

Determinação de atrazina em água utilizando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Otimization of extraction solid phase method for determination of atrazine by gas chromatography

Cristhiane Anete Neiverth¹

Resumo

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-striazina), um herbicida da família das s-triazinas mais utilizados em todo o mundo, tem sido detectado em águas superficiais e subterrâneas em concentrações preocupantes. Esse composto apresenta baixo potencial de bioacumulação e moderada adsorção e mobilidade em solo. Uma das maneiras de se determinar a atrazina é por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS), utilizando, no preparo da amostra, a extração em fase sólida (SPE), a qual elimina interferentes e pré-concentra a amostra em um único passo. Esta pesquisa objetivou desenvolver uma metodologia para análise de atrazina em água, utilizando Extração em Fase Sólida em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. A recuperação foi estudada em dois níveis de concentração (0,2 e 2,0 mg L⁻¹) comparando o SIM e MS/MS. Para a quantificação, o método SIM apresentou melhores resultados de recuperação (105% e 98%) e coeficiente de variação (1,6%) a uma concentração de 2,0 mg L⁻¹. O limite de detecção do modo de SIM foi de 0,20 ng L⁻¹ e a metodologia foi testada em água superficial e água de lixiviação de colunas indeformadas de três cabeceiras. Apenas duas amostras de água lixiviada apresentaram concentrações de atrazina acima do permitido pela legislação (2,0 mg L⁻¹).

Palavras-chave: 1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamine-s-triazine; SIM; MS/MS.

Abstract

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-striazina), a herbicide from the family of s-triazine, widely used all over the world, has been detected in ground and surface waters in worrying levels of concentration. This compound has a low potential for bioaccumulation, moderate adsorption and mobility in soil. One way

¹ Dra.; Física; Professora do Colégio Estadual do Paraná; Endereço: Avenida João Gualberto, 250, Alto da Glória, CEP: 80030-000, Curitiba, Paraná, Brasil; E-mail: crisneiverth@yahoo.com.br

is to determine atrazine is by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG-MS), using for the sample preparation the extraction in solid phase (SPE), which eliminates interferences and pre-concentrates the sample into a single step. This research aimed to develop a methodology for analysis of atrazine in water using Solid Phase Extraction in Gas Chromatography coupled with the Mass Spectrometry. The recovery was studied at two concentration levels (0.2 and 2.0 mg L⁻¹), comparing the SIM and MS / MS. For quantification, the SIM method showed a better recovery (98% and 105%) and coefficient of variation (1.6%) at a concentration of 2.0 mg L⁻¹. The detection limit of the SIM mode was 0.20 ng L⁻¹ and the method was tested in surface water and leachate water of undisturbed soil columns of three headwaters. Only two samples of leachate water had concentrations of atrazine above those permitted by law (2.0 mg L⁻¹).

Key words: 1-chloro-3-ethylamino-5-isopropylamine-s-triazine; SIM; MS/MS.

Introdução

Herbicidas constituem um dos grupos mais danosos de contaminantes para a saúde humana, fauna e flora. A maioria dessas substâncias é aplicada diretamente no solo ou pulverizadas na plantação, e então, liberados no ambiente (VEGA et al., 2005). A preocupação social acerca dos níveis dos herbicidas no ambiente e a constante tendência observada na legislação para reduzir seus níveis máximos permitidos em uma variedade de matrizes estão aumentando o número de amostras que precisam ser monitoradas e a necessidade de sua determinação precisa a níveis cada vez mais baixos (BOUAD et al., 2001). A determinação em matrizes ambientais, entre elas o solo, exige o uso de métodos de preparação seletivos e que envolvam etapas de extração, limpeza e pré-concentração anteriores à determinação cromatográfica (COSTA et al., 2008). Na etapa de pré-concentração, a Extração em Fase Sólida (SPE) é usualmente empregada com o propósito de isolar um ou mais analitos presentes em uma matriz complexa para

posterior análise por intermédio do uso de um método instrumental (LANÇAS, 2004).

