

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**

**CENTRO DE ENGENHARIA, MODELAGEM E CIÊNCIAS SOCIAIS APLICADAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Bárbara Alonso Vieira Luiz**

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM DO HERBICIDA  
PARAQUAT EM AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS COMO TÉCNICA  
AMBIENTALMENTE AMIGÁVEL**

Santo André – SP  
2016

Bárbara Alonso Vieira Luiz

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM PONTO NUVEM DO HERBICIDA  
PARAQUAT EM AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS COMO TÉCNICA  
AMBIENTALMENTE AMIGÁVEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal do ABC como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental. Linha de pesquisa: Tecnologias Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Helena Gomes Coelho.

Santo André – SP  
2016

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC  
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luiz, Bárbara Alonso Vieira

Avaliação da extração em ponto nuvem do herbicida Paraquat em amostras de águas naturais como técnica ambientalmente amigável. / Bárbara Alonso Vieira Luiz. — 2016.

87 fls. : il.

Orientadora: Lucia Helena Gomes Coelho

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Santo André, 2016.

1. herbicida. 2. Paraquat. 3. extração em ponto nuvem. 4. Triton X-114. 5. espectrofotometria. I. Coelho, Lucia Helena Gomes. II. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, 2016. III. Título.

**Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.**

**Santo André, 10 de Agosto de 2016.**

**Assinatura do autor:** Álvaro como Dina Lopez

**Assinatura do orientador:** Ricardo Felício de Azevedo



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental**  
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
pgcta@ufabc.edu.br

### FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Barbara Alonso Vieira Luiz, realizada em 23 de junho de 2016:

*Lucia Helena G. Coelho*

Prof.(a) Dr.(a) **Lucia Helena Gomes Coelho** (UFABC) – Presidente

*Dácio Roberto Matheus*

Prof.(a) Dr.(a) **Dácio Roberto Matheus** (UFABC) – Membro Titular

*Guilherme Lopes Batista*

Prof.(a) Dr.(a) **Guilherme Lopes Batista** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Ivanise Gaubeur** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Wanessa Melchert Mattos** (USP) – Membro Suplente

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial à orientadora Profa. Dra. Lucia Helena Gomes Coelho, pelo voto de confiança, pelo profissionalismo na orientação deste trabalho e pela compreensão com meus horários. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de conhecer a área científica.

Aos meus pais, por serem responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado. Sempre foram um grande exemplo de força, coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Ao Wellington, meu esposo, por ter compreendido tantas horas dedicadas aos estudos, pela força e suporte nas horas mais difíceis, dando o apoio necessário para continuar.

À Coordenação dos Laboratórios Didáticos Úmidos por ceder um laboratório para que os testes fossem realizados.

Aos colegas de trabalho, que nunca tiveram pena em dividir o conhecimento que têm. Sempre cordiais e atenciosos. Obrigada pela paciência nos momentos de reclamações e discussões que, sem dúvida, valeram a pena.

## RESUMO

O uso de pesticidas na agricultura é um dos principais fatores de poluição do solo e das águas superficiais e subterrâneas, sendo potencialmente danoso ao ambiente e à saúde humana. Comumente, os resíduos de pesticidas estão presentes em concentrações baixas, o que torna necessária a extração e pré-concentração do analito a fim de elevar a detectabilidade dessas substâncias. Neste trabalho, avaliou-se a viabilidade técnica de aplicação da metodologia para extração e pré-concentração de traços do herbicida Paraquat, presente em amostras de água, por extração em ponto nuvem, minimizando a utilização de solventes orgânicos tóxicos e a geração de resíduos, estratégias de preparo de amostra de grande interesse para as áreas de tecnologias verdes. Os procedimentos foram realizados utilizando-se diferentes surfactantes: não iônico (Triton X-114) e iônicos (SDS – aniônico e CTAB – catiônico). Testou-se a influência de composto iônico na amostra para auxiliar a separação das fases e observou-se que, para o sistema SDS/CTAB, a adição de 10% de NaCl (m/v) ajudou na separação da fase micelar em relação à fase aquosa, porém este sistema não foi eficaz para a extração do Paraquat devido ao aspecto coloidal da fase orgânica. Para o Triton X-114, o composto iônico não apresentou diferença significativa na separação das fases, não justificando a utilização do reagente. Este sistema apresentou resposta linear para soluções entre 0,2 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de Paraquat, com FE de 71 e recuperação entre 62 e 100% para concentração de 3 mmol L<sup>-1</sup> em surfactante, e, FE 45 e recuperação de 100% para 6 mmol L<sup>-1</sup> em surfactante. A solução de Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup> apresentou repetibilidade em suas extrações, com coeficiente de variação médio de 15,5%, porém não foi reprodutível. Para quantificações em amostras reais, fez-se necessária a reação com ditonito para seletividade do Paraquat, pois substâncias presentes na amostra podem ser extraídas e absorverem no mesmo comprimento de onda que o analito de interesse ( $\lambda = 258$  nm). Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 15 e 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a leitura direta e 50 e 167  $\mu\text{g L}^{-1}$  para a determinação colorimétrica. Contudo, a aplicação em amostras reais não apresentou a mesma eficiência de pré-concentração e extração, sobretudo pela elevada solubilidade do Paraquat em água, concluindo-se que a técnica não se mostrou a mais adequada para a aplicação proposta. A quantificação por colorimetria é uma alternativa interessante à determinação por HPLC por ser mais rápida, menos laboriosa e de menor custo, além do resíduo ser de mais fácil disposição que os solventes orgânicos convencionalmente utilizados em cromatografia.

**Palavras-chave:** herbicida; Paraquat; extração em ponto nuvem; Triton X-114; espectrofotometria.

## ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture is one of the main factors of soil, surface and groundwater pollution, and they are potentially harmful to the environment and human health. Pesticides residues are commonly present at low concentrations, which makes necessary an extraction and pre-concentration step of the analyte in order to increase the detectability of these substances. In this work, it was evaluated the feasibility of application of the extraction and pre-concentration of traces of the herbicide Paraquat present in water samples, using cloud point extraction methodology, minimizing the use of toxic organic solvents and the generation of residues, which are considered strategies of sample preparation with huge interest for green technologies. The procedures were performed using different surfactants: nonionic (Triton X-114) and ionic (SDS - anionic and CTAB - cationic). It was tested the influence of ionic compounds in the sample to aid phase separation and it was observed that, for SDS/CTAB system, the addition of 10% NaCl (w/v) helped the micellar phase separation, but this system was not effective for Paraquat extraction once the organic phase produced had a colloidal aspect. For the Triton X-114, the ionic compound was no significant difference, not justifying the use of the reagent. This system showed linear response between 0.2 and 5.0 mg L<sup>-1</sup> of Paraquat, with enrichment factor of 71 and recovery between 62 and 100% with the concentration of 3 mmol L<sup>-1</sup> in tensoative, and, enrichment factor 45 to 100% recovery for 6 mmol L<sup>-1</sup> in surfactant. The solution of Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup> showed repeatability in the cloud point extraction, with mean variation coefficient of 15.5%, but it was not reproducible. For the measurements using real samples, it was necessary a prior reaction with dithionite for selectivity detection of Paraquat, once many substances present in the water sample can be simultaneously extracted and analysed at the same wavelength as the target analyte ( $\lambda = 258$  nm). The limits of detection and quantification were, respectively, 15 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the direct analysis and 50 and 167  $\mu\text{g L}^{-1}$  for the colorimetric determination. However, the application in real samples did not show the same efficiency of pre-concentration and extraction, especially because Paraquat has high solubility in the water, concluding that the technique was not the most suitable for the proposed application. The colorimetric quantification is an interesting alternative to HPLC determination because it is faster, less laborious and lower cost, in addition to generating an easier disposition residue than conventionally organic solvents used in chromatography.

**Keywords:** herbicide; Paraquat; cloud point extraction; Triton X-114; spectrophotometry.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
2.1. <b>Objetivos específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1. Herbicidas</b> .....	<b>22</b>
3.1.1. Paraquat .....	23
<b>3.2. Sequência analítica</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3. Quantificação do herbicida Paraquat</b> .....	<b>26</b>
3.3.1. Método colorimétrico e espectrofotométrico .....	28
3.3.2. Cromatografia líquida de alto desempenho .....	30
3.3.3. Cromatografia de pareamento iônico .....	31
3.3.4. Cromatografia a gás .....	32
3.3.5. Eletroforese capilar .....	32
<b>3.4. Técnicas de preparo de amostra para determinação de Paraquat</b> .....	<b>33</b>
3.4.1. Extração líquido-líquido .....	34
3.4.2. Extração em fase sólida .....	34
3.4.3. Resinas de troca iônica .....	35
3.4.4. Extração em ponto nuvem .....	36
3.4.4.1. <i>Otimização da extração em ponto nuvem</i> .....	44
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1. Reagentes</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2. Acondicionamento dos padrões e amostras de Paraquat</b> .....	<b>47</b>
<b>4.3. Preparo de soluções e padrões</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4. Determinação do Paraquat</b> .....	<b>49</b>
4.4.1. Análise direta por espectrofotometria UV-Vis .....	49
4.4.2. Análise colorimétrica por espectrofotometria UV-Vis .....	49
<b>4.5. Extração em ponto nuvem</b> .....	<b>50</b>
4.5.1. Extração em ponto nuvem e fluxograma da metodologia – Triton X-114 .....	50

4.5.2.	Extração em ponto nuvem e fluxograma da metodologia – SDS/CTAB.....	52
4.5.3.	Efeito da força iônica .....	53
4.5.4.	Estudo de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade .....	53
4.5.5.	Aplicação em amostra de água de manancial.....	55
4.5.6.	Alteração do pH da solução.....	56
4.5.7.	Adição de álcool.....	57
4.5.8.	Presença de par iônico.....	57
4.5.9.	Comparação da eficiência de extração com outro surfactante não iônico .....	57
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>5.1.</b>	<b>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Paraquat por espectrofotometria Uv-Vis .....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.</b>	<b>Efeito da força iônica .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3.</b>	<b>Estudos de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4.</b>	<b>Amostra real de água de manancial .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Até a segunda metade do Século XX, as relações produtivas dos seres humanos com a natureza eram coerentes, pois eles dependiam dela e de seus ciclos para se sustentar, e raramente se evidenciavam grandes degradações ambientais. Porém, após a Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento econômico e tecnológico se intensificou e o setor industrial se destacou frente ao setor agrário. Este por sua vez, teve que se industrializar para atender às novas necessidades culturais e de consumo (Silva & Falchetti, 2011).

