

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISMAEL DOS SANTOS BELMONTE

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DEDICADA,
POR HPLC-UV, PARA DETERMINAÇÃO DE PARAQUATE EM
AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO**

Porto Alegre, março de 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ISMAEL DOS SANTOS BELMONTE

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA DEDICADA,
POR HPLC-UV, PARA DETERMINAÇÃO DE PARAQUATE EM
AMOSTRAS DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Química

Prof^a Dr^a Mariana Roberto Gama Sato
Orientadora

Porto Alegre, março de 2023.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (outubro/2020) e (março/2023), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Mariana Roberto Gama Sato. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Tiago Franco de Oliveira
(UFCSPA)

Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos
Santos
(UFRGS)

Prof. Dr. Klester de Souza Santos
(UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Mariana Roberto Gama
Sato
Orientadora
(UFRGS)

Ismael dos Santos Belmonte

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu namorado, Murilo Martini, pelo apoio incondicional desde a minha decisão de cursar o mestrado. Foi um período muito intenso, em que tive todo o suporte, carinho e compreensão necessários.

Agradeço ao meu irmão, Luis Henrique Belmonte Lopes, que sempre me perguntava como estava o andamento do meu mestrado, mesmo não fazendo ideia do que eu estava fazendo, isso sempre demonstrou que ele compreendia a importância do que esta pesquisa representava para mim.

Agradeço a minha amiga, professora e colega, Irene Teresinha Santos Garcia, oriunda da mesma cidade que eu, e que sempre me incentivou a me dedicar ao mestrado. Você foi uma peça essencial para que eu continuasse com determinação nesta caminhada.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Química Analítica Ambiental (LQAA), Mauricio Perin, Clara Miranda, e em especial, a Nicole Lazzari, que dividiu momentos especiais comigo durante os tempos em que o Campus do Vale estava praticamente deserto. Obrigado por sempre ser uma amiga que pude contar durante esse período.

Agradeço à professora Tânia Mara Pizzolato, por ter aberto as portas do LQAA para mim e por todos os ensinamentos que me passou, por todas as caronas e jantas gostosas que fizeste. Agradeço por ser uma pessoa exigente, pois isso me ajudou a evoluir como pesquisador.

Agradeço a minha orientadora, Mariana Roberto Gama Sato, que foi extremamente paciente, cuidadosa e dedicada. Obrigado por me dar liberdade para desenvolvermos nossa pesquisa e por acreditar no meu potencial.

Agradeço a todos aos professores e funcionários, e ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da UFRGS.

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro com a bolsa de mestrado.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA DISSERTAÇÃO

I) Artigo referente ao estágio docente:

BELMONTE, Ismael dos S.; BORGES, Amanda Vieira; GARCIA, Irene Teresinha Santos. Adaptation of Physical Chemistry Course in COVID-19 Period: Reflections on Peer Instruction and Team-Based Learning. **Journal of Chemical Education**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 2252–2258, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00529>

II) Artigo de revisão referente à pesquisa da dissertação:

BELMONTE, Ismael dos S.; PIZZOLATO, Tânia M.; GAMA, Mariana R. Quaternary ammonium pesticides: A review of chromatography and non-chromatography methods for determination of pesticide residues in water samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 35, p. e00171, 2022.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00171>

III) Resumo publicado em anais de eventos

BELMONTE, Ismael dos S.; PIZZOLATO, Tânia M.; GAMA, Mariana R. Large volume injection for the direct determination of paraquat using HILIC separation with UV detection. 20th Brazilian Meeting on Analytical Chemistry, Bento Gonçalves-RS, 2022.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Revisão bibliográfica	4
3.1 Agrotóxicos	4
3.2 Herbicidas	5
3.3 Presença de poluentes emergentes na água.....	6
3.4 Paraquate	8
3.3 Técnicas de preparo de amostra para a determinação de paraquate em água	11
3.4 Técnicas instrumentais para a análise de paraquate	14
3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência	14
3.4.2 Outras técnicas instrumentais aplicadas na determinação de PQ	22
4. Materiais e métodos	25
4.1 Instrumentação	25
4.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados	26
4.3 Preparo das soluções analíticas	27
4.4 Condições do sistema HPLC-UV/Vis	27
4.5 Preparo das amostras	28
4.6 Validação do método analítico	28
5. Resultados e discussão.....	30
5.1 Condições do sistema HPLC-UV/Vis	30
5.1.1 Estratégia de pré-concentração por injeção de grande volume	54
5.2 Validação do método analítico	59
5.2.1 Análise de amostra real	64
5.3 Perspectivas futuras deste trabalho	65
6. Conclusão	67
7. REFERÊNCIAS.....	69
8. ANEXOS	76
8.1 Parâmetros de desempenho do método analítico.....	76
8.1.1 Linearidade	76

8.1.2 Efeito matriz.....	77
8.1.3 Precisão.....	79
8.1.4 Exatidão.....	80
8.1.5 Limite de detecção (LOD)	80
8.1.6 Limite de quantificação (LOQ)	81
8.2 Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico	81
8.2.1 Tempo de retenção (t_R).....	82
8.2.2 Fator de retenção (k)	82
8.2.3 Eficiência (N)	83
8.2.4 Fator de assimetria (A_s).....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias de contaminação aquática por agrotóxicos.....	7
Figura 2. Estrutura química da molécula de PQ.....	8
Figura 3. Comparação entre FE totalmente porosa com partícula de 1,8 μm e FEs <i>core-shell</i> com partículas de 2,7 e 4,0 μm	15
Figura 4. Diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	16
Figura 5. Representação esquemática de um detector de UV-Vis utilizado em HPLC.	18
Figura 6. Fases estacionárias comumente utilizadas em HILIC.....	21
Figura 7. Interações de PQ com uma FE HILIC zwitteriônica de sulfobetaína (imagem fora de escala).....	22
Figura 8. Sistema HPLC-UV/Vis modelo Ultimate 3000 (Dionex, EUA).	25
Figura 9. Cromatogramas de soluções de PQ obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária ciano. Condições: ácido acético 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ . (a) interferência do ácido acético (volume de injeção 10 μL) e (b) emprego dos ácidos fosfórico e fórmico (volume de injeção 5 μL).....	31
Figura 10. Cromatogramas de soluções de PQ em ACN e MeOH obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária amida. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção 5 μL	33
Figura 11. Cromatogramas de diferentes volumes de injeção de uma solução de PQ 10,0 mg L ⁻¹ em ACN obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária amida. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v) e fluxo 1,0 mL min ⁻¹	34
Figura 12. Cromatogramas das soluções de tolueno 10,0 mg L ⁻¹ , o-xileno 5,0 mg L ⁻¹ e PQ 10,0 mg L ⁻¹ em ACN, obtidos com o emprego da coluna HILIC-Z. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo 1,0 mL min ⁻¹	35
Figura 13. Cromatogramas das soluções de 10,0 mg L ⁻¹ de PQ em ACN, em tampão de mesma proporção utilizado na FM e em ácido fórmico ajustado em pH 3,0, empregando-se a coluna HILIC-Z. Condições: formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ (pH 3,0):formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ em ACN (50:50, v/v) e fluxo 0,8 mL min ⁻¹	36
Figura 14. Avaliação do fator de retenção do PQ frente à variação de ACN na composição da FMB na coluna HILIC-Z. Condições: formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹	

(pH 3,0):formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ em ACN (FMA:FMB); fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.	37
Figura 15. Comportamento cromatográfico do PQ frente a variação de 45 a 75% de ACN na composição da FM na coluna HILIC-Z. Condições: fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.	38
Figura 16. Cromatogramas de soluções de PQ 1,0 e 10,0 mg L ⁻¹ utilizando-se como FMA tampão de formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ e FMB tampão de formiato de amônio 20 mmol L ⁻¹ em MeOH (16.a) e em ACN (16.b) na proporção de 25:75 (FMA:FMB), fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.....	40
Figura 17. Curva analítica do PQ preparada em solvente (ACN).	41
Figura 18. Curva analítica do PQ preparada em matriz (água da torneira).	42
Figura 19. Variação das áreas de pico de PQ obtida de soluções analisadas em um intervalo de um dia.	43
Figura 20. Áreas de picos de PQ obtidas de soluções sem ajuste e com ajuste de pH em 3,0, injetadas em diferentes tempos. O <i>insert</i> mostra a variação das áreas dos picos de PQ referentes às soluções de 2,0 mg L ⁻¹ em ACN:H ₂ O e em pH 3,0.....	44
Figura 21. Curva analítica de PQ em soluções preparadas em ACN:H ₂ O (1:1, v/v).45	
Figura 22. Áreas integradas referentes às soluções de PQ preparadas em água ultrapura no intervalo de 120 min.	46
Figura 23. Curva analítica do PQ em MeOH:H ₂ O (1:1, v/v) obtida por injeção imediatamente após o preparo.....	47
Figura 24. Curva analítica do PQ em água da torneira obtida por injeção imediatamente após o preparo.....	48
Figura 25. Variação das áreas nos diferentes conjuntos de soluções de PQ 1,0 mg L ⁻¹ no intervalo de 90 min.....	49
Figura 26. Comportamento da mesma solução de PQ de 1,0 mg L ⁻¹ acondicionada em vials de vidro, vidro desativado e de PP no intervalo de 90 min.....	52
Figura 27. Cromatograma de PQ 1,0 mg L ⁻¹ utilizando-se formiato de amônio 50 mmol L ⁻¹ (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65). Condições: fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.	53
Figura 28. Correlação linear entre o volume de injeção e a área de pico para uma solução de PQ de 1,0 mg L ⁻¹	56

Figura 29. Cromatogramas da solução de 1,0 mg L ⁻¹ de PQ para os volumes de injeção de 5 a 50 µL. Condições: formiato de amônio 50 mmol L ⁻¹ (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65) e fluxo 0,8 mL min ⁻¹	58
Figura 30. Cromatogramas dos brancos, e das amostras com adição de PQ referente às concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 µg L ⁻¹ . Condições: formiato de amônio 50 mmol L ⁻¹ (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65), fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção 50 µL.....	60
Figura 31. Curva analítica obtida para as soluções de PQ preparadas em água da torneira na faixa de 2,5 a 100,0 µg L ⁻¹	61
Figura 32. Distribuição dos resíduos.....	62
Figura 33. Cromatograma de amostra de água da torneira com a adição de PQ com concentração final de 10,0 µg L ⁻¹ . Condições: formiato de amônio 50 mmol L ⁻¹ (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65), fluxo 0,8 mL min ⁻¹ e volume de injeção 50 µL.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas do PQ.	9
Tabela 2. Eficiência cromatográfica e fatores de assimetria para volumes de injeção de solução de 1,0 mg L ⁻¹ de PQ de 5 a 50 µL.	57
Tabela 3. Recuperações de PQ em água da torneira em três níveis de concentração: 5,0, 25,0 e 100,0 µg L ⁻¹	63
Tabela 4. Precisão de uma solução de 50,0 µg L ⁻¹ de PQ preparada em água da torneira e analisada em dois dias distintos.	63

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN – acetonitrila

ANOVA - análise de variância

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A_s - fator de simetria

ATPS - sistema bifásico aquoso, *aqueous two-phase system*

CA - concentração experimental do analito

CTA - concentração teórica do analito adicionado

DLLME - microextração líquido-líquido dispersiva, *dispersive liquid-liquid microextraction*

DMCS – diclorodimetilsilano

DP – desvio padrão

DQ - diquate

CE - eletroforese capilar, *capillary electrophoresis*

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, *Environmental Protection Agency*

ERO - espécies reativas de oxigênio

ESI - ionização por eletrospray

ETE - Estações de Tratamento de Efluentes

FE - fase estacionária

FM - fase móvel

GC - cromatografia gasosa, *gas chromatography*

HHP- agrotóxicos altamente perigosos, *highly hazardous pesticides*

HILIC - cromatografia de interação hidrofílica, *hydrophilic interaction chromatography*

HLB - balanço hidrofílico-lipofílico, *hydrophilic-lipophilic balanced*

HLLME - microextração líquido-líquido homogênea, *homogeneous liquid-liquid microextraction*

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência, *high-performance liquid chromatography*

IC - inclinação da curva analítica

ISFME - *in situ solvent formation microextraction*

k – fator de retenção

IL - líquidos iônicos, *ionic liquids*

LMR - limites máximos de resíduos

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LPME - microextração em fase líquida, *liquid-phase microextraction*

LVI - injeção de grande volume, *large volume injection*

MEKC - cromatografia eletrocinética micelar, *micellar electrokinetic chromatography*

MeOH - metanol

MIPs - polímeros molecularmente impressos, *molecularly imprinted polymers*

MMQO - método dos mínimos quadrados ordinários

MMQP - método dos mínimos quadrados ponderados

N – Número de pratos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PP – polipropileno

PQ – paraquate

QUATs - agrotóxicos de amônio quaternário, *quaternary ammonium pesticides*

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RSD - desvio padrão relativo, *Relative Standard Deviation*

SBSE - extração sortiva de barra de agitação, *stir-bar sorptive extraction*

SERS - espalhamento Raman intensificado por superfície, *surface enhanced Raman spectroscopy*

SHS - solvente de hidrofiliabilidade comutável, *switchable-hydrophilicity solvent*

SPE - extração em fase sólida, *solid-phase extraction*

SPME - microextração em fase sólida, *solid-phase microextraction*

SQR - substância química de referência

TEA – trietilamina

THF - tetraidrofurano

t_M - tempo de retenção de um composto não retido

t_R - tempo de retenção

UE – União Europeia

VMP - valor máximo permitido

RESUMO

Palavras-chave: paraquate, agrotóxicos, HILIC, injeção de grande volume, core-shell.

O Paraquate (PQ) destaca-se por ser um herbicida de contato não seletivo, de amplo espectro e com ação dessecante, todavia, devido a sua alta toxicidade foi banido em diversos países, incluindo o Brasil. A alta polaridade de PQ dificulta sua determinação por abordagens de separação multirresíduo, exigindo assim um método instrumental substituto de análise ou métodos cromatográficos ajustados, como aqueles baseados em pareamento de íons ou colunas com fases estacionárias não triviais para melhor retenção de PQ. Nesse sentido, a cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) surgiu como uma opção para a análise bem-sucedida do PQ. A baixa concentração de resíduos de PQ geralmente requer uma técnica de detecção altamente sensível, comumente apoiada por uma estratégia de pré-concentração. Assim, a injeção de grandes volumes de amostra representa uma alternativa adequada às técnicas de extração, uma vez que essa abordagem requer pouco (ou nenhum) preparo da amostra e reduz a geração de resíduos associados à tradicional extração em fase sólida (SPE) como etapa de pré-concentração. Este trabalho descreve pela primeira vez a determinação cromatográfica direta de PQ em amostras de água combinando *injeção de grande volume* com o modo HILIC de separação em coluna com fase estacionária *core-shell* e detecção na região do UV. As amostras de água da torneira foram filtradas em uma membrana de PTFE 0,22 μm . A separação cromatográfica empregou uma coluna HILIC zwitteriônica (100 x 4,6 mm d.i., 4,0 μm) e tampão ACN/formiato de amônio 65:35 (v/v) 50 mmol L⁻¹ como fase móvel. O volume de injeção foi de 50 μL e a detecção UV foi realizada a 257 nm. Os valores de LOQ e LOD foram estimados em 4,04 e 1,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A curva analítica apresentou linearidade na faixa de 2,5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0,9999$). A precisão (calculada para 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ) obteve RSD de 0,50%. Recuperações de 103,4; 99,9 e 106,6% (RSD < 2,2%) foram estimadas para amostras de água de torneira fortificadas com 5,0, 25 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ, respectivamente. Não houve efeito de matriz para as curvas analíticas no solvente orgânico aquoso, água ultrapura ou amostra de água. O método proposto foi validado conforme a RDC nº 166/2017 da Anvisa e atingiu um LOQ cerca de 3 vezes menor que o limite máximo estabelecido para PQ, sem a necessidade de uma etapa de pré-concentração, possibilitando sua aplicação para análises com manipulação mínima da amostra.

ABSTRACT

Keywords: paraquat, pesticides, HILIC, large volume injection, core-shell.

Paraquat (PQ) stands out for being a non-selective, broad-spectrum contact herbicide with a desiccant action. However, due to its high toxicity, it was banned in several countries, including Brazil. The high polarity of PQ hinders its determination by multiresidue separation approaches, thus requiring an alternative instrumental method of analysis or fine-tuned chromatographic methods, such as those based on ion pairing or columns with special stationary phases for better retention of PQ. In this sense, hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has emerged as an option for the successful analysis of PQ. Low concentrations of PQ residues generally require a highly sensitive detection technique, which is commonly helped by a pre-concentration strategy. Thus, the injection of large sample volumes represents a suitable alternative for analyte improved signal, since this approach requires little (or no) sample preparation and reduces the generation of waste associated with traditional solid-phase extraction (SPE) as a pre-concentration step. This work describes for the first time the direct chromatographic determination of PQ in water samples exploiting large volume injection for HILIC separation using a core-shell packed column and UV detection. Tap water samples were filtered through a 0.22 μm PTFE membrane. Chromatographic separation employed a zwitterionic core shell HILIC column (100 x 4.6 mm i.d., 4.0 μm) and ACN/ammonium formate buffer 65:35 (v/v) 50 mmol L⁻¹ as mobile phase, at a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The injection volume was 50 μL and UV detection was performed at 257 nm. LOQ and LOD values were estimated at 4.04 and 1.33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The analytical curve showed linearity in the range of 2.5 to 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.9999$). Precision (calculated for 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ of PQ) obtained an RSD of 0.50%. Recoveries of 103.4; 99.9 and 106.6% (RSD < 2.2%) were estimated for tap water samples fortified with 5.0, 25 and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ of PQ, respectively. There was no matrix effect for the analytical curves in the aqueous organic solvent, ultrapure water or water sample. The proposed method was validated according to the Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa) RDC n^o 166/2017 and reached a LOQ about 3 times lower than the maximum limit established for PQ, without the need for a pre-concentration step, allowing its application to analyses with minimal manipulation of the sample.

1. Introdução

Os agrotóxicos têm sido utilizados extensivamente desde a década de 1950 no Brasil para aumentar a produtividade rural. Diferentes classes de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas são aplicadas em culturas de interesse econômico para atuar como defensivos agrícolas a fim de reduzir os danos causados por pragas, doenças e plantas daninhas. A necessidade do aumento da produção de alimentos fez o Brasil se tornar o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, desde 2008. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a FAO, essa demanda crescente por produtos agrícolas tende a aumentar nos próximos 30 anos, e conseqüentemente, o uso de agrotóxicos tende a acompanhar essa demanda.

Os agrotóxicos são considerados contaminantes emergentes e o seu uso causa prejuízos à saúde humana e impacta negativamente o meio ambiente, por meio da contaminação antropogênica da flora, fauna, solos e mananciais. A contaminação dos ecossistemas aquáticos por esses compostos tem sido relatada e causa preocupação, uma vez que não se possuem muitos dados sobre toxicidade ecológica, tampouco sobre toxicidade humana, além de serem de difícil remoção, inclusive no processo de tratamento de água para torná-la própria para consumo humano.

O paraquate (PQ) é um herbicida de contato não seletivo, de amplo espectro e com ação dessecante, muito utilizado na cultura da soja e de cereais. Devido a sua elevada toxicidade, o PQ foi banido em 27 países da União Europeia, bem como na Inglaterra e China, e recentemente, foi proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) a partir de setembro de 2020, mas depois liberado para que os produtores rurais usassem os estoques já comprados para a safra 2020-2021. Em 2020, o PQ foi o quinto agrotóxico mais consumido no Rio Grande do Sul (RS), e dentre os estados do Brasil, o RS foi o que utilizou a maior parcela do herbicida, 29,1% de todo PQ comercializado no país foi consumido no RS (IBAMA, 2020).

Recentemente, o Ministério da Saúde publicou a Portaria GM/MS nº 888, de 2021, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, em que foi estabelecido o

valor máximo permitido (VMP) para substâncias orgânicas que representam risco à saúde em água potável, dentre elas o PQ, fixado em $13 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os métodos cromatográficos são os mais utilizados para a determinação de PQ em amostra de água. Devido à alta polaridade, esse analito não é passível de determinação por métodos multirresíduos de agrotóxicos, geralmente voltados a espécies de média e baixa polaridade, e necessita de um método dedicado, que muitas vezes emprega condições cromatográficas diferenciais para a sua análise. Diante disso, o desenvolvimento de um método cromatográfico dedicado para avaliar a presença de PQ em água para consumo humano torna-se relevante.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico dedicado baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do UV para a determinação de paraquate em água potável.

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar o comportamento do analito em diferentes diluentes.
- II. Avaliar diferentes colunas cromatográficas para o desenvolvimento do método analítico via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção na região do UV (HPLC-UV). Testar e otimizar diferentes condições de separação para o modo de cromatografia líquida de interações hidrofílicas (HILIC). Validar o método cromatográfico desenvolvido.
- III. Avaliar o método de injeção de grande volume como etapa de pré-concentração de amostra.
- IV. Aplicar o método cromatográfico a uma amostra real de água advinda da rede de abastecimento.
- V. Verificar se o método cromatográfico desenvolvido atende aos requisitos da Portaria nº 888/2021 do Ministério da Saúde.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Agrotóxicos

O monitoramento de contaminantes emergentes, como fármacos, agrotóxicos, hormônios e drogas de abuso, é uma das demandas do século XXI. Estes poluentes são substâncias potencialmente tóxicas sobre as quais os efeitos ou a presença no ambiente ainda são pouco conhecidos. Estes compostos têm sido detectados nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água e ar), sendo tanto de origem antropogênica (oriundos em efluentes domésticos, industriais, hospitalares e aqueles provenientes das atividades agrícola e pecuária), quanto de ocorrência natural (presentes em diferentes espécies de plantas, por exemplo) (SOUZA, M. C. O. *et al.*, 2022). No entanto, grande parte dessas substâncias não estão incluídas em programas de monitoramento de rotina pelos órgãos de meio ambiente e de saúde, e tampouco estão inseridas em normas ou legislações ambientais. Dentre estes contaminantes, os agrotóxicos ganham um certo destaque no atual cenário.

Os agrotóxicos são definidos como qualquer produto e agente de processos físicos, químicos ou biológicos usados para matar, repelir ou controlar certas formas de vida vegetal ou animal que são consideradas pragas. As principais classes dos agrotóxicos incluem os herbicidas, utilizados para destruir ervas daninhas e outras vegetações indesejadas; os inseticidas, para controlar uma ampla variedade de insetos; e os fungicidas, que são aplicados para impedir o crescimento de mofo e bolor.

Relatórios apontam que o Brasil além de ser o maior comprador mundial de agroquímicos (mais de US\$ 10 bilhões ao ano), é também o maior consumidor de agrotóxicos altamente perigosos (DOWLER, 2020) (HHPs, do inglês *highly hazardous pesticides*) — designação técnica da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura para agrotóxicos que contêm ingredientes ativos com toxicidade extremamente aguda, que persistem no meio ambiente e em organismos, e com efeitos negativos crônicos na saúde humana e no meio ambiente, mesmo sob níveis de exposição muito baixos (PARRA-ARROYO *et al.*, 2022).

Os dados sugerem que o uso de HHPs provavelmente continuará aumentando no Brasil. Como indício disso, em 2019, o governo brasileiro aprovou 475 novos pesticidas — o número mais alto em 14 anos — incluindo substâncias banidas na União Europeia (BRAGA *et al.*, 2020). As importações de pesticidas no Brasil também bateram um recorde histórico, quase 335 mil toneladas de agrotóxicos em 2019, um aumento de 16% em relação a 2018. Aponta-se o Rio Grande do Sul como o quarto estado do Brasil com maior volume de vendas anuais de agrotóxicos, chegando a mais de 50 mil toneladas por ano (IBAMA, 2020), com um maior enfoque para os herbicidas.

3.2 Herbicidas

Os herbicidas são a classe de agrotóxicos mais utilizada no mundo, e a que possui maior registros na literatura de resíduos desses contaminantes em matrizes ambientais. Os herbicidas modernos são frequentemente imitadores sintéticos de hormônios vegetais naturais que interferem no crescimento normal das plantas alvo, possuindo diferentes características que classificam esses compostos quanto a seletividade, a translocação, a época de aplicação, a estrutura química, e o mecanismo de ação (SHARMA; JHA; REDDY, 2018).

Os herbicidas seletivos são aqueles que matam apenas certas espécies de plantas e não outras, enquanto os não-seletivos (ou de amplo espectro) são eficazes na maioria das espécies de plantas, incluindo culturas. Além disso, quando são sistêmicos, são extensivamente translocados na planta através de seu sistema vascular junto com água, nutrientes e outros materiais do local de absorção para os locais de ação. Quando são não-sistêmicos, matam os tecidos das plantas mais rapidamente devido a atividade de contato (DAYAN *et al.*, 2019).

Os herbicidas são classificados em três quanto à época de aplicação: pré-plantio, pré-emergência e pós-emergência. Os herbicidas pré-plantio aqueles não-seletivos aplicados ao solo antes do plantio e são incorporados mecanicamente ao solo. O objetivo da incorporação é evitar perdas por fotodecomposição e/ou volatilidade. Os herbicidas pré-emergência são aplicados antes que as mudas de

ervas daninhas emergem através da superfície do solo. Eles não impedem a germinação de ervas daninhas, mas matam as ervas daninhas à medida que crescem através da zona tratada com herbicida. Já os pós-emergência são aplicados após a emergência das mudas de ervas daninhas na superfície do solo e geralmente requerem múltiplas aplicações para o controle adequado. Podem ser de aplicação foliar ou radicular, seletivos ou não-seletivos, de contato ou sistêmicos (VATS, 2015).

