análise cromatográfica. A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está diretamente relacionada com a polaridade do agrotóxico e do sorvente escolhido<sup>[10]</sup>.

O aumento do uso de agrotóxicos de caráter mais polar, considerados mais facilmente degradáveis, influencia nas técnicas de determinação que podem ser empregadas. Esses compostos, bem como seus metabólitos, dificilmente podem ser determinados por Cromatografia Gasosa (Gas Chromatography, GC) sem uma etapa de derivatização<sup>[3]</sup>, demandando o desenvolvimento de métodos que utilizam a Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)<sup>[21-23]</sup>. Publicações recentes destacam a tendência de se utilizarem técnicas sofisticadas como Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa acopladas a Espectrometria de Massas na determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes ambientais<sup>[24,25]</sup>. No entanto, métodos que utilizam HPLC com detecção por arranjo de diodos (Diode Array Detection, DAD) ainda são empregados, principalmente para a análise de herbicidas mais polares, pois não demandam um elevado investimento em instrumentação<sup>[23,26-29]</sup>.

Herbicidas do grupo das imidazolinonas, com amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo e na água<sup>[30]</sup>, tais como imazapique e imazetapir, são empregados em larga escala na agricultura pela sua eficiência, mesmo em baixas doses de aplicação. Apesar de sua baixa toxicidade para mamíferos e outros animais, para muitos herbicidas desse grupo, uma concentração de 0,1 µg L<sup>-1</sup> em água tem sido considerada como tóxica para plantas não alvo<sup>[31]</sup>. O herbicida clomazona pertence ao grupo das isoxazolidinonas e é muito utilizado na cultura do arroz irrigado. De aplicação pré-emergente, esse herbicida também é bastante utilizado no Brasil para culturas de soja, cana-de-açúcar, fumo e algodão.

O herbicida clomazone, 2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona, é altamente solúvel em água (1.100 mg L<sup>-1</sup>) e seu tempo de meia-vida em estudos de campo em diversos tipos de solo variou de 4 a 12 semanas<sup>[32]</sup>. Consequentemente, as propriedades físico-químicas da clomazona apontam-na como uma potencial poluidora do meio ambiente aquático e de águas subterrâneas<sup>[33]</sup>. A clomazona foi detectada na maioria das amostras de água de rio coletadas nas regiões produtoras de arroz irrigado do sul do Brasil<sup>[12]</sup>.

Os herbicidas imazapique, ácido 2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il]-5-metil nicotínico, e imazetapir, ácido 5-etil-2-[(RS)-4-isopropil-4-metil-5-oxo-2-imidazolin-2-il]nicotínico, pertencem ao grupo das imidazolinonas aplicados, em alguns casos, em formulações contendo a mistura dos dois compostos. No Brasil, o herbicida imazapique tem uso autorizado para as culturas arroz, cana-de-açúcar, amendoim e milho e o imazetapir, para arroz, feijão e soja. Imazapique e imazetapir são altamente solúveis em água, com 2.200 e 1.400 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente<sup>[30]</sup>. Os valores da constante de dissociação ácida (pKa) para imazapique são 2,0 e 3,6 e para imazetapir são 2,1 e 3,9, indicando que os dois são herbicidas ácidos<sup>[30]</sup>.

Estudo desenvolvido por Santos et al.<sup>[34]</sup> demonstrou que o período de detecção dos herbicidas na água de irrigação foi mais longo para imazetapir que para clomazona. A meia-vida do imazetapir na água variou conforme a dosagem aplicada, com valores entre 1,6 e 6,2 dias, e para clomazona foi de cinco dias. Os herbicidas clomazona, imazetapir e imazapique dissolvidos em água apresentam alto potencial de contaminação de águas superficiais pelo transporte. Os três herbicidas avaliados apresentam risco potencial de contaminação de águas subterrâneas, tanto avaliando-se pelos critérios do EPA como pelo método de GUS<sup>[35]</sup>.

A Figura 1 apresenta as estruturas dos herbicidas estudados, onde se destaca o grupamento carboxílico do grupo das imidazolinonas.