A promoção do progresso não visava as questões ambientais; pensava-se somente no desenvolvimento econômico, na expansão territorial e nas indústrias de transformação, inserindo grandes quantidades de poluentes no meio ambiente (Silva & Falchetti, 2011).

Poluição é o termo utilizado quando há alteração em um ambiente decorrente da presença de substâncias que apresentam riscos e o meio é incapaz de neutralizar seus efeitos negativos, gerando desequilíbrio(s) ecológico(s) (Rocha, Rosa & Cardoso, 2004).

As fontes poluidoras podem ser classificadas em:

- Fontes pontuais: redes de efluentes domésticos e industriais, derramamentos acidentais, atividades de mineração e enchentes;
- Fontes não-pontuais: práticas agrícolas, emissões por veículos automotores, residências dispersas, deposições atmosféricas, trabalhos de construção, e enxurradas em solos;
- Fontes lineares: enxurradas em autoestradas, por exemplo (Rocha, Rosa & Cardoso, 2004; Spiro & Stigliani, 2009).

Os poluentes podem atingir os corpos hídricos por meio de diferentes setores:

- Setor urbano (águas residuárias urbanas: esgoto; restos de alimentos, detergentes, detritos orgânicos, material proteico, etc.),
- Setor industrial (águas industriais: substâncias tóxicas; derivados do petróleo, metais pesados, etc.),
- Setor agropecuário (detritos orgânicos de origem animal, fertilizantes, praguicidas, etc.) (Rocha, Rosa & Cardoso, 2004; Fellenberg, 2011).

Os dois maiores causadores de poluição ambiental são a industrialização e a produção de alimentos. Na industrialização, os processos de transformação da matéria-prima e produção dos artefatos existentes geram grandes quantidades de resíduos e poluição ambiental. Na produção de alimentos o problema consiste no crescimento contínuo da população, pois, as áreas de cultivo de alimentos não aumentam na mesma proporção e isto torna necessária a

máxima eficiência das culturas e a intensificação da produção nas áreas já utilizadas. Em meados da década de 60, a Revolução Verde, com a promessa de acabar ou pelo menos minimizar a fome no mundo, introduziu no campo a utilização de fertilizantes e pesticidas, maquinários agrícolas e sementes geneticamente modificadas, aumentando a produtividade, porém ocasionando problemas ecológicos e sociais (Silva & Falchetti, 2011).

Reduzir ou eliminar a utilização e geração de substâncias tóxicas é a mais fundamental abordagem para a prevenção da poluição e aplicação de tecnologias verdes (processos e produtos ambientalmente amigáveis). Muitos métodos oficiais realizados para detecção e quantificação dos agrotóxicos recomendam técnicas clássicas de extração que utilizam grandes quantidades de solventes orgânicos, os quais são frequentemente tóxicos e se descartados na água, no ar e no solo, podem poluir o meio ambiente até mais do que o uso desses agrotóxicos.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias de extração tem sido bastante explorado com o intuito de minimizar ou até mesmo eliminar os problemas relacionados com as técnicas convencionais. Assim, um grande esforço está sendo feito no sentido de eliminar, quando possível, ou substituir solventes orgânicos convencionais por solventes verdes, como por exemplo, fluidos supercríticos, líquidos iônicos à temperatura ambiente, produtos biodegradáveis e água (Lenardão, *et al.*, 2003; Patil, 2014).

Atenção considerável vem sendo dedicada ao uso de micelas de surfactantes para pré-concentração e separações em química analítica e nas ciências da separação (McIntire, 1990; Moradi & Yamini, 2012). Soluções aquosas de certas micelas de surfactantes exibem comportamento de separação de fases com rápida turbidez da solução em função da alteração da temperatura. Tal fenômeno vem sendo explorado nas ciências da separação para o desenvolvimento de metodologias de extração, purificação e esquemas de pré-concentração para diferentes classes de compostos, dentre as quais se destacam os pesticidas. O referido método, denominado extração em ponto nuvem, torna-se conveniente por exigir adição de pequena quantidade de surfactante na solução aquosa da amostra, eliminando a necessidade do uso de grandes quantidades de solventes orgânicos como nas técnicas de extração convencionais (Martínez, *et al.*, 2000; Martínez, *et al.*, 2003). Sua aplicação analítica está condicionada a qualquer componente presente na água que seja capaz de se associar às micelas, ou de ser dissolvido em seu interior orgânico. O desenvolvimento e a aplicação dessa técnica de extração estão em consonância com o conceito de tecnologias verdes ao empregar o uso de alternativas analíticas mais amigáveis e sustentáveis para a determinação de

compostos de interesse ambiental, como é o caso de pesticidas em águas naturais contaminadas.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade técnica de aplicação de uma metodologia mais limpa para a extração e pré-concentração do herbicida Paraquat em amostras de água, baseada na extração por ponto nuvem, e quantificação por espectrofotometria UV-Vis, para minimizar a geração de resíduos tóxicos.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Propor um processo de extração por ponto nuvem para pré-concentração do herbicida Paraquat utilizando padrões de concentração conhecida e variando o tipo de surfactante (não-iônico, catiônico e aniônico) e a sua concentração no meio, bem como a força iônica do sistema;
- Verificar se a técnica é adequada para a determinação analítica do Paraquat, após a extração em ponto nuvem, por medição direta ou após reação com ditionito de sódio em meio alcalino, seguida de análise por espectrofotometria UV-Vis;
- Avaliar o processo proposto em amostras de águas naturais, nas quais foi adicionada concentração conhecida de Paraquat, com vistas a avaliar a aplicabilidade da técnica.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os pesticidas, também conhecidos como agrotóxicos ou agrotóxicos, são substâncias químicas empregadas na produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, em florestas nativas ou plantadas. Seu uso tem como finalidade o controle de pragas e doenças que comprometem a produtividade agrícola. A Tabela 1 apresenta as diferentes categorias de pesticidas e seus organismos alvo (Baird & Cann, 2011). Inseticidas, acaricidas e fungicidas são alguns dos produtos mais utilizados. Herbicidas também são largamente empregados e são substâncias desfolhantes, dessecantes e estimuladores ou inibidores do crescimento vegetal empregados no controle de plantas daninhas (Peres, Moreira & Dubois, 2003; Carvalho & Pivoto, 2011; Steffen, Steffen, & Antonioli, 2011).

**Tabela 1:** Exemplos de pesticidas e seus organismos alvo.

<b>Tipo de pesticida</b>	<b>Organismo alvo</b>
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Aves
Bactericida	Bactérias
Desinfetante	Micro-organismos
Fungicida	Fungos
Herbicida	Plantas
Inseticida	Insetos
Larvicida	Larvas de insetos
Moluscicida	Caracóis, lesmas
Nematicida	Nematoídes
Piscicida	Peixes
Raticida	Roedores
Cupicida	Cupins

Fonte: Baird & Cann (2011)

O combate a insetos, fungos e plantas invasoras é realizado há aproximadamente 1.000 anos, inicialmente com a utilização de sulfeto de arsênio pelos chineses (Carvalho & Pivoto, 2011). Em escala mundial, os pesticidas começaram a ser utilizados a partir da Segunda Guerra Mundial (Carraro, 1997). No Brasil, estes produtos foram incorporados no mercado por volta da década de 1960 (Peres, Moreira & Dubois, 2003).

Apesar dos efeitos tóxicos, em potencial, sobre o ambiente e o homem, atualmente o uso de agrotóxicos é o método de controle mais amplamente usado devido à alta efetividade

em curto prazo, fácil aplicação e custo relativamente baixo, sendo, portanto, essencial na manutenção da alta produtividade na agricultura de larga escala. Nos últimos anos, agroquímicos mais seguros têm surgido no mercado, no entanto, ainda é comum o emprego de práticas inadequadas de aplicação e o uso de dosagens excessivas que levam à contaminação do solo e da água, causando efeitos danosos aos organismos não-alvo, o que inclui o ser humano.

Após a aplicação do composto no ambiente, as moléculas podem seguir diferentes rotas de acordo com os processos físico-químicos e biológicos que podem degradar ou movimentar o produto, depositando-se nos solos e em águas superficiais ou subterrâneas. Outros meios de contaminação ambiental se dão pela erosão do solo, carreamento do produto pelas águas da chuva, contato com embalagens descartadas de maneira inadequada, equipamentos de aplicação desregulados, lavagem de folhas tratadas e de equipamentos utilizados na aplicação do produto e por descarte inadequado de efluentes industriais contendo esses pesticidas (Carvalho & Pivoto, 2011; Steffen, Steffen, & Antonioli, 2011).

A utilização abusiva de pesticidas é um dos principais fatores de poluição do solo, águas subterrâneas e superficiais. O monitoramento dos resíduos desses compostos nas diferentes matrizes ambientais tem se tornado imprescindível para a minimização do impacto ambiental, pois, quão breve for sua detecção, mais rápida será a intervenção, sendo essencial o papel da química analítica em fornecer respostas quanto à presença e concentração desses resíduos no ambiente (Faria, Queiroz & Neves, 2005).

### **3.1. Herbicidas**

Os herbicidas são compostos químicos utilizados na destruição de plantas, principalmente ervas daninhas, sem causar danos para a cultura de interesse. Exemplos de usos dos herbicidas são eliminação de dicotiledôneas (folhas largas) em gramados, sem matar a grama (monocotiledônea), destruição de plantas indesejáveis em acostamentos de estradas e linhas férreas, renovação de pastagens, dessecação pré-colheita, desfolhação de regiões inteiras, entre outros (Rocha, Rosa & Cardoso, 2004; Baird & Cann, 2011; Oliveira Junior, 2011).

As ervas daninhas podem atrapalhar o desenvolvimento de uma lavoura e, depois que estas dominam a área, competem por água, luz, nutrientes e espaço. Elas precisam ser removidas antes do plantio e controladas após a inserção das culturas (Embrapa, 2004).



Na agricultura comercial, a extração manual e mecânica das ervas daninhas foi largamente substituída pela utilização dos herbicidas. Este produto melhora a produtividade agrícola, reduz a necessidade de mão-de-obra, minimiza a erosão do solo por não perturbá-lo e pode diminuir o valor final dos alimentos (Spiro & Stigliani, 2009; Baird & Cann, 2011).. Deve-se considerar, também, que no plantio direto menos maquinário e, conseqüentemente, menos combustível é necessário para cultivar uma lavoura, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa (MAPA, 2015).