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), herbicida do grupo das triazinas, é largamente utilizada no controle de gramíneas e folhas largas em milho, sorgo, cana-de-açúcar e outras culturas (EXTONET, 2009). Esse herbicida tem sido extensivamente estudado, contribuindo para a compreensão do seu comportamento na água e no solo (NEIVERTH et al., 2008). Esse composto apresenta persistência moderada (ESPINOZA; BÁEZ, 2003) e, conseqüentemente, a sua lixiviação no solo é de extrema relevância na contaminação da água subterrânea. Órgãos regulamentadores no Brasil estabelecem que os níveis de atrazina em água não devem ser superiores a 2,0 µg L⁻¹. Portanto, há necessidade de se criarem metodologias eficazes em sua determinação dentro do limite de quantificação e com máxima precisão possível. Este trabalho objetivou otimizar um procedimento analítico baseado na extração em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com a finalidade de

determinar atrazina em água, atendendo as exigências dos órgãos regulamentadores no Brasil, como a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e a Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL., 2005).

Materiais e Métodos

Nas extrações, os solventes utilizados foram etanol e acetato de etila grau analítico (CARLO-ERBA). Como padrão nas calibrações utilizou-se Atrazina 98,7% (Supelco). Todos os materiais foram lavados com detergente Extran® e deixados em banho de hidróxido de potássio 10% por duas horas e lavados com água ultrapura (Mili-Qplus®). Os materiais de vidro foram calcinados (500 °C, 4 horas) antes do uso.

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque em etanol com atrazina na concentração de 10 µg mL⁻¹. A partir da solução estoque foram preparadas soluções padrões em acetato de etila: 0,1, 0,5, 1, 2, 4 e 8 µg mL⁻¹. Exatos 20 µg de atrazina dissolvida em 100 mL de água (200 µg L⁻¹) foram inseridos no interior de uma microcoluna de fase sólida C18 (C18, 17 %, Silicycle, 500 mg), previamente limpa com 5 mL de metanol e 3 mL de acetato de etila nessa seqüência, para otimizar o volume de acetato de etila utilizado na eluição da atrazina na coluna de extração em fase sólida.

Na otimização da metodologia de análise e nas amostras reais foram utilizados 100 mL de água, as quais foram passadas pela coluna de fase sólida, previamente limpa sob pressão negativa a um fluxo de 15 mL min⁻¹. Após, o analito foi eluído com uma quantidade adequada de acetato de etila. Em seguida, a água residual contida no eluato foi retirada, passando o mesmo por uma micro coluna de vidro contendo sulfato

de sódio calcinado (500 mg, 500 °C, 4 h). O solvente foi evaporado com fluxo de N₂ até a secura e o eluato seco foi acondicionado em congelador até a análise.

Os analitos (1 µL de amostra dissolvido em 100 µL de acetato de etila) foram introduzidos automaticamente de um sistema auto-amostrador (TripPlus AS, Thermo) em um Cromatógrafo Gasoso (Focus GC, Thermo). As amostras foram quantificadas por Espectrometria de Massa com analisador de íon trap (Polaris Q, Thermo). Dois modos de quantificação foram estudados: SIM (monitoramento de íon seletivo) e MS/MS (geração de íon secundário, refragmentação). As amostras foram injetadas no modo sem divisão de fluxo (1 min), e separadas com uma coluna cromatográfica modelo DB-5, 30 m, 0,25 mm i.d. e 0,25 mm de espessura do filme. A programação do cromatógrafo foi: temperatura do injetor de 280 °C, linha de transferência de 300°, gás de arraste hélio a 1,5 mL min⁻¹, com fluxo constante e compensação de vácuo. A programação de temperatura do forno foi: 90 °C, isoterma de cinco minutos, aquecimento até 160 °C na taxa de 15 °C min⁻¹ e até 280 °C na taxa de 25 °C min⁻¹ com isoterma final de cinco minutos. O Espectrômetro de Massa foi operado com impacto de elétrons de 70 eV. Para quantificação da atrazina, foi usado o fragmento *m/z* 200 no modo SIM e sua refragmentação gerando o íon *m/z* 122 no modo MS/MS. Neste último, foram selecionados os parâmetros: energia máxima de excitação média com janela de isolamento 1,5 µm e tempo de isolamento 15 ms, sendo que o primeiro e último íons produzidos e detectados foram, respectivamente, *m/z* 100 e 210. A quantificação foi realizada a partir da padronização externa. Na otimização do método foi avaliada a seletividade,

linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A metodologia foi aplicada em amostras de água superficial (Ponta Grossa) e água lixiviada de colunas de solos, coletados em três cabeceiras de drenagem, localizadas nos municípios de Ponta Grossa e Paranavaí. As amostras de água lixiviada eram provenientes de colunas de solos coletas com um tubo de PVC com 50 cm de altura, 7,5 cm de diâmetro e 0,9 de espessura de parede. Três solos distintos estavam presentes nas cabeceiras: Latossolo vermelho distrófico rúbrico (LB), textura argilosa (39% argila, 12% silte e 49% areia), Latossolo vermelho distrófico típico (LV1), textura argilosa (31% argila, 8% silte e 61% areia) e Latossolo vermelho distrófico típico (LV2), textura arenosa (21% argila, 8% silte e 71% areia). A análise granulométrica foi realizada conforme Embrapa (1997). A coleta da água superficial foi realizada manualmente em frascos de vidro âmbar, os quais foram acondicionados em caixa de isopor e mantidos sob refrigeração. Todas as amostras de água foram centrifugadas (6000 rpm, 30 min., Eppendorf 5810R) e os sobrenadantes separados e mantidos em geladeira a 5 °C até o momento das análises.

Resultados e Discussão

O espectro de massa da atrazina apresenta a perda do grupo metila $[M-15]^+$ como principal fragmento (m/z 200). Os demais fragmentos característicos são o íon molecular (M^+ 215) e o fragmento m/z 173, perda do grupo lateral isopropila menos um hidrogênio. Já o espectro MS/MS do íon m/z 200 apresenta, como pico base, o fragmento m/z 122, resultado da perda do cloro mais o grupo isopropila. Com base nos espectros de massas, os íons m/z 200 (TIC) e

m/z 122 (MS/MS) foram selecionados para quantificação e confirmação da atrazina nas amostras (CAI et al., 2004).

Neste trabalho utilizou-se o método de calibração com padronização externa, obtendo-se uma curva com faixa de trabalho de 0,1 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A linearidade nas curvas de calibração utilizando os métodos SIM (m/z 200) e MS/MS (m/z 122) foram de $r = 0,979$ e $r = 0,997$ respectivamente (Tabela 1) (SHABIR, 2003). O limite de detecção (LD) é a mais baixa concentração do analito que pode ser detectada e seguramente distinguida do zero (nível de ruído do sistema), mas não necessariamente quantificada, pois a concentração na qual o valor medido é maior que a incerteza associada a ele (GARCIA et al., 2003) e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do soluto que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais. Neste estudo, o LD foi calculado a partir do desvio padrão (DP) e o coeficiente angular (CA) da curva de calibração de acordo com a fórmula: $LD=3,3(DP/CA)$. O LQ foi calculado com o mesmo procedimento seguindo a fórmula: $LQ=10(DP/CA)$ (Tabela 1). Neste estudo os LD e LQ para os dois modos (SIM e MS/MS) foram semelhantes, e na ordem de grandeza de ng L^{-1} , considerando um fator de concentração igual a 1000 vezes (Tabela 1). Com esses limites determinados, estabeleceu-se que a quantidade de amostra para atender as exigências dos órgãos regulamentadores (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005) não precisa exceder os 100 mL.

Na Pré-concentração das amostras, utilizou-se uma coluna de extração em fase sólida (SPE, C18), eluindo-se uma solução de atrazina em água (200 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, em seguida, foram adicionados 10 mL

Tabela 1 - Resultados da otimização do método analítico testado para a quantificação da atrazina em água

Modo	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Linearidade	LD	LQ	CV	Recuperação
			pg L^{-1}			
SIM	0,20	0,98	0,20	0,61	23,80%	0,21 \pm 0,05 (105%)
					1,57%	1,95 \pm 0,03 (98%)
MS/MS	2,00	1,00	0,16	0,50	16,66%	0,18 \pm 0,03 (90%)
					3,16%	1,58 \pm 0,05 (80%)

Fonte: Autora (2012).

Nota: faixa, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Coeficiente de Variação (CV), recuperação e linearidade.

de acetato de etila, recolhendo-se alíquotas de 1 mL para serem analisadas por GC-MS. Aproximadamente 83% da atrazina foi recuperada na primeira alíquota e 99% somando-se as primeiras cinco alíquotas. Entretanto, para garantir que toda atrazina fosse recuperada, optou-se pela eluição com 7 mL do eluato (NEIVERTH et al., 2008).