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para a determinação de resíduos dos herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir em água de lavoura irrigada, uma vez que são amplamente utilizados no cultivo do arroz irrigado e possuem considerável persistência no meio ambiente. Para o preparo de amostra avaliaram-se a eficiência dos sorventes a base de sílica

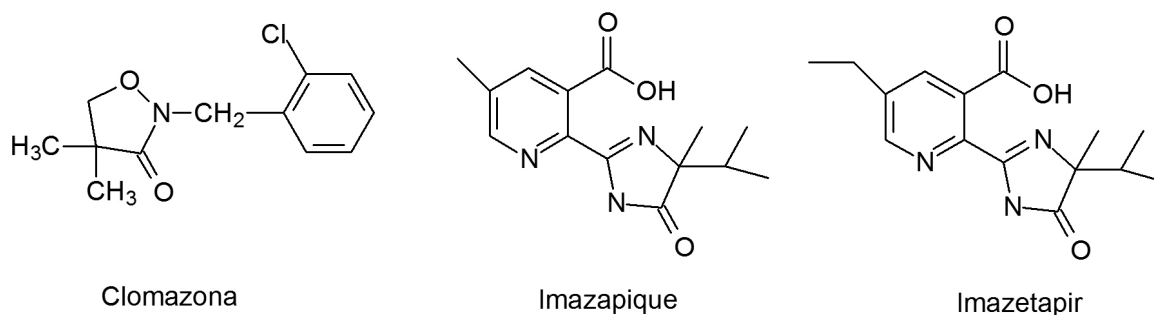


Figura 1 Estruturas dos herbicidas estudados.

modificada com C18 e a eficiência do sorvente polimérico. A análise por HPLC-DAD permitiu a confirmação da presença e a quantificação, pelo espectro de absorção molecular, dos agrotóxicos estudados, com boa resposta e baixo custo.

## 2 Experimental

### 2.1 Reagentes e materiais

Foram utilizados padrões dos herbicidas clomazona, imazetapir e imazapique com 93,0, 98,0 e 99,0% de pureza, respectivamente, obtidos da firma Dr. Ehrenstorfer (Alemanha). A solução estoque, na concentração de  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ , foi preparada em acetonitrila e mantida a  $-16^\circ\text{C}$ . As soluções analíticas foram preparadas por diluição da solução estoque em acetonitrila.

Foram utilizados como solventes acetonitrila e metanol, grau HPLC, bem como diclorometano, grau resíduos de pesticidas (Mallinckrodt, EUA), água purificada em sistema Direct-Q UV3<sup>®</sup> da Millipore (EUA) e ácido fosfórico grau analítico 85% (Merck, Brasil).

Os sorventes avaliados em SPE em cartucho foram: Strata C18-E (sorvente à base de octadecilsilano),  $500 \text{ mg/3 mL}$  e tamanho médio das partículas de  $55 \mu\text{m}$ , e Strata-X (sorvente polimérico à base de estireno-divinilbenzeno com

superfície modificada),  $200 \text{ mg/3 mL}$  e tamanho médio das partículas de  $33 \mu\text{m}$ , ambos adquiridos da Phenomenex (EUA).

### 2.2 Instrumentação e análise cromatográfica

Cromatógrafo a líquido Varian (EUA), composto por bomba modelo ProStar 210 e detector por arranjo de diodos ProStar 335, sistema de aquisição de dados Star Workstation 6.0, coluna analítica Synergi  $4 \mu\text{ Fusion RP-80}$  ( $250 \times 4,6 \text{ mm}$ , d.i.;  $4 \mu\text{m}$ ) e coluna de guarda do mesmo material ( $4 \times 3 \text{ mm}$ ), ambas da firma Phenomenex (EUA). A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila: água (60: 40, v/v), pH 3,0 ajustada com ácido fosfórico, na vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . Foi utilizado um volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$  e a detecção foi efetuada em  $220 \text{ nm}$  para clomazona e  $254 \text{ nm}$  para imazetapir e imazapique. Os espectros de absorção molecular foram adquiridos entre  $200 \text{ nm}$  e  $350 \text{ nm}$ .

### 2.3 Avaliação das condições para o preparo de amostra por SPE

Na etapa de SPE empregou-se um sistema *manifold* com capacidade para 12 cartuchos (Phenomenex, EUA) e uma bomba de vácuo modelo TE-058 (Tecnal, Brasil). Foram realiza-

das as seguintes etapas na SPE: (i) condicionamento; (ii) percolação da amostra na vazão de cerca de  $5 \text{ mL min}^{-1}$  e (iii) eluição.