Um herbicida com baixa toxicidade para animais, pois a enzima afetada é exclusiva de plantas, e amplamente utilizado devido a sua alta eficiência e baixo impacto é o Glifosato (N-(fosfonometil) glicina,  $C_3H_8NO_5P$ ). O Glifosato expandiu a utilização do plantio direto, substituindo a necessidade do arado. Contudo, o emprego prolongado deste herbicida causou um efeito colateral a diversas espécies de ervas daninhas, a resistência ao seu modo de ação (inibição da síntese da enzima EPSP – 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato – utilizada na geração de aminoácidos necessários à planta) (Spiro & Stigliani, 2009; Fellenberg, 2011). A fim de se solucionar este problema, outro herbicida passou a ser largamente empregado no controle a ervas daninhas: o Paraquat (Embrapa, 2006).

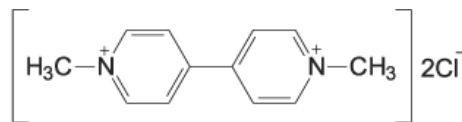
### **3.1.1. Paraquat**

O Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto,  $C_{12}H_{14}Cl_2N_2$ ) é um herbicida de contato não seletivo que, desde sua descoberta há cerca de 50 anos, é muito utilizado em diversas culturas para o controle de ervas daninhas, como agente dessecante ou desfolhante e como herbicida aquático (Kambhampati, *et al.*, 1994; Otero, *et al.*, 2006). É uma substância sólida, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 1. A formulação comercial consiste de uma solução na concentração de  $200 \text{ g L}^{-1}$ , 20% (m/v) (Souza & Machado, 2003; Oliveira & Brighenti, 2011). O Paraquat é muito solúvel em água e, quando em solução, apresenta-se com carga positiva. Outras características interessantes do Paraquat são estabilidade térmica, baixa volatilidade e manutenção de suas propriedades em soluções neutras e ácidas (Kambhampati, *et al.*, 1994), despertando o interesse para a ampla aplicação desse composto. Normalmente, a degradação do Paraquat ocorre rapidamente quando exposto à radiação solar. No entanto, quando liberado em solos argilosos, grande quantidade é retida pelos sítios adsorptivos das partículas de argila estabilizando o produto, dificultando, portanto, a sua degradação (Oliveira & Brighenti, 2011). A adsorção do Paraquat é interlaminar e herbicidas adsorvidos podem ser transportados pela erosão do solo para águas superficiais (Guimarães,

1987; EPA, 1997 (b)). Porém, se o pH da solução do solo ou de águas superficiais estiver maior que o  $pK_a$  do Paraquat, que é de aproximadamente 9,5, a concentração da forma neutra será maior que a da forma protonada, possibilitando a dessorção e aumentando a mobilidade e disponibilidade do contaminante (Oliveira & Brighenti, 2011).

Nos padrões normais de uso, o Paraquat não é considerado perigoso para as águas subterrâneas (EPA, 1997 (b)). A dose recomendada de aplicação varia de 300 a 600 g i.a.  $ha^{-1}$ , (g i.a. = gramas de ingrediente ativo) dependendo das espécies a serem controladas (Embrapa, 2006). Dentre os principais países do continente Americano, somente o Canadá incluiu o Paraquat nos índices para controle do padrão de potabilidade da água, sendo o limite de 10  $\mu g/L$  (Bastos, *et al.*, 2004).

**Figura 1:** Fórmula estrutural do herbicida Paraquat na forma dicloreto.



Fonte: Souza & Machado (2003)

O local de atuação do Paraquat nas plantas é o cloroplasto. Os cloroplastos realizam a fotossíntese nas plantas verdes, absorvendo a energia luminosa usada para produzir açúcares. O mecanismo de ação do Paraquat consiste em inibir a fotossíntese por meio da formação de radicais livres. Ele atua como um falso aceptor de elétrons, no qual os elétrons livres do fotossistema reagem com o cátion Paraquat, resultando em um radical livre. O oxigênio presente no ar rapidamente reage com o radical livre formando superóxidos. Os superóxidos atacam os ácidos graxos insaturados das membranas, abrindo e desintegrando os tecidos da célula. A ruptura das membranas celulares permite o escape da água do material vegetal e leva à desidratação da folhagem com consequente necrose e morte. A ação é intensificada pela intensidade luminosa e pela umidade (Oliveira Junior, 2011).

Este herbicida é utilizado em cerca de 90 países no preparo da terra, para o plantio de mais de 100 tipos de lavouras ou no controle de ervas daninhas inclusive nos principais mercados agrícolas com sistemas de regulamentação bastante exigentes, como Canadá, Austrália, EUA, Japão e Nova Zelândia. Exemplos das principais aplicações em culturas são:

- alimentares: milho, arroz, soja, trigo, batatas;

- frutíferas: maçãs, laranjas, bananas;
- bebidas: café, chá, cacau;
- processadas: algodão, dendê, açúcar e borracha (Schmitt, *et al.*, 2006).

Existem relatos de intoxicações por Paraquat por via dérmica, ocular e por injeção intramuscular, subcutânea ou endovenosa (em casos de suicídio por envenenamento). Entretanto, do ponto de vista toxicológico, as intoxicações resultantes de ingestão de Paraquat são as mais importantes (González, *et al.*, 2001; Soloukides, *et al.*, 2007). O Paraquat é extremamente tóxico podendo ser letal para humanos e animais. Este produto, quando em contato com determinadas enzimas como, por exemplo, NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo), torna-se um radical que, em presença de oxigênio, oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido, regenerando a molécula de Paraquat, disponibilizando-a para novos ciclos de redução e oxidação e produzindo grande quantidade de oxigênio que leva o organismo ao estresse oxidativo ou à peroxidação de lipídeos (Serra, Domingos & Prata, 2003; Souza & Machado, 2003). Em caso de ingestão, o produto se dispersa rapidamente pelo organismo por meio da circulação sanguínea e órgãos muito vascularizados como pulmões, rins e fígado podem ser afetados (Serra, Domingos & Prata, 2003). O composto é considerado um fator de risco para a doença de Parkinson (Hao, *et al.*, 2013) e a dose letal média via oral para 50% dos animais testados (DL50) varia entre 22 e 262 mg da formulação/kg dependendo da espécie (Schmitt, *et al.*, 2006).

O herbicida Paraquat, por se tratar de um produto persistente e de alta toxicidade, exige um rigoroso controle de sua presença no ambiente, pois quanto mais rápida e eficiente for a detecção do composto, mais rapidamente poderão ser realizadas técnicas de remediação na área e, assim, menor será o impacto ambiental. Atualmente, as técnicas analíticas empregadas na determinação e quantificação do herbicida Paraquat utilizam produtos que também são deletérios ao meio ambiente, por isso, a proposta de metodologias mais limpas e com menor geração de resíduos para disposição final é de grande interesse nas áreas ambiental, clínica e forense (Ruiz, *et al.*, 1996).

### **3.2. Sequência analítica**

Apesar dos avanços na instrumentação analítica em termos de sensibilidade e seletividade, etapas de extração e pré-concentração ainda são muito utilizadas para

determinação de elementos traço, especialmente em matrizes ambientais (Pereira & Arruda, 2003).

A sequência analítica consiste nas principais etapas de uma análise:

- Definição do problema – informação necessária;
- Escolha do método – deve considerar a quantidade e o tipo de amostra, o elemento de interesse e sua concentração, o custo e a frequência da análise;
- Amostragem – deve ser representativa;
- Pré-tratamento da amostra – deve considerar as substâncias de interesse, a faixa de concentração, a quantidade de amostra disponível, o método e o custo; é uma etapa crítica, onde se comete mais erros, se gasta mais tempo e a que possui o maior custo;
- Calibração – resposta do sistema de detecção para quantidades conhecidas do analito;
- Medida – obtenção dos dados analíticos;
- Avaliação – confiabilidade dos resultados;
- Ação – utilização da informação da análise para tomada de decisão (Gaubeur, 2014; Nomura, 2014 (b)).

### **3.3. Quantificação do herbicida Paraquat**

A determinação de resíduos de herbicidas é realizada, geralmente, por análise cromatográfica, recorrendo-se tanto a métodos de cromatografia gasosa como de cromatografia líquida. Métodos alternativos baseados em análises por eletroforese capilar ou espectrofotometria também podem ser utilizados para esse fim. A escolha dos detectores dos métodos de separação depende, entre outros fatores, das características estruturais dos herbicidas em questão, da sensibilidade e da linearidade requeridas (LeDoux, 2011).

A Tabela 2 apresenta estudos com diferentes estratégias de extração e quantificação do herbicida Paraquat.

**Tabela 2:** Diferentes estratégias de extração e quantificação do herbicida Paraquat e exemplos de solventes utilizados.

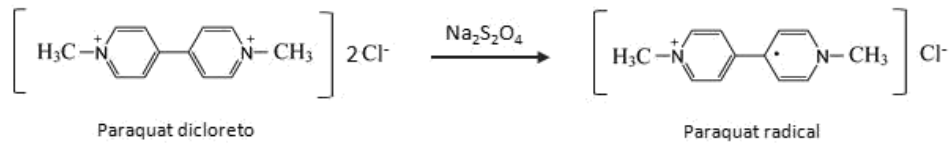
Matriz	Extração	Eluente	Técnica	Recuperação	Referência
Soro	Extração em fase sólida	Metilisobutilcetona / Dodecil sulfato de sódio	Espectrofotometria	73 %	Kuo, 1984
Água potável	Resina de troca iônica	Hexano / Metanol / Acetato de amônio / Acetonitrila	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos e confirmação com espectrometria de massas	83 - 97 %	Kambhampati, <i>et al.</i> , 1994
Água potável	Extração em fase sólida	Metanol / Brometo de cetil trimetil amônio / Hidróxido de amônio / Ácido 1-hexano sulfônico / Ácido ortofosfórico / Dietilamina	Cromatografia de pareamento iônico com detector ultravioleta	88 - 94 %	EPA, 1997 (a).
Água potável Água de rio Água de lago	Extração em fase sólida	Ácido trifluoroacético / Metanol	Cromatografia a líquido com fonte de ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massas	46 - 85 %	Taguchi, <i>et al.</i> , 1998
Soro Urina	Líquido - Líquido	Sulfato de amônio / Clorofórmio / Fenol	Eletroforese capilar com detector ultravioleta	53 - 72 %	Vinner, <i>et al.</i> , 2001
Óleo de oliva	Líquido - Líquido	n-Hexano / Ácido heptafluorobutirico	Cromatografia a líquido com fonte de ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massas	≥ 92 %	Aramendía, <i>et al.</i> , 2006

Água potável	Extração em fase sólida	Ácido sulfúrico / Hidróxido de amônio / Sulfato de sódio / Metanol	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos	95 - 98 %	Otero, <i>et al.</i> , 2006
Plasma Urina	Extração em fase sólida	Borohidreto de sódio / Metanol	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	68 – 98 %	Almeida & Yonamine, 2007
Soro humano	Líquido - Líquido	Ácido tricloroacético	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector ultravioleta	99 - 100 %	Hara, <i>et al.</i> , 2007
Batatas Cereais Leguminosas	Líquido - Líquido	Metanol / Ácido Clorídrico	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em tandem	92 - 120 %	Kolberg, <i>et al.</i> , 2012
Água potável Água natural	Extração em fase sólida	Acetato de amônio / Acetonitrila	Cromatografia a líquido de alta eficiência com detector ultravioleta	104 - 105 %	Jing, Qun & Roher, 2013

### 3.3.1. Método colorimétrico e espectrofotométrico

O método colorimétrico consiste em uma reação química do Paraquat com o reagente ditionito de sódio (hidrosulfito de sódio –  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Figura 2), em meio básico, que reduz a molécula de Paraquat e gera um radical de coloração azul. Esta reação segue uma proporcionalidade que permite a avaliação da presença do composto, ou seja, a cor se intensifica à medida que a concentração do analito aumenta, de acordo com a lei de Beer (Pereira & Dantas, 1995; Gabriel, *et al.*, 2002; Abreu, 2008).