Os modos de ação desses compostos são inúmeros, atuando como inibidores na síntese de aminoácidos ou de lipídeos, inibidores de crescimento de mudas, reguladores de crescimento, inibidores da fotossíntese ou de pigmentos protetivos e disruptores da membrana celular das plantas (HAZARAIMI *et al.*, 2022).

3.3 Presença de poluentes emergentes na água

O uso contínuo e excessivo de agrotóxicos permite que resíduos desses compostos apareçam em locais inesperados, como por exemplo, nos corpos hídricos, principalmente por conta do escoamento do campo agrícola e de efluentes industriais (SYAFRUDIN *et al.*, 2021). A contaminação dos ecossistemas aquáticos ocorre principalmente de forma difusa, de modo que as fontes são quantificadas de modo indireto, o que dificulta a adoção de medidas que impeçam sua chegada às águas superficiais e subterrâneas (WEISSTEINER *et al.*, 2014). A Figura 1 ilustra as principais vias de contaminação aquática por agrotóxicos. Uma vez aplicados, os agrotóxicos podem sofrer transformações bióticas ou abióticas, ou ainda, permanecerem inalterados. Dessa forma, podem ser adsorvidos pelo solo, sofrer lixiviação e serem mobilizados para outros locais, tanto na forma inalterada quanto seus produtos de degradação e metabólitos, que muitas vezes possuem toxicidade desconhecida. Além disso, os agrotóxicos podem tornar-se persistentes, ocasionando bioacumulação, por exemplo, nos peixes, progredindo na cadeia alimentar (SLABY *et al.*, 2022).

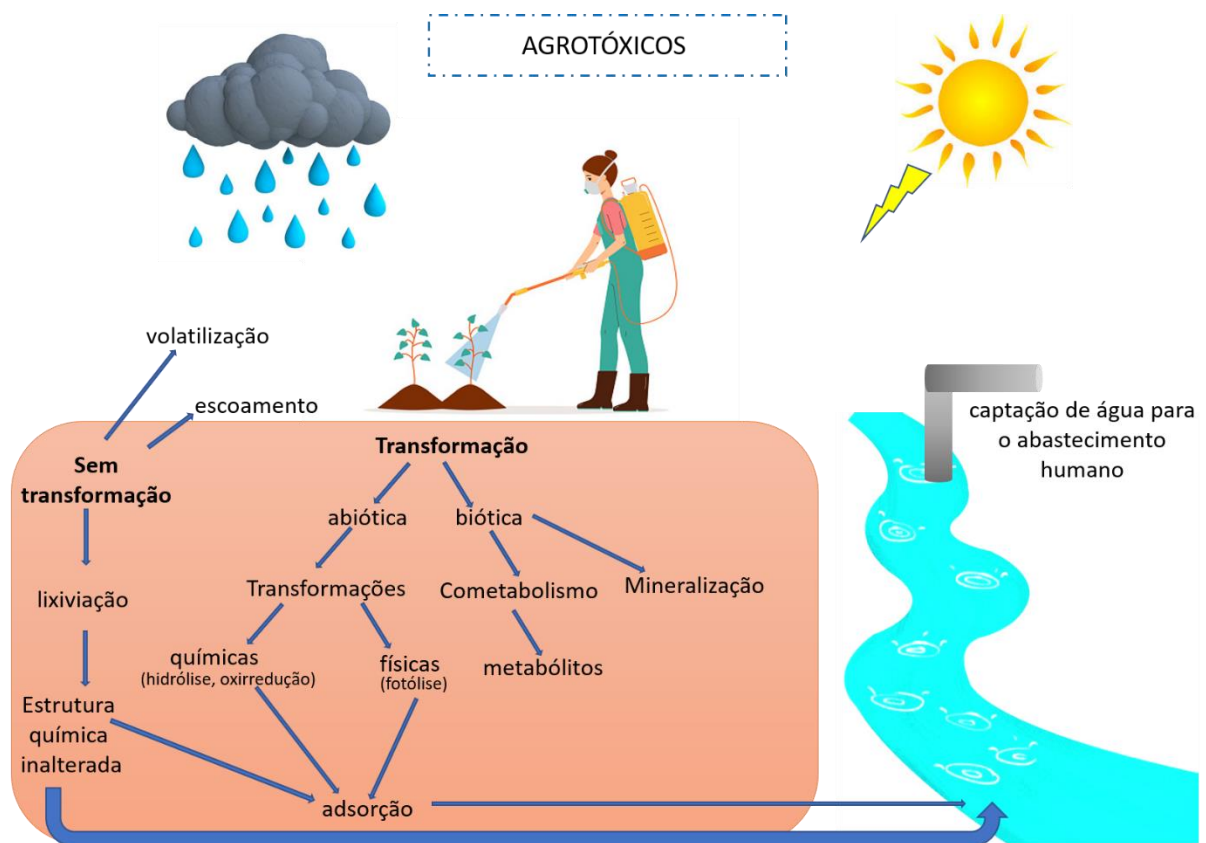


Figura 1. Representação esquemática das vias de contaminação aquática por agrotóxicos.

Fonte: autoria própria.

Ocorre que muitas vezes esses poluentes chegam até as Estações de Tratamento de Efluentes (ETE), e acabam não sendo totalmente removidos no processo de tratamento para o consumo humano, o que compromete a qualidade do abastecimento de água potável, e por consequência, a saúde humana (SALEH; ZOUARI; AL-GHOUTI, 2020). A exposição crônica a agrotóxicos por meio da ingestão de água contaminada pode desencadear problemas endocrinológicos, de desregulação hormonal, reprodutivos e até mesmo carcinogênicos (WESTERHOFF *et al.*, 2005), podendo apresentar efeitos ainda mais deletérios quando combinados do que quando isolados (RIZZATI *et al.*, 2016). No Brasil, a extensa contaminação da água potável por diferentes agrotóxicos indica uma forte correlação com o aumento do risco de câncer (PANIS *et al.*, 2022).

3.4 Paraquate

O paraquate (dicloreto de 1,1-dimetil-4,4'-bipiridínio, PQ) é um herbicida pós-emergência, de amplo espectro e não-seletivo, pertencente à classe dos agrotóxicos de amônio quaternário (QUATs), promove um rápido controle de plantas daninhas pela ação do contato foliar com translocação mínima no xilema¹. O PQ (Figura 2) possui alto potencial de absorção ao solo, que contribui para que seja o terceiro herbicida mais usado no mundo depois do glifosato e do glufosinato.

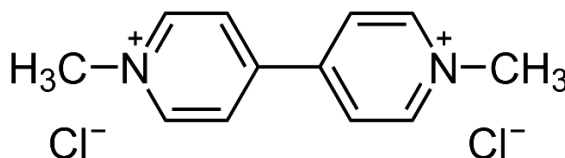


Figura 2. Estrutura química da molécula de PQ.

Nas plantas, o PQ é absorvido e transportado do ambiente externo para os cloroplastos, o principal local de ação do PQ. Assim, por meio de sucessivas reações bioquímicas, o PQ faz com que sejam geradas várias formas de espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo, radical superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio. O excesso de ERO destrói rapidamente as membranas celulares, levando à clorose e murcha das folhas e, finalmente, à dessecação (NAZISH *et al.*, 2022).

O PQ é fortemente adsorvido aos colóides do solo, o que limita sua lixiviação e também o torna menos disponível para decomposição biológica, permitindo que esse herbicida persista no solo. A forte adsorção do PQ ao solo se deve principalmente às interações eletrostáticas entre os cátions bivalentes do herbicida com as cargas negativas dos minerais argilosos e/ou matéria orgânica, influenciadas pelo pH e pela força iônica do meio (GONDAR *et al.*, 2012).

As características físico-químicas do PQ (Tabela 1) como elevada solubilidade em água e baixa pressão de vapor trazem atenção quanto à afinidade desse herbicida aos corpos hídricos. Embora a não lixiviação desse herbicida para os lençóis freáticos

¹ O xilema é um tecido vascular que distribui água e solutos pelo corpo de um vegetal.

seja justificada pela forte adsorção ao solo, resíduos de PQ foram relatados em amostras ambientais de águas superficiais ou potáveis (FRANCO *et al.*, 2022).

Tabela 1. Características físico-químicas do PQ.

Paraquate	
Massa molar (g mol ⁻¹)	257,2
Solubilidade em água a 20 °C (g L ⁻¹)	620
log <i>P</i> (20 °C)	-4,5
Tempo de meia-vida no solo (dias)	644

Fonte: (HERTFORDSHIRE, 2017)

A elevada toxicidade animal de PQ, cerca de 28 vezes maior do que o glifosato (WALSH; KINGWELL, 2021), fez com que esse composto fosse banido em diversos países. Desde 2007 o PQ foi proibido na União Europeia, embora ainda seja permitida a exportação de alimentos em que foi utilizado PQ, desde que os valores de resíduos estejam dentro dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pelo Bloco, que variam de 0,02 a 0,05 mg kg⁻¹ (EUROPEAN COMMISSION, 2021). Nos EUA, seu uso é limitado apenas por aplicadores licenciados.

Além dos inúmeros casos de envenenamento por PQ que foram relatados globalmente, o PQ é considerado um fator de risco chave para desenvolvimento da doença de Parkinson em humanos (NEVES *et al.*, 2022). O mecanismo de toxicidade do PQ em células humanas está associado à produção de ERO em ciclos redox, causando estresse oxidativo celular pela geração de radicais livres (NASPOLINI *et al.*, 2021). O PQ é classificado como moderadamente perigoso (classe II) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e perigoso (classe I) pela ANVISA, já que, além da toxicidade aguda, o herbicida gera efeitos tóxicos agudos retardados mesmo em baixos níveis de concentração, causando danos pulmonares graves e também por não haver antídoto para tal composto (WHO, 2020).

A ANVISA iniciou o processo de reavaliação toxicológica do PQ por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 177, de 21 de setembro de 2017, em que decidiu pela manutenção do registro dos agrotóxicos contendo PQ por três anos (ANVISA, 2017b). Após esse período, a RDC nº 428, de 7 de outubro de 2020, foi publicada e dispôs sobre a proibição desse herbicida em produtos agrotóxicos no país.

Essa norma também regulou a possibilidade de utilização dos estoques em posse dos agricultores brasileiros de produtos à base do ingrediente ativo PQ para o manejo do cultivo de soja nas Regiões Norte e Nordeste durante a safra agrícola de 2020/2021 (ANVISA, 2020).

Mesmo com a decisão da proibição do agrotóxico, entidades de classe do setor agrícola, principalmente ligados à produção de soja, fazem pressão para que os produtos à base de PQ tenham liberação emergencial seguida de revisão da decisão da ANVISA. Segundo essas entidades, os agrotóxicos substitutos do PQ, como o diquate (DQ), tiveram aumento expressivo no preço além de escassez.

Após o banimento de PQ, muitos casos de contrabando desse herbicida têm sido relatados, especialmente em 2022. Em Mato Grosso, a Receita Federal do Brasil apreendeu 24 mil litros de PQ que estavam escondidos junto à carga declarada como sendo de sulfato de alumínio, que havia sido enviada da China (RECEITA FEDERAL, 2022). No Paraná, um contrabandista foi preso com mais de 10 toneladas do herbicida (DESTAQUE RURAL, 2022). Em Minas Gerais, 8 toneladas de PQ foram apreendidas de um contrabando vindo do Paraguai (JORNAL ESTADO DE MINAS, 2022). No Rio Grande do Sul, seguidos casos de apreensões são realizados, sendo que a maioria tem origem na Argentina (CORREIO DO POVO, 2022). A utilização ilegal desse composto faz com que seja necessário um monitoramento contínuo avaliando a sua possível presença no território brasileiro.

Embora os LMR de PQ para alimentos fossem estabelecidos pela ANVISA, não havia uma definição de VMP para esse herbicida em água potável. Somente com o advento da Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021, houve a regulamentação do VMP de PQ em água potável, fixado em $13 \mu\text{g L}^{-1}$. Na UE, por exemplo, o VMP de agrotóxico em água potável é de $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$, podendo a soma total de todos os agrotóxicos chegar a $0,50 \mu\text{g L}^{-1}$ (UNIÃO EUROPEIA, 2020).

Para que seja possível quantificar PQ com precisão e exatidão em uma ordem de concentração tão baixa, como $\mu\text{g L}^{-1}$, é necessário um método analítico bastante sensível e seletivo. Além disso, são requeridos um preparo de amostra adequado e condições analíticas especiais, visto que o PQ é uma analito desafiador, e que devido às suas características físico-químicas, muitas vezes necessita de um método único para sua determinação.

3.3 Técnicas de preparo de amostra para a determinação de paraquate em água

A determinação de PQ em amostras de água requer um pré-tratamento eficiente que seja capaz de remover os interferentes para não afetar a identificação e quantificação do herbicida. Além disso, muitas vezes é necessário realizar a pré-concentração de PQ durante o preparo de amostra, já que a concentração ambiental presente é extremamente baixa.

A técnica de extração em fase sólida (do inglês, *solid-phase extraction*, SPE) é amplamente utilizada na determinação de PQ em amostras de água. Na SPE, as etapas da pré-concentração são: condicionamento do sorvente, percolação da amostra, limpeza da coluna (*clean-up*), eluição do analito. Assim, o PQ presente na matriz aquosa é retido pelo sorvente presente no cartucho juntamente com os interferentes, e, posteriormente, um solvente orgânico seletivo remove os interferentes e outro solvente é adicionado para eluir o herbicida. Os mecanismos de separação presentes na pré-concentração de PQ são principalmente adsorção, partição (fase normal e reversa) e troca iônica.

O método EPA 549.2 utiliza SPE para a determinação de PQ em água. Como a maioria das fases sólidas disponíveis anteriormente eram mais apolares, para reter compostos altamente polares como PQ, era necessária a adição de um pareador aniônico. O ácido 1-hexanossulfônico formava o par iônico com a espécie PQ^{2+} em solução e era retido no sorvente C_8 (U.S. EPA, 1997).

Além de cartuchos C_8 ou C_{18} , também foram utilizados cartuchos do tipo HLB (do inglês, *hydrophilic-lipophilic balanced*), que possuem em sua estrutura uma parte lipofílica, que interage com a parte mais apolar do PQ, enquanto os grupos hidrofílicos ligados interagem com as cargas positivas para proporcionar maior retenção. Embora a retenção seja melhorada quando comparada com a proporcionada por grupos alquila, para a pré-concentração utilizando-se cartuchos HLB foi necessária a adição de pareadores aniônicos (OH *et al.*, 2014). Entretanto, os cartuchos de troca catiônica fraca são os mais adequados para SPE direta de PQ.

Outra técnica de preparo de amostra amplamente utilizada para a determinação de PQ em água é a microextração em fase sólida (do inglês, *solid-phase*

microextraction, SPME). A SPME agrega as vantagens da SPE, como a simplicidade, baixo custo, fácil automação, além de contornar as desvantagens da SPE, como o entupimento do cartucho e o uso de solventes orgânicos (LI, J. *et al.*, 2015).

Na extração por SPME, é necessário que a molécula de interesse seja volátil ou semi-volátil, pois com o aquecimento ou imersão direta, o analito será adsorvido/absorvido na fibra extratora. Para se analisar PQ com a etapa de SPME, realiza-se uma reação de derivatização, que consiste na redução do PQ com NaBH₄ para tornar a molécula volátil. Dessa forma, por meio do aquecimento, a espécie PQ reduzida é adsorvida pela fibra extratora (geralmente PDMS), e, após o tempo de equilíbrio atingido, o analito é dessorvido termicamente para determinação.

Outra técnica miniaturizada utilizada para pré-concentrar PQ em amostras de água foi a aplicação de solvente de hidrofiliabilidade comutável (do inglês, *switchable-hydrophilicity solvent*, SHS), uma variação da microextração em fase líquida (do inglês, *liquid-phase microextraction*, LPME). O emprego de SHS tem como vantagem a utilização de baixo volume de solvente menos tóxicos que os orgânicos convencionais (poucos µL) e a possibilidade de recuperação do solvente extrator sem destilação (ALSHANA *et al.*, 2020).

O processo de extração de PQ via SHS consiste na adição de trietilamina (TEA) após a redução do analito, a fim de formar duas fases imiscíveis. Ao borbulhar CO₂ ao sistema bifásico, a amina terciária é protonada e torna-se solúvel em água. Ao remover o CO₂, o equilíbrio ácido-base do sistema é perturbado e as espécies voltam a forma imiscível, extraindo-se assim a forma reduzida de PQ para a fase contendo TEA. Outras formas de se perturbar o equilíbrio ácido-base do sistema são por meio do ajuste de pH ou mudança de temperatura (LAMEI *et al.*, 2018).

As propriedades únicas dos líquidos iônicos (IL), como baixa pressão de vapor, alta estabilidade térmica, alta viscosidade e densidade, e solubilidade ajustável em água e solventes orgânicos, levam a um grande número de aplicações em química analítica. Assim como os SHS, os IL são potenciais substitutos dos solventes orgânicos voláteis, do ponto de vista ambiental e analítico.

A microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) é baseada no uso de um sistema de solventes ternários, consistindo em uma fase aquosa, um solvente extrator apolar e um solvente dispersor, que é miscível no solvente extrator e na amostra (RYKOWSKA; ZIEMBLIŃSKA;

NOWAK, 2018) (como por exemplo, acetona, metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano). A utilização de cátions e ânions de IL na técnica de DLLME faz com que não seja necessário o uso do solvente dispersor, o que deu origem às técnicas de microextração líquido-líquido homogênea (do inglês, *homogeneous liquid-liquid microextraction*, HLLME).

Uma variação da HLLME é a formação do solvente de microextração *in situ* (do inglês, *in situ solvent formation microextraction*, ISFME), em que um IL hidrofílico, por exemplo, o cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [EMIm]Cl, e um agente de pareamento de íons, por exemplo, o lítio bis(nonafluorobutanesulfonyl)amida, Li[NNf₂] são adicionados à amostra de água contendo PQ, e ocorre a formação de gotículas turvas de um IL hidrofóbico, o [EMIm][NNf₂], que contém o agrotóxico pré-concentrado (HAMAMOTO; KATSUTA, 2018). A formação de minúsculas gotas da fase extratora dá origem à maior área interfacial, aumentando assim a cinética da extração e resultando em elevados valores de fator de enriquecimento.

Outra variação da HLLME é o sistema bifásico aquoso baseado em IL (do inglês, *aqueous two-phase system*, ATPS), em que a extração do analito é realizada com IL de baixa viscosidade e hidrofílicos. A separação de fases é induzida pela adição de sal (geralmente inorgânico) à solução aquosa homogênea. Nessa abordagem, obteve-se um fator de enriquecimento de PQ de 18,6 e LOD na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (OU SHA *et al.*, 2018).

Por se tratar de uma analito desafiador do ponto de vista analítico, diversos avanços têm sido reportados no que diz respeito às estratégias de preparo de amostras para a determinação de PQ em água. A utilização de IL como modificador de superfície de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro mostrou ser promissora para extrair PQ, obtendo-se boa repetibilidade (RSD <4,0%) e baixo LOD $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, a utilização de polímeros de impressão molecular (do inglês, *molecularly imprinted polymers*, MIPs), que possuem sítios de ligação específicos acessíveis para grupos químicos da molécula alvo, foram utilizados como revestimento para extração sortiva de barra de agitação (do inglês, *stir-bar sorptive extraction*, SBSE). A abordagem MIP-SBSE obteve um LOD na ordem de ng L^{-1} para a determinação de PQ (YAO *et al.*, 2020).

3.4 Técnicas instrumentais para a análise de paraquate

As técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação de PQ são as técnicas de separação. Dentre estas, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), foco deste trabalho.

3.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida é definida como uma técnica físico-química de separação de componentes de uma mistura de espécies não voláteis e termicamente instáveis. A separação é realizada por meio da distribuição dos solutos analisados entre duas fases: a fase móvel (FM) e a fase estacionária (FE) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Em cromatografia líquida, a FM é um solvente ou solução responsável por arrastar os componentes da amostra e participa do processo de separação. A seleção de uma FM é extremamente relevante para uma determinada separação, e deve levar em conta as características físico-químicas, a força cromatográfica e seletividade dos solventes. A FE é um suporte sólido responsável por reter os analitos por meio de diferentes mecanismos, como adsorção, partição e troca iônica. Há uma gama de FE com diferentes grupos funcionais a fim de atender as necessidades analíticas. A natureza desses grupos pode ser polar, como amino ($-NH_2$) e ciano ($-CN$), ou ainda, apolar, como octadecil ($-C_{18}$) ou fenil ($-C_6H_5$) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Quanto menores e mais uniformes forem as partículas das FEs, mais eficientes são as colunas. Com o avanço da cromatografia líquida moderna, dois grupos de FEs ganharam destaque: as de partículas totalmente porosas e as de partículas superficialmente porosas. As totalmente porosas possuem tamanho médio de partícula menores do que as superficialmente porosas, o que acarreta aumento considerável da pressão de trabalho. Para contornar esse fato, desenvolveu-se as FEs de partículas com diâmetro total entre 3 e 6 μm , contendo um núcleo ("core") de

sílica revestido com uma camada porosa (“*porous shell*”), com espessura entre 0,1 e 1 μm e diâmetro de poros em torno de 30 nm, denominadas “*core-shell*” (LANÇAS, 2010).

Apesar de a camada superficial porosa ser relativamente fina, ela representa mais de 70% do volume total da partícula, aumentando assim a capacidade (quantidade de amostra que ela suporta) em relação aos problemas iniciais apresentados por esse tipo de FE. Isso se reflete na diminuição dos múltiplos caminhos existentes por onde as moléculas do soluto poderão passar e pela diminuição do tempo que o mesmo soluto demora para difundir para dentro e para fora da FE (FERREIRA; JARDIM, 2017). A Figura 3 apresenta uma comparação entre FEs descritas.

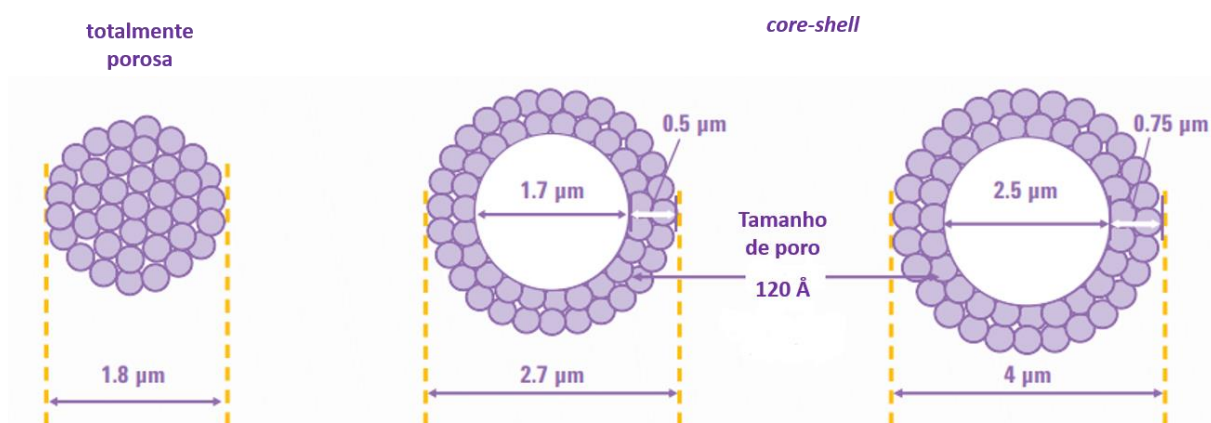


Figura 3. Comparação entre FE totalmente porosa com partícula de 1,8 μm e FEs *core-shell* com partículas de 2,7 e 4,0 μm .

Fonte: Agilent Technologies, 2015.

A FE está acondicionada dentro da coluna cromatográfica, através da qual a FM flui continuamente. A partir daí, os analitos que apresentarem maior interação com a FE irão permanecer menos tempo na FM e, como consequência, irão deslocar-se mais lentamente através da coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Quando a FE possui polaridade maior do que a FM, denomina-se cromatografia de fase normal; quando ocorre o contrário, classifica-se como cromatografia de fase reversa. Atualmente, a maioria das separações cromatográficas ocorre por meio de fase reversa, em que o princípio da retenção é a hidrofobia, ocasionada pelas interações entre a parte mais apolar do soluto com a FE e a repulsão desta parte pela

FM aquosa. Os solventes orgânicos comumente utilizados como FM no modo reverso são acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF). Além disso, o modo de eluição pode ser classificado como isocrático, quando não ocorre mudança na composição da FM; e gradiente, quando ocorre e deseja-se separar um número maior de compostos de uma mistura (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A instrumentação necessária para a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) é, usualmente, modular. Isso permite que possa integrar módulos de diferentes fabricantes, desde que compatíveis. A Figura 4 ilustra um diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

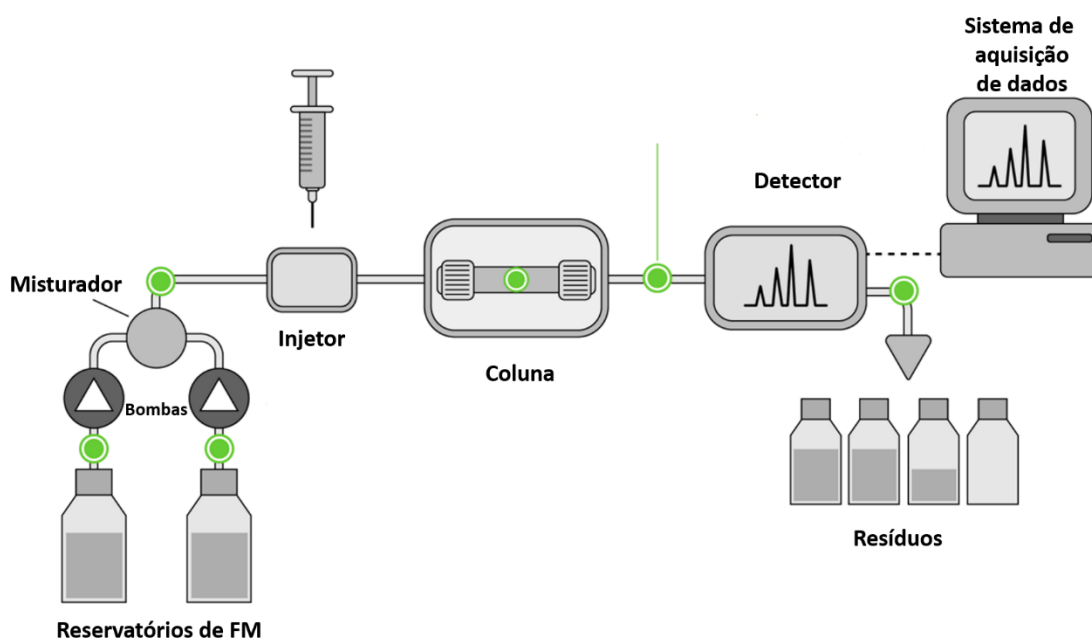


Figura 4. Diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Fonte: Adaptado de Sensirion (2022).