O procedimento de extração foi otimizado em termos do cartucho de extração, pH e volume da amostra e do solvente de eluição, empregando amostras branco fortificadas com os herbicidas em estudo. Foram avaliados os sorventes Strata C18 e o sorvente polimérico Strata-X, contendo 500 mg e 200 mg, respectivamente. O volume de amostra foi escolhido em função do volume de *breakthrough*, o qual ocorre quando os agrotóxicos não são fortemente retidos pelo sorvente ou quando a capacidade do sorvente é excedida. Foram estudados volumes de amostra entre 50 mL e 500 mL, com massa dos analitos constante. Considerando que os herbicidas imazetapir e imazapique podem se ionizar e, assim, afetar a retenção nos sorventes, foram avaliados os valores de pH da amostra ajustados em 2,0 e 3,0, bem como sem correção de pH (6,0).

Foi analisada uma amostra de água de lavoura irrigada que não apresentou nenhum interferente no tempo de retenção dos compostos de interesse. Essa amostra foi usada para realizar as fortificações necessárias para avaliar a recuperação do método.

## 2.4 Procedimento de extração SPE otimizado

Os cartuchos de extração em fase sólida foram primeiramente condicionados com 3 mL de metanol, 3 mL de água purificada para retirar o excesso de metanol e 3 mL de água purificada pH 2,0. Um volume de 100 mL de água de superfície branco, com pH ajustado em 2,0, fortificada com os analitos de interesse, foi percolada através do cartucho, em sistema *manifold*, a uma vazão de aproximadamente  $5 \text{ mL min}^{-1}$ , com auxílio de vácuo. Após a etapa de concentração, 3 mL de água purificada foram percolados e o cartucho

foi seco pela aplicação de vácuo por 15 min. Na sequência foi efetuada a eluição dos analitos retidos no cartucho, utilizando-se duas alíquotas de 1,0 mL da mistura diclorometano: metanol (65:35, v/v), com tempo de interação de 1 min após cada alíquota. Para injeção no sistema HPLC-DAD, o solvente foi evaporado com o auxílio de nitrogênio e o residual redissolvido em 500  $\mu\text{L}$  da fase móvel, resultando em um fator de concentração de 200 vezes.

## 2.5 Validação do método

A garantia de métodos analíticos confiáveis é cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que o método proposto gere informações com qualidade, ele foi submetido a um procedimento de validação. Definidas as melhores condições para análise dos herbicidas, foi efetuada a validação do método segundo os parâmetros descritos a seguir:

- *Linearidade e curva analítica*: A linearidade do método foi observada pela equação da regressão linear ( $y = ax + b$ ), sendo considerado como evidência de um ajuste ideal um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) maior que 0,99. A curva analítica foi obtida pela análise em triplicata de soluções analíticas contendo a mistura dos herbicidas numa faixa de concentração de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ , para imazapique e imazetapir, e de  $0,04 \text{ mg L}^{-1}$  a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  para clomazona.
- *Limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)*: Os limites foram estabelecidos considerando-se LOD e LOQ como sendo a concentração que produz uma relação sinal-ruído correspondentes a 3 e 10 vezes, respectivamente<sup>[36]</sup>.
- *Exatidão (recuperação)*: A exatidão foi avaliada pela realização de ensaios de recuperação<sup>[37]</sup>, aplicando-se o método proposto em amostras branco fortificadas, em triplicata e em três diferentes níveis de forti-

ficação, correspondendo a 1, 5 e 10 vezes o limite de quantificação do método. Foram consideradas aceitáveis recuperações entre 70% e 120%<sup>[38]</sup>.

- *Precisão (repetitividade e precisão intermediária)*: A precisão do método, em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ), foi efetuada no mesmo dia, pelo mesmo operador e com extração em triplicata das amostras fortificadas – cada extrato foi analisado três vezes. Para avaliar a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) do método, utilizaram-se dias e operadores diferentes para a análise.