**Figura 2:** Reação entre Paraquat e ditionito de sódio.



Fonte: modificado de Hara *et al*, (2007)

Este procedimento deve ser executado com cautela, pois o ditionito é facilmente oxidado pelo ar, e devido a isso, a solução deve ser armazenada protegida da luz, misturada cautelosamente e utilizada em até três horas após o preparo, caso contrário, haverá a diminuição ou ausência da coloração, suscitando concentrações menores que as reais e erros de determinação (Pereira & Dantas, 1995). A medida da intensidade colorimétrica é obtida por espectrofotometria na região do visível (Vis). A espectrofotometria é uma das técnicas analíticas mais empregadas por utilizar um equipamento robusto, com custo relativamente baixo, e que, ocasionalmente, cobrem uma ampla faixa do espectro eletromagnético (região do visível, ultravioleta e até infravermelho próximo). É uma ferramenta que permite a obtenção de medidas de absorção ou transmitância e de parâmetros físico-químicos, por exemplo, constantes de equilíbrio e velocidades de reação (Rocha & Teixeira, 2004).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer e envolve a medida direta de espécies que absorvem radiação nas regiões ultravioleta, visível ou infravermelho do espectro eletromagnético. À medida que a luz atravessa um meio contendo um analito que a absorve, um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado; quanto maior for a concentração do analito, maior será a absorção (Rocha & Teixeira, 2004). As medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda são obtidas por meio da Equação 1.

$$A = \epsilon bc$$

(Equação 1)

Onde:

A = absorvância

$\epsilon$  = absorvidade molar, é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente

b = distância percorrida pelo feixe através da amostra

c = concentração da espécie absorvente

Fonte: Rocha & Teixeira (2004)

A extensão do caminho do meio sobre o qual a luz percorre também influencia na absorvância da radiação, pois, quanto mais longo for o comprimento (caminho óptico), maior será a absorção, pois aumentará a quantidade de analitos absorvendo a radiação (Rocha & Teixeira, 2004).

### **3.3.2. Cromatografia líquida de alto desempenho**

A cromatografia se baseia na separação das moléculas por meio das diferenças em suas estruturas e/ou composição. Em geral, utiliza-se uma fase estacionária imobilizada em uma coluna ou sobre uma superfície plana, e uma fase móvel (eluente), que se movimenta através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos. Os componentes são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração (diferentes afinidades e interações entre duas fases imiscíveis) (Kupiec, 2004; Jakhotiya & Shrivastva, 2013). Na cromatografia líquida a fase móvel é constituída, comumente, por solventes orgânicos, podendo também ser empregadas soluções aquosas (Collins, Braga & Bonato, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (*high-performance liquid chromatography* – HPLC) é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados, e a fase móvel é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Vários tipos de detectores podem ser colocados na saída da coluna para proporcionar uma identificação e quantificação continua dos componentes da amostra (UV-Vis, fluorescência, condutométricos entre outros). A análise



quantitativa por HPLC pode atingir uma precisão superior a 0,5% (Collins, Braga & Bonato, 2006).

Para a determinação de herbicidas, a coluna comumente utilizada é a de fase reversa C<sub>18</sub>, onde os componentes da amostra são separados pelas diferenças de polaridade, criando forças de interações específicas entre o substrato (fase estacionária), a fase móvel e os analitos (Jing, Qun & Roher, 2013).

### ***3.3.3. Cromatografia de pareamento iônico***

A cromatografia de pareamento iônico (IPC) pode ser considerada uma modificação da cromatografia líquida convencional, possibilitando uma maior versatilidade da metodologia. A essência deste modo de separação consiste na modificação dinâmica da superfície da fase estacionária apolar de uma cromatografia empacotada para a adsorção de solutos iônicos orgânicos e inorgânicos.

Na cromatografia líquida, a maioria das separações é feita com fases estacionárias convencionais de alquil-sílica, em geral C<sub>18</sub> e C<sub>8</sub>. O alto custo das colunas cromatográficas pode inviabilizar a aquisição de uma elevada gama de colunas com composição química diferenciada. Tal inconveniente pode ser contornado adicionando, junto à fase móvel, um reagente de pareamento iônico (IPR) para garantir características de polaridade diferenciada à fase estacionária (Cecchi, 2008). A grande vantagem da IPC em relação a cromatografia convencional é que o IPR é, primeiramente, ligado à fase estacionária hidrofóbica (coluna de C<sub>18</sub>, por exemplo) por meio de sua parte apolar e, uma vez adsorvida, interage com os componentes da fase móvel através de forças iônicas e polares (Collins, Braga & Bonato, 2006).

Comumente, a fase móvel para IPC é composta por:

- modificador orgânico, o qual é adicionado para aumentar a solubilidade do analito, melhorando a interação da fase estacionária apolar empacotada e ajustando a retenção e seletividade do analito;
- aditivos para mascarar íons de metais pesados que prejudiquem a eficiência cromatográfica;
- reagente de pareamento iônico, entre os quais se destaca a série homóloga de compostos perfluorados, ácidos carboxílicos e sais caotrópicos;

- solução tampão, já que o pH do eluente constitui um importante parâmetro de otimização, uma vez que controla o grau de ionização dos solutos e, com isso, a magnitude das interações eletrostáticas podendo ser utilizado para regular a seletividade (Cecchi, 2008).

A metodologia de referência para análise de Paraquat, juntamente com outro herbicida, o Diquat, em águas de abastecimento é preconizada pela EPA e está baseada em extração em fase sólida seguida da determinação por IPC (EPA, 1997(a)).

#### **3.3.4. Cromatografia a gás**

A cromatografia a gás (GC) é uma técnica de separação e análise de misturas que contenham compostos voláteis e semivoláteis. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de determinado gás de arraste inerte, denominada fase móvel, e levada até uma coluna contendo a fase estacionária, onde ocorre a separação por partição da mistura. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente, ou mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil. A fase móvel não interage com os compostos presentes na amostra, sua única função é transportar o analito (Silva, 2003; Holler, Skoog & Crouch, 2009).

As substâncias separadas eluem da coluna em tempos diferentes de acordo com as características da coluna e das condições experimentais (vazão da fase móvel, temperatura da coluna, entre outras) e passam por um detector que gera um sinal proporcional à concentração de analitos eluídos (Silva 2003).

Na GC é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e seja estável termicamente para não se decompor nas condições de separação. Os métodos de detecção utilizados em GC são rápidos e sensíveis, como, por exemplo, o de captura de elétrons (ECD), de condutividade térmica (TCD) e o de ionização por chama (FID) (Georgakopoulos, *et al.*, 2011). A espectrometria de massa (MS) também é utilizada com frequência na detecção dos compostos, pois proporciona, para além da quantificação, uma identificação estrutural precisa das substâncias (Fenik, Tankiewicz & Biziuk, 2011; LeDoux, 2011).

#### **3.3.5. Eletroforese capilar**

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação baseada na diferença de migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico (Silva, 2003;

Spudeit, Dolzan & Micke, 2012). A separação é conduzida em uma coluna capilar de sílica fundida preenchida com eletrólito específico para a análise de interesse.

Na CE ocorre um fenômeno denominado fluxo eletrosmótico, no qual os grupos silanóis ( $-\text{SiOH}$ ), constituintes do revestimento interno do capilar de sílica, ficam negativamente carregados entre pHs 2 e 8,5, gerando íons silanoatos ( $-\text{SiO}^-$ ) na parede da coluna e esses, quando submetidos a ação de um campo elétrico pela aplicação de uma diferença de potencial, fazem com que os íons presentes na amostra, pela diferença de cargas, se movam em direção ao eletrodo de carga oposta (Silva, 2003; Spudeit, Dolzan & Micke, 2012). Os íons que interagirem eletrostaticamente com o revestimento do capilar, migrarão mais lentamente e serão detectados posteriormente por um dispositivo detector posicionado ao fim dessa coluna capilar. Comumente, utilizam-se detectores UV-Vis, fluorimétricos, condutométricos ou potenciométricos na determinação por CE.

A adição de componentes no eletrólito, como, por exemplo, surfactantes, podem causar a modificação da superfície interna do capilar, e esta pode ser dinâmica ou permanente, por meio da adsorção ou alteração química da sílica, respectivamente (Spudeit, Dolzan & Micke, 2012).

As vantagens de utilização da CE são a vasta gama de aplicação da técnica, inclusive na análise de pesticidas, o baixo custo analítico (destacando-se o baixo custo das colunas capilares), a simplicidade na operação e no manuseio, o tempo de análise, além da redução significativa nas quantidades de reagentes e solventes orgânicos utilizados, especialmente quando comparada à técnica de HPLC (Spudeit, Dolzan & Micke, 2012). Entretanto, a técnica ainda é pouco aplicada para fins de análise de rotina e requer maior conhecimento da dinâmica de separação para ajuste das condições analíticas.

### **3.4. Técnicas de preparo de amostra para determinação de Paraquat**

A escolha adequada de uma técnica de preparo da amostra também é um fator importante para a obtenção de resultados analíticos confiáveis e exatos. A técnica deve ser simples, reduzindo o tempo e as etapas de análise e diminuindo a introdução de erros; seletiva, proporcionando maior detectabilidade; rápida; com instrumentação de baixo custo; quando necessário, incluir uma etapa de concentração do analito para atingir o nível de detecção do instrumento utilizado para determinação; e, consumir quantidades mínimas de reagentes e solventes, reduzindo os riscos ao meio ambiente (Jardim, 2010).