O reservatório de solventes (FM) é o primeiro componente de um cromatógrafo líquido. A FM deve ser filtrada, de maneira a eliminar as partículas que possam se alojar em partes da bomba e do injetor. Além disso, costuma-se proceder com a degaseificação da FM para eliminar gases dissolvidos que podem criar bolhas, causando problemas na bomba e aumento de ruído da linha base do detector (LANÇAS, 2016).

O sistema de bombas é responsável por pressurizar a FM com precisão e exatidão, livres de pulsação. As bombas em uso nos cromatógrafos líquidos são de pressão constante (pneumáticas) ou de volume constante (mecânicas), sendo a última a mais utilizada. Dentre as bombas de volume constante, destaca-se a de pistão recíprocante ou alternante, que pressuriza e empurra a FM através de uma válvula de direção única (*check valve*), conseguindo chegar a pressões de 5000 psi (LANÇAS, 2016).

O sistema de introdução de amostra é realizado pelo injetor, que coloca a amostra na coluna pressurizada, de forma que ocorra um mínimo de perda de eficiência nesta transferência. O tipo mais comum de válvula para introdução de amostras em cromatógrafos líquidos é chamado de válvula de seis vias, onde há seis orifícios conectados que permitem várias operações distintas (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

A coluna cromatográfica é onde ocorre a separação e, tipicamente, apresenta diâmetro interno de 2,0 mm a 4,6 mm e comprimento entre 5,0 cm e 25,0 cm. Como a temperatura é um fator importante para o processo de separação, é necessário que seja controlada (termostatizada) por meio de forno. Com as atuais demandas analíticas, novas colunas cromatográficas têm sido desenvolvidas, com FE altamente tecnológicas e com tamanho de partícula cada vez menor (LANÇAS, 2016).

A saída da coluna está conectada ao detector para que os componentes sejam identificados e quantificados. As duas classes de detectores mais utilizados em cromatografia líquida são os universais e os seletivos. Detectores universais respondem a qualquer composto da amostra, como por exemplo, o índice de refração, o espalhamento de luz evaporativo e o espectrômetro de massas. Já os detectores seletivos respondem a um grupo de componentes presentes no efluente da coluna, como por exemplo o detector de UV-Vis para compostos que possuem grupos cromóforos; e o fluorescência para compostos que fluorescem (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O detector de UV-Vis é o mais difundido nos equipamentos de HPLC devido a sua simplicidade, boa sensibilidade e baixo custo. Seu princípio é baseado na relação existente entre o feixe de luz que incide na amostra e a intensidade do feixe que emerge dela, relação denominada transmitância. No entanto, o parâmetro proporcional à concentração das espécies absorventes é a absorbância. A Figura 5

ilustra o funcionamento de um detector de UV-Vis em um HPLC (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

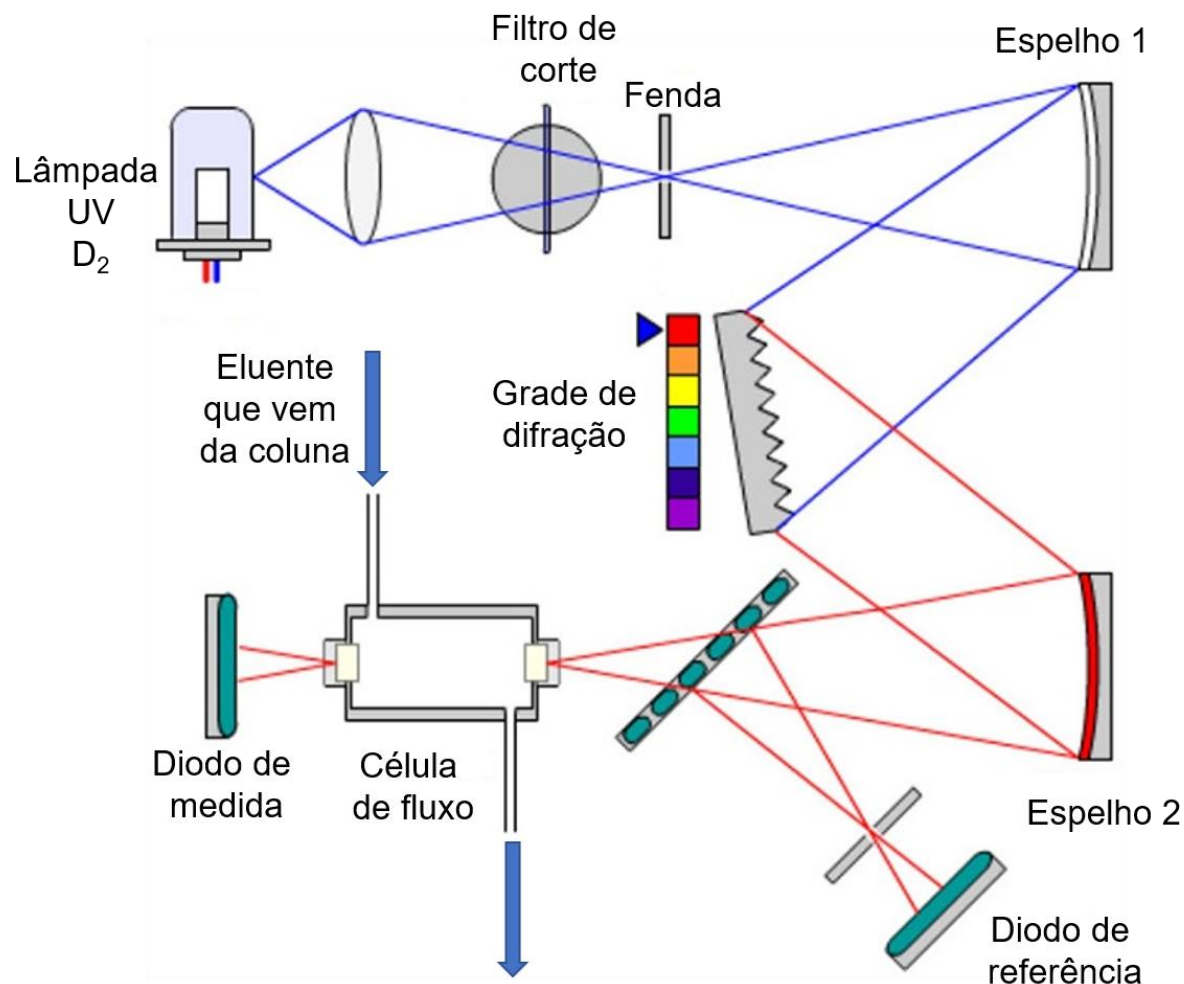


Figura 5. Representação esquemática de um detector de UV-Vis utilizado em HPLC.

Fonte: Adaptado de LCGC NORTH AMERICA (2018).

Neste detector, a luz é colimada através de uma fenda que permite que o feixe de luz caia sobre uma grade de difração, que divide a luz branca em seus comprimentos de onda componentes. A grade gira em um estágio eletromecânico, que direciona a parte desejada do espectro para uma fenda adicional através da qual um pequeno número de comprimentos de onda (tipicamente 2 nm) poderá passar. À medida que o analito elui na célula de fluxo, ele absorve a luz e as mudanças na transmitância da luz (medida em unidades de miliabsorbância, mAU) são registradas por meio do diodo de medição. O diodo de referência é usado para fazer correções

de flutuações na intensidade da lâmpada e, assim, melhorar a estabilidade óptica e o desempenho do instrumento. Para que a detecção seja bem conduzida pelo UV-Vis, deve-se atentar para o comprimento de onda máximo de absorção do solvente, para que não interfira na análise (LCGC NORTH AMERICA, 2018).

Como a molécula de PQ possui grupo cromóforo e absorve no comprimento de onda de 257 nm, a utilização do sistema LC-UV para sua determinação é uma das mais difundidas. Os métodos LC-UV conseguem chegar a LOD na faixa de 0,008 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, desde que seja feito algum processo de pré-concentração do herbicida. A maioria das aplicações de LC-UV utiliza colunas de fase reversa, costumeiramente C_{18} , o que torna necessário o uso de pareadores iônicos na fase móvel. Outra característica dessas análises é a necessidade do uso de tampões com alta concentração de sais, principalmente fosfatos. A utilização de sistemas LC-DAD é uma opção para a confirmação do analito não apenas pelo tempo de retenção (t_R), como no caso do LC-UV, mas também pelo espectro de absorção do pico cromatográfico (HAMAMOTO; KATSUTA, 2018; OU SHA *et al.*, 2018; YAO *et al.*, 2020).

LC-MS e GC-MS são técnicas muito importantes na análise de resíduos de agrotóxicos como PQ por alinharem alta sensibilidade e seletividade ao utilizarem o analisador de massas para separar os íons de mesma razão massa/carga (m/z) gerados na fonte de ionização. O LC-MS é geralmente aplicado para analisar compostos polares e menos voláteis, enquanto o GC-MS é usado para compostos de baixa polaridade, voláteis e termicamente estáveis.

O PQ é um analito que não possui dificuldade quanto à ionização, o que facilita sua análise via LC-MS, especialmente utilizando-se ionização por eletrospray (ESI). Nos métodos LC-MS, quando se utilizam colunas de fase reversa, aplicam-se pareadores iônicos voláteis, uma vez que os pareadores iônicos comumente utilizados nos métodos LC-UV são incompatíveis com a MS. O uso de tampões também se faz necessário para análises via LC-MS, já que PQ necessita de uma fase móvel com elevada força iônica. Nesse caso, deve-se realizar a substituição de tampões fosfato por sais voláteis, devido à deposição na fonte de ionização. No entanto, esses reagentes podem contaminar o sistema de cromatografia, bem como a fonte de ESI e competir com PQ durante a ionização. Isso pode levar à supressão de íons com altos

níveis de ruído de fundo, o que, por sua vez, resulta em sensibilidade reduzida (TAKINO; DAISHIMA; YAMAGUCHI, 2000).

Métodos que utilizam o acoplamento de sistemas LC à espectrometria de massas em tandem (MS/MS) têm em sua estrutura um analisador de massas para isolar o íon de interesse, e outro analisador de massas para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua fragmentação. A análise de PQ via LC-MS/MS consegue contornar problemas de coeluição ou sobreposição dos picos cromatográficos, principalmente quando se tem DQ presente na mesma amostra. Outro artifício utilizado para se obter melhores resultados analíticos para esse tipo de análise, é a utilização de padrões analíticos de PQ marcados isotopicamente, como o PQ-d₆, o que possibilita avaliar com grande confiabilidade os efeitos de matriz, dentre outros (HAO *et al.*, 2013).

Conforme citado, o uso de da cromatografia de fase reversa para a determinação de moléculas polares como o PQ geralmente não apresenta bom desempenho. Mesmo com o uso de pareadores iônicos, são observadas limitações que podem causar problemas quantitativos na análise do herbicida. Uma alternativa ao uso dos pareadores iônicos para a determinação de compostos polares ou iônicos é a utilização da cromatografia de interação hidrofílica, do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC). A HILIC é uma modalidade de separação na qual é empregada uma FE mais polar do que em fase reversa e uma FM com pouca concentração de água ou tampão (40 – 3%), e grandes quantidades de solvente orgânico (60 – 97%), tipicamente ACN, que resulta em uma baixa viscosidade da FM, que implica menores pressões nas análises em HPLC, e, conseqüentemente, menos ruído (MCCALLEY, 2017). A baixa viscosidade da FM em HILIC aumenta a difusão da amostra na coluna, o que resulta em picos mais largos (SONG *et al.*, 2016). O uso da alta proporção de solvente orgânico facilita a utilização de HILIC com a espectrometria de massas (GAMA *et al.*, 2012).

As FEs utilizadas em HILIC mais comuns são suportadas em sílica: nua (não derivatizada), quimicamente ligadas a grupos polares, carregadas ou zwitteriônicas. A Figura 6 exemplifica as FE citadas. Dentre estas FE, destaca-se a zwitteriônica, composta por uma molécula eletricamente neutra, mas que possui cargas opostas em diferentes átomos. Essa estrutura química possui propriedades bastante interessantes do ponto de vista analítico, como solubilidade em água, propriedade

anfóteras (variável com o pH) e ponto de fusão elevado, o que permite maior versatilidade quanto às separações cromatográficas (QIAO; SHI; XU, 2016).

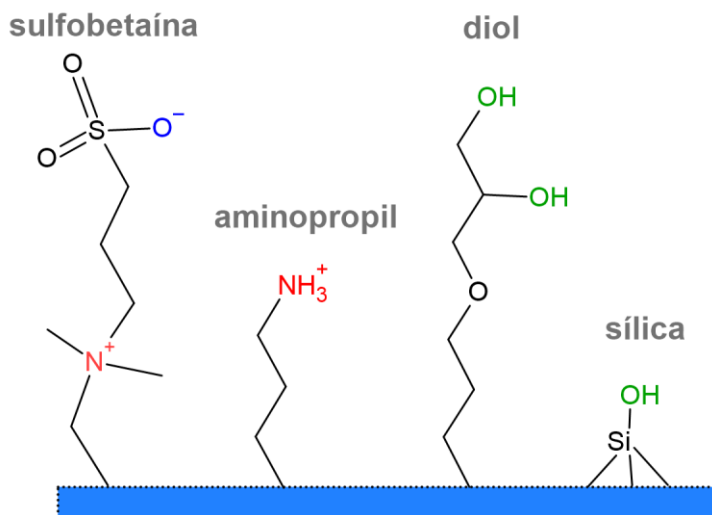


Figura 6. Fases estacionárias comumente utilizadas em HILIC.

Fonte: autoria própria.

HILIC foi empregada com sucesso para a determinação de PQ em amostras de água (HAMAMOTO; KATSUTA, 2018; HAO *et al.*, 2013; JAYANTA; LEEPIPATPIBOON, 2018). A retenção de moléculas polares como PQ em HILIC é descrita como um mecanismo de modo misto. A partição de compostos polares entre uma camada enriquecida com água imobilizada na superfície da FE e uma fase móvel altamente orgânica é considerada o principal mecanismo de retenção, seguido das interações eletrostáticas e das interações de ligação de hidrogênio. Além disso, outras interações, como interações dipolo-dipolo e até mesmo interações hidrofóbicas, podem estar envolvidas. A Figura 7 ilustra as interações de PQ com uma FE zwitteriônica.

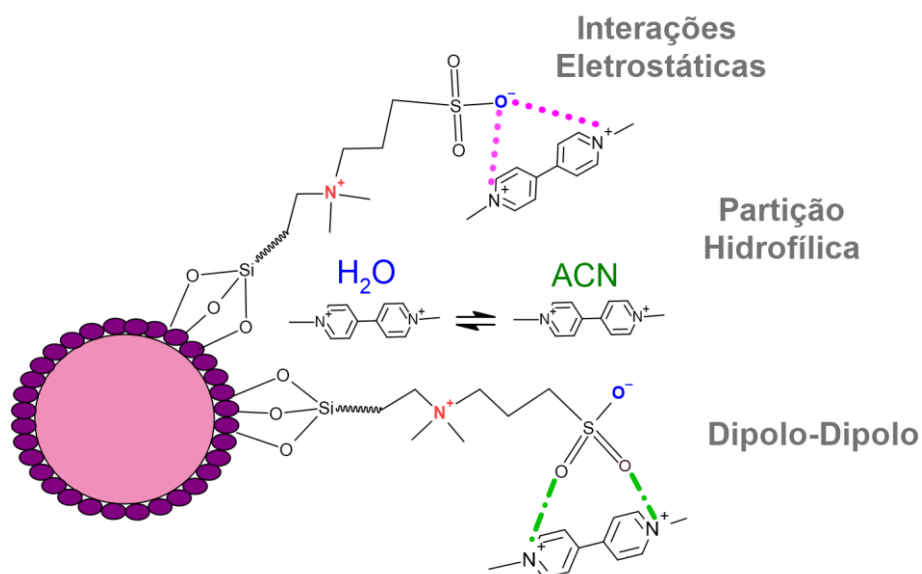


Figura 7. Interações de PQ com uma FE HILIC zwitteriônica de sulfobetaina (imagem fora de escala).

Fonte: autoria própria.

A combinação de FEs compostas por partículas superficialmente porosas juntamente com grupos químicos ligados que permitam operar em modo HILIC aparentam ser promissoras para a determinação de compostos altamente polares, além de terem sido pouco exploradas até o momento.

3.4.2 Outras técnicas instrumentais aplicadas na determinação de PQ

Além de HPLC, a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) são as outras técnicas de separação utilizadas na determinação de PQ em amostras de água. Técnicas eletroquímicas e espectroscópicas, dentre outras, também têm sido aplicadas.

O PQ é um agrotóxico não-volátil, o que faz com que seja necessária a realização de uma reação de derivatização para torná-lo passível de análise por GC. Para isso, a reação mais utilizada é a redução química com borohidreto de sódio (NaBH_4) para a obtenção de um composto perhidrogenado volátil, que é pré-concentrado por meio da SPME para posterior análise em GC-MS.

CE e suas técnicas derivadas, como a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*), foram empregadas com bastante êxito na determinação de PQ em amostras de água. Uma característica das separações eletroforéticas em capilar é a alta resolução, o que requer um pequeno volume a injeção de um pequeno volume de amostra, o que torna a detecção de baixas concentrações inviáveis. Além disso, a utilização da detecção UV nessas técnicas apresenta algumas dificuldades devido ao comprimento óptico curto e ao pequeno diâmetro interno dos capilares empregados. Para contornar tais limitações, técnicas de pré-concentração on-line, como o *stacking* (empilhamento), são aplicadas na determinação de PQ.

O *stacking* consiste em injetar um grande volume de amostra dissolvido em uma solução mais diluída que o tampão que será empregado na análise, e introduzi-lo no capilar por injeção hidrodinâmica e, em seguida, aplicar a tensão. Desse modo, a intensidade do campo elétrico será maior na região de baixa condutividade, portanto a velocidade do analito carregado nessa região será maior. Com esse procedimento, a banda larga de injeção, ocasionada pelo maior volume de amostra inserido no capilar, é comprimida em uma banda estreita, permitindo não só um aumento na detectabilidade do método, mas também na eficiência (BONATO, 2010).

A utilização de técnicas de pré-concentração on-line (CHUI; THANG; SEE, 2017; NÚÑEZ *et al.*, 2002, 2001), como o *stacking*, ou *off-line* (ACEDO-VALENZUELA *et al.*, 2004; NÚÑEZ; MOYANO; GALCERAN, 2002; ZHOU *et al.*, 2010), como SPE, permite que os métodos eletroforéticos obtenham LODs de 0,075 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando detectores UV ou DAD.

Os métodos espectroscópicos relatados para a determinação de PQ possuem um enfoque maior no desenvolvimento de novos materiais, principalmente em escala nanométrica, para aplicação em técnicas de fluorescência, ultravioleta/visível e espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, do *inglês surface enhanced Raman spectroscopy*), com destaque para a primeira. Os materiais desenvolvidos para as determinações por fluorescência consistem em estruturas químicas utilizadas como sondas, que possuem propriedades fotoluminescentes quando não ligadas ao PQ e que ao interagirem com o herbicida, por meio do mecanismo de transferência de elétrons fotoinduzido tem a atividade extinta. Assim, é realizada a detecção de fluorescência indireta de PQ, que apresenta vantagens como baixo custo, quantidade

de amostra reduzida, detecção de alta sensibilidade, como por exemplo, $3,0 \text{ ng L}^{-1}$ (DURÁN; CONTENTO; RÍOS, 2013).

O número de métodos eletroanalíticos para a determinação de PQ têm aumentado consideravelmente. Assim como os métodos espectroscópicos, o enfoque também está no desenvolvimento de materiais para utilizar, por exemplo, como sensores eletroquímicos em métodos voltamétricos. As aplicações encontradas mostram que as técnicas eletroanalíticas possuem vantagens como menor custo, análise mais rápida, maior aplicabilidade e menores limites de detecção, permitindo alcançar, por exemplo, LOD de $0,044 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para amostras de água de rio (SOUZA, D. De; MACHADO; PIRES, 2006).

4. Materiais e métodos

4.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa estão listados abaixo:

- Sistema HPLC-UV/Vis, modelo Ultimate 3000 (Dionex, EUA), equipado com:
 - Amostrador automático WPS3000 (Dionex, EUA);
 - Termostato TCC-3000 (Dionex, EUA);
 - Detector UV/Vis (Dionex, EUA);
 - Sistema de aquisição de dados Chromeleon V 4.1 (Dionex, EUA);

O sistema HPLC-UV/Vis utilizado nesta pesquisa pode ser visualizado na Figura 8.



Figura 8. Sistema HPLC-UV/Vis modelo Ultimate 3000 (Dionex, EUA).

Fonte: o autor.

- Balança analítica de precisão APX-200 (Denver Instrument, EUA);
 - Micropipetadores automáticos com capacidade variável Transferpette® S (Brand, Alemanha);
 - pHmetro modelo DM-22 equipado com eletrodo de vidro combinado (Digimed, Brasil).
-
- Colunas analíticas:
 - HILIC-Z Poroshell 120 (100 x 4,6 mm; 4 µm) (Agilent Technologies, EUA);
 - LiChrospher® 100 CN LiChroCART® (250 x 4,6 mm; 5 µm) (Supelco, EUA);
 - Unisol Venusil Amide (250 x 2,1 mm; 5 µm) (Agela Technologies, EUA)

4.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa seguem descritos:

- Padrão sólido de dicloreto de paraquate (Sigma Aldrich, EUA);
- Acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, EUA)
- Água ultrapura, obtida em sistema Millipore Milli-Q Direct UV3R (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA);
- Formiato de amônio (Sigma Aldrich, EUA);
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich, EUA);
- Hexano (Sigma Aldrich, EUA);
- Diclorodimetilsilano (Sigma Aldrich, EUA);

Os materiais utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa seguem descritos:

- Tubo de polipropileno, com tampas de rosca com capacidade de 50 mL (Nest Biotechnology, China);
- Filtros de seringa PTFE de 13 mm e porosidade de 0,22 µm (Whatman, China);

- Filtros de membrana celulose regenerada de 13 mm e porosidade de 0,22 μm para filtrar fase móvel (Agilent Technologies, EUA);
- Frascos de vidro (vial), capacidade de 2 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Frascos de polipropileno (vial), capacidade de 1,5 mL (Agilent Technologies, EUA);
- Tubos Eppendorf, capacidade de 2 mL (Eppendorf, Brasil);
- Vidrarias comuns de laboratório.

4.3 Preparo das soluções analíticas

Preparou-se uma solução estoque individual na concentração de 1000 mg L^{-1} a partir do padrão sólido de PQ em água ultrapura com 10% (v/v) de ACN (ANASTASSIADES *et al.*, 2021). A partir dessa solução individual, preparou-se uma solução intermediária na concentração 10 mg L^{-1} . Estas soluções foram acondicionadas em frascos de polipropileno em temperatura inferior a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (freezer). Todas as soluções foram preparadas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) e em água ultrapura para avaliar o comportamento dos padrões e intensidades do sinal analítico nesses solventes. Além disso, foram avaliados os solventes de preparo das soluções-padrão.

4.4 Condições do sistema HPLC-UV/Vis

As condições cromatográficas foram testadas e definidas a partir das informações disponíveis na literatura.

A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida a 30 $^{\circ}\text{C}$ e o volume de injeção no sistema HPLC-UV/Vis foi otimizado em 50 μL . A temperatura do amostrador foi mantida a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Inicialmente, para a verificação da intensidade dos sinais e dos tempos de retenção do analito, injetou-se uma solução na concentração de 1,0 mg L^{-1} preparada

em água ultrapura. Empregou-se a fase móvel constituída por (A) solução tampão aquosa de formiato de amônio 50 mmol L⁻¹, pH 3,0 ajustado com ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. O modo de eluição isocrático foi avaliado nas variações de 40 a 95% de B; com vazão de 0,8 mL min⁻¹ e tempo de análise de 6 min. Empregou-se o modo de eluição isocrática na proporção de 35:65 A/B (v/v).

4.5 Preparo das amostras

Amostras de água da torneira foram obtidas na cidade de Porto Alegre, RS, no mês de junho de 2022. As amostras foram coletadas em um tubo de polipropileno de 30 mL e filtradas com filtro de seringa PTFE de 0,22 µm. As amostras foram filtradas diretamente para o vial de polipropileno e seguiram para a análise cromatográfica.