## 2.6 Aplicabilidade do método

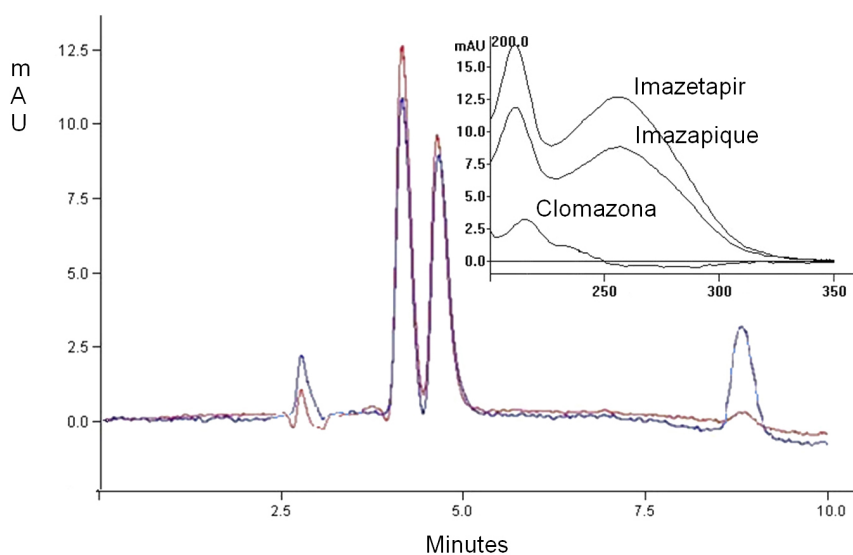
O método desenvolvido e validado foi aplicado para a determinação de resíduos dos herbicidas imazetapir, imazapique e clomazona em amostras de água de rios e lagos, além de estudos de dissipação em água de lavouras de arroz irrigado. A aplicação do método em diferentes águas visa avaliar a eficiência do método e a ocorrência de interferentes. As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em temperatura entre 1 °C e 4 °C, ao abrigo da luz.

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Análise cromatográfica por HPLC-DAD

Os cromatogramas da Figura 2, obtidos por HPLC-DAD de uma mistura dos três herbicidas na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram uma boa separação entre os herbicidas em estudo. A Figura 2 apresenta também os espectros de absorção molecular entre 200 nm e 350 nm obtidos por HPLC-DAD para os herbicidas em estudo. Esses espectros foram utilizados para obter-se o comprimento de onda máximo de absorção de cada herbicida, nas condições da separação cromatográfica, e para confirmar a identidade dos picos, através da comparação dos espectros obtidos para os padrões e amostras.

O comprimento de onda para a detecção de clomazona foi selecionado no máximo de absorção (220 nm). Para imazetapir e imazapique o máximo de absorção ocorre em 212 nm, entretanto, para a quantificação desses herbicidas, optou-se pelo comprimento de onda de segunda



**Figura 2** Cromatogramas de uma solução analítica contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de imazapique ( $t_R$  4,3 min), imazetapir ( $t_R$  4,7 min) e clomazona ( $t_R$  8,6 min), obtidos em 220 nm (linha azul) e 254 nm (linha vermelha), com os respectivos espectros de absorção na região entre 200 nm e 350 nm.

absorção máxima (245 nm), que minimiza o risco de interferentes da matriz e apresenta uma boa resposta para esses compostos.

O HPLC-DAD confirmou ser uma boa opção para a análise dos herbicidas em água, permitindo a análise com boa detectabilidade em 10 min.

### 3.2 Otimização do procedimento SPE

Os resultados de recuperação obtidos com os dois cartuchos avaliados e com três diferentes solventes de eluição estão apresentados na Tabela 1.

Tanto o sorvente C18 quanto a fase polimérica proporcionaram recuperações para os herbicidas clomazona, imazapique e imazetapir dentro da faixa de 70% a 120%, resultados que estão em concordância com os obtidos por Vigna et al.<sup>[39]</sup> empregando cartuchos C18 e poliméricos para extração desses agrotóxicos. Entre os materiais de extração testados, o sorvente apolar (Strata C18) ofereceu forte retenção hidrofóbica com interações polares nos grupos silanóis remanescentes, já o sorvente polimérico (Strata-X) é um material funcionalizado com N-vinilpirrolidona, que oferece vários modos de retenção, com interações  $\pi$ - $\pi$ , ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e hidrofóbicas. Assim, ambos sorventes podem ser aplicados para os herbicidas selecio-

nados, desde que a ionização dos herbicidas imidazolinonas seja suprimida. Considerando que o sorvente C18 é mais frequentemente empregado e é um sorvente que possui um custo mais baixo que os poliméricos, esse foi o escolhido para o preparo das amostras dos herbicidas em água.

Quanto ao solvente de eluição, as misturas de diclorometano: metanol (80: 20, v/v) e diclorometano: acetonitrila (50: 50, v/v) proporcionaram bons resultados. No entanto, percentuais de recuperação mais próximos de 100% foram obtidos com a mistura de diclorometano: metanol 65: 35 (v/v), a qual foi escolhida para a eluição dos analitos. Metanol e acetonitrila, sem diclorometano, também foram testados, mas não proporcionaram boas recuperações para imazetapir e imazapique. A adição de diclorometano aumenta a solubilidade dos analitos e favorece a eluição dos analitos.