Na etapa de pré-tratamento da amostra, os erros mais cometidos são a contaminação (pelo ar, impurezas de reagentes, inclusive a água, ou pelos materiais), perda de elementos (por volatilização ou adsorção) e decomposição incompleta das amostras em estratégias de abertura de amostra (Nomura, 2014 (a)).

Usualmente, os pré-tratamentos empregados para determinação do Paraquat em amostras ambientais são extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração com resina de troca iônica, muitas vezes com utilização de solventes orgânicos (Pereira & Arruda, 2003; Hara, *et al.*, 2007), para posterior determinação e quantificação por HPLC, GC, IPC ou CE (Kambhampati, *et al.*, 1994; Hara, *et al.*, 2007).

### **3.4.1. Extração líquido-líquido**

Extração líquido-líquido, também conhecida como extração por solvente, consiste na partição de um analito ou de compostos específicos presentes em uma mistura de líquidos heterogêneos, baseada em suas diferentes solubilidades nos dois líquidos imiscíveis, como, por exemplo, água e um solvente orgânico. A natureza do solvente extrator, o pH e a força iônica também podem influenciar na eficiência da extração, como por exemplo, adicionando-se sal à solução, a força iônica será alterada, o que pode resultar na diminuição da solubilidade do analito na fase aquosa e sua migração para o solvente orgânico extrator (Kebbekus & Mitra, 1998; Arruda, 2006).

A amostra aquosa contendo a substância de interesse é agitada na presença do solvente e, se o mesmo possuir densidade menor que a fase aquosa, ficará na parte superior do recipiente; caso contrário, se depositará no fundo. Posteriormente à extração, idealmente, o solvente pode ser reciclado e reutilizado (Kebbekus & Mitra, 1998).

Este procedimento pode ser aplicado na separação e pré-concentração de espécies orgânicas e inorgânicas (Pereira & Arruda, 2003), entretanto, a extração líquido-líquido possui limitações como baixa seletividade; possibilidade de formação de emulsões, comprometendo a extração; e, muitas vezes, necessidade de utilização de solventes de caráter tóxico (Arruda, 2006).

### **3.4.2. Extração em fase sólida**

A extração em fase sólida foi desenvolvida em 1976 para suprir as desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido e, hoje, é o método mais comumente utilizado para

extração e quantificação de pesticidas, inclusive o Paraquat. Os principais objetivos desta técnica são a remoção de interferentes da matriz da amostra, a pré-concentração e o isolamento dos analitos. Esta técnica consiste na retenção do analito por um par iônico (Picó, *et al.*, 2000). Substâncias semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas são retidas em um adsorvente, enquanto que os interferentes e os demais componentes da matriz da amostra são eluídos pela fase sólida. A espécie de interesse é posteriormente eluída da fase sólida com auxílio de um solvente adequado ou dessorção térmica, no caso dos compostos semivoláteis (Jardim, 2010).

A técnica de extração em fase sólida pode ser realizada utilizando-se membranas, colunas descartáveis em forma de seringas, cartuchos ou discos. A fase sólida extratora, comumente, é um composto orgânico hidrofóbico que recobre ou está quimicamente ligado à sílica granulada, e este pode ser não polar, moderadamente polar ou polar (Skoog, *et al.*, 2007).

Os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) introdução da amostra, com retenção do analito; 3) limpeza da coluna com solvente para retirar os interferentes menos retidos que o analito; 4) eluição do analito (Jardim, 2010; Macherey-Nagel, 2015).

Apesar da simplicidade, a técnica apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise, os altos custos dos cartuchos de extração (além destes serem descartáveis) e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada (Jardim, 2010).

Um exemplo de aplicação da extração em fase sólida é a determinação de constituintes orgânicos em água potável por meio de métodos aprovados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – Environmental Protection Agency) (EPA, 1997 (a)).

### **3.4.3. Resinas de troca iônica**

A separação por troca iônica é um processo pelo qual os íons presos em um sólido poroso, e essencialmente insolúvel, são trocados por íons de mesma carga presentes em uma solução que é levada ao contato com o sólido (Alexandratos, 2009; Kammerer, Carle & Kammerer, 2011).

As resinas sintéticas utilizadas neste processo foram inicialmente produzidas em 1935 e desde então encontraram ampla aplicação em análises de água, na purificação de soluções e na separação de íons. Estas resinas são de grande importância na concentração de íons de soluções diluídas (traços de elementos podem ser coletados em uma coluna e posteriormente liberados da resina por tratamento com um pequeno volume de solvente, resultando em uma solução consideravelmente mais concentrada) e na eliminação de íons com potencial de interferência nas análises (Skoog, *et al.*, 2007). A atração entre as cargas presentes no analito e na superfície da resina é eletrostática (Silva, 2003).

As resinas utilizadas são polímeros de alto peso molecular que contêm um grande número de grupos funcionais iônicos por molécula. As resinas trocadoras podem ser classificadas em dois grupos: de cátions, com grupos ácidos negativamente carregados; e, de ânions, que possuem grupos básicos positivamente carregados (Alexandratos, 2009; Kammerer, Carle & Kammerer, 2011).

Uma importante característica das resinas de troca iônica é a insolubilidade, pois esta permite a sua reutilização por muitos anos (Alexandratos, 2009), porém outras características devem ser consideradas quando do uso, tais como: composição da matriz, polaridade, tamanho da partícula, entre outras (Kammerer, Carle & Kammerer, 2011). Assim como os sistemas de extração em fase sólida, a técnica apresenta como desvantagem o tempo elevado do processo, além de possuir uma menor seletividade.

#### **3.4.4. Extração em ponto nuvem**

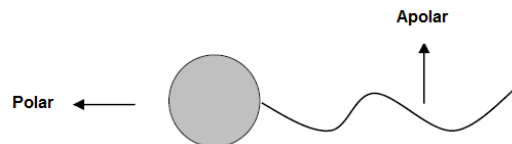
Atualmente, com o reconhecimento da necessidade de utilização de tecnologias verdes em química analítica (reduzindo-se o consumo de energia e recursos e a geração de resíduos) (Colin & Cann, 2011), e a indispensabilidade de procedimentos rápidos, simples e eficientes para análises ambientais em nível de traço e ultratraços, faz-se necessário o desenvolvimento e aplicação de procedimentos mais limpos de preparo de amostra, como, por exemplo, por extração em ponto nuvem. Tal alternativa se torna bastante vantajosa quando aplicada à análises ambientais, pois evita a utilização de solventes tóxicos e inflamáveis, diminui o limite de detecção da técnica de análise escolhida devido ao alto fator de pré-concentração, mitiga as perdas de analitos por não utilizar processos de evaporação de solvente, e possui boa relação custo-benefício por não requerer reagentes de alto custo tampouco equipamentos sofisticados (Faria, Queiroz & Neves, 2005).

Com a substituição dos solventes por baixas quantidades de reagentes com menor toxicidade (no caso, surfactantes) a extração por ponto nuvem, quando comparada com outras técnicas de extração, é menos prejudicial ao meio ambiente.

A técnica de extração por ponto nuvem (CPE) se baseia no fenômeno em que uma solução aquosa de surfactante torna-se turva por adição de alguma substância apropriada ou por alteração de alguma de suas propriedades. A turbidez ocorre quando o composto atinge seu ponto nuvem (Bezerra & Ferreira, 2006).

Os surfactantes apresentam em sua estrutura uma extremidade com cadeia de hidrocarboneto, apolar, e outra extremidade polar (Faria, Queiroz & Neves, 2005; Silva, 2008), conforme representado na Figura 3.

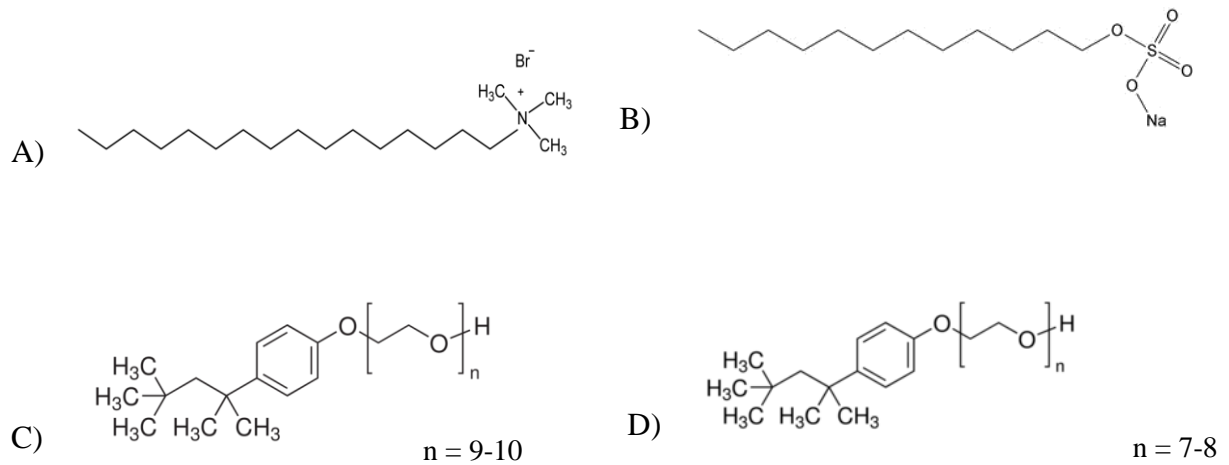
**Figura 3:** Estrutura genérica de um tensoativo.



Fonte: modificado de Silva (2008)

Os surfactantes são ainda classificados segundo seu grupo hidrofílico, sendo eles catiônicos (o grupo hidrofílico possui carga positiva, como por exemplo o brometo de cetiltrimetil amônio - CTAB), aniônicos (o grupo hidrofílico possui carga negativa, como por exemplo o dodecil sulfato de sódio - SDS), não iônicos (o grupo hidrofílico não possui carga, mas a solubilidade se dá por seus grupos fortemente polares, com as hidroxilas, ou pelos menos polares, como os óxidos de etileno, como por exemplo o Triton X-114 (1,1,3,3-tetrametilbutil fenil-poli-etilenoglicol) e anfóteros (nos quais há grupos catiônicos e aniônicos e a estrutura que prevalecerá dependerá do pH da solução, formando espécies catiônicas, aniônicas ou neutras, como por exemplo o butirato de 4-dodecil dimetil amônio - DAB) (Bezerra & Ferreira, 2006). A Figura 4 ilustra as estruturas dos surfactantes mais utilizados em extração em ponto nuvem: CTAB, SDS, Triton X-100 e Triton X-114.