4.6 Validação do método analítico

A validação do método proposto nesta pesquisa foi avaliada pela determinação dos parâmetros de seletividade, efeito matriz, curva analítica e faixa linear, limites de quantificação e detecção, exatidão através de ensaio de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária (reprodutibilidade), todos dispostos nos Anexos desta dissertação (item 8).

A solução branco utilizada em todos os ensaios consistiu em uma amostra de água da torneira que apresentou um pico com baixa intensidade no mesmo tempo de retenção que o PQ, o que pode indicar que a água utilizada apresenta resíduos do analito abaixo do LOQ.

A avaliação do efeito matriz foi realizada pela comparação estatística entre a inclinação da curva analítica preparada em solvente e a inclinação obtida na curva analítica preparada na matriz (água de torneira), conforme a equação (1) descrita no item 8.1.1 e as equações (2, 2.1 e 2.2) do item 8.1.2.

A linearidade foi avaliada nas curvas analíticas preparadas em seis níveis de concentração em vial de vidro não desativados, sendo estes 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,5 mg L⁻¹. Posteriormente, após a otimização em vials de polipropileno, a linearidade foi obtida para concentrações entre 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg L⁻¹.

As curvas de calibração foram injetadas em triplicata e a média das áreas foi utilizada para a obtenção da regressão linear e dos coeficientes de determinação (r^2) para cada caso, utilizando o Microsoft Office® Excel 2019. As avaliações estatísticas do coeficiente angular e do coeficiente linear foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) e do teste t de Student, respectivamente.

O limite de quantificação (LOQ) foi definido por meio do método da curva analítica, conforme a equação 6 no item 8.1.6. O limite de detecção (LOD) foi definido assim como o LOQ, conforme equação 5 no item 8.1.5.

A exatidão e precisão (em termos de repetibilidade) do método proposto foram avaliadas através das porcentagens de recuperação e RSD (%). Avaliou-se 3 níveis de fortificação (5,0, 25,0 e 100,0 µg L⁻¹). Para cada nível de fortificação foram feitas 3 réplicas e o cálculo da recuperação foi realizado de acordo com a equação (4) e do RSD conforme a equação (3), ambas descritas no item 8.1.4 e 8.1.3, respectivamente. Para a verificação da precisão intermediária, foi preparado um ensaio de fortificação no nível de 50,0 µg L⁻¹.

5. Resultados e discussão

5.1 Condições do sistema HPLC-UV/Vis

Testes iniciais foram realizados com colunas que possuíam FE funcionalizadas com grupos polares amida e ciano. Embora os métodos reportados na literatura com FE polares para a determinação de PQ por HPLC-UV, em sua maioria, utilizem FM contendo tampão, optou-se por desenvolver um método que fosse livre de solução tampão, para evitar prejuízos na vida útil da coluna e de todo o sistema cromatográfico. Todos os testes de separação foram realizados no comprimento de onda de 257 nm, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura do forno da coluna em 25 °C.

Nos primeiros testes para o desenvolvimento do método, utilizou-se água ultrapura acidificada na FMA (1% de ácido acético, v/v) e ACN na FMB. Para a separação do analito empregou-se uma coluna com fase estacionária à base de sílica com grupos ciano (CN) quimicamente ligados, o que possibilitaria operar em modo HILIC e reter compostos polares (VASS *et al.*, 2016). Embora a composição da FMA tenha sido variada de 5 a 95% em relação à FMB, não foi possível obter a separação do PQ nestas condições. Além disso, quando a amostra foi acidificada nas mesmas condições das FM, o ácido acético absorveu neste comprimento de onda, sendo eluído logo após o volume morto da coluna. Os testes foram repetidos para as mesmas composições de FMA e MeOH como FMB e observou-se as mesmas limitações em relação à interferência do ácido acético na detecção. A Figura 9 mostra os cromatogramas obtidos para soluções de PQ utilizando-se FMA:FMB (50:50, v/v).

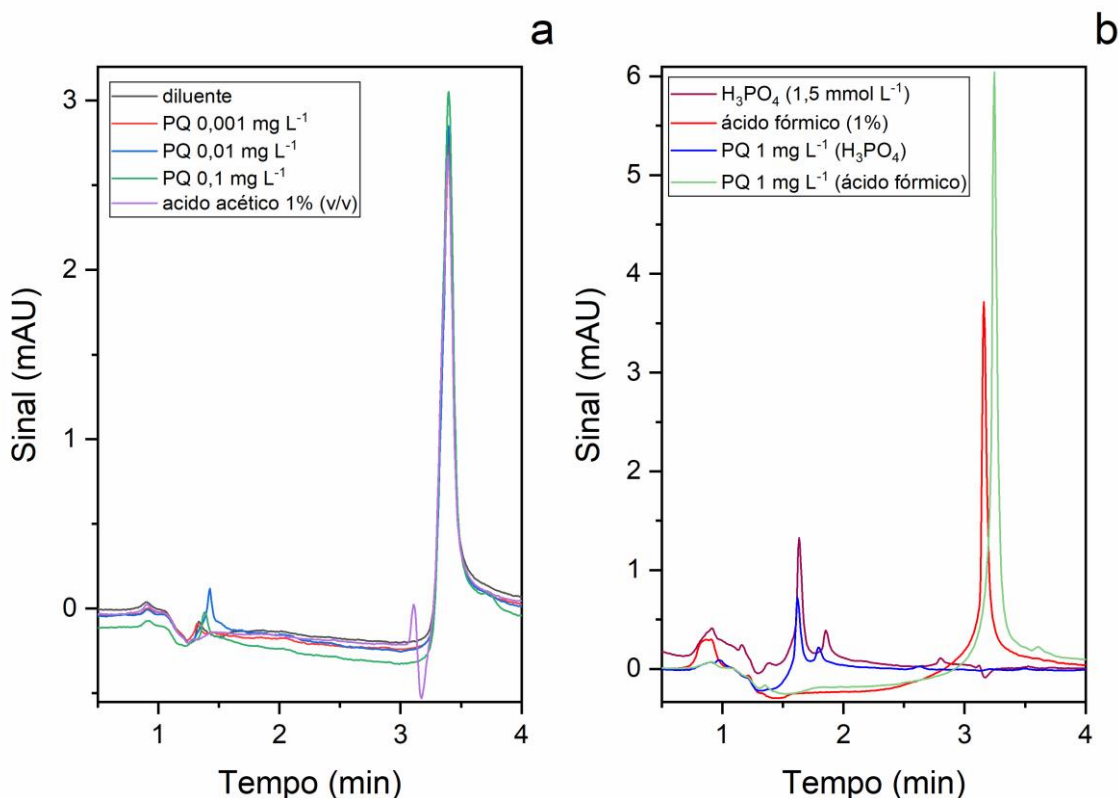


Figura 9. Cromatogramas de soluções de PQ obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária ciano. Condições: ácido acético 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. (a) interferência do ácido acético (volume de injeção $10 \mu\text{L}$) e (b) emprego dos ácidos fosfórico e fórmico (volume de injeção $5 \mu\text{L}$).

Fonte: o autor.

A Figura 9.a) mostra os cromatogramas das injeções de $10 \mu\text{L}$ do diluente utilizado nas amostras, ACN:ácido acético 1% (v/v) (1:1), bem como soluções de PQ nas concentrações de 0,1; 0,01 e $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ neste mesmo diluente e a solução de ácido acético 1% utilizada. É possível perceber que um pico de mesma intensidade se repete em todas as injeções próximo de 3,4 min, diferente do que seria esperado se esse pico fosse do PQ, pois deveria haver variação nas intensidades devido às três concentrações distintas injetadas. Isso indica que o PQ não foi eluído nestas condições e que o ácido acético absorveu neste comprimento de onda da análise, causando interferência, o que poderia levar a falsas conclusões.

Para contornar a absorção do ácido acético nesse comprimento de onda, optou-se por acidificar a amostra e a FMA com ácido fosfórico e ácido fórmico. Embora a retenção do PQ também não tenha sido possível com a utilização destas novas

condições, estes ácidos não interferiram na análise cromatográfica. A Figura 9.b) mostra os cromatogramas de injeções de 5 μL de soluções de PQ 1,0 mg L^{-1} , em que foi utilizado ácido fosfórico 1,5 mmol L^{-1} e ácido fórmico 1% (v/v) como diluentes das soluções, bem como as injeções destes diluentes.

Dado que os resultados obtidos com a coluna de FE ciano não foram satisfatórios, foram realizadas novas tentativas empregando-se uma coluna dotada de outro grupo polar quimicamente ligado, grupo amida (CONH_2), que também opera em modo HILIC. No entanto, as mesmas limitações anteriores foram observadas, uma vez que o PQ não foi retido nesta coluna sob as mesmas condições cromatográficas testadas anteriormente. A Figura 10 mostra os cromatogramas referentes às injeções de 5 μL de soluções de PQ 10,0 mg L^{-1} utilizando-se $\text{ACN:H}_2\text{O}$ (1:1), (v/v) e $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1), (v/v) como diluentes, bem como os cromatogramas dos diluentes utilizados. É possível observar que as intensidades das soluções que contêm PQ são maiores na região do tempo de volume morto, indicando que esse composto não foi eluído. Além disso, o pico referente ao PQ que utiliza ACN ao invés de MeOH apresentou significativa diferença de área.

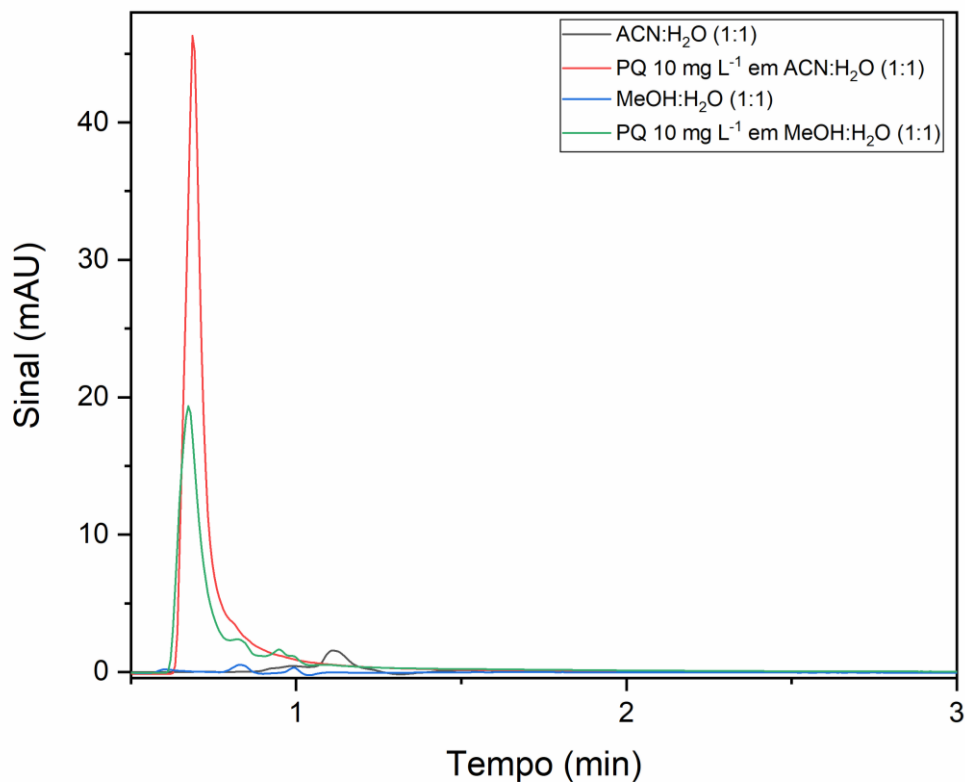


Figura 10. Cromatogramas de soluções de PQ em ACN e MeOH obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária amida. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção $5 \mu\text{L}$.

Fonte: o autor.

Como forma adicional de verificação de que o pico observado no tempo de volume morto é referente ao analito não eluído, foram realizadas injeções de diferentes volumes de injeção de uma solução de PQ $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,5 μL . Na Figura 11, observa-se um aumento da intensidade dos picos conforme o aumento do volume de injeção, o que evidencia, mais uma vez, que o PQ não foi eluído nestas condições.

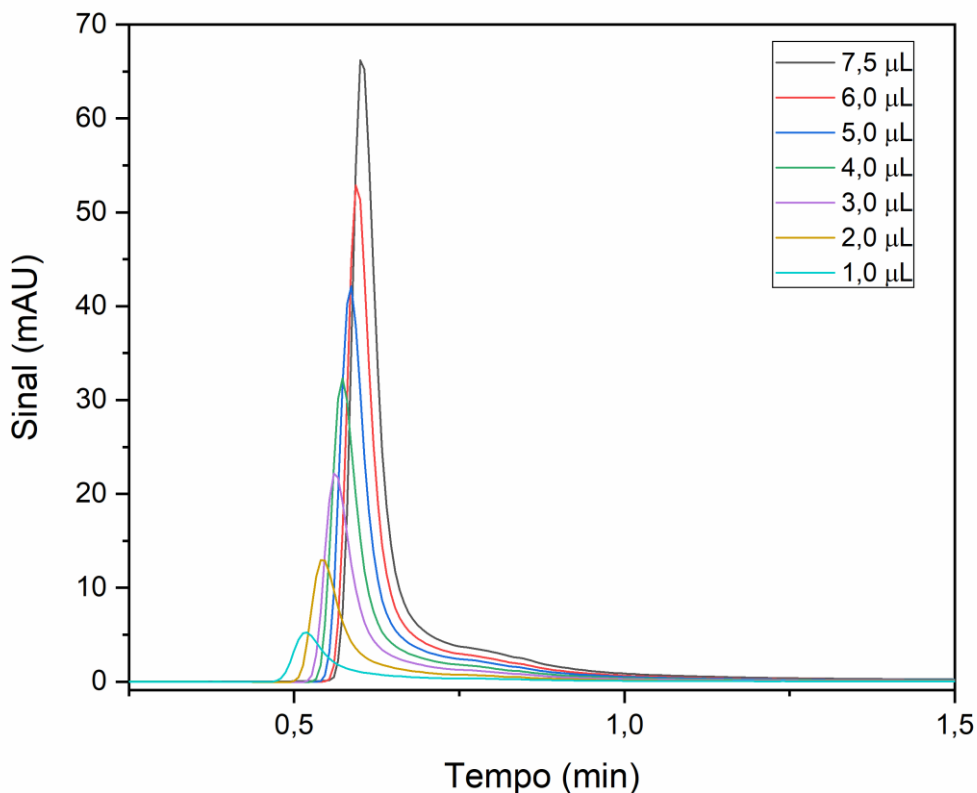


Figura 11. Cromatogramas de diferentes volumes de injeção de uma solução de PQ $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN obtidos com o emprego de uma coluna de fase estacionária amida. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v) e fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Fonte: o autor.

Para a realização de novos testes, adquiriu-se uma coluna HILIC, que é capaz de reter compostos altamente polares sem a necessidade de adição de reagentes de pareamento iônico. Empregou-se a coluna HILIC-Z Poroshell nas mesmas condições testadas antes, novamente sem obter sucesso na retenção do PQ. Também foram utilizados compostos apolares, como o-xileno e tolueno, nas concentrações de $5,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, como marcadores de tempo de retenção de um composto não retido (t_M). Conforme esperado, esses compostos não ficaram retidos nesta coluna, o mesmo que ocorreu com PQ, demonstrado na Figura 12.

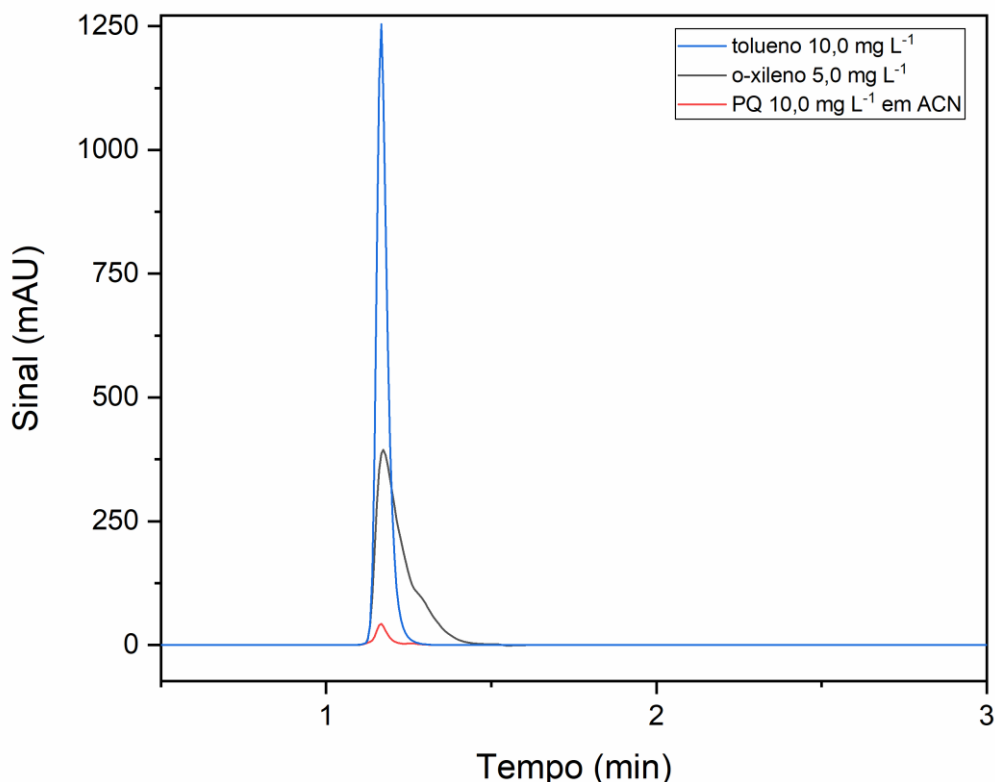


Figura 12. Cromatogramas das soluções de tolueno $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, o-xileno $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e PQ $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN, obtidos com o emprego da coluna HILIC-Z. Condições: ácido fórmico 1% (v/v):ACN (50:50, v/v), fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Fonte: o autor.

A partir da constatação de que não seria possível realizar a separação de PQ nessas condições, avaliou-se o uso de tampão para a retenção do analito nessa coluna. Valendo-se dos dados da literatura, preparou-se uma solução de formiato de amônio de 200 mmol L^{-1} (pH $\sim 3,0$). Para a FMA diluiu-se essa solução na proporção 10:90 (v/v) a fim de se obter uma solução aquosa de formiato de amônio 20 mmol L^{-1} ; para a FMB diluiu-se a solução de formiato de amônio de 200 mmol L^{-1} (pH $\sim 3,0$) em ACN na proporção 10:90 (v/v) para se obter uma solução de formiato de amônio na mesma concentração que a FMA. A temperatura escolhida foi $30 \text{ }^\circ\text{C}$, a vazão foi reduzida para $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção inicial testado foi de $5 \text{ } \mu\text{L}$.

A Figura 13 mostra o perfil cromatográfico de soluções de PQ $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN, em tampão (FMA:FMB (1:1), (v/v)) e em uma solução de ácido fórmico ajustado a pH 3,0. A intensidade dos picos em que se utilizou tampão e ácido fórmico mostrou-

se mais pronunciada, sendo maior no último. Dessa forma, optou-se pelo uso de uma solução de ácido fórmico ajustado em pH 3,0, próximo ao da FM, como diluente das soluções de PQ.

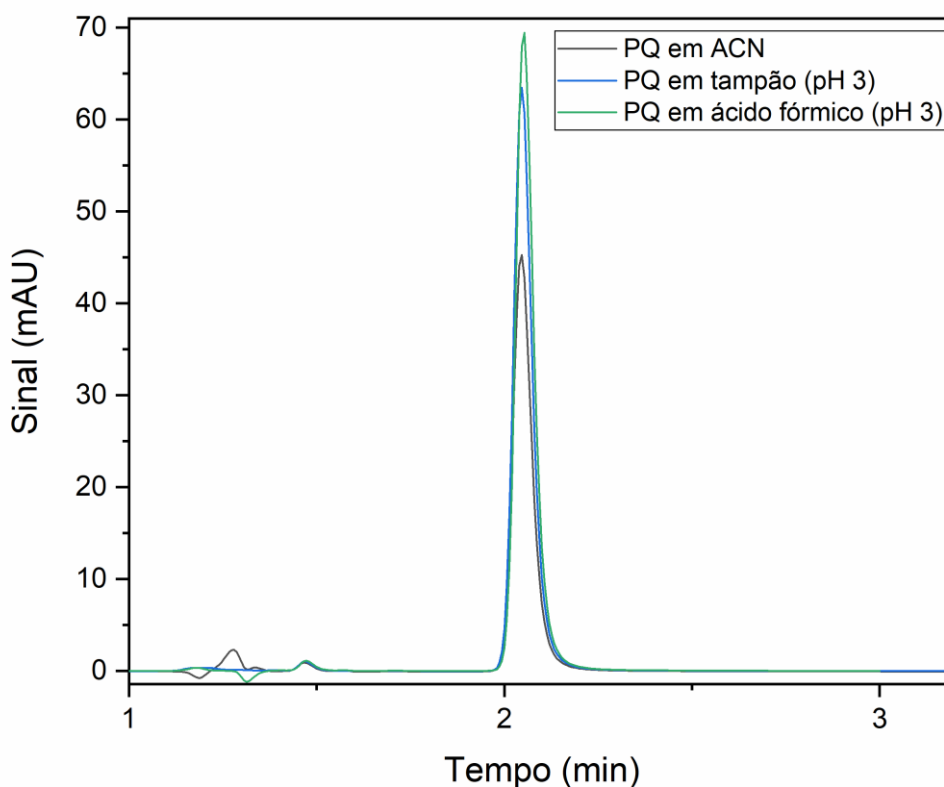


Figura 13. Cromatogramas das soluções de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PQ em ACN, em tampão de mesma proporção utilizado na FM e em ácido fórmico ajustado em pH 3,0, empregando-se a coluna HILIC-Z. Condições: formiato de amônio 20 mmol L^{-1} (pH 3,0):formiato de amônio 20 mmol L^{-1} em ACN (50:50, v/v) e fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Fonte: o autor.

A fim de se verificar a operação da coluna no modo HILIC, a composição da FM foi avaliada variando-se a FMA de 40 a 95% em relação à FMB, conforme demonstrado na Figura 14. Sabe-se que neste modo de separação, o aumento da proporção da fase orgânica deve levar ao aumento da retenção de um analito polar, uma vez que os equilíbrios de partição entre a FM, rica em solvente orgânico, e a camada de água imobilizada sobre a FE são favorecidos, levando a maior retenção de solutos polares.

Adicionalmente, não foi observada variação da área dos picos de PQ com a variação da composição da FM, no entanto, com o aumento da proporção da fase orgânica, houve uma diminuição da altura dos picos seguido de aumento da largura da base. Para se obter uma condição em que a retenção do PQ fosse adequada, com fator de retenção (k) maior do que 2 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), optou-se pela proporção de 30:70 v/v (FMA:FMB). Utilizou-se tolueno como marcador de t_M , empregado na obtenção do k , calculado conforme a equação 7.

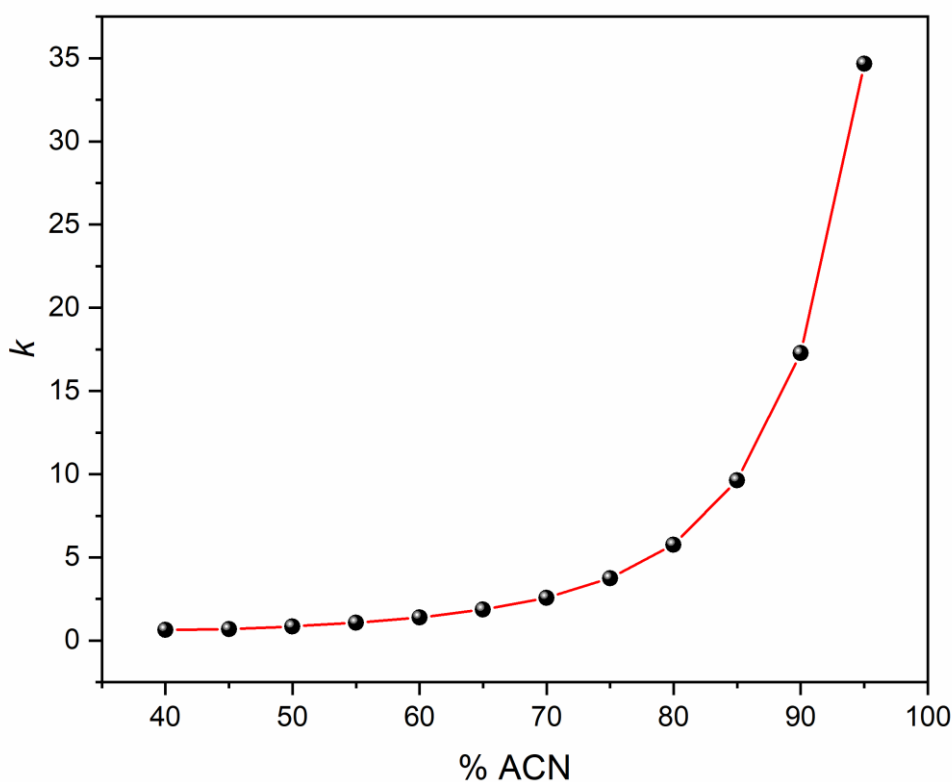


Figura 14. Avaliação do fator de retenção do PQ frente à variação de ACN na composição da FMB na coluna HILIC-Z. Condições: formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ (pH 3,0):formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ em ACN (FMA:FMB); fluxo 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.

Fonte: o autor.