Definidos o sorvente e o solvente de eluição, foi testado o volume de solvente necessário para a eluição dos herbicidas. Os resultados estão na Tabela 2.

A eluição com  $2 \times 1$  mL da mistura diclorometano: metanol (65: 35, v/v) foi a que proporcionou melhores resultados. Esse volume foi posteriormente evaporado e o extrato foi redis-

**Tabela 1** Recuperações obtidas com diferentes sorventes e solventes de eluição.

Herbicidas	Recuperação (%)*					
	Strata C18			Strata-X		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Imazapique	93 ± 2	74 ± 2	75 ± 2	106 ± 9	82 ± 2	78 ± 2
Imazetapir	83 ± 3	66 ± 4	88 ± 10	89 ± 1	46 ± 4	74 ± 2
Clomazona	86 ± 3	70 ± 2	71 ± 2	94 ± 3	72 ± 1	58 ± 8

\*100 mL de amostra branco (pH 2,0) fortificada com os herbicidas em  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , volume de eluição 2 mL, evaporação com auxílio de  $\text{N}_2$  e redissolução em 500  $\mu\text{L}$  de fase móvel; S1 = diclorometano: metanol (65: 35, v/v); S2 = diclorometano: metanol (80: 20, v/v); S3 = diclorometano: acetonitrila (50: 50, v/v).

**Tabela 2** Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição diclorometano: metanol, 65: 35 (v/v) e sorvente Strata C18.

Herbicidas	Recuperação (%)*	
	1 mL	2 mL
Imazapique	67 ± 10	93 ± 2
Imzetapir	72 ± 9	83 ± 3
Clomazona	112 ± 8	86 ± 3

\*Fortificação: 5 µg L<sup>-1</sup>; 100 mL de amostras de água branco; pH 2,0.

solvido em 500 µL de fase móvel, para que o volume final fosse exato e para aumentar o fator de concentração.

Os resultados para os testes empregando diferentes valores para o pH da amostra (2,0, 3,0 e 6,0) estão na Tabela 3.

Os herbicidas do grupo das imidazolinonas são normalmente determinados em amostras com valores de pH entre 2,0 e 3,0<sup>[39,40]</sup>. Nessa faixa de pH, os compostos ácidos passam a ter maior interação com o sorvente, entretanto podem surgir nos cromatogramas picos interferentes devido aos ácidos húmicos e fúlvicos. Com pH ajustado em 3,0 e amostra sem correção de pH foram obtidas recuperações entre 72% e 98%. No entanto, como os herbicidas imidazolinonas estudados apresentam valores de pKa baixos, os melhores resultados foram obtidos com pH 2,0, sendo esse o valor escolhido para a validação e aplicação do método.

A Tabela 4 apresenta os resultados de recuperação obtidos em função de diferentes volumes de amostra empregando uma massa constante dos analitos.

Para imzetapir e imazapique ocorreu diminuição significativa na recuperação com o aumento do volume da amostra acima de 150 mL, sendo que a partir de 200 mL as recuperações ficaram abaixo dos valores aceitáveis. Para

**Tabela 3** Recuperações obtidas para os herbicidas empregando-se diferentes valores de pH da amostra.

Herbicidas	Recuperação (%)*		
	pH 2,0	pH 3,0	pH 6,0
Imazapique	100 ± 4	71 ± 8	72 ± 10
Imzetapir	90 ± 6	75 ± 6	81 ± 7
Clomazona	96 ± 3	97 ± 10	99 ± 10

\*Fortificação: 5 µg L<sup>-1</sup>; 100 mL de amostra de água branco; pH 2,0.