**Figura 4:** Estrutura química dos surfactantes:  
A) CTAB; B) SDS; C) Triton X-100; D) Triton X-114.



Fonte: Sigma Aldrich (2015)

Os surfactantes são capazes de formar micelas, estruturas de dimensões coloidais geradas pela agregação espontânea de suas moléculas. Quando submetidas a diferentes condições experimentais, como, por exemplo, aumento da temperatura, intensidade iônica e presença de contra íons, atinge-se a concentração micelar crítica (CMC), concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas. Abaixo da CMC, o surfactante está predominantemente na forma de monômeros não associados. Acima da CMC, a formação de agregados micelares é favorecida, porém, ainda há um equilíbrio entre as micelas e os monômeros (Faria, Queiroz & Neves, 2005; Silva, 2008).

O aumento da temperatura provoca a desidratação do grupo hidrofílico das moléculas de surfactante, um aumento do número de agregação e uma elevação do tamanho das micelas até que um fenômeno de separação de fases ocorre. Um composto dissolvido em água, tal como um composto orgânico, com pouca afinidade pela água, se dividirá preferencialmente em favor do surfactante, devido a sua solubilização nos agregados micelares (Duarte & Canselier, 2005).

A temperatura a ser aplicada para atingir a CMC, e, conseqüentemente o ponto nuvem, é característica para cada surfactante, mas empiricamente é caracterizada pela turbidez da amostra. Esta turbidez apresenta duas fases: uma de menor volume e rica em surfactante, contendo o analito desejado, e outra aquosa, de maior volume, denominada de fase pobre pela baixa concentração de surfactante (Ramella, 2009).



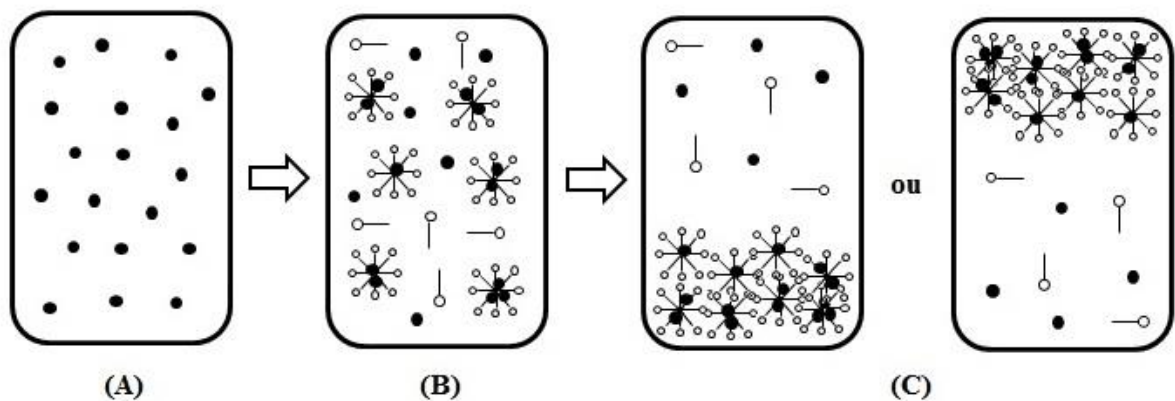
Assim, pode-se dizer que a CPE deve ser realizada sob condições ideais a fim de que a pré-concentração seja maximizada. Quantitativamente, o máximo de eficiência de extração é estimado pelo fator de enriquecimento (FE), também chamado de fator de pré-concentração, o qual é um parâmetro utilizado para determinar a capacidade de extração de analitos em sistemas micelares. O fator de enriquecimento é definido como a relação entre a concentração de analito na fase rica em surfactante ( $C_s$ ) e a concentração em solução aquosa antes da etapa de pré-concentração ( $C_{AQ}$ ), ou seja,  $FE = C_s / C_{AQ}$ . Em geral, o FE é ditado por  $V_{aq} / V_s$ , ou seja, a relação entre o volume de fase aquosa inicial ( $V_{aq}$ ) e o volume da fase rica em surfactante ( $V_s$ ), após a separação de fase. Isso depende da relação de fase, ou seja, do coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) do analito entre as fases rica e aquosa e da concentração de surfactante.

Vários fatores devem ser levados em conta, a fim de obter o máximo de FE. Sabe-se que o processo de extração e de pré-concentração pode ser alterado pelos tipos e concentração dos surfactantes e aditivos, pH, temperatura e tempo de equilíbrio e condições de centrifugação (Li & Chen, 2003; Xie et. al., 2010). Há uma estreita faixa de concentração do surfactante em que a separação de fases ocorre mais facilmente, e na qual a eficiência de extração e o sinal analítico são máximos. Acima dessa faixa, o sinal analítico é prejudicado devido ao aumento do volume final da fase micelar, afetando o fator de pré-concentração. No entanto, se a concentração de surfactante é menor do que a recomendada, a precisão e reprodutibilidade, provavelmente, serão afetadas devido à fase resultante rica em surfactante não ser suficiente para serem obtidas medidas reprodutíveis da extração e separação (Paleologos et al., 2005).

Do ponto de vista metodológico, o processo de extração em ponto nuvem é feito pela adição de surfactante puro (ou solução concentrada do surfactante) à uma solução aquosa contendo os componentes a serem extraídos e/ou pré-concentrados. A quantidade de surfactante adicionada deve assegurar a formação dos agregados micelares em solução, ou seja, a concentração final do surfactante em solução deve exceder a CMC. Qualquer espécie que se associe e se ligue ao agregado micelar em solução pode ser subsequentemente extraída em diferentes partições, dependendo da força da interação da ligação micela-soluto. Em seguida, as condições são alteradas pelo aumento da temperatura, adição de sal ou de outro surfactante para assegurar que a solução micelar seja separada da fase aquosa. A centrifugação pode ser empregada, quando necessário, para acelerar a separação das duas

fases. Deve-se, no entanto, tomar cuidado para que a temperatura da solução não seja inferior à do ponto nuvem durante a centrifugação, pois o processo de separação de fases é reversível, e, abaixo da temperatura do ponto nuvem, será obtida novamente uma única fase. A fase rica em surfactante contendo os componentes extraídos pode ser submetida a tratamento adicional antes da etapa de quantificação (por exemplo, derivatização química). A Figura 5 ilustra o processo de extração em ponto nuvem e o desenvolvimento das fases rica e pobre.

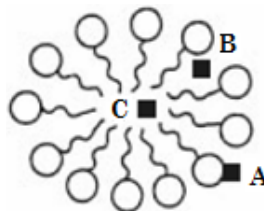
**Figura 5:** Esquema do processo de extração e pré-concentração utilizando ponto nuvem:  
 (A) Solução com o analito, (B) Adição do surfactante para formação do meio micelar,  
 (C) Separação das fases após aquecimento e centrifugação.



Quando há utilização de sal para facilitar a separação das fases, interpreta-se que o ponto nuvem é atingido pela ação de efeitos eletrostáticos de cargas repulsivas (Bezerra & Ferreira, 2006).

A solubilização das espécies nas micelas varia de acordo com a sua natureza. Espécies químicas polares ou com carga são solubilizadas nos espaços entre os grupos polares das micelas; moléculas anfipáticas (que possuem uma região hidrofílica e outra hidrofóbica) são solubilizadas nas interfaces entre os grupos polares e o núcleo; e espécies não polares ou sem carga são solubilizadas no núcleo das micelas (Bezerra & Ferreira, 2006), conforme apresentado na Figura 6.

**Figura 6:** Representação bidimensional de uma micela e seus sítios de solubilização.  
 (A) espécies químicas polares ou com carga; (B) espécies químicas anfipáticas; e  
 (C) espécies químicas não polares ou sem carga.



Fonte: modificado de Maniasso (2001)

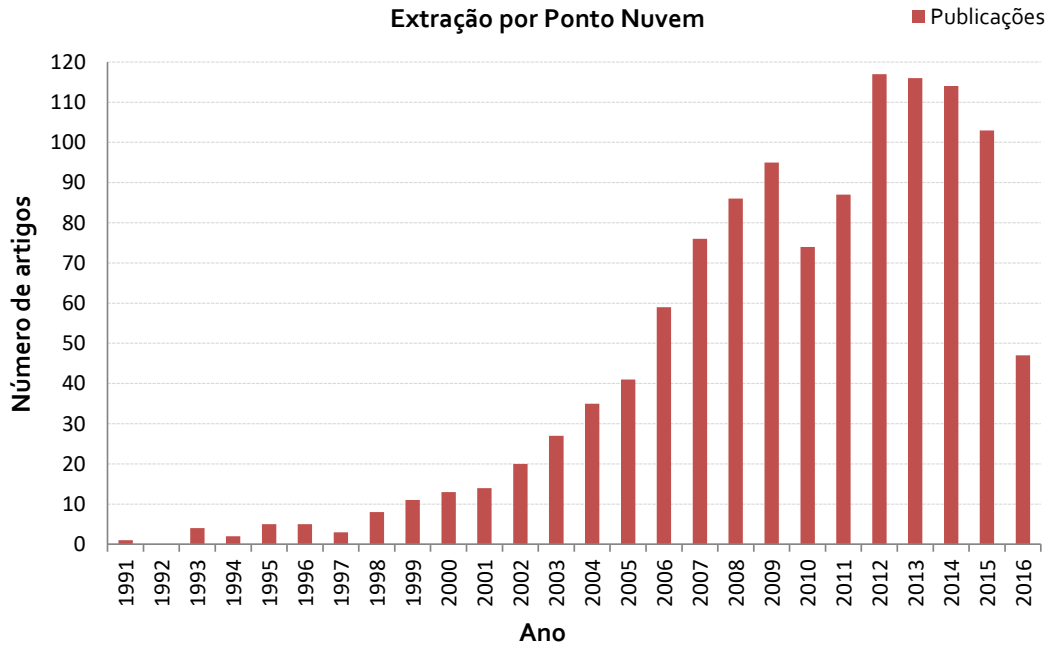
A separação física das fases é facilitada pela diferença de densidade entre as duas fases formadas, pois a rica em surfactante apresenta, normalmente, maior densidade, ficando na parte inferior do meio de preparo. Porém, este fenômeno é reversível, e, com a aplicação de resfriamento, uma única fase é novamente formada (Faria, Queiroz & Neves, 2005).