A Figura 14 mostra o perfil de retenção de PQ na coluna HILIC-Z e o seu comportamento sob as condições citadas. Nota-se que com o aumento da fração orgânica ACN, há um aumento da retenção do composto altamente polar. Isso ocorre

porque quanto maior a quantidade de solvente orgânico na FM, maior é a diferença de polaridade entre a camada de água imobilizada sobre a superfície polar da FE e a FM, composta pelo solvente orgânico e por água, fazendo com que o analito polar permaneça preferencialmente retido na camada de água imobilizada e aumentando a sua retenção (LI, Y.; LEE, 2009).

O aumento da retenção de PQ com o aumento da proporção de fase móvel orgânica de 45 a 75% de ACN também está evidenciado na Figura 15. É possível observar que neste intervalo a largura da base dos picos mais do que dobra e a altura dos picos cromatográficos diminui cerca de 43%, preservando-se as áreas referentes aos respectivos picos (RSD 1,4%) para injeções de 5 μ L da mesma solução de 10,0 mg L^{-1} . Além disso, houve uma melhora nos formatos dos picos, com a diminuição da assimetria de pico de 1,22 para 1,05.

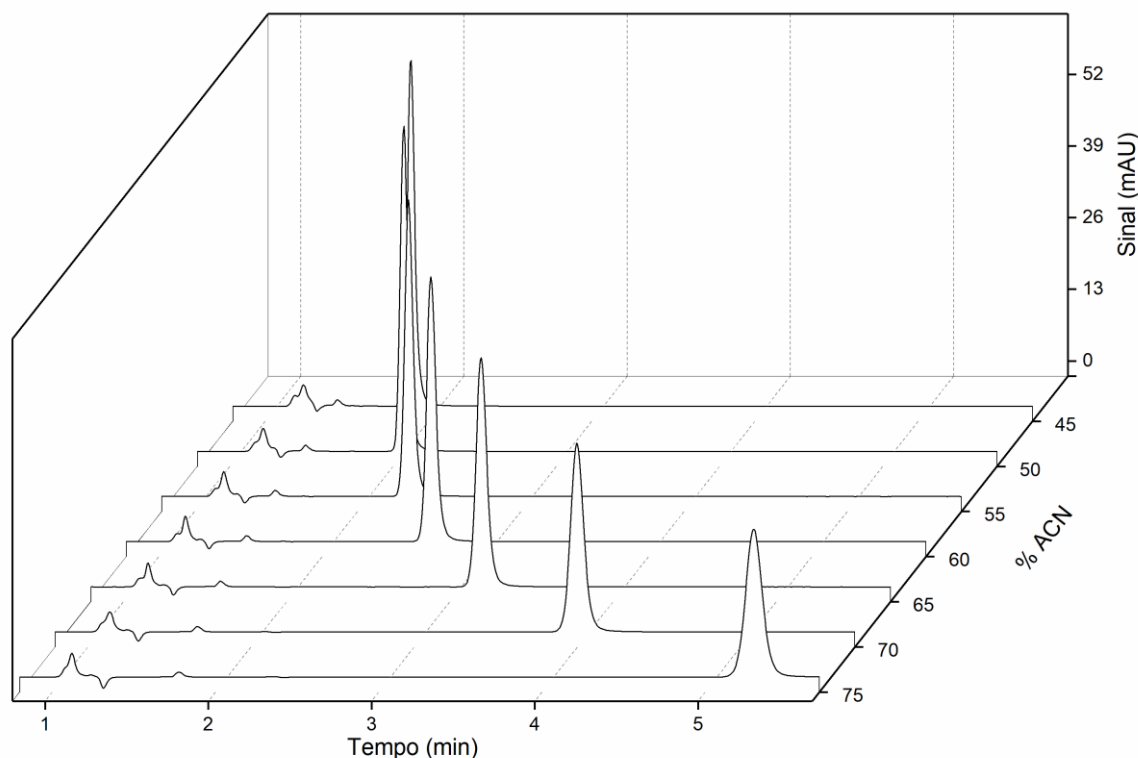


Figura 15. Comportamento cromatográfico do PQ frente a variação de 45 a 75% de ACN na composição da FM na coluna HILIC-Z. Condições: fluxo 0,8 mL min^{-1} e volume de injeção de 5 μ L.

Fonte: o autor.

A coluna empregada utiliza a tecnologia Poroshell, ou seja, são de partículas superficialmente porosas com o núcleo rígido, o que possibilita um aumento na taxa de transferência de massa, levando a separações rápidas, mais eficientes e com baixas pressões. A pressão de trabalho não ultrapassou 640 psi e a resposta cromatográfica mostrou-se reprodutível em relação a área e t_R , com um período de 30 minutos de condicionamento da coluna com a FM antes do início das injeções. Além disso, notou-se que a coluna possui um tempo de reequilíbrio rápido, indicado pela repetibilidade de t_R do PQ (RSD < 0,5%). Assim, com 5 volumes de coluna, cerca de 5 mL de FM, foi possível reestabelecer as condições de análise.

Devido às limitações encontradas com relação à disponibilidade de ACN no mercado, avaliou-se a troca do solvente orgânico ACN por MeOH na composição da FM. Isso ocasionou uma diminuição no tempo de retenção do analito, de modo que k foi menor do que 1, tornou o pico mais assimétrico e causou uma diminuição média em torno de 20% na área do PQ comparada com a área utilizando-se ACN, além de a pressão do sistema ter dobrado (1240 psi). A Figura 16 mostra os cromatogramas de soluções de PQ 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ utilizando-se como FMA tampão de formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ e FMB tampão de formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ em MeOH (15.a) e em ACN (15.b) na proporção de 25:75 (FMA:FMB). Esses resultados indicaram que a ACN foi o solvente orgânico mais adequado para a separação de PQ em modo HILIC.

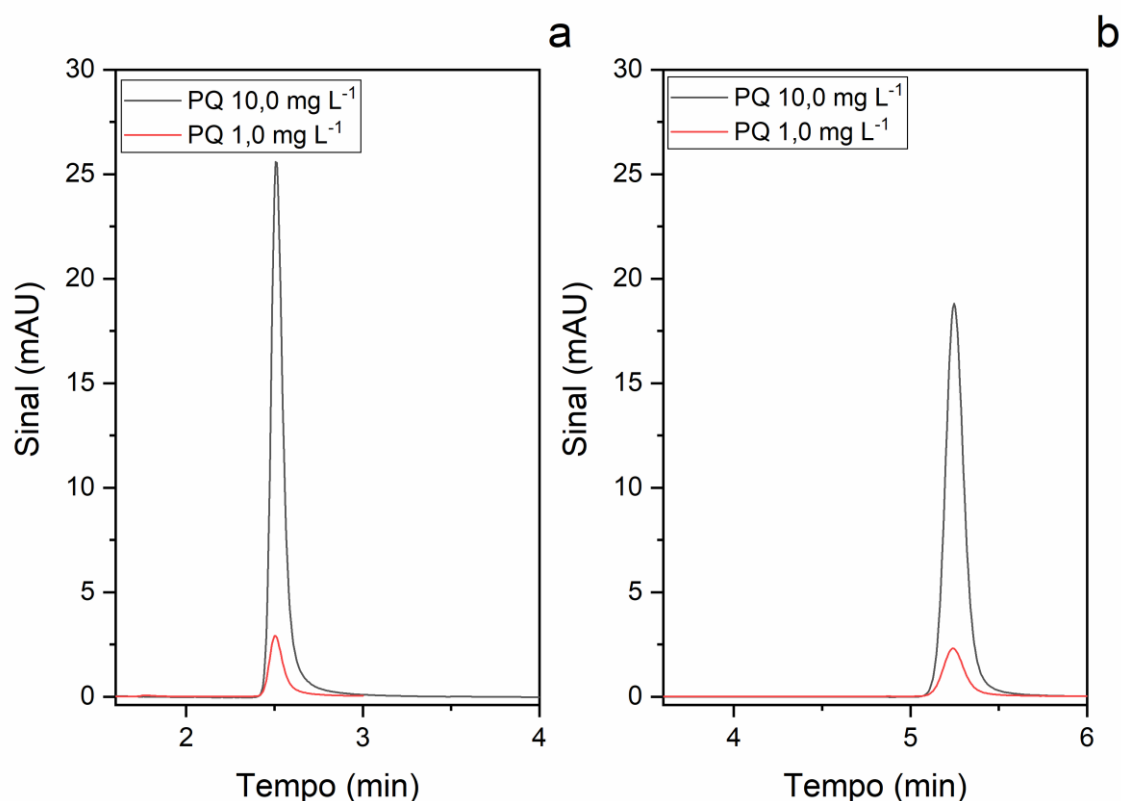


Figura 16. Cromatogramas de soluções de PQ 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ utilizando-se como FMA tampão de formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ e FMB tampão de formiato de amônio 20 mmol L⁻¹ em MeOH (16.a) e em ACN (16.b) na proporção de 25:75 (FMA:FMB), fluxo 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL.

Fonte: o autor.

Definidas as condições cromatográficas de análise, foram realizados testes com soluções mais diluídas de PQ, como 5,0; 1,0 e 0,5 mg L⁻¹, que foram simultaneamente preparadas em MeOH. Cada nível de concentração foi injetado em triplicata. Para a solução de concentração 5,0 mg L⁻¹ não houve variação das áreas dos picos cromatográficos (RSD < 2%) durante as 3 injeções, todavia, para as soluções de 1,0 e 0,5 mg L⁻¹ observou-se uma variação mais acentuada nas áreas dos picos (RSD > 8%). No dia seguinte, as mesmas soluções que haviam sido guardadas no freezer a -4 °C foram reinjetadas. A solução de 5,0 mg L⁻¹ não apresentou variação na área do pico, a solução de 1,0 mg L⁻¹ teve uma redução de cerca de 50% da área do pico com relação ao dia anterior e a solução de 0,5 mg L⁻¹ sequer pode ter integrada a área do pico cromatográfico.

Por se acreditar que o solvente em que o analito estava contido poderia ter interferido na determinação das áreas, novos testes foram realizados com soluções de concentração de PQ iguais a 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 10,0 mg L⁻¹, em que foram novamente preparadas em ACN ao mesmo tempo e injetadas em triplicata. A Figura 17 mostra a curva analítica obtida. Notou-se que alguns pontos se mostraram fora da faixa linear, embora as medidas de dispersão tenham sido baixas (RSD < 9%) e que os testes de Dixon para verificação de *outliers* não indicaram que esses valores devessem ser retirados (Q(6), $p = 0,01$). Entretanto, o ponto 1,0 mg L⁻¹ foi o que teve a maior medida de dispersão comparado aos outros (8,4%), o que poderia indicar que a partir dessa concentração, a resposta analítica do PQ poderia ser diferente de linear.

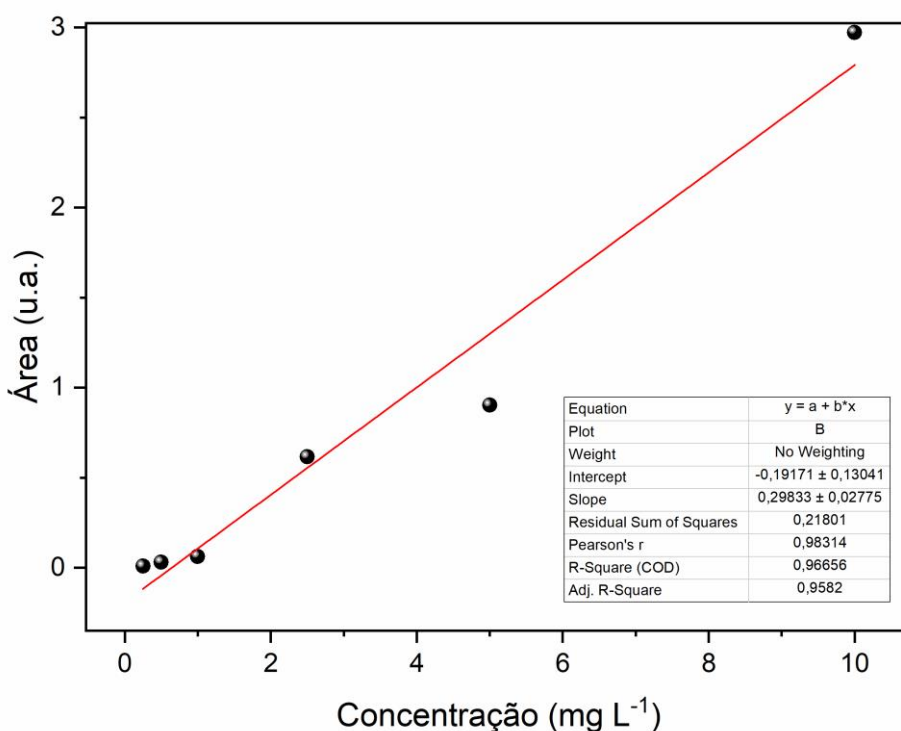


Figura 17. Curva analítica do PQ preparada em solvente (ACN).

Fonte: o autor.

Para verificar a existência de efeito matriz, soluções de mesma concentração, 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 10,0 mg L⁻¹, foram preparadas em água da torneira ao mesmo tempo e injetadas em triplicata. A Figura 18 mostra a curva analítica com as soluções

de PQ preparadas em água da torneira. Nota-se que o coeficiente de correlação (r) foi maior do que aquele obtido com as soluções preparadas em ACN. Além disso, o coeficiente angular da equação da reta foi ligeiramente maior do que o obtido em ACN, o que indica que não há um efeito matriz de supressão do sinal analítico.

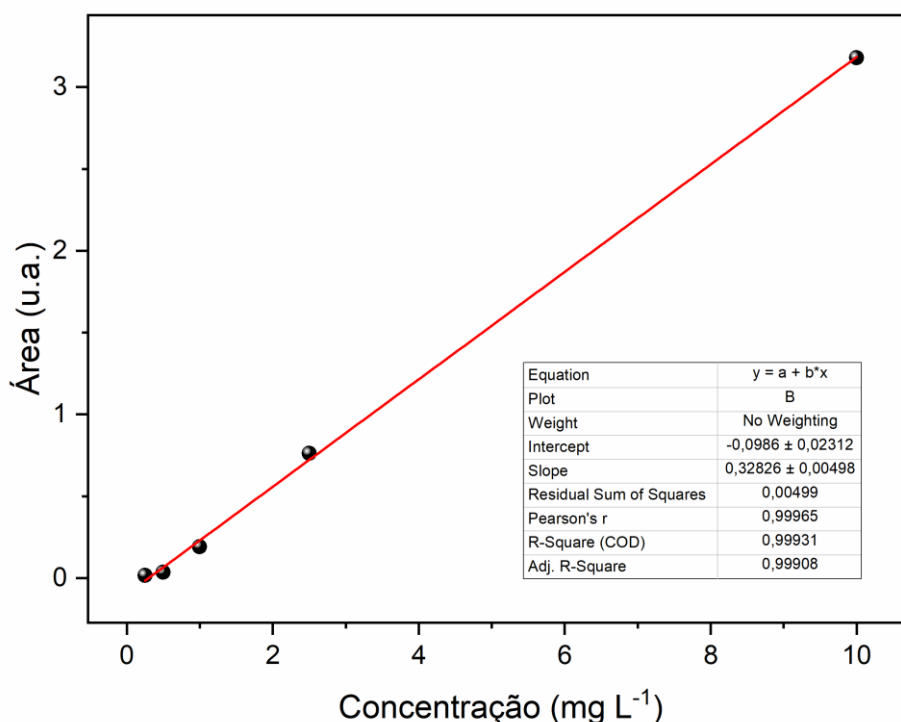


Figura 18. Curva analítica do PQ preparada em matriz (água da torneira).

Fonte: o autor.

As soluções utilizadas na curva analítica preparadas em água da torneira foram guardadas no freezer a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e novamente injetadas em triplicata no dia seguinte. As soluções de $10,0$; $2,5$ e $1,0\text{ mg L}^{-1}$ obtiveram $\text{RSD} < 1,5\%$ entre as medidas, ou seja, menores do que as realizadas na leitura da curva analítica do dia anterior ($\text{RSD} < 5,0\%$). Todavia, houve significativa diminuição das áreas de pico de PQ comparadas às obtidas no dia anterior, principalmente nas soluções de menor concentração, de modo que, a solução de $0,25\text{ mg L}^{-1}$ sequer pode-se observar o pico cromatográfico. A Figura 19 mostra a variação das áreas de pico de PQ das soluções analisadas em

um intervalo de um dia. Observa-se que quanto menor a concentração de PQ, maior foi a diminuição de área comparada com o dia anterior.

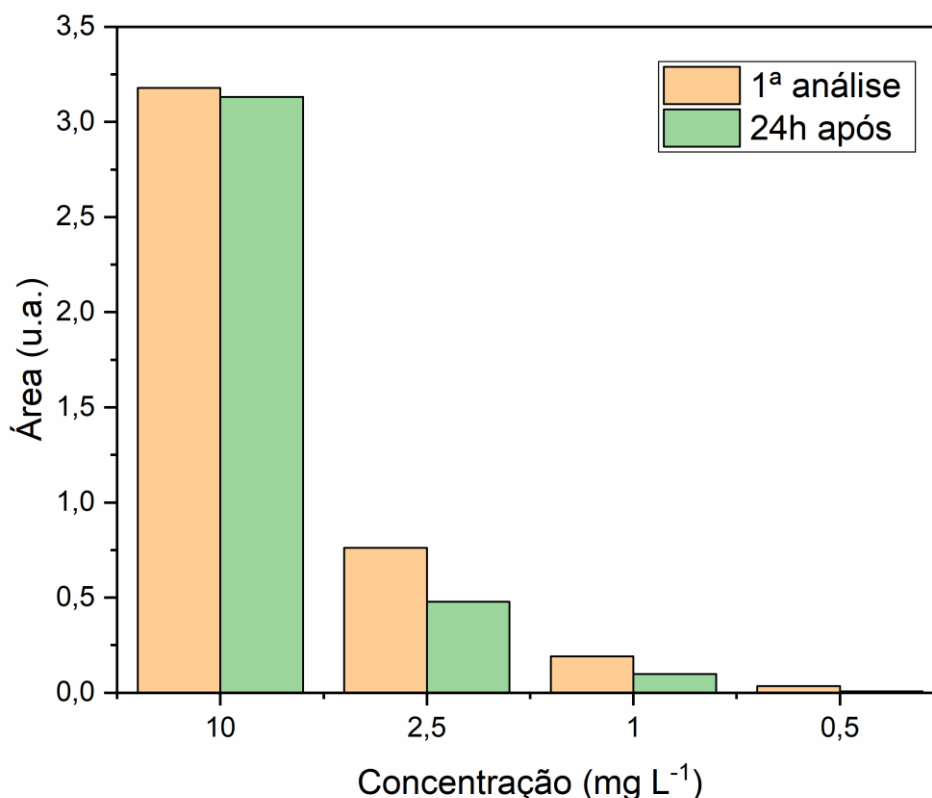


Figura 19. Variação das áreas de pico de PQ obtida de soluções analisadas em um intervalo de um dia.

Fonte: o autor.

Estas constatações indicaram que com o decorrer do tempo a solução de PQ poderia estar degradando, no entanto, não há relatos na literatura que descrevam este tipo de evento.

Como forma de averiguar se o pH do solvente estaria influenciando na diminuição do sinal analítico de PQ, foi testado o preparo das soluções de PQ em pH próximo ao da FM, pH 3,0, para as concentrações de 2,0; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹, ajustado com ácido fórmico, que foram comparadas a uma solução de 2,0 mg L⁻¹ preparada em ACN:H₂O (1:1, v/v) sem ajuste de pH. A Figura 20 mostra que, para as concentrações de 10,0 e 5,0 mg L⁻¹, o ajuste de pH em 3,0 não influenciou na variação

das áreas após um determinado tempo. Para a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ com ajuste de pH 3,0 percebe-se que as áreas dos picos cromatográficos diminuem com o decorrer do tempo, o que é atenuado ao se substituir o solvente por ACN:H₂O sem ajuste de pH, e está ilustrado no *insert* da Figura 20, que compara os dois solventes com a normalização do tempo.

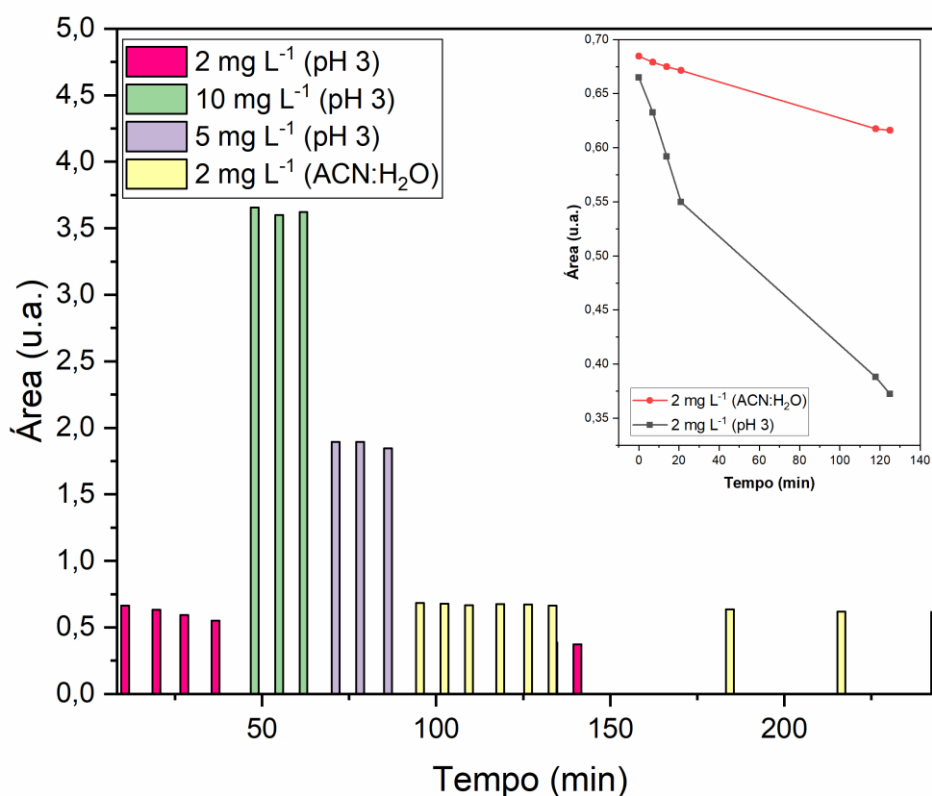


Figura 20. Áreas de picos de PQ obtidas de soluções sem ajuste e com ajuste de pH em 3,0, injetadas em diferentes tempos. O *insert* mostra a variação das áreas dos picos de PQ referentes às soluções de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN:H₂O e em pH 3,0.

Fonte: o autor.

Dado que as soluções de PQ utilizando ACN:H₂O (1:1, v/v) como solvente e sem ajuste de pH apresentaram melhor resultado quanto a possível degradação, uma nova curva analítica foi proposta. Para isso, utilizaram-se soluções de concentração 0,01; 0,1; 0,5; 2,0 e 5,0 mg L^{-1} , todas preparadas ao mesmo tempo. Para as duas soluções de concentração mais baixa, não foi possível realizar a integração da área

do pico e obter o sinal analítico. A Figura 21 mostra a curva analítica preparada em ACN:H₂O (1:1, v/v).

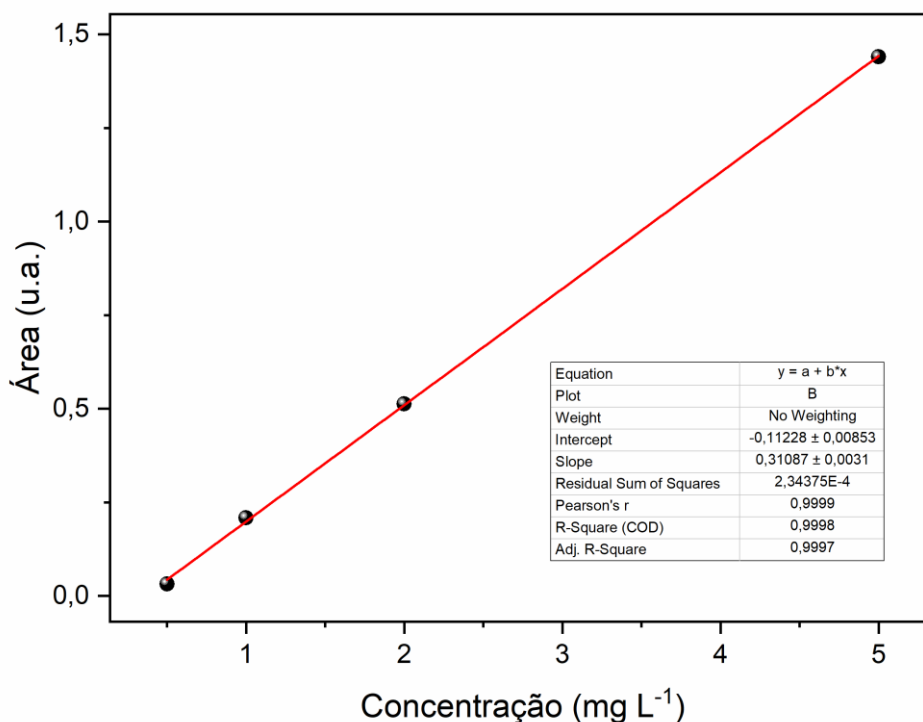


Figura 21. Curva analítica de PQ em soluções preparadas em ACN:H₂O (1:1, v/v).

Fonte: o autor.