A recuperação foi estudada em dois níveis de concentração (0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) em 100 mL de água, sendo os modos SIM e MS/MS avaliados. Na tabela 1, estão os resultados da otimização do método analítico testado para a quantificação da atrazina em água. As recuperações no modo SIM foram 105% e 98%, para as faixas de 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Já no modo MS/MS, esses valores foram de 90% e 80% para a mesma faixa de valores. A precisão avaliada por meio da análise das amostras fortificadas apresentou valores de 3 e 5% para os modos estudados (SIM e MS/MS). Os coeficientes de variação (CV) foram de 23,8 e 1,5 % para 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ no modo SIM e 16,76 e 3,2 % para 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ no modo MS/MS. Observa-se que, nos dois modos, a dispersão entre as leituras é menor na amostra mais concentrada. Considerando a concentração de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, o modo SIM foi mais preciso e exato que o MS/MS e, por isso, foi escolhido

na análise das amostras. O modo MS/MS foi utilizado somente para a certificação da atrazina através de seu espectro, tornando assim, a análise mais seletiva.

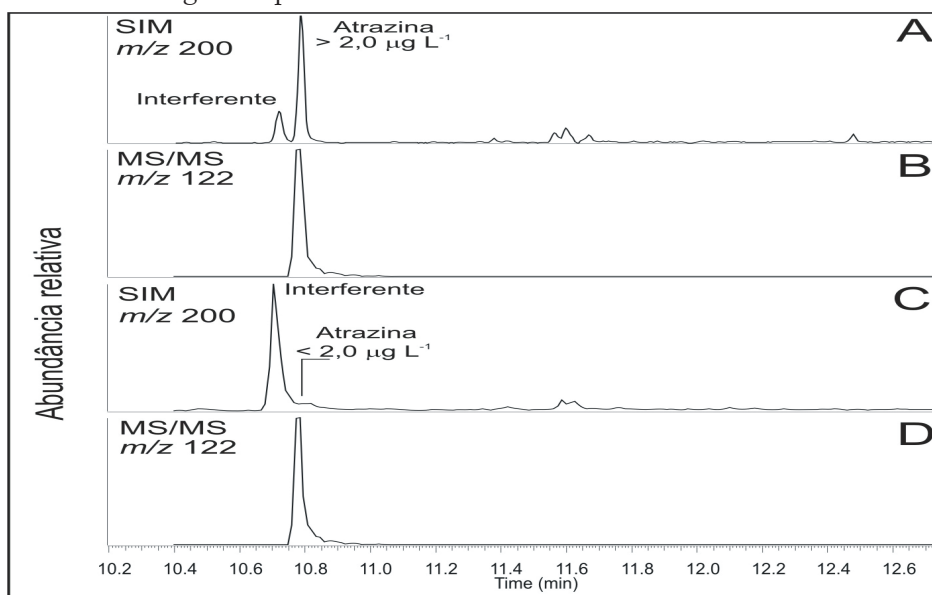
Essa metodologia foi aplicada em amostras de água superficial (n=3) e água lixiviada (n=3) de colunas inderformadas de solo coletadas no terço superior de uma cabeceira de drenagem. A principal razão para a escolha dos locais de coleta das amostras de água e de solo foi devido à sua suscetibilidade à contaminação por atrazina, pois esses locais são áreas agricultáveis. A atrazina foi detectada em todas as amostras, sendo que, na água superficial, essas estavam abaixo do limite permitido (< 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e fora da curva de calibração externa usada para a quantificação. Já, nas amostras d'água lixiviada, o teor de atrazina foi superior à concentração permitida em duas delas, e LV1 (36,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e LV2 (5,9 $\mu\text{g L}^{-1}$); na LB a concentração de atrazina encontrava-se abaixo do permitido (1,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). O alto teor do herbicida em LV1 e LV2 demonstra seu grau de fragilidade, sendo que a primeira apresenta mais alto teor que a segunda, apesar de LV1 possuir textura argilosa e LV2 arenosa. Essa aparente incongruência pode estar associada ao histórico de aplicação da atrazina nessas áreas. No solo da cabeceira

LV1, ocorre a aplicação da atrazina há vários anos, enquanto no solo LV2 o herbicida não foi aplicado nos últimos anos, diretamente, e sim somente no seu entorno, sendo atualmente esta área destinada à pastagem. Comparativamente, as duas áreas de textura argilosa (LV1 e LB) apresentam um contraste maior na atrazina lixiviada. A menor concentração detectada em LB pode estar relacionada aos seus altos teores de argila (39%), os quais proporcionam maior capacidade de retenção do herbicida.