**Tabela 4** Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes de amostra.

Volume (mL)	Recuperação (%)*		
	Imazapique	Imzetapir	Clomazona
50	101 ± 8	105 ± 11	109 ± 5
100	93 ± 2	83 ± 9	99 ± 2
150	82 ± 2	70 ± 3	93 ± 2
200	61 ± 1	63 ± 4	101 ± 4
250	55 ± 1	61 ± 4	106 ± 3
300	40 ± 5	51 ± 6	103 ± 1
500	33 ± 5	43 ± 2	72 ± 2

\*Massa de cada herbicida: 0,1 µg; amostra branco (pH 2,0); eluição com 2 mL da mistura DCM: MeOH (65: 35, v/v), evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de fase móvel.

clomazona, a diminuição na recuperação ocorreu apenas com um volume de amostra acima de 300 mL, porém ficou no intervalo aceito na literatura. O volume de *breakthrough* está relacionado com a hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada e pode ser baixo quando os compostos não são fortemente retidos pelo sorvente. Isso justifica os resultados obtidos, uma vez que clomazona, com K<sub>ow</sub> de 350, é o mais hidrofóbico dos herbicidas avaliados, enquanto imzetapir e imazapique, com K<sub>ow</sub> de 31 e 0,01, respectivamente, são menos hidrofóbicos.

### 3.3 Validação do método

As equações de regressão linear obtidas para os herbicidas imazapique, imzetapir e clomazona nos cinco níveis de concentração apresen-



taram coeficiente de determinação ( $r^2$ ) > 0,999, indicando que a resposta do sistema HPLC-DAD é linear na faixa de concentração entre 0,025 mg L<sup>-1</sup> e 2,5 mg L<sup>-1</sup> para imazetapir e imazapique e entre 0,05 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> para clomazona.

O LOD estimado para o método foi de 0,04 µg L<sup>-1</sup> para imazapique e imazetapir e de 0,08 µg L<sup>-1</sup> para o clomazona. Os valores de LOQ para os herbicidas em amostras de água de superfície, empregando o método desenvolvido, foram de 0,12 µg L<sup>-1</sup> para imazapique e imazetapir e de 0,25 µg L<sup>-1</sup> para clomazona.

A repetitividade ( $RSD_r$ ) e a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o instrumento ( $n = 6$ ), para os níveis de concentração utilizados na elaboração das curvas analíticas dos herbicidas, ficaram entre 3,1% e 7,0% e 0,1% e 9,5%, respectivamente, sendo consideradas adequadas.

Os resultados de precisão e exatidão do método, obtidos no ensaio de recuperação em três níveis de fortificação, estão na Tabela 5. A precisão do método apresentou RSD entre 1,3% e 7,7% para repetitividade e entre 2,5% e 9,0% para a precisão intermediária. Neste trabalho seguiu-se a recomendação para validação de métodos cromatográficos aplicados a determinação de resíduos de agrotóxicos, a qual adota recuperações entre 70% e 120%, com valores de  $RSD \leq$

20%<sup>[41]</sup>. Todos os valores obtidos estão dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

Os herbicidas avaliados não estão contemplados na Portaria MS n. 2.914 de 2011, que dispõe sobre a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e na Resolução n. 357 do CONAMA de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece padrões de qualidade. Para águas superficiais, geralmente os limites são da ordem de 1 µg L<sup>-1</sup> a 3 µg L<sup>-1</sup><sup>[42]</sup>.

### 3.4 Aplicação do método desenvolvido

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo de dissipação dos herbicidas em experimento realizado em lavoura de arroz irrigado na Universidade Federal de Santa Maria. Com os resultados obtidos no estudo de dissipação dos herbicidas foi possível concluir que há persistência dos herbicidas na lâmina de água e que a concentração aplicada e as condições climáticas influenciam diretamente nas concentrações residuais dos herbicidas. Nas amostras analisadas não foram observadas interferências da matriz, sendo possível determinar os três herbicidas de forma adequada.

**Tabela 5** Recuperação  $RSD_r$  e  $RSD_{pi}$  do método para três níveis de fortificação.

Herbicida	Nível de fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	$RSD_r$ (%)	Recuperação (%)	$RSD_{pi}$ (%)
Imazapique	0,12	98	3	95	9
	0,60	81	5	93	7
	1,20	107	5	89	6
Imazetapir	0,12	89	1	94	2
	0,60	95	5	101	3
	1,20	107	7	96	3
Clomazona	0,25	86	8	95	7
	1,25	106	1	91	5
	2,50	94	3	105	4

## 4 Conclusão

A SPE com sorvente C18 possibilitou o preparo de várias amostras simultaneamente, permitindo a concentração de resíduos dos herbicidas imazetapir, imazapique e clomazona de forma eficiente e com baixo consumo de solvente. O método empregando HPLC-DAD mostrou-se adequado para a determinação dos herbicidas em 10 min. A validação do método forneceu resultados de recuperação entre 81% e 107% e precisão (RSD < 9%), considerados satisfatórios. Os limites de quantificação do método (0,12 µg L<sup>-1</sup> para imazapique e imazetapir e 0,25 µg L<sup>-1</sup> para clomazona) foram adequados para análise de agrotóxicos em água de superfície.