Como as soluções de concentrações de PQ abaixo de 0,5 mg L⁻¹ não puderam ser quantificadas, optou-se por testes utilizando apenas água ultrapura como solvente para as concentrações de 0,4; 0,25 e 0,1 mg L⁻¹. Todas as soluções foram preparadas ao mesmo tempo e injetadas na sequência. A água ultrapura mostrou-se capaz de evitar a possível degradação de PQ nestas concentrações menores, como mostra a Figura 22. Para as soluções de 0,4 e 0,25 mg L⁻¹, as quatro injeções no intervalo de 2 horas resultaram em pouca variação das áreas dos picos cromatográficos (RSD < 3%); já a solução e 0,1 mg L⁻¹, a partir da terceira injeção, no intervalo de 1 hora, a área do pico já havia diminuído pela metade, resultando em uma elevada dispersão entre as medidas (RSD > 32%).

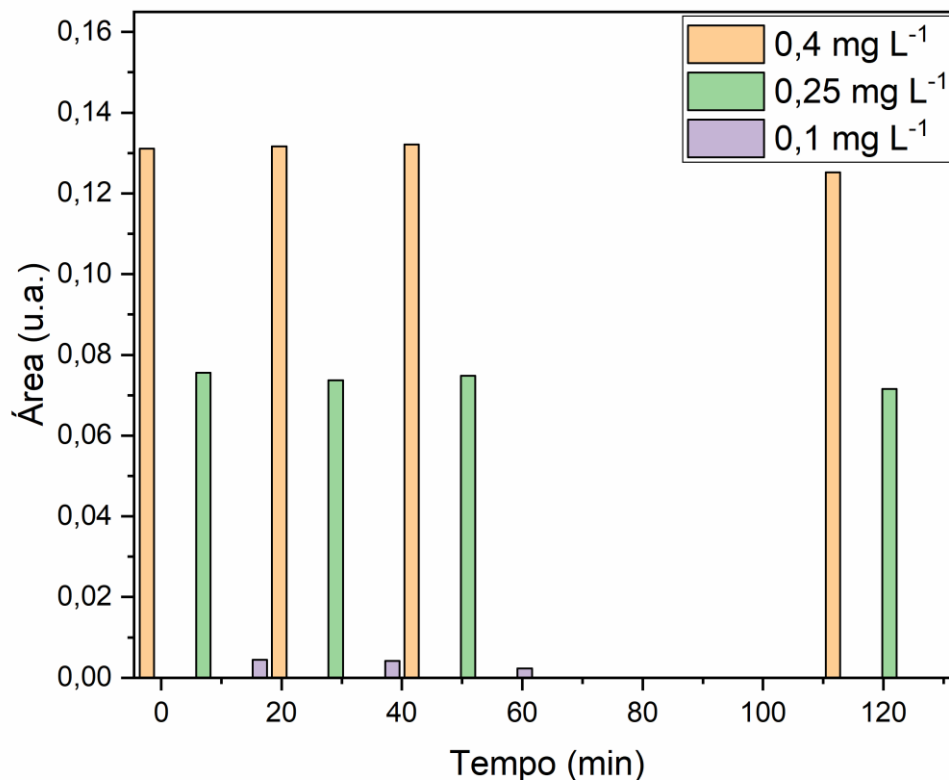


Figura 22. Áreas integradas referentes às soluções de PQ preparadas em água ultrapura no intervalo de 120 min.

Fonte: o autor.

Um novo teste foi realizado utilizando-se MeOH:H₂O (1:1, v/v) como solvente da solução de PQ na concentração de 0,5 mg L⁻¹ ao longo de 40 minutos em 4 injeções. O sinal analítico para essa concentração mostrou-se mais intenso do que aquele observado utilizando ACN:H₂O (1:1, v/v) como solvente. Além disso, houve apenas uma variação de 3% durante as medidas.

Diante disso, optou-se por realizar uma nova curva analítica empregando-se MeOH:H₂O (1:1, v/v) como solvente, em que foram utilizadas soluções de concentração 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 5,0 mg L⁻¹, e, dado que o tempo entre as injeções indicava diminuição do sinal analítico de PQ, cada solução foi preparada instantes antes das injeções. Esse artifício mostrou-se capaz de minimizar a diminuição das áreas dos picos cromatográficos entre as injeções em triplicata (RSD < 8%), embora não tenha sido possível quantificar a solução de concentração mais

baixa, e, por isso, esse ponto foi retirado da curva analítica. Dessa forma, obteve-se valores de LOQ e LOD de 0,178 e 0,053 mg L⁻¹, respectivamente. A Figura 23 mostra a curva analítica empregando-se MeOH:H₂O como solvente.

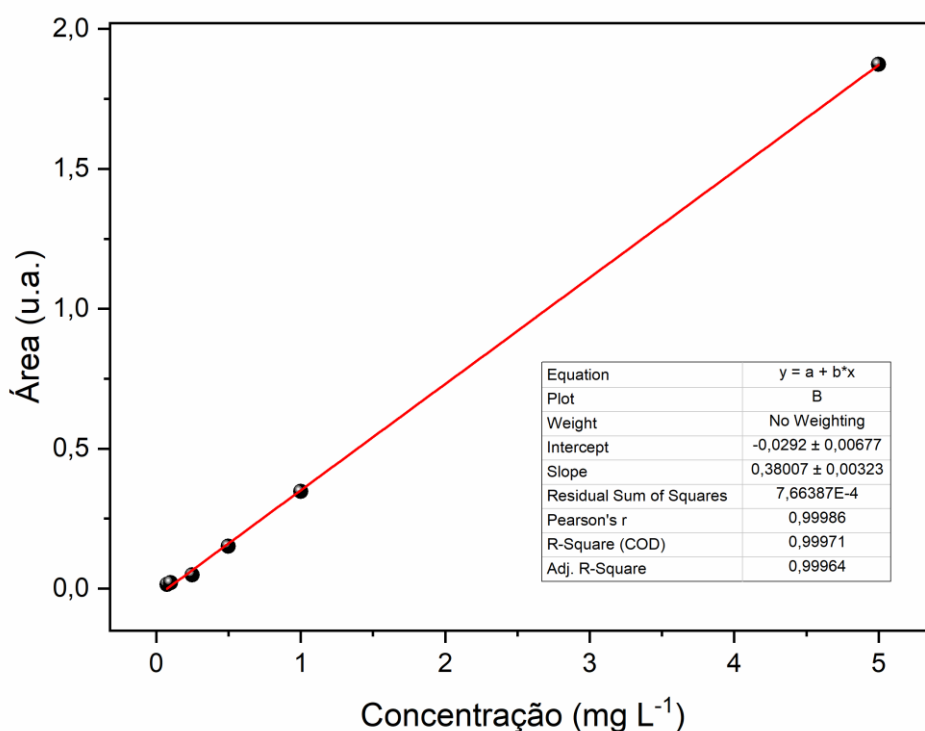


Figura 23. Curva analítica do PQ em MeOH:H₂O (1:1, v/v) obtida por injeção imediatamente após o preparo.

Fonte: o autor.

Uma vez que o artifício de preparar cada solução de PQ e na sequência injetá-la no sistema HPLC-UV tenha se mostrado a melhor opção, até então, para contornar os problemas de possível degradação, o mesmo foi aplicado com as soluções de PQ preparadas em água da torneira. Primeiramente, foram empregadas soluções de concentração 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹, mas, novamente, não foi possível obter pico cromatográfico suficiente para ser integrado com a solução de concentração mais baixa. Assim, empregou-se uma solução de concentração 0,06 mg L⁻¹ com sucesso como o ponto mais baixo da curva analítica. Os valores de coeficiente angular demonstraram que inexistiu efeito matriz, o que foi confirmado por meio do teste t de Student ($t(10) = 0,005$; $p = 0,99$), calculado conforme a equação 2. Os

valores de LOQ e LOD obtidos na matriz foram menores do que em MeOH:H₂O (1:1, v/v), 0,108 e 0,032 mg L⁻¹, respectivamente. A Figura 24 mostra a curva analítica empregando-se água da torneira como solvente.

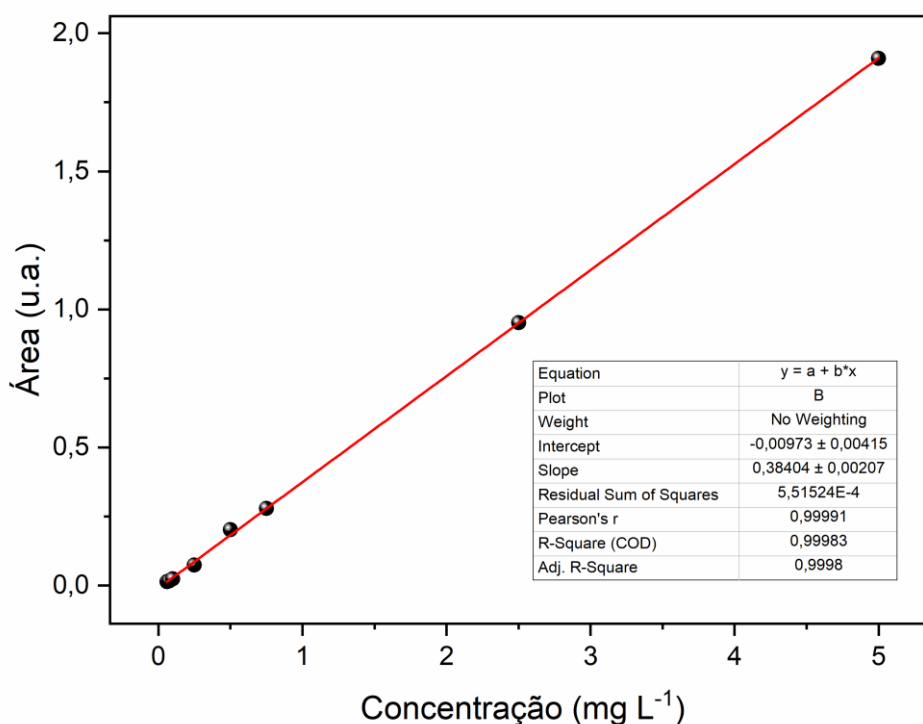


Figura 24. Curva analítica do PQ em água da torneira obtida por injeção imediatamente após o preparo.

Fonte: o autor.

Dado que os resultados na matriz obtiveram resultado ligeiramente melhores do que em solvente, avaliou-se mais uma vez a influência do pH. A água da torneira possui pH em torno de 6,60, enquanto o pH da água ultrapura é mais ácido, em torno de 5,50. Assim, foram preparadas soluções de 1,0 mg L⁻¹ de PQ em água ultrapura pH 6,60 e 7,70, e soluções de 1,0 mg L⁻¹ de PQ em MeOH:H₂O pH 6,60 (1:1, v/v) e MeOH:H₂O pH 7,70 (1:1, v/v), que foram injetadas em três instantes: 0, 30 e 90 minutos. Foi preparada uma solução adicional controle, com a mesma composição utilizada nas curvas analíticas, MeOH:H₂O (1:1, v/v). O ajuste de pH foi realizado com uma solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹.

A solução de PQ preparada em pH 6,60 obteve uma área cerca de 37% menor do que a solução preparada com a adição de MeOH e da solução controle. Com relação às soluções com ajuste de pH 7,70, não foi observada diminuição de área, todavia, houve uma diminuição de cerca de 13% em relação à solução controle.

Durante o intervalo de 30 minutos, todas as soluções obtiveram redução entre 6 e 13% de suas áreas, enquanto que no intervalo de 90 minutos, as soluções controle e em MeOH:H₂O pH 6,60 obtiveram as menores reduções, 25 e 16%, respectivamente. Embora a solução em MeOH:H₂O pH 7,70 (1:1, v/v) tenha tido uma redução de 15% em 90 minutos, essa solução já havia tido uma redução considerável quando comparada com a solução controle. A Figura 25 mostra a variação das áreas nos diferentes conjuntos de soluções de PQ 1,0 mg L⁻¹.

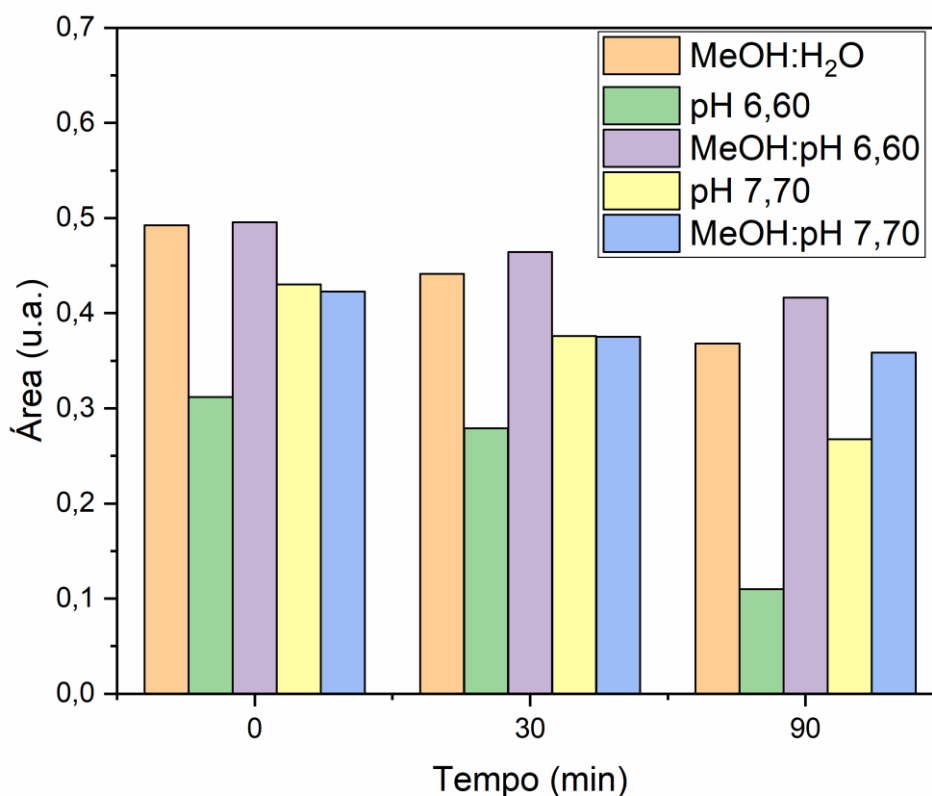


Figura 25. Variação das áreas nos diferentes conjuntos de soluções de PQ 1,0 mg L⁻¹ no intervalo de 90 min.

Fonte: o autor.

O mesmo conjunto de soluções descrito acima foi aplicado para a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, mas dado que as soluções preparadas em água ultrapura em pH 6,60 e 7,70 e em MeOH:H₂O pH 7,70 (1:1, v/v) obtiveram uma redução de mais de 55% em relação a solução controle (MeOH:H₂O), foi avaliado o efeito do tempo de 90 minutos apenas para as soluções controle e em MeOH:H₂O pH 6,60 (1:1, v/v), em que houve uma diminuição de 28 e 9%, respectivamente. Esses testes mostraram-se inconclusivos devido à enorme variabilidade dos resultados e poucas correlações possíveis para serem estabelecidas.

O tempo entre o preparo das soluções e a injeção mostrou-se capaz de alterar significativamente os resultados. Para as concentrações menores, esse intervalo entre o preparo à injeção é ainda mais crítico. Como não foi possível precisar esse tempo, um método que baseado em injeções instantaneamente após o preparo das soluções poderia dar resultados com grande variação, o que prejudicaria a confiabilidade destes dados.

Uma nova hipótese relatada em alguns trabalhos, de que o PQ adsorve em vidro, foi aventada (HAO *et al.*, 2013). Dado que em solução PQ apresenta carga positiva, isso explicaria a atração pelos silanóis nas superfícies dos materiais de vidro, o que faria com que a molécula adsorvesse nas paredes das vidrarias empregadas, reduzindo sua concentração com o passar do tempo. Este fenômeno seria mais evidente em soluções de baixa concentração

Para testar se estava ocorrendo adsorção durante o processo de análise, foi preparada uma solução de PQ em água ultrapura na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ em material de polipropileno (PP). Essa solução foi posteriormente colocada em vials de PP, vidro e vidro desativado.

O processo de desativação de vidro consiste em tratar o vidro por meio de uma reação em que são inseridos grupos hidrofóbicos a fim de desativar os silanóis. Para isso, são utilizados reagentes silanizantes, costumeiramente, clorosilanos. Em contato com um grupo silanol (SiOH), os clorosilanos reagem liberando HCl e dão origem a uma ligação Si-O-Si e a introdução de um polímero de cadeia curta (SEED, 1994).

A reação de silanização foi realizada utilizando-se diclorodimetilsilano (DMCS) 5% em tolueno. A vidraria foi mergulhada nessa solução por 24h. Como o DMCS é extremamente volátil e inflamável, todo esse processo foi realizado em capela de exaustão, pois durante a reação, vapores de HCl são liberados. Durante a incubação,

o silano irá evaporar, depositar-se na superfície da vidraria e polimerizar. Após, foi feita uma lavagem com MeOH e a vidraria foi colocada em forno a 230 °C por 3h.

Submetidas à análise cromatográfica, as soluções de PQ acondicionadas em vials de vidro e vidro desativado obtiveram áreas menores do que a solução que estava em vial de PP, 12 e 6%, respectivamente. Entre as 4 injeções nos tempos 0, 20, 40 e 90 minutos o coeficiente de variação das áreas no vial de vidro foi de 7%, enquanto que nos vials de vidro desativado e de PP foi menor que 1%. Uma quinta injeção foi realizada 20h após a primeira injeção, e constatou-se uma significativa diminuição da área da solução que estava em vial de vidro em cerca de 60% da área inicial, o que acarretou um aumento do coeficiente de variação para 26%, o que não foi observado nas soluções que estavam em vials de vidro desativado e PP. A Figura 26 mostra o comportamento da mesma solução de PQ de 1,0 mg L⁻¹ acondicionada em vials de vidro, vidro desativado e PP no intervalo de 90 minutos.

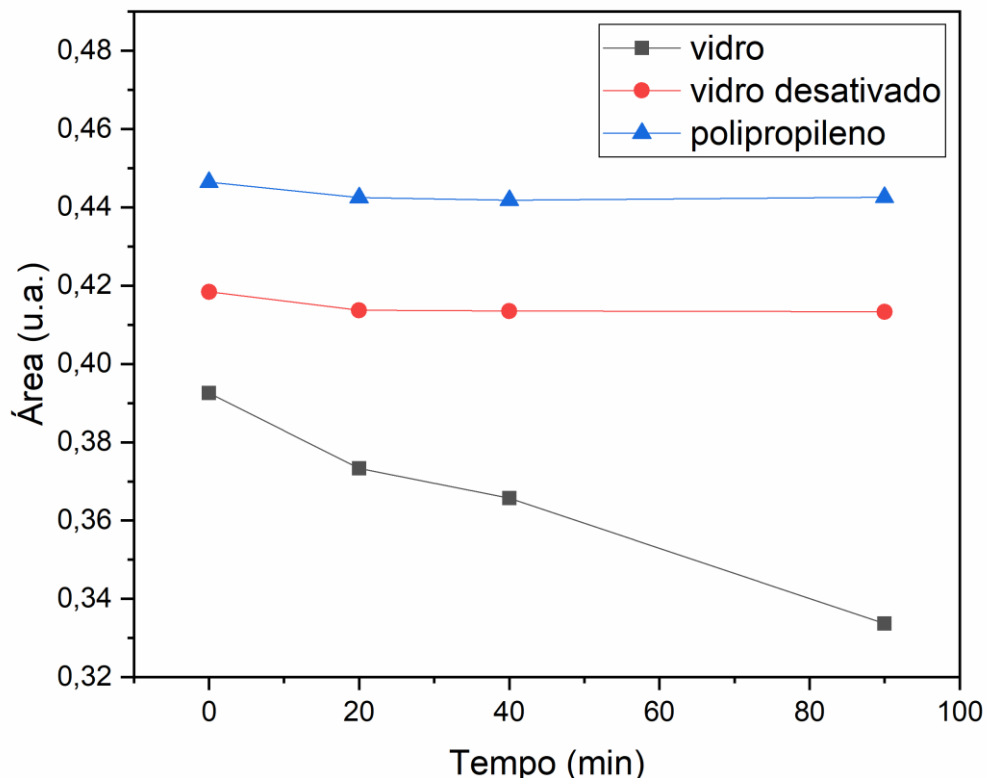


Figura 26. Comportamento da mesma solução de PQ de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ acondicionada em vials de vidro, vidro desativado e de PP no intervalo de 90 min.

Fonte: o autor.

Dessa forma, constatou-se que a causa da diminuição do sinal analítico de PQ durante as injeções no sistema cromatográfico decorria do processo de adsorção que estava possivelmente ocorrendo nos vials de vidro onde as soluções eram preparadas e acondicionadas. Uma possível explicação para o processo de adsorção pode ser atribuída à atração eletrostática das moléculas de PQ carregadas positivamente pelos grupos silanóis presentes nas paredes de vidro dos vials. Para que a adsorção não ocorresse durante as análises cromatográficas foram utilizados materiais de PP. Além disso, as soluções puderam ser preparadas todas ao mesmo tempo, sem a necessidade de preparo seguido de injeção instantaneamente posterior.

Outra mudança realizada no método foi a retirada de tampão de formiato de amônio do componente orgânico da FM. Avaliou-se que um possível entupimento no canal B do sistema cromatográfico poderia ter decorrido da presença do sal. Optou-

se por elevar a concentração do tampão ajustado em pH 3,0 com ácido fórmico na fase aquosa para 50 mmol L^{-1} , além de adicionar 0,1% de ácido fórmico na ACN. Utilizando-se a proporção de 35:65 (FMA:FMB) chegou-se a uma separação com k maior que 2. Essas alterações diminuíram o tempo de retenção do PQ, que antes era de 5,30 min e que agora passou para 4,93 min, sem modificar formato dos picos. O formato de pico de PQ costumeiramente é alargado devido à elevada polaridade e às inúmeras interações que ocorrem com a FE. A Figura 27 mostra a retenção de PQ utilizando-se 35% de FMA formiato de amônio 50 mmol L^{-1} (pH 3,0) e 65% de FMB ACN com 0,1% de ácido fórmico.

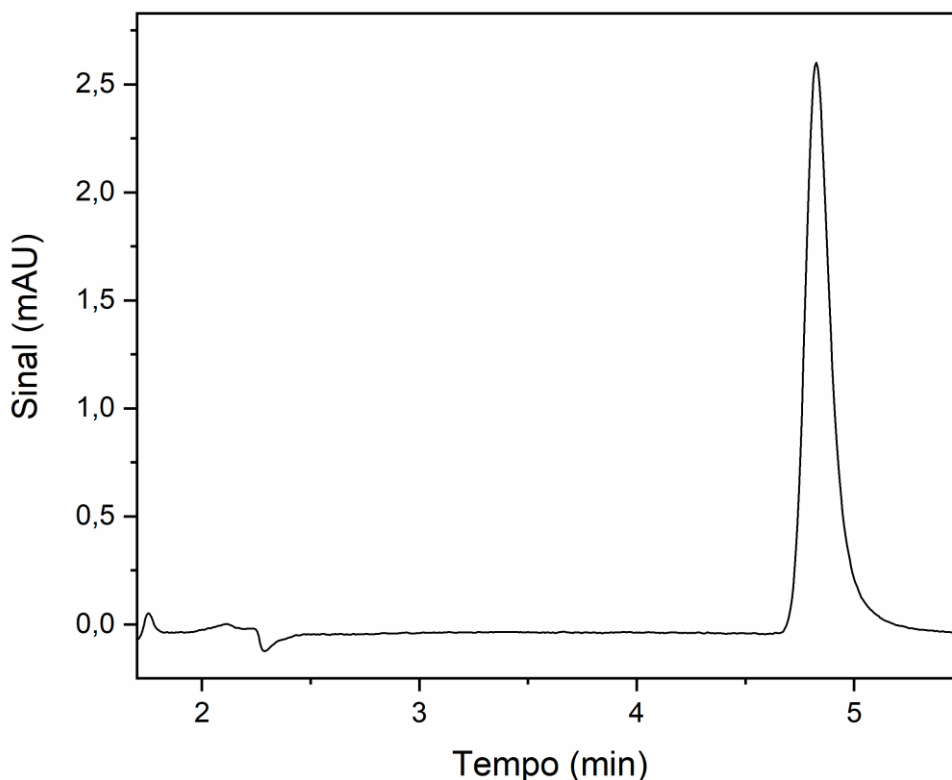


Figura 27. Cromatograma de PQ $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ utilizando-se formiato de amônio 50 mmol L^{-1} (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65). Condições: fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $5 \mu\text{L}$.

Fonte: o autor.

5.1.1 Estratégia de pré-concentração por injeção de grande volume

Como forma de se melhorar os resultados, a pré-concentração é uma estratégia costumeiramente utilizada para determinação de resíduos de agrotóxicos em água. Essa estratégia permite, por meio do preparo de amostra, isolar e pré-concentrar os analitos. Procedimentos como a SPE envolvem etapas adicionais, como evaporação do solvente e redissolução dos analitos na fase móvel, que requer o uso de reagentes e consumíveis, que tornam o processo analítico mais moroso e custoso e podem causar erros significativos. Em contraste, a injeção direta de grande volume (LVI, do inglês, *large volume injection*) de amostras de água reduz e simplifica o processo analítico de enriquecimento de analitos, pois requer uma única etapa de pré-tratamento de amostra: centrifugação ou filtração (LEONHARDT *et al.*, 2015).

LVI é definido como um volume de injeção $\geq 10\%$ do volume vazio da coluna. Injetar um grande volume de amostra diretamente na coluna cromatográfica aumenta a sensibilidade do método, uma vez que se tem maior massa do analito para detecção. Todavia, grandes volumes de injeção podem causar perda de eficiência no processo cromatográfico com a deterioração nos formatos dos picos e a perda na intensidade do sinal analítico. As limitações quanto ao volume de injeção dependem das dimensões da coluna, da hidrofobicidade do analito, do solvente de injeção e da natureza da fase estacionária (BUSETTI *et al.*, 2012).