A existência dos fenômenos de ponto nuvem e solubilização micelar torna possível a extração em duas fases aquosas, o que reduz ou mesmo elimina a utilização de solventes orgânicos (Duarte & Canselier, 2005). Entretanto, a fase micelar é bastante viscosa e difícil de ser analisada diretamente por técnicas cromatográficas ou espectrofotométricas. Assim, é comum se diluir a fase micelar com um volume mínimo de solvente orgânico (geralmente alguns mililitros de acetonitrila ou metanol) ou mesmo com a fase móvel utilizada em análises por cromatografia ou eletroforese capilar.

Os surfactantes mais utilizados para extrações por ponto nuvem são os não iônicos do tipo éter octilfenóxi polioxietilenados (OPE), também conhecidos como Triton, Igepal, Tween, entre outros, pois possuem como vantagem, as baixas temperaturas de ponto nuvem, a ampla disponibilidade comercial e o custo mais acessível (Faria, Queiroz & Neves, 2005). Os compostos Triton X-110 e X-114, por exemplo, possuem o ponto nuvem em, aproximadamente, 63 e 23 °C respectivamente, temperatura essa onde é observada a separação de fases (Arnold & Linke, 2007).

Uma pesquisa foi realizada na base de dados Scopus, em maio de 2016, no período de 1991 a 2016, com a palavra chave “*cloud point extraction*”, e os dados obtidos estão representados no gráfico a seguir (Figura 7):

**Figura 7:** Número de artigos publicados por ano sobre extração por ponto nuvem (“cloud point extraction”) de acordo com o banco de dados Scopus.



A partir dessa avaliação, pode-se verificar um aumento expressivo no número de publicações a partir de 2006 e um número superior a 100 artigos científicos nos últimos quatro anos, mostrando que esse tipo de estratégia de preparo de amostras ainda se encontra em pleno desenvolvimento na academia.

Exemplos de aplicação da CPE para pesticidas estão apresentados nos trabalhos a seguir. Compostos organofosforados, tais como metil paration, etil paration, paroxon e feniltroton, presentes em amostras de água de rio, que realizaram as determinações das substâncias empregando o surfactante não-iônico Triton X-114 antes da análise por HPLC com detecção eletroquímica (Pinto, Pavon & Cordero, 1995). Oito pesticidas organofosforados (clorpirifós, diazinon, dimetoato, etoprofós, malation, metidation, paration metílico e paration etílico), utilizados tipicamente na agricultura espanhola, foram extraídos de águas residuais e subterrâneas e pré-concentrados pela técnica de extração por ponto nuvem. Foram empregados os surfactantes éter laurílico de poli(oxietileno) (POLE) e Genapol X-080, com determinação por cromatografia a líquido e detecção ultravioleta. Os autores obtiveram recuperações na faixa de 27 a 105% e fator de enriquecimento de 20 vezes, possibilitando limites de detecção de até 30 mg L<sup>-1</sup> (Sanz, *et al.*, 2004).

O Genapol X-080 e o POLE foram também empregados em amostras de água na extração de benzimidazol e seus resíduos (benomil, carbendazim, tiabendazol e fuberidazol). Os extratos foram analisados por cromatografia a líquido com detecção por fluorescência. A eficiência de recuperação dos fungicidas pelo método do ponto nuvem foi comparável à extração em fase sólida. O fator enriquecimento obtido para o fuberidazol, utilizando-se o surfactante POLE em concentração de 4% (m/v), foi de 10 vezes, com limite de detecção de  $4 \text{ ng L}^{-1}$  (Halko & Dutta, 2002; Halko, *et al.*, 2004).

Na Tabela 3 estão relacionados trabalhos que utilizaram a extração em ponto nuvem para pré-concentração de alguns herbicidas, porém não foi encontrada aplicação para o Paraquat.

**Tabela 3:** Extração em ponto nuvem aplicada na determinação de herbicidas.

Herbicida	Matriz	Surfactante	Técnica	Referência
Napropamida	Água natural e ultrapura	Genapol X-080 e Genapol 150	Cromatografia Líquida / Detector de Fluorescência	Stangl & Niessner, 1995
Ametrina Terbutrina Prometrina Simazina Atrazina Propazina	Água bruta e de rio	Triton X-114	Eletroforese Capilar / Detector Ultravioleta	Martínez, <i>et al.</i> , 1999
Clortoluron Metoxuron Cloridazon Propazina Simazina Atrazina	Água	Genapol X-080	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) / Detector Ultravioleta	Halko & Dutta, 2002
Atrazina Simazina Ametrina Prometrina	Água de poço e de rio	Triton X-114	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC) / Detector Espectrofotométrico com Arranjo de Diodos	Silva, Razaboni & Abate, 2014

#### 3.4.4.1. *Otimização da extração em ponto nuvem*

A solubilização de um composto é resultado da interação entre a substância que se deseja solubilizar (soluto) e o elemento que a dissolve (solvente). Para que este processo ocorra é necessária uma energia que supere as forças existentes entre as moléculas que constituem o soluto e as atrações presentes entre moléculas de solvente. A força de atração soluto-solvente deve compensar as interações existentes nas moléculas de soluto entre si e de solvente entre si. A insolubilidade pode ocorrer quando há presença de uma substância polar e outra apolar, pois as interações entre compostos apolares são relativamente fracas, não havendo energia suficiente para separar as moléculas polares, que permanecerão associadas (Martins, Lopes & Andrade, 2013).

Para contornar dificuldades experimentais e otimizar a extração em ponto nuvem de substâncias polares, pode-se alterar algumas propriedades da solução para favorecer sua partição para o meio com baixa polaridade.

Nas extrações líquido-líquido a amostra é particionada entre uma fase orgânica e outra aquosa, imiscíveis. A afinidade do soluto pelo solvente de extração, a razão das fases e o número de extrações determinarão a eficiência do sistema (Queiroz, Collins, & Jardim, 2001).

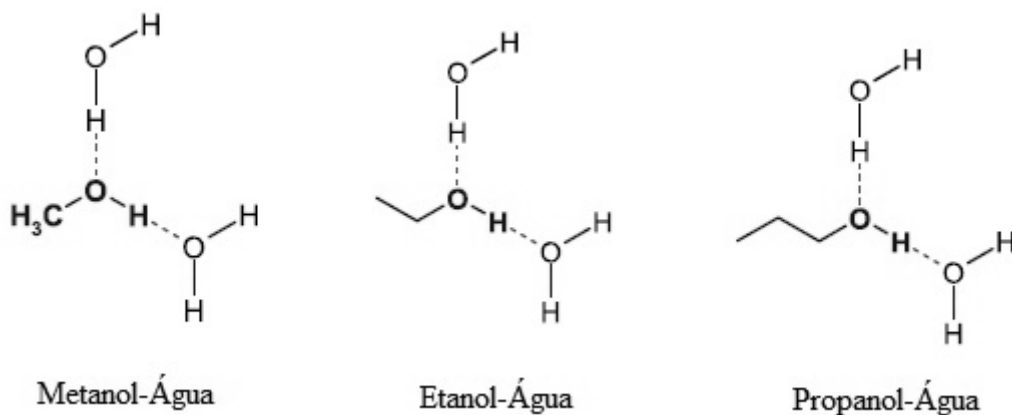
Dentre os parâmetros que direcionam as extrações, o mais importante é o pH. O ajuste do pH da amostra é necessário para assegurar uma boa recuperação do analito de interesse. A extração de substâncias básicas é, normalmente, realizada a pH maiores que 7 e a extração de substâncias ácidas é feita em pH menores que 5 (Queiroz, Collins, & Jardim, 2001). A solubilidade total de uma substância e o seu coeficiente de partição entre dois meios diferentes são dependentes do pH. A alteração do pH da solução também pode alterar o coeficiente de partição das espécies solubilizadas (Ni, Sanghvi & Yalkowsky, 2002).

Serajuddin & Mufson (1985) observaram que para alguns compostos orgânicos, a solubilidade é muito dependente do pH, da força iônica e da natureza dos íons utilizados para ajustar o pH, pois, em trabalhos por eles pesquisados, houve um grande declínio na solubilidade devido ao efeito do íon comum.

Outro parâmetro que pode alterar a solubilidade das substâncias em soluções aquosas é a presença de álcoois, pois segundo Mukherjee, *et al.*, (2011), álcoois de cadeia curta (metanol, etanol, propanol e butanol), tendem a permanecer na solução aquosa por promover a formação de estruturas expandidas de água em torno de suas regiões hidrofóbicas. Os álcoois são basicamente compostos anfífilicos que possuem um grupo funcional –OH ligado a um átomo de carbono saturado, e são solúveis em solventes polares devido a interação das

ligações de hidrogênio (Figura 8) (Martins, Lopes & Andrade, 2013; Galvão, *et al.*, 2015). Eles são capazes de atuar tanto como doadores, como aceptores de elétrons (Galvão, *et al.*, 2015). Álcoois com até 3 átomos de carbono são completamente miscíveis em água, porém com o aumento da cadeia carbônica dos álcoois, a solubilidade em solventes polares diminui, pois a cadeia carbônica se torna a parte mais significativa da molécula e eles tendem a se comportar como hidrocarbonetos (Martins, Lopes & Andrade, 2013).

**Figura 8:** Representação da ligação de hidrogênio entre álcoois e água.



Fonte: Martins, Lopes & Andrade (2013)

As moléculas de álcool, ao interagirem com a estrutura tetraédrica da água, podem alterar a conformação da estrutura da água. Com a dissolução de pequenas quantidades de álcool, a estrutura da água é mantida, em grande parte, porém ocorrem pequenas deformações que vão influenciar diretamente nas propriedades termodinâmicas da solução (Galvão, *et al.*, 2015).

Para aumentar a hidrofobicidade de moléculas que contenham grupos ionizáveis, pode-se utilizar a técnica de formação do par iônico. Este processo é utilizado para dissolver moléculas iônicas em solventes não-polares, por meio da formação de uma espécie neutra devido a presença de íons de cargas opostas (You, *et al.*, 2009). A formação do par-iônico ocorre somente por meio de interações moleculares, não havendo ligações químicas de nenhum tipo. Dependendo da natureza de interação entre o solvente e o íon, o par-iônico pode se apresentar de duas formas: próximo ou afastado (íons soltos em solução). Os íons livres em solução são rodeados por moléculas polarizadas, devido suas cargas iônicas, e a interação

solvente-íon faz com que haja a solvatação do íon. A interação entre o íon e o contra-íon deve ser suficientemente forte para transcender a camada de solvatação, caso contrário, permanecerão apenas na forma livre (Guerrero, *et al.*, 1997).