A figura 1 apresenta os cromatogramas parciais do íon seletivo m/z 200 e a refragmentação utilizados para quantificação (SIM m/z 200, Figura 1A, C) e confirmação da estrutura (MS/MS m/z 122, Figura 1B, D) de amostras de água lixiviada (Figura 1A,B) e superficial (Figura 1C,D). Interessante notar que, na quantificação da atrazina pelo

fragmento m/z 200, existe um interferente com próximo tempo de retenção, mas que não é o composto alvo; isso poderia incorrer em erro nas análises que não fornecem alternativas para sua identificação, como por exemplo na cromatografia gasosa. Com o auxílio do modo MS/MS, o interferente é facilmente detectado através do espectro de massas gerado a partir da quebra do íon m/z 200. Por exemplo, a figura 1B e D apresentam o fragmento majoritário m/z 122, identificando que o pico com menor tempo de retenção não se trata da atrazina e sim de um interferente. O uso desse artifício é imprescindível na detecção correta da atrazina em água em baixas concentrações da mesma (Figura 1C, D), onde o pico mais abundante no cromatograma do íon seletivo está relacionado a um interferente, podendo levar à incorreta detecção do composto.

Figura 1 - Cromatogramas parciais do íon seletivo m/z 200



Fonte: Neiverth (2009).

Nota: (A, C) e da refragmentação (C, D) nas amostras de água lixiviadas (A, B) e água superficiais (C, D).

Conclusões

O modo SIM mostrou ser mais adequado que o MS/MS na quantificação de atrazina no nível permitido pelos órgãos regulamentadores do Brasil, através do uso da curva de calibração externa. A metodologia requer uma quantidade pequena de água (100 mL) para a detecção da atrazina no nível permitido. O uso do fragmento m/z 122 gerado na segunda quebra o íon m/z 200 se mostrou eficaz na detecção da

atrazina na amostra. As amostras de águas superficiais apresentaram níveis de atrazina inferior ao permitido e as amostras de águas coletadas, a partir da lixiviação do solo em colunas indeformadas, apresentaram níveis de atrazina superior ao permitido em dois solos das três cabeceiras analisadas.

Apoio

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas).

Referências

- BOUAD, A.; RAMOS, L.; GONZALEZ, M. J.; FERNÁNDEZ, P.; CAMARA, C. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorous pesticides in soil samples by Gas Chromatography. **Journal of Chromatography A**, New York, US, v. 939, n. 1-2, p. 13-21, 2001.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. n. 053, p. 58-63.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004.
- CAI, Z.; WANG, D.; MA, W. T. Gas chromatograph/ion trap mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environment waters by an isotope dilution technique. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, NL, v. 503, p. 263-270, 2004.
- COSTA, L. L. F.; SANT'ANA, E.; SUCHARA, E. A.; BENATO, V. S.; CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do Estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 31, n.1, p. 79-83, 2008.
- ESPINOZA, J.; BÁEZ, M. E. Determination of atrazine in aqueous soil extracts by high-performance thin-layer Chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, Chile, v. 48, n. 1, p. 1-8, 2003.
- EXTONET. **Atrazine information profiles**. Extension toxicology network InfoBase. Oregon State University. 2009. Disponível em: <<http://ace.orst.edu/info/extonet>>. Acesso em: 10 set. 2009.

GARCIA, G. V.; GOVANTES, F.; SHAW, L. J.; BURNS, R. G.; SANTERO, E. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., USA, v. 69, n. 12, p. 6987–6993, 2003.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.

NEIVERTH, C. A. **Lixiviação de NPK e atrazina em colunas indeformadas de solos de diferentes pedossequências no Paraná**. 2009. 169 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

NEIVERTH, C. A.; HANSEL, F. A.; PUCCI, P. S. B.; PEREIRA, C. M.; DEDECEK, R. A.; CURCIO, G. R. Otimização da coluna (C18) na extração em fase sólida, usada na análise do herbicida atrazina. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 7., 2008, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 1 CD-ROM. Resumo.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Foods and Drug Administration, the US Pharmacopeia and International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, New York, US, v. 987, n. 1-2, p. 57 – 66, 2003.

VEGA A. B.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, NL, v. 538, p. 117–127, 2005.