Os métodos mais comuns baseados em LVI são aqueles em que o solvente da amostra é eluotropicamente fraco, como a água, no caso de separações cromatográficas em fase reversa. O solvente de eluição mais fraco que a fase móvel permite que o analito se concentre na cabeça da coluna e evita que ocorra alargamento ou distorção grave dos picos. Quando se utilizam amostras dissolvidas em solventes mais fortes ocorre uma perturbação local momentânea durante a transição pela coluna, ocasionada pela interrupção na distribuição de equilíbrio dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel, que pode causar distorção nas bandas do analito (LAYNE *et al.*, 2001).

Segundo os estudos de Ruta *et al.* (2010), embora o modo HILIC seja eficiente para a separação de compostos polares, ele não é compatível com a injeção direta de grandes volumes quando o solvente de injeção é a água. Dessa forma, os métodos

LVI desenvolvidos para o modo HILIC realizam a troca de solventes. Para a determinação de acrilamida em amostras de água, estas foram diretamente trocadas por solvente em diclorometano usando acetonitrila como intermediário. Após a troca do solvente, a amostra foi injetada diretamente em uma coluna HILIC (BACKE; YINGLING; JOHNSON, 2014).

As colunas com FE do tipo *core-shell* podem fornecer alta eficiência, mas o desempenho das partículas do núcleo é mais sensível à sobrecarga da amostra do que as partículas totalmente porosas, devido a menor área destinada aos processos de difusão dos analitos. Nestas colunas as interações ocorrem apenas nos poros que estão nas superfícies das partículas que compõem a FE, não podendo adentrar no núcleo destas partículas, ou seja, a área que o soluto tem para difundir é ainda menor quando comparada com as colunas totalmente porosas, que em tese, são as mais adequadas para esse tipo de estratégia. Tradicionalmente, colunas do tipo *core-shell* admitem volumes de injeção menores que colunas totalmente porosas.

Os métodos cromatográficos LVI para colunas *core-shell* relatados são, até o momento, são para colunas com FE que tradicionalmente operam em modo de fase reversa. O efeito da sobrecarga de volume de injeção no desempenho de colunas *core-shell* C₁₈ com partículas de tamanho 2,6 µm e diferentes comprimentos (50, 100 e 150 mm) foi estudado para a determinação de enantiômeros de aminoácidos por um método LVI. Sob condições otimizadas, o volume de injeção de 50 µL foi selecionado para a coluna de 150 mm, consideravelmente menor quando comparado a métodos LVI para colunas com FE dotadas de partículas totalmente porosas de mesmo tamanho (OLAH; TARNAI; FEKETE, 2013).

A fim de se avaliar o efeito do volume de injeção na área de pico do PQ, uma solução de PQ de 1,0 mg L⁻¹ foi injetada em diferentes volumes: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 50 µL. A Figura 28 mostra a relação gráfica estabelecida entre o volume de injeção e a área de pico obtida para essa solução, nela foi possível observar a correlação linear existente.

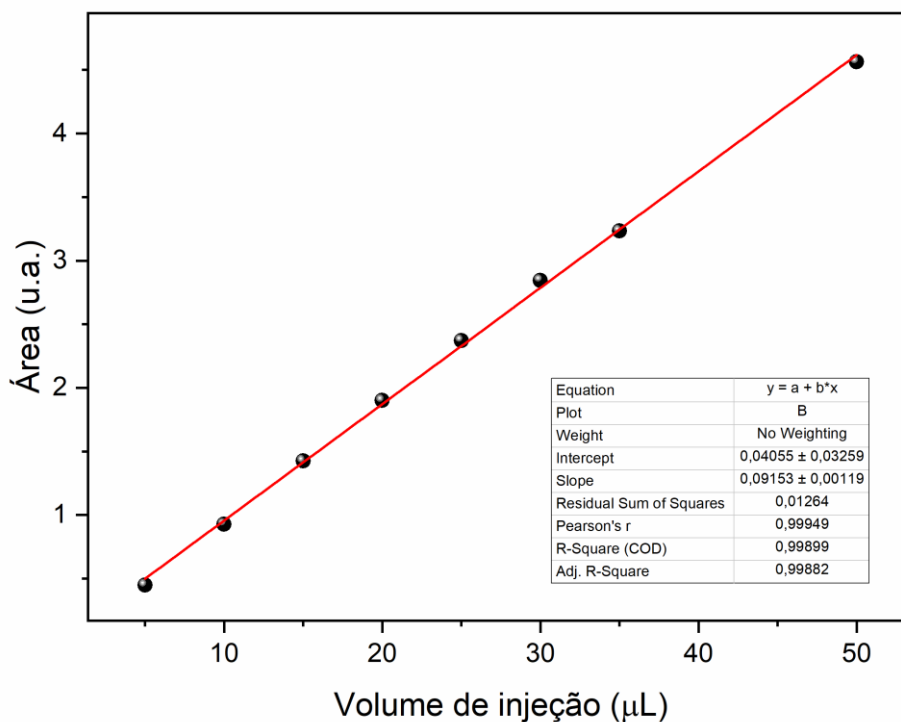


Figura 28. Correlação linear entre o volume de injeção e a área de pico para uma solução de PQ de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Fonte: o autor.

Uma relação linear entre o volume de injeção no intervalo de 5 a 20 μL da solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PQ foi estabelecido com o aumento da altura dos picos cromatográficos, mantendo-se as larguras das bases desses picos praticamente sem alteração. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para eficiência cromatográfica e fatores de assimetria para as injeções de 5 a 50 μL , calculados conforme as equações 8 e 9, do item 3.6, respectivamente.

Tabela 2. Eficiência cromatográfica e fatores de assimetria para volumes de injeção de solução de 1,0 mg L⁻¹ de PQ de 5 a 50 µL.

Volume de injeção (µL)	A _s	N
5	1,60	7273
10	1,44	7939
15	1,42	7841
20	1,39	7194
25	1,28	6155
30	1,15	5087
35	1,03	4463
50	0,95	3614

Nota-se que com o aumento do volume de injeção, houve uma melhora no formato do pico de PQ, com uma diminuição do fator de assimetria de 1,60 para 1,39. A partir de volume de injeção de 25 µL observou-se um ligeiro desdobramento do pico cromatográfico de PQ, sem evidentes prejuízos na determinação da área de pico, o que foi confirmado pela Figura 28. O aumento das larguras das bases dos picos cromatográficos afetou a eficiência cromatográfica, causando uma diminuição significativa nos valores de N, pois leva ao aumento da largura da base medida à meia altura, utilizada para o cálculo de eficiência. Todavia, o fator de assimetria dos picos foi de 1,28 para 0,95 no intervalo de volume de injeção de 25 a 50 µL, evidenciando uma melhora neste parâmetro cromatográfico. A Figura 29 mostra os cromatogramas da solução de 1,0 mg L⁻¹ de PQ para os volumes de injeção de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 50 µL.

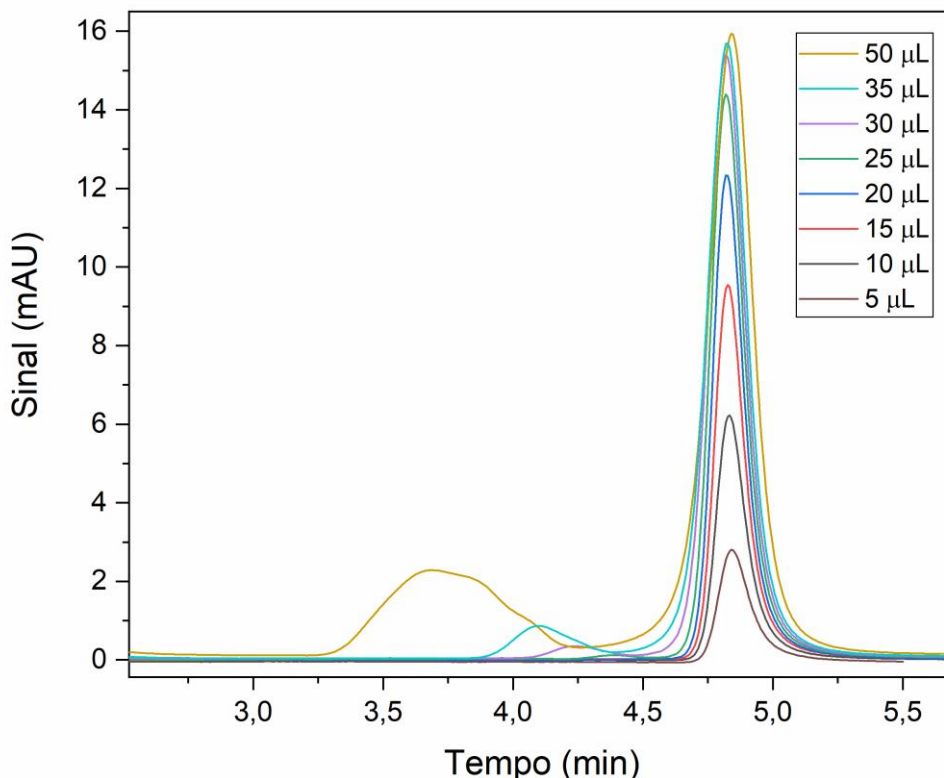


Figura 29. Cromatogramas da solução de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de PQ para os volumes de injeção de 5 a $50 \text{ }\mu\text{L}$. Condições: formiato de amônio 50 mmol L^{-1} (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65) e fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Fonte: o autor.

Uma possível explicação para o mecanismo de pré-concentração “*on-column*” que ocorreu com a injeção de grande volume de amostra aquosa pode ser feito por meio da analogia com o que ocorre quando se injeta um grande volume de amostra aquosa seguido da injeção de um plugue de água em cromatografia de fase reversa (GRITTI *et al.*, 2010). Como a amostra está dissolvida em um solvente de menor força de eluição do que a fase móvel, ao entrar na coluna, os analitos contidos na amostra aquosa são dispersados em um meio de maior força iônica, estabelecendo interações com a FE zwitteriônica. Dessa forma, as moléculas de PQ ficaram confinadas no início da coluna, e a água presente da matriz elui o PQ, mas, movendo-se mais rápido, de modo que, ao eluir, ocorre um processo de empilhamento de banda do analito. Ou seja, a banda larga da injeção foi comprimida em uma banda mais estreita por meio da eluição com a fase móvel dotada de força iônica maior do que a da amostra. Isso

corroborar com o que já havia sido constatado antes, que a separação de PQ em modo HILIC só se torna viável com a adição de tampão na fase móvel aquosa.

Outra evidência de que ocorre um enriquecimento do PQ durante o processo cromatográfico é que ao se injetar quantidades em massa equivalentes de soluto na coluna áreas diferentes são obtidas. Quando se injetou 50 µL de uma solução de 1,0 mg L⁻¹ de PQ, embora tenha ocorrido o desdobramento do pico, obteve-se uma área 55% maior do que aquela correspondente a injeção de 5 µL de uma solução de 10,0 mg L⁻¹.

Como foi observada correlação linear de área de pico com a injeção de um volume tão alto como 50 µL para a solução de 1,0 mg L⁻¹ de PQ, adotou-se a estratégia de LVI, como forma de se desenvolver um método sem necessitar pré-concentração para atender a baixos valores de LOD e LOQ. Embora tenha ocorrido desdobramento do pico com o volume injeção de 50 µL para uma solução de 1,0 mg L⁻¹ de PQ, essa concentração foi considerada elevada para a faixa de concentração ambiental encontrada desse agrotóxico em amostras reais de água. Portanto, considerou-se como um volume seguro para injeção, uma vez que a concentração mais alta da curva analítica seria 10 vezes menor do que essa concentração testada (0,1 mg L⁻¹), evitando problemas de sobrecarga da coluna.

5.2 Validação do método analítico

Todos os testes estatísticos empregados na validação do método analítico foram realizados a um nível de significância de 5%, segundo orientado pela RDC nº 166/2017 da ANVISA. Na ausência de critério para validação analítica, adotou-se, de forma suplementar, a diretriz SANTE (2021).

Conforme demonstrado anteriormente, não ocorre efeito matriz quando se utiliza MeOH:H₂O como solvente ou água da torneira ($t(10) = 0,005$; $p = 0,99$). Dessa forma, o método foi desenvolvido utilizando água da torneira como solvente das soluções de PQ.

Como a RDC nº 166/2017 da ANVISA não possui intervalo de tolerância aceitável para tempo de retenção do analito, adotou-se o preconizado pela norma

SANTE (2021), de em $t_R \pm 0,1$ min. Assim, as análises das amostras de água da torneira sem adição de PQ (branco) mostraram um pico com pouca intensidade e área extremamente pequena, mas passível de ser integrado, em $t_R 4,93 \pm 0,1$ min. Dessa forma, a área obtida correspondente à média das análises das injeções de 5 brancos foi subtraída das áreas obtidas nas medidas de validação do método. A Figura 30 mostra os cromatogramas dos brancos (quintuplicata), e das amostras com adição de PQ (em triplicata) referente às concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. É possível observar que com o aumento da concentração, o pico de PQ é deslocado para t_R menor, mas dentro do limite de tolerância de $\pm 0,1$ min.

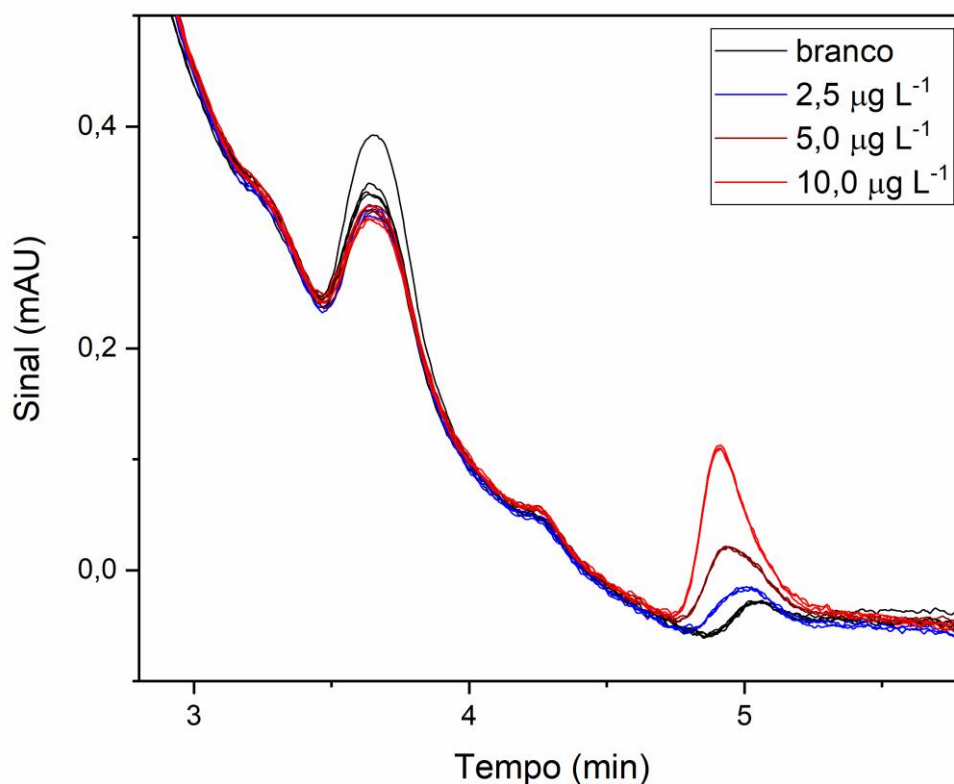


Figura 30. Cromatogramas dos brancos, e das amostras com adição de PQ referente às concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Condições: formiato de amônio 50 mmol L^{-1} (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65), fluxo 0,8 mL min^{-1} e volume de injeção 50 μL .

Fonte: o autor.

A linearidade do método foi avaliada pela injeção em triplicata de soluções de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ, em que se obteve RSD < 5% entre todas as injeções de 50 μL e coeficiente de determinação acima de 0,99. O teste de C de Cochran indicou que existe diferença entre as variâncias dos valores de y para cada um dos níveis de concentração ($C(6) = 0,738$, $p < 0,05$), ou seja, os dados são heterocedásticos, e, por isso, empregou-se o MMQP. A ANOVA mostrou que o coeficiente angular da curva analítica é significativamente diferente de zero ($F(2, 6) = 38583$, $p < 0,05$). Além disso, o teste t de Student demonstrou que o coeficiente linear não é estatisticamente diferente de zero ($t(4) = 5,39$; $p < 0,05$).

Utilizando-se as equações 5 e 6, obtiveram-se os valores de 4,04 e 1,33 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LOQ e LOD, respectivamente. Esses valores mostram-se adequados uma vez que compreendem os VMP de PQ aceitáveis pela legislação para a matriz água potável. A Figura 31 mostra a curva analítica obtida e as barras azuis mostram os desvios-padrão das medidas, notadamente baixos e a Figura 32 mostra a distribuição dos resíduos.

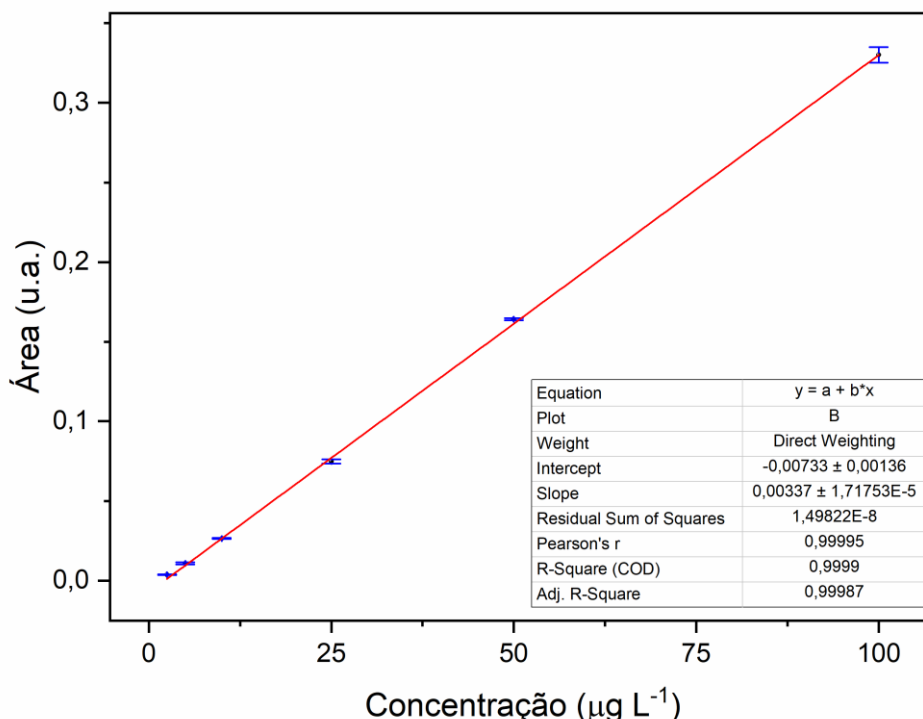


Figura 31. Curva analítica obtida para as soluções de PQ preparadas em água da torneira na faixa de 2,5 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: o autor.

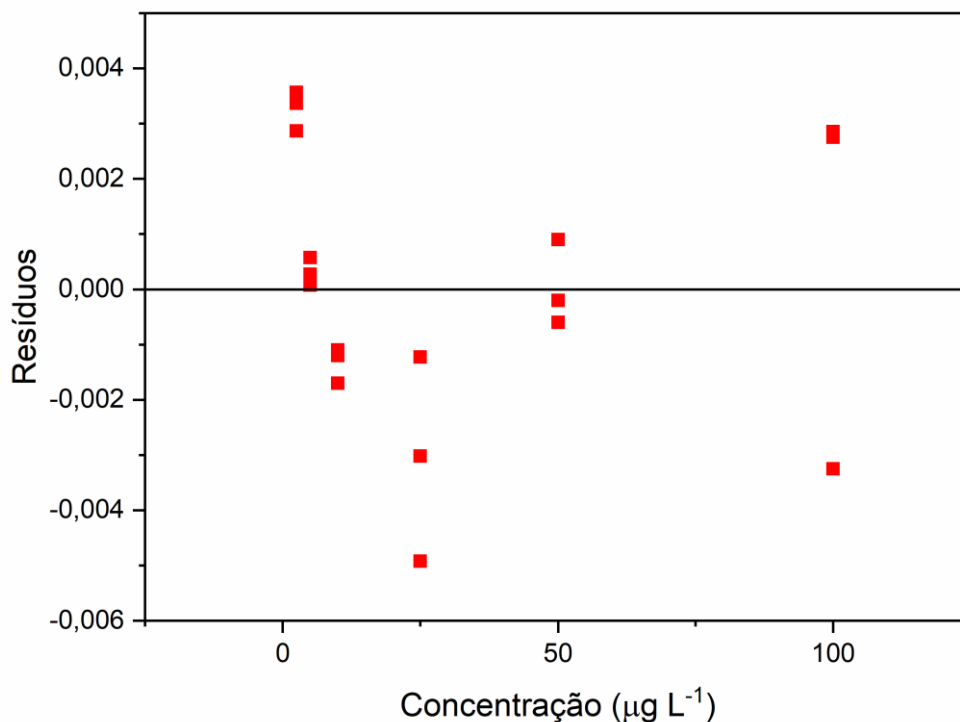


Figura 32. Distribuição dos resíduos.

Fonte: o autor.

Para avaliar a exatidão do método, foram preparadas três soluções em triplicata por meio da adição de PQ em água da torneira, e calculada a recuperação para as seguintes concentrações: 5,0, 25,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme a equação (4). Foi aplicado um teste t de Student pareado para cada nível de concentração e os brancos. Embora os valores de recuperação dos três níveis estejam dentro dos limites aceitáveis (80 – 110%), as soluções de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ mostraram-se estatisticamente diferentes. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a recuperação de PQ.

Tabela 3. Recuperações de PQ em água da torneira em três níveis de concentração: 5,0, 25,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Recuperação (%)			
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,0	25,0	100,0
	100,8	98,3	105,8
Recuperação (%)	104,4	99,6	107,2
	105,0	101,8	106,7
Média	103,4	99,9	106,6
DP	2,25	1,80	0,72
RSD (%)	2,2	1,8	0,7
<i>p</i> -valor	0,12	0,92	< 0,05

A precisão foi avaliada por meio da injeção em triplicata de uma solução de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ preparada em água da torneira e analisada em dois dias distintos, calculada conforme a equação (3). A ANOVA demonstrou que os ensaios de precisão são estatisticamente equivalentes, ou seja, não há variação significativa se os ensaios forem realizados em dias diferentes ($F(1, 6) = 0,041$, $p = 0,85$). A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a precisão de uma solução de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ.

Tabela 4. Precisão de uma solução de 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ preparada em água da torneira e analisada em dois dias distintos.

Precisão de uma solução 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de PQ	
	Áreas
	0,1752
Dia 1	0,1763
	0,1748
	0,1768
Dia 2	0,1744
	0,1756
Média	0,1755
DP	0,0009
RSD (%)	0,5

Conforme demonstrado nas Tabelas 3 e 4, os valores obtidos para recuperação e precisão foram satisfatórios e encontram-se dentro das especificações para as faixas de concentração analisadas.

5.2.1 Análise de amostra real

Visando verificar a aplicabilidade do método desenvolvido, uma amostra de 30 mL de água da torneira de Porto Alegre foi coletada em um frasco de PP e filtrada com filtro de seringa de PTFE 0,22 μm . A seguir, foi adicionado PQ de modo que a concentração final fosse 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. A amostra fortificada foi preparada em triplicata e injetados em duplicata, resultando em uma concentração média de $9,44 \pm 0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (RSD 2,64%). A Figura 33 mostra o cromatograma da amostra de água da torneira com a adição de PQ com concentração final de 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

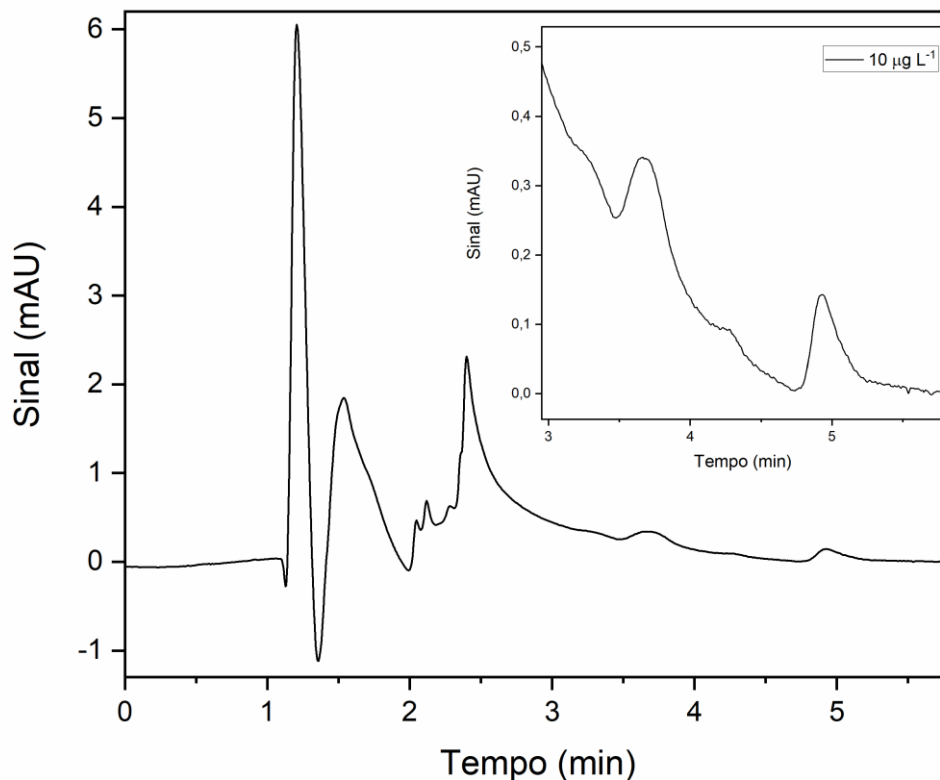


Figura 33. Cromatograma de amostra de água da torneira com a adição de PQ com concentração final de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Condições: formiato de amônio 50 mmol L^{-1} (pH 3,0):ACN com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (35:65), fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção $50 \mu\text{L}$.