Apesar das propriedades físico-químicas distintas dos herbicidas analisados e da complexidade da matriz, o método mostrou-se adequado para o monitoramento dos herbicidas avaliados e para o acompanhamento de estudos conduzidos em lavoura de arroz irrigado com herbicidas largamente empregados nessa cultura, permitindo assim estimar o risco de contaminação dos mananciais hídricos por herbicidas aplicados na lavoura.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) o apoio financeiro e as bolsas concedidas.

## Referências

- Richardson SD. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* 2006; 78:4021-4045. <http://dx.doi.org/10.1021/ac800660d>
- Carabias-Martinez R, Gonzalo ER, Hernandez EH, Mendez JH. Simultaneous determination of phenyl- and sulfonyleurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2004; 517:71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.007>
- Kuster M, López de Alda M, Barceló D. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry techniques. *Mass Spectrometry Reviews* 2006; 25:900-916. <http://dx.doi.org/10.1002/mas.20093>
- Picó Y, Fernandez M, Ruiz MJ, Font G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2007; 70:117-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.10.010>
- Wells MJM. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids. In: Mitra S, editor. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Hoboken: Wiley-Interscience; 2003. p. 37-138.
- Sabin GP, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Multiresidue Determination of Pesticides in Drinking Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society* 2009; 20:918-925. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000500017>
- Primel EG, Zanella R, Kurz MHS, Goncalves FF, Machado SO, Marchezan E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul, Brasil: predição teórica e monitoramento. *Química Nova* 2005; 28:605-609. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422005000400010>
- Zanella R, Primel EG, Goncalves FF, Martins ML, Adaime MB, Marchezan E, Machado SLO. Study of the degradation of the herbicide clomazone in distilled and in irrigated rice field waters using HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Brazilian Chemical Society* 2008; 19:987-995. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532008000500026>
- Pichon V, Charpak M, Henion MC. Multiresidue analysis of pesticides using new laminar extraction disks and liquid chromatography and application to the French priority list. *Journal of Chromatography A* 1998; 795:83-92. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01035-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01035-2)
- Caldas SS, Gonçalves FF, Primel EG, Prestes OD, Martins ML, Zanella R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria

- de massas. *Química Nova* 2011; 34:1604-1617. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>
- 11 Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Mentasti E. Preconcentration of contaminants in water analysis. *Journal of Chromatography A* 2000; 902:289-309. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00838-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00838-4)
  - 12 Zanella R, Primel EG, Machado SLO, Gonçalves FF, Marchezan E. Monitoring of the Herbicide Clomazone in Environmental Water Samples by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Chromatographia* 2002; 55:573-577. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02492903>
  - 13 Rissato SR, Libânio M, Giafferis GP, Gerenutti M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). *Química Nova* 2004; 27:739-743. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500012>
  - 14 Shukla G, Kumar A, Bhanti M, Joseph PE, Taneja A. Organochlorine pesticides contamination of ground water in the city of hyderabad. *Environmental International* 2006; 32:244-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2005.08.027>
  - 15 Marques MN, Cotrim MB, Faustino MAP, Beltrame O F<sup>o</sup>. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção, pertencentes à bacia hidrográfica do rio Ribeira de Iguape, São Paulo. *Química Nova* 2007; 30:1171-1178. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000500023>
  - 16 Bortoluzzi EC, Rheinheimer DS, Gonçalves CS, Pellegrini JBR, Maroneze AM, Kurz MHS, et al. Investigation of the occurrence of pesticides residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Química Nova* 2007, 30, 1872-1876. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000800014>
  - 17 Donato FF, Kemmerich M, Facco JF, Friggi CA, Prestes OD, Adaime MB, et al. Simultaneous determination of pesticide and antibiotic residues at trace levels in water samples by SPE and LC-MS/MS. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* 2012, 07, 331-340.
  - 18 Martins ML, Donato FF, Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013; 405:7697-7709.
  - 19 Carvalho JJ, Jeronimo PCA, Gonçalves C, Alpendurada MF. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2008; 392:395-368. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2328-x>
  - 20 Kowal S, Balsaa P, Werres F, Schmidt TC. Determination of the polar pesticide degradation product *N,N*-dimethylsulfamide in aqueous matrices by UPLC-MS/MS. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2009, 395:1787-1794. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2861-2>
  - 21 Ayano E, Kanazawa H, Andoa M, Nishimura T. Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2004; 507:211-218. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.027>
  - 22 Zanella R, Primel EG, Kurz MHS, Gonçalves FF, Martins ML, Machado SLO, et al. Risk assessment of surface water contamination by herbicide residues: monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and Confirmation by GC-MS. *Journal of Brazilian Chemical Society* 2007; 18:585-589. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000300014>
  - 23 Tran ATK, Hyde RV, Doble P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. *Chemosphere* 2007; 67:944-953. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.002>
  - 24 Bruzzoniti MC, Sarzanini C, Costantino G, Fungi M. Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry in drinking waters. *Analytica Chimica Acta* 2006; 578:241-249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.066>
  - 25 Estévez E, Cabrera MC, Molina-Díaz A, Robles-Molina J, Palacios-Díaz MP. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Science of The Total Environment* 2012; 433:538-546. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.031>
  - 26 Lagana A, Fago C, Marino A. Simultaneous determination of imidazolinone herbicides from soil and natural waters using soil column extraction and off-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with UV detection or liquid chromatography electrospray mass spectroscopy. *Analytical Chemistry* 1998; 70:121-130. <http://dx.doi.org/10.1021/ac9707491>
  - 27 Bezemer E, Rutan S. Study of hydrolysis of a sulfonylurea herbicide using liquid chromatography

- with diode array detection and mass spectrometry by three-way multivariate curve resolution-alternating least squares. *Analytical Chemistry* 2001; 73:4403-4409. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0101656>
- 28 Zanella R, Primel EG, Gonçalves FF, Kurz MHS, Mistura CM. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters. *Journal of Separation Science* 2003; 26:935-938. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200301309>
- 29 Liu JF, Chao JB, Jiang GB, Cai YQ, Liu JM. Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water by on-line continuous flow liquid membrane extraction-C18 precolumn liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 2003; 995:21-28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00515-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00515-6)
- 30 Zanella R, Adaime MB, Peixoto SC, Friggi CA, Prestes DP, Machado SLO, et al. *Herbicides Persistence in Rice Paddy Water in Southern Brazil, Herbicides - Mechanisms and Mode of Action*, Dr. Mohammed Nagib Hasaneen (Ed.). InTech; 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicidesmechanisms-and-mode-of-action/herbicides-persistence-in-rice-paddy-water-in-southern-brazil>.
- 31 Vencill WK. *Herbicide Handbook*. 8th ed. Lawrence: Weed Science Society of America; 2002.
- 32 Mervosh TL, Simms GK, Stoller EW. Clomazone fate as affected by microbial activity, temperature, and soil moisture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43:537-543. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00050a052>
- 33 Hatrik S, Tekel J. Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. *Journal of Chromatography A* 1996; 733:217-233. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00725-3](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(95)00725-3)
- 34 Santos FM, Marchesan E, Machado SLO, Avila LA, Zanella R, Gonçalves FF. Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. *Planta Daninha* 2008; 26:875-881. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582008000400019>
- 35 Martini LFD, Caldas, SS, Bolzan CM, Bundt AD, Primel EG, Avila LA. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado. *Ciência Rural* 2012; 42:1715-1721. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012001000001>
- 36 Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004; 27:771-780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- 37 Hubert P, Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *Journal of Chromatography A* 2007; 1158:111-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.111>
- 38 Mamun MdIR, Park JH, Choi J-H, Kim HK, Choi WJ, Han S-S, et al. Development and validation of a multiresidue method for determination of 82 pesticides in water using GC. *Journal of Separation Science* 2009; 32:559-574. <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200800606>
- 39 Vigna CR, Morais LS, Collins CH, Jardim IC. Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. *Journal of Chromatography A* 2006; 1114:211-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.034>
- 40 Furlong ET, Burkhardt MR, Gates PM, Werner SL, Battaglin WA. Routine determination of sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides at nanogram-per-liter concentrations by solid-phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *Science of the Total Environment* 2000; 248:135-146. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00537-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00537-9)
- 41 COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *Document n° SANCO/12495/2011*. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO; 2011.
- 42 Zanella R, Primel EG, Gonçalves FF, Martins AF. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. *Journal of Chromatography A* 2000; 904(2):257-262. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00912-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00912-2)

---

Recebido: 27/08/2013

Aceito: 07/10/2013