Fonte: o autor.

Como a análise da amostra de água destinada ao abastecimento para consumo humano indicou a possível presença de PQ em concentração abaixo do LOQ, apontado pela presença de um pico cromatográfico dentro do intervalo de tolerância do t_R $4,93 \pm 0,1 \text{ min}$, foi adotada a estratégia de adição e recuperação do analito. A partir deste método foi possível quantificar PQ em concentrações abaixo do VMP pela legislação brasileira, estabelecido como $13 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.3 Perspectivas futuras deste trabalho

- I) Avaliar outras condições cromatográficas a fim de otimizar o método e possibilitar a aplicação para outros agrotóxicos de amônio quaternário.
- II) Avaliar a aplicação deste método para outras matrizes;
- III) Realizar a transferência do método para um sistema LC-MS/MS a fim de obter-se um método que também atenda ao VMP de PQ da UE em água potável ($0,10 \mu\text{g L}^{-1}$).

6. Conclusão

Como a remoção e a prevenção do aporte de contaminantes emergentes no meio ambiente ainda é uma questão difícil de ser solucionada, a detecção e avaliação da presença e a quantificação destes poluentes em matrizes aquáticas tornam-se muito relevantes. Os compostos que não são passíveis de serem determinados em métodos multirresíduos são desafiadores do ponto de vista analítico por requererem condições diferenciadas para serem analisados, como é o caso do PQ, um agrotóxico altamente polar.

Métodos que utilizam HPLC-UV para a determinação de resíduos de agrotóxicos tornam-se desafiadores por depender da etapa de pré-concentração para analisar concentrações extremamente baixas. Nesse sentido, métodos que não necessitam da etapa de pré-concentração para atingir limites de detecção e de quantificação que atendam às legislações de contaminantes ganham destaque por vantagens como simplicidade, menor custo e eficiência. A metodologia proposta não requereu o uso de cartuchos de SPE, permitindo também a mínima manipulação da amostra.

O emprego do modo de separação HILIC na análise de PQ evitou a utilização de reagentes de pareamento iônico, o que tornou mais simples a metodologia proposta, além de evitar as desvantagens da cromatografia em fase reversa por pareamento iônico.

O método desenvolvido demonstrou que, ao contrário do que foi relatado na literatura, foi possível empregar a estratégia de pré-concentração por injeção de grande volume para amostras aquosas em modo HILIC. Além disso, propusemos, até onde sabemos, a pré-concentração por injeção de grande volume em modo HILIC para colunas com fase estacionária do tipo *core-shell*, que admitem volumes de injeção menores que as colunas com partículas totalmente porosas.

Além disso, os valores de LOQ e LOD encontrados, 4,04 e 1,33 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, foram satisfatórios, uma vez que método desenvolvido nesse trabalho conseguiu atender aos valores máximos permitidos pela Portaria nº 888/2021 do Ministério da Saúde, que é de 13 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o PQ, sem utilizar uma instrumentação

altamente sensível, como LC-MS/MS. Dessa forma, o método mostrou-se uma opção rápida, eficiente e mais econômica em comparação com os métodos existentes.

7. REFERÊNCIAS

ACEDO-VALENZUELA, María-Isabel *et al.* Determination of neutral and cationic herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 519, n. 1, p. 65–71, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.055>

ALSHANA, Usama *et al.* Switchable-hydrophilicity solvent liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 131, p. 116025, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116025>

ANASTASSIADES, M. *et al.* Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC - or IC - MS / MS Measurement I . Food of Plant Origin (QuPPE - PO - Method). [s. l.], v. 12, n. Version 12, p. 1–101, 2021.

ANVISA. **Guia nº 10, versão 1, de 30 de agosto de 2017 - Guia para tratamento estatístico da validação analítica**. [S. l.], 2017a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/publicado-guia-para-tratamento-estatistico-de-validacao-analitica>. Acesso em: 25 dez. 2022.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 177, de 21 de setembro de 2017**. [S. l.], 2017b. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19308145/do1-2017-09-22-resolucao-rdc-n-177-de-21-de-setembro-de-2017-19308065. Acesso em: 12 out. 2022.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 428, de 7 de outubro de 2020**. [S. l.], 2020. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6053710/%281%29RDC_428_2020_COMP.pdf/e4fdb0f0-7c52-4224-91f1-8dbfb87c4916.

BACKE, Will J.; YINGLING, Virginia; JOHNSON, Todd. The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection – hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1334, p. 72–78, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.005>

BONATO, Pierina S. Técnicas de Pré-concentração on line em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 69–76, 2010.

BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante *et al.* Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 312–314, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0100-3>

BUSETTI, Francesco *et al.* Trace analysis of environmental matrices by large-volume injection and liquid chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 402, n. 1, p. 175–186, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5290-y>

CHUI, Mei Qi; THANG, Lee Yien; SEE, Hong Heng. Integration of the free liquid membrane into electrokinetic supercharging – capillary electrophoresis for the

determination of cationic herbicides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1481, p. 145–151, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.042>

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CORREIO DO POVO. **Secretaria da Agricultura do RS apreende 1,2 mil litros de Paraquate no Noroeste do Estado**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.correiodopovo.com.br/noticias/rural/secretaria-da-agricultura-do-rs-apreende-1-2-mil-litros-de-paraquate-no-noroeste-do-estado-1.825615>. Acesso em: 12 out. 2022.

DAYAN, Franck E. *et al.* Herbicide Mechanisms of Action and Resistance. *In*: COMPREHENSIVE BIOTECHNOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 36–48. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00211-1>

DESTAQUE RURAL. **Contrabandista é preso com mais de 10 toneladas de Paraquat**. [S. l.], 2022. Disponível em: [Contrabandista é preso com mais de 10 toneladas de Paraquat](#). Acesso em: 12 out. 2022.

DOWLER, Crispin. **Soya, corn and cotton make Brazil world leader for hazardous pesticides**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://unearthed.greenpeace.org/2020/02/20/brazil-pesticides-soya-corn-cotton-hazardous-croplife/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

DURÁN, Gema M.; CONTENTO, Ana M.; RÍOS, Ángel. Use of CdSe/ZnS quantum dots for sensitive detection and quantification of paraquat in water samples. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 801, p. 84–90, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.003>

EUROPEAN COMMISSION. **EU Pesticides database**. [S. l.], 2021. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en%0Ahttps://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en%0Ahttps://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language. Acesso em: 23 ago. 2022.

FERREIRA, Claudio de C.; JARDIM, Isabel C. S. F. Fases estacionárias/ extratoras core-shell: desenvolvimento, características e aplicações. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 7–23, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/sc.2017.002>

FRANCO, Dison S.P. *et al.* Advances made in removing paraquat herbicide by adsorption technology: A review. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 49, p. 102988, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102988>

GAMA, Mariana Roberto *et al.* Hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 37, p. 48–60, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.009>

GONDAR, Dora *et al.* Adsorption of paraquat on soil organic matter: Effect of exchangeable cations and dissolved organic carbon. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 235–236, p. 218–223, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.07.044>

GRITTI, Fabrice *et al.* Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 18, p. 3000–3012, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.044>

HAMAMOTO, Takuya; KATSUTA, Shoichi. An Ionic Liquid-based Microextraction Method for Ultra-High Preconcentration of Paraquat Traces in Water Samples Prior to HPLC Determination. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 1439–1444, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2116/analsci.18P369>

HAO, Chunyan *et al.* Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1304, p. 169–176, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.033>

HAZARAIMI, M.H. *et al.* The state-of-the-art development of photocatalysts for the degradation of persistent herbicides in wastewater. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 843, p. 156975, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156975>

HERTFORDSHIRE, Uo. **PPDB: Pesticide Properties DataBase**. [S. l.], 2017. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1524.htm>. Acesso em: 12 out. 2022.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 10 ago. 2022.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

JAYANTA, Siripastr; LEEPIPATPIBOON, Natchanun. Hollow-fiber Microextraction Combined with Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Analytical Determination of High Polarity Herbicides in Water. **Chiang Mai Journal of Science**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 2381–2396, 2018.

JORNAL ESTADO DE MINAS. **Carga de agrotóxico ilegal é interceptada pela PF em Uberlândia**. [S. l.], 2022. Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2022/07/08/interna_gerais,1378931/carga-de-agrotoxico-ilegal-e-interceptada-pela-pf-em-uberlandia.shtml. Acesso em: 12 out. 2022.

LAMEI, Navid *et al.* Ultrasound-Assisted Switchable Solvent in Determination of Quaternary Ammonium Herbicide Paraquat in Biological, Environmental Water, and Apple Juice Samples Using Chemical Reduction Process Coupled to GC–MS Detection. **Chromatographia**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 923–930, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3500-x>

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia Líquida Moderna. HPLC - CLAE**. Campinas: Átomo, 2016.

LANÇAS, Fernando M. O Renascimento das partículas superficialmente porosas (“core shell particles”) em HPLC. **Scientia Chromatographica**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 47–54, 2010. Disponível em:

<https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v2n2a4.pdf>

LAYNE, J. *et al.* Volume-load capacity in fast-gradient liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 913, n. 1–2, p. 233–242, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01199-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01199-7)

LCGC NORTH AMERICA. How It Works: UV Detection for HPLC. **LCGC North America**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 894, 2018.

LEONHARDT, Juri *et al.* Large Volume Injection of Aqueous Samples in Nano Liquid Chromatography Using Serially Coupled Columns. **Chromatographia**, [s. l.], v. 78, n. 1–2, p. 31–38, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2789-3>

LI, Jia *et al.* Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 72, p. 141–152, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.023>

LI, Yun; LEE, Milton L. Biocompatible polymeric monoliths for protein and peptide separations. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 32, n. 20, p. 3369–3378, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.200900478>

MAPA. **Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica**. 1ªed. Brasília: [s. n.], 2011.

MCCALLEY, David V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1523, p. 49–71, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.026>

NASPOLINI, Nathalia Ferrazzo *et al.* Paraquat induces redox imbalance and disrupts glutamate and energy metabolism in the hippocampus of prepubertal rats. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 85, p. 121–132, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.05.010>

NAZISH, Tahmina *et al.* Understanding paraquat resistance mechanisms in *Arabidopsis thaliana* to facilitate the development of paraquat-resistant crops. **Plant Communications**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 100321, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100321>

NEVES, Paula Fernanda Ribas *et al.* Age-related tolerance to paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 361, p. 43–53, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2022.03.010>

NÚÑEZ, O. *et al.* Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 961, n. 1, p. 65–75, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00031-6)

NÚÑEZ, O *et al.* Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 912, n. 2, p. 353–361, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00582-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00582-9)

NÚÑEZ, O; MOYANO, E; GALCERAN, M.T. Solid-phase extraction and sample stacking–capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium

herbicides in drinking water. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 946, n. 1–2, p. 275–282, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01562-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01562-X)

OH, Jin-Aa *et al.* Ultra-trace level determination of diquat and paraquat residues in surface and drinking water using ion-pair liquid chromatography with tandem mass spectrometry: A comparison of direct injection and solid-phase extraction methods. **Journal of Separation Science**, [s. l.], v. 37, n. 20, p. 2900–2910, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400551>

OLAH, E.; TARNAI, M.; FEKETE, J. Possibility of Large Volume Injection and Band Focusing in UHPLC. **Journal of Chromatographic Science**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 839–844, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms179>

OU SHA *et al.* Determination of Paraquat in Environmental Water by Ionic Liquid-Based Liquid Phase Extraction with Direct Injection for HPLC. **Journal of Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 73, n. 9, p. 862–868, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1061934818090083>

PANIS, Carolina *et al.* Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment International**, [s. l.], v. 165, p. 107321, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107321>

PARRA-ARROYO, Lizeth *et al.* Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 807, p. 151879, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151879>

QIAO, Lizhen; SHI, Xianzhe; XU, Guowang. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 81, p. 23–33, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.021>

RECEITA FEDERAL. **Receita Federal realiza apreensões de agrotóxicos de uso proibido no Brasil no Porto de Itapoá**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/receitafederal/pt-br/assuntos/noticias/2022/julho/receita-federal-realiza-apreensoes-de-agrotoxicos-de-uso-proibido-no-brasil-no-porto-de-itapoa>. Acesso em: 12 out. 2022.

RIZZATI, V. *et al.* Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 254, p. 231–246, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.003>

RUTA, Josephine *et al.* A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 52, p. 8230–8240, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.106>

RYKOWSKA, I.; ZIEMBLIŃSKA, J.; NOWAK, I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 259, p. 319–339, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.043>

SALEH, Iman A.; ZOUARI, Nabil; AL-GHOUTI, Mohammad A. Removal of pesticides from water and wastewater: Chemical, physical and biological treatment approaches.

Environmental Technology & Innovation, [s. l.], v. 19, p. 101026, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101026>

SANTE 11312. **Guidance SANTE 11312/2021 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. [S. l.], 2021. Disponível em: https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/SANTE_11312_2021.pdf. Acesso em: 19 dez. 2022.

SEED, Brian. Silanizing Glassware. **Current Protocols in Molecular Biology**, [s. l.], v. 28, n. 1, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03bs28>

SHARMA, Anamika; JHA, Prashant; REDDY, Gadi V.P. Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 643, p. 1522–1532, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.312>

SLABY, Sylvain *et al.* Distribution of pesticides and some of their transformation products in a small lentic waterbody: Fish, water, and sediment contamination in an agricultural watershed. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 292, p. 118403, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118403>

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. Third Edited. Hoboken: Wiley, 2010.

SONG, Huiying *et al.* Extensive database of liquid phase diffusion coefficients of some frequently used test molecules in reversed-phase liquid chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1455, p. 102–112, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.054>

SOUZA, Djenaine De; MACHADO, Sergio A.S.; PIRES, Roberto C. Multiple square wave voltammetry for analytical determination of paraquat in natural water, food, and beverages using microelectrodes. **Talanta**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 1200–1207, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.12.045>

SOUZA, Marília Cristina Oliveira *et al.* Legacy and emerging pollutants in Latin America: A critical review of occurrence and levels in environmental and food samples. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 848, p. 157774, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157774>

SYAFRUDIN, Muhammad *et al.* Pesticides in Drinking Water—A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 468, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18020468>

TAKINO, Masahiko; DAISHIMA, Shigeki; YAMAGUCHI, Kenji. Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography/Electrospray–Mass Spectrometry Using Volatile Ion-Pairing Reagents. **Analytical Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 707–711, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.2116/analsci.16.707>

U.S. EPA. **EPA Method 549.2: Determination of Diquat and Paraquat in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection**. [S. l.], 1997. Disponível em: <https://www.epa.gov/esam/epa-method-5492-determination-diquat-and-paraquat->

drinking-water-liquid-solid-extraction-and. Acesso em: 12 out. 2022.

UNIÃO EUROPEIA. **Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020 relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano.** [S. l.], 2020. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=EL>. Acesso em: 12 out. 2022.

VASS, Andrea *et al.* Study of different HILIC, mixed-mode, and other aqueous normal-phase approaches for the liquid chromatography/mass spectrometry-based determination of challenging polar pesticides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 408, n. 18, p. 4857–4869, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9589-6>

VATS, Sharad. Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. *In*: [S. l.: s. n.], 2015. p. 153–192. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-09132-7_3

WALSH, Alison; KINGWELL, Ross. Economic implications of the loss of glyphosate and paraquat on Australian mixed enterprise farms. **Agricultural Systems**, [s. l.], v. 193, p. 103207, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103207>

WEISSTEINER, Christof J. *et al.* An indicator to map diffuse chemical river pollution considering buffer capacity of riparian vegetation — A pan-European case study on pesticides. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 484, p. 64–73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.124>

WESTERHOFF, Paul *et al.* Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 39, n. 17, p. 6649–6663, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es0484799>

WHO. **WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition.** [S. l.: s. n.], 2020. ISSN 16841042.

YAO, Jianmei *et al.* Specific recognition of cationic paraquat in environmental water and vegetable samples by molecularly imprinted stir-bar sorptive extraction based on monohydroxylcucurbit[7]uril–paraquat inclusion complex. **Microchimica Acta**, [s. l.], v. 187, n. 10, p. 578, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04491-5>

ZHOU, Qingxiang *et al.* Determination of paraquat and diquat preconcentrated with N doped TiO₂ nanotubes solid phase extraction cartridge prior to capillary electrophoresis. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 2, n. 8, p. 1063, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c0ay00250j>

8. ANEXOS

8.1 Parâmetros de desempenho do método analítico

A validação de um método analítico consiste na demonstração experimental da adequação dos procedimentos adotados a fim de demonstrar qualidade das medições química por meio da comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Os parâmetros para a validação de métodos são descritos por diferentes grupos de trabalhos de organizações nacionais e internacionais (MAPA, 2011). No Brasil, os dois principais guias de validação são a RDC nº 166/2017 da ANVISA e a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (JARDIM *et al.*, 2004). Para esse trabalho foram adotados os seguintes parâmetros de validação segundo a RDC nº 166/2017 da ANVISA: linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2017b).

8.1.1 Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata.

A relação matemática entre o sinal analítico medido com a concentração é expressa por meio da equação da reta da curva analítica. A relação gráfica da regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados, deve ser avaliada pela associação linear entre as variáveis por meio dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2).

$$y = ax + b \text{ (equação 1)}$$

Sendo y a resposta do detector, a o coeficiente angular, x a concentração e b a intersecção.

O método dos mínimos quadrados pode ter um fator de ponderação, sendo então denominado método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) ou pode ser aplicado diretamente, sem fator de ponderação, sendo então denominado método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Para escolha do método a ser utilizado, deve-se considerar a variância dos resultados de y para cada valor de x . Se a variância de y for constante (situação denominada homocedasticidade), pode-se utilizar o MMQO. Caso sejam observadas alterações de variância de y (situação denominada heterocedasticidade), é recomendável que se utilize o MMQP, pois a utilização do MMQO poderá gerar resultados tendenciosos (ANVISA, 2017a).

8.1.2 Efeito matriz

O efeito matriz é um estudo de seletividade que tem como objetivo averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental. O efeito de matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito, de modo que as retas sejam paralelas. As retas poderão ser consideradas paralelas quando seus coeficientes angulares não forem estatisticamente diferentes.

Existem algumas maneiras para avaliar se as inclinações não são estatisticamente diferentes. Uma das maneiras possíveis de se avaliar o efeito matriz é por meio do teste t de Student. Para isso, antes, deve-se comparar as variâncias das curvas analíticas, aplicando-se o teste F de Snedecor. Quando o teste F indica variâncias semelhantes, o valor de T é calculado conforme a equação abaixo:

$$T = \frac{\hat{a}_1 - \hat{a}_2}{s_{\hat{a}_1 - \hat{a}_2}} \text{ (equação 2)}$$

Em que:

\widehat{a}_1 é a estimativa de a_1 , usando as n_1 observações do grupo 1;

\widehat{a}_2 é a estimativa de a_2 , usando as n_2 observações do grupo 2;

$S_{\widehat{a}_1-\widehat{a}_2}$ é a estimativa do desvio-padrão da diferença entre os coeficientes angulares dos modelos. Este desvio-padrão é igual à raiz quadrada da seguinte variância:

$$S^2_{\widehat{a}_1-\widehat{a}_2} = S^2_{P,y/x} \left[\frac{1}{(n_1-1)S^2_{x_1}} + \frac{1}{(n_2-1)S^2_{x_2}} \right] \text{ (equação 2.1)}$$

Em que:

$$S^2_{P,y/x} = \frac{(n_1-2)S^2_{y/x_1} + (n_2-2)S^2_{y/x_2}}{n_1+n_2-4} \text{ (equação 2.2)}$$

Em que:

S^2_{y/x_1} é o quadrado médio do resíduo para o grupo 1;

S^2_{y/x_2} é o quadrado médio do resíduo para o grupo 2;

$S^2_{x_1}$ é a variância dos X para o grupo 1;

$S^2_{x_2}$ é a variância dos X para o grupo 2.

O valor obtido de T deve ser comparado com o valor crítico, considerando $n_1 + n_2 - 4$ graus de liberdade e nível de significância de 5%. Assim, O teste t compara as inclinações das retas ajustadas segundo as equações definidas acima, testando a hipótese nula de que as inclinações são iguais (retas paralelas). Temos então:

$$\begin{cases} H_0: b_1 = b_2 \\ H_1: b_1 \neq b_2 \end{cases}$$

Se $T_{\text{calculado}} \geq T_{\text{crítico}}$ rejeita-se a hipótese nula e considera-se que existe efeito matriz significativo e o método não é suficientemente seletivo. Para que este método

seja utilizado, devem ser propostas ações corretivas que minimizem a distorção no resultado causada pelo efeito matriz.

Se a hipótese nula não for rejeitada, considera-se que não há efeito matriz significativo. Neste caso, as retas de regressão podem ser consideradas paralelas e a mesma inclinação pode ser aplicada nos dois modelos (ANVISA, 2017a).

8.1.3 Precisão

A precisão é a estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR ou RSD, do inglês, *Relative Standard Deviation*) da série de medições conforme a fórmula abaixo:

$$DPR = RSD = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \text{ (equação 3)}$$

Em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada através da participação de um ensaio interlaboratorial colaborativo.

A repetibilidade deve avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. Além disso, deve utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

A precisão intermediária deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos, e, contemplar as mesmas

concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

8.1.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro.

A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível.

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela fórmula abaixo, calculando-se o DPR para cada concentração.

$$\text{Recuperação} = \frac{CA(\text{adicionada}) - CA(\text{amostra})}{CTA} \times 100 \text{ (equação 4)}$$

Em que: CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado

8.1.5 Limite de detecção (LOD)

O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva da

curva analítica, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado. Nesse trabalho, optou-se pela determinação por meio dos parâmetros da curva analítica, conforme a equação abaixo.

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \text{ (equação 5)}$$

Em que: IC é a inclinação da curva analítica, σ é o desvio padrão que foi obtido a partir do desvio padrão residual da linha de regressão.

8.1.6 Limite de quantificação (LOQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim como no LOD, a determinação do LOQ pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva da curva analítica. Nesse trabalho, optou-se pela determinação por meio dos parâmetros da curva analítica, conforme a equação abaixo.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{IC} \text{ (equação 6)}$$

Em que: IC é a inclinação da curva analítica, σ é o desvio padrão que foi obtido a partir do desvio padrão residual da linha de regressão.

8.2 Parâmetros de adequação do sistema cromatográfico

Os testes de adequação do sistema são aplicados aos métodos analíticos cromatográficos para confirmar a adequação contínua dos métodos para uso em diferentes ocasiões após a sua validação inicial.

8.2.1 Tempo de retenção (t_R)

O tempo de retenção (t_R) é o tempo desde a injeção da amostra até a aparição da resposta máxima de pico da zona da amostra eluída, ou seja, até o aparecimento do pico no cromatograma, podendo este ser utilizado como um parâmetro para identificação. Os t_R são característicos dos compostos que representam, mas não são exclusivos. A coincidência dos tempos de retenção de uma amostra e de uma SQR pode ser utilizada como critério parcial na construção de um perfil de identidade, mas pode não ser suficiente, por si só, para estabelecer a identidade. Os tempos absolutos de retenção de um determinado composto podem variar de um cromatograma para o próximo (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

8.2.2 Fator de retenção (k)

A razão entre a quantidade da substância com afinidade pela FE e a quantidade com afinidade pela FM é definida como fator de retenção (k). k é uma grandeza adimensional e é independente das dimensões da coluna utilizada e do fluxo da fase móvel empregada. Para um melhor desempenho cromatográfico, é desejável que os valores de k estejam entre 1 e 10. O k pode ser definido pela Equação 7:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \text{ (equação 7)}$$

Em que: t_R é o tempo de retenção e t_M é o tempo morto, que é o tempo necessário para eluição de componentes que não interagem com a FE (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

8.2.3 Eficiência (N)

O número de pratos teóricos, N, representa a eficiência de uma coluna cromatográfica. Um prato teórico é definido como um equilíbrio de distribuição do soluto entre a FE e a FM. Quanto maior N, maior o número de estágios de equilíbrio, promovendo assim uma separação mais eficiente. O número de pratos teóricos para picos com forma gaussiana, pode ser calculado pela Equação 8 (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \text{ (equação 8)}$$

Em que: t_R é o tempo de retenção e $W_{h/2}$ é a largura do pico à metade da altura.

8.2.4 Fator de assimetria (A_S)

A simetria de picos pode ser avaliada por meio do fator de simetria (A_S), que pode ser calculada a 10 ou a 5% da altura do pico. Neste trabalho optou-se pelo cálculo utilizando a 10% da altura do pico, conforme Equação 9:

$$A_S = \frac{W_{0,10}}{F} \text{ (equação 9)}$$

Em que: $W_{0,10}$ é a largura do pico à 10% da altura referente à distância do máximo ao final do pico e F descreve a distância da frente do pico ao máximo, também relativo à 10% da altura do pico.

Os picos são simétricos quando essa razão resulta em 1, mas na realidade, o desejável é que esse resultado seja menor do que 1,5. Fatores de assimetria entre 0,8 e 1,2 são considerados satisfatórios, com pouca ou nenhuma influência de cauda nos picos cromatográficos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).