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Reagentes

Os surfactantes utilizados neste trabalho foram: polietileno glicol terc-octilfenil éter - Triton X-114 (Sigma Aldrich); dodecilsulfato de sódio - SDS (Vetec, 99%) e brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB (Sigma Aldrich, 98%).

Os reagentes usados nos estudos foram: dicloreto de Paraquat (Fluka, 99,9%), ditionito de sódio (Impex, 87%), hidróxido de sódio (Sigma Aldrich, 98%), cloreto de sódio (Vetec, 99%), ácido acético glacial (Vetec, 99,8%), ácido clorídrico (Vetec, 37%), etanol (Sigma Aldrich, 99,5%), acetonitrila (Merck, 99,5%), metanol (Impex, 99,9%), tolueno (Sigma Aldrich, 99,5%), acetona (Merck, 99,8%), n-hexano (Neon, 99%), diclorodimetilsilano (Aldrich, 99,5%) e ácido 1-hexanosulfônico (Sigma Aldrich, 98%).

### 4.2. Acondicionamento dos padrões e amostras de Paraquat

Na maior parte das etapas, as soluções de Paraquat e as amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno o qual tem por característica ser inerte ao composto de interesse; já o vidro tem por característica adsorver Paraquat através dos grupos silanóis presentes em sua estrutura. Assim, as cubetas de quartzo utilizadas nas análises espectrofotométricas passaram por um processo de silanização para evitar a adsorção do cátion Paraquat em sua superfície. A silanização consiste em uma reação entre os grupos silanóis presentes na superfície do vidro e um agente silanizante para minimizar a interação do analito de interesse com o vidro.

Assim, a vidraria foi mantida em banho de detergente por quarenta minutos em lavadora ultra-sônica da marca Sanders Medical (modelo Sonic Clean 2PS), enxaguada com água ultra pura, seguida de metanol, acetona e n-hexano, com secagem à temperatura ambiente. A vidraria foi preenchida com a solução de silanização e mantida em contato por doze horas. Após a reação, a vidraria foi enxaguada com tolueno e metanol, e a secagem foi realizada como anteriormente (Abad, 2006). Durante o período de trabalho, essa etapa só precisou ser feita uma única vez, pois se realizou uma aferição da absorvância da cubeta de quartzo e não houve alteração desse valor, indicando que não ocorreu adsorção do Paraquat no material.

### 4.3. Preparo de soluções e padrões

A solução de silanização foi obtida pela diluição de 10 mL do agente silanizante diclorodimetilsilano em tolueno, para o volume final de 100 mL e concentração de 10% (v/v).

A solução estoque do padrão de Paraquat foi preparada diluindo-se 11,7 mg do composto em água ultra pura e avolumada para 50 mL em tubo de polipropileno do tipo Falcon, obtendo-se a concentração final de  $234 \text{ mg L}^{-1}$ . As demais soluções padrão foram preparadas com diluições sucessivas.

As soluções dos surfactantes, utilizadas nas extrações em ponto nuvem, foram preparadas como segue:

- Triton X-114 15% (v/v) – pipetou-se 7,5 mL de Triton X-114 em balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultra pura;
- Triton X-114 3% (v/v) – pipetou-se 1,5 mL de Triton X-114 em balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultra pura;
- SDS  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  – pesou-se 1,442 g, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se com água ultra pura;
- CTAB  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  – pesou-se 0,365 g, transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se com água ultra pura.

A solução de ditionito de sódio 1% (m/v) em meio básico de hidróxido de sódio (NaOH)  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi obtida com a dissolução de 0,2 g de NaOH em água ultra pura, com posterior adição de 0,576 g de ditionito de sódio, sendo o volume final ajustado para 50 mL. A homogeneização deve ser cuidadosa para não causar muita turbulência, pois o ditionito degrada com o oxigênio do ar.

No preparo das soluções padrão empregou-se água ultra pura com resistividade de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  obtida com um purificador Heal Force (modelo NW), pipetas automáticas de volume variável da marca Gilson (modelo Pipetman Classic), sendo P20  $\mu\text{L}$  (de 2 a 20  $\mu\text{L}$ ), P200  $\mu\text{L}$  (de 20 a 200  $\mu\text{L}$ ), P1000  $\mu\text{L}$  (de 200 a 1000  $\mu\text{L}$ ) e P10 mL (de 1 a 10 mL), e tubos de centrifugação com fundo cônico em polipropileno (do tipo Falcon com 15 mL de capacidade).

A homogeneização do sistema foi realizada com o auxílio de um agitador vortex, da marca Marconi (modelo MA 162).

As medições e ajustes de pH das soluções foram efetuadas com o pHmetro da marca Ion (modelo pHB500).

Para o aquecimento das soluções e extração no ponto nuvem, utilizou-se um banho-maria Quimis (modelo Q334M-28). As amostras acondicionadas nos tubos Falcon foram centrifugadas em equipamento da marca Quimis (modelo Q222T216) para facilitar a separação das fases.

As análises espectrofotométricas diretas (sem reação com solução de ditionito) foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro da marca PG Instruments (modelo TV80+ UV/VIS) com cubeta de quartzo com volume de 3 mL e 1 cm de caminho óptico previamente silanizada. Já as análises espectrofotométricas colorimétricas (após reação com solução de ditionito) foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific (modelo Genesys 10S Vis) com cubeta de acrílico com volume de 1,5 mL e 1 cm de caminho óptico.

#### **4.4. Determinação do Paraquat**

##### ***4.4.1. Análise direta por espectrofotometria UV-Vis***

As soluções padrão de Paraquat foram analisadas diretamente, sem nenhum pré-tratamento, em espectrofotômetro, para verificação dos parâmetros analíticos. A faixa de concentração de trabalho utilizada neste estudo, foi de 0,05 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

Para a análise no espectrofotômetro foram utilizados 3 mL da amostra em uma cubeta de quartzo silanizada, com caminho óptico de 10 mm. Os espectros de absorção do Paraquat foram obtidos na faixa espectral entre 190 e 800 nm, sendo variado o comprimento de onda de 1 em 1 nm. O comprimento de onda de máxima absorção foi  $\lambda = 258$  nm. A cada troca da solução a ser analisada, foram realizadas lavagens da cubeta com água ultrapura.

##### ***4.4.2. Análise colorimétrica por espectrofotometria UV-Vis***

A análise colorimétrica é possível devido à redução do analito com ditionito de sódio. As soluções foram preparadas homogeneizando-se cautelosamente 50  $\mu$ L do padrão de Paraquat, 100  $\mu$ L de água ultra pura, 200  $\mu$ L de acetonitrila e 300  $\mu$ L da solução de ditionito de sódio 1% em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, com posterior análise por espectrofotometria UV-Vis

(leitura em  $\lambda = 604 \text{ nm}$ ). A faixa de concentração de trabalho utilizada foi de 0,05 a 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Nas análises espectrofotométricas foram utilizados 650  $\mu\text{L}$  da amostra em uma cubeta de acrílico com 1 cm de caminho óptico. Os espectros de absorção foram obtidos entre 550 e 650 nm, com intervalo de comprimento de onda de 1 nm. Foram realizadas lavagens da cubeta com água ultrapura a cada troca de solução.

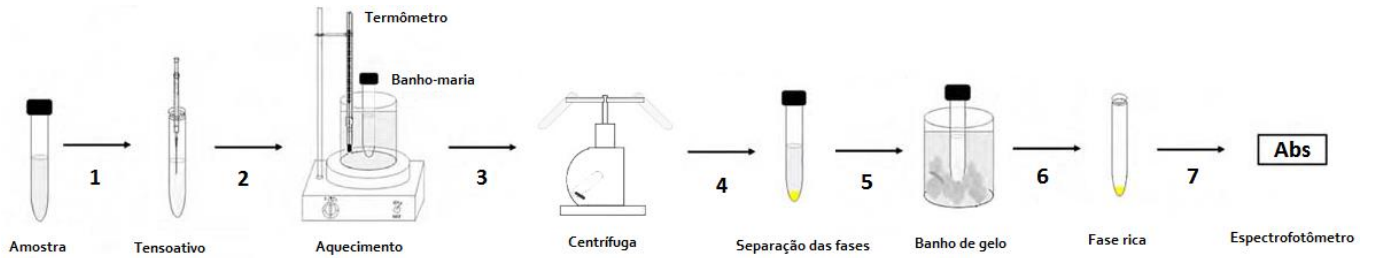
#### **4.5. Extração em ponto nuvem**

##### ***4.5.1. Extração em ponto nuvem e fluxograma da metodologia – Triton X-114.***

A extração e pré-concentração do herbicida Paraquat com o auxílio do surfactante Triton X-114 foi realizada homogeneizando-se 9,5 mL de amostra e 0,5 mL do surfactante 3% (v/v), ou 9,8 mL de amostra e 0,2 mL do surfactante 15% (v/v), para concentrações finais de 3 e 6  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente. As misturas foram aquecidas em banho-maria a 60°C por 20 minutos, até a turvação da solução. Para melhor separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e, em seguida, colocadas em banho de gelo por 15 minutos para aumentar a viscosidade da fase micelar e facilitar a separação por inversão. A fase orgânica (mais densa e, conseqüentemente, depositada no fundo do frasco) foi coletada e diluída em acetonitrila até o volume de 3 mL, para análises diretas, e 300  $\mu\text{L}$ , para análises colorimétricas (com adição de 300  $\mu\text{L}$  da solução de ditionito de sódio 1% em NaOH 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ), para posterior análise por espectrofotometria. A Figura 9 demonstra as etapas realizadas no processo de extração e pré-concentração por ponto nuvem e a Figura 10 apresenta uma imagem da separação das fases obtidas com o surfactante Triton X-114 após o ponto nuvem.

As medidas foram obtidas por análise espectrofotométrica, varrendo o espectro na faixa do ultravioleta, de 190 a 400 nm, para análises diretas, e visível, de 550 a 650 nm, para análises colorimétricas, ambas variando-se o comprimento de onda de 1 em 1 nm.

**Figura 9:** Esquema de extração e pré-concentração por ponto nuvem com o surfactante Triton X-114: 1) Adição do surfactante Triton X-114 à amostra, 2) Aquecimento da mistura em banho-maria a 60°C por 20 minutos para atingir o ponto nuvem, 3) Centrifugação da solução para facilitar a separação das fases, 4) Separação das fases aquosa e orgânica, 5) Banho de gelo para aumentar a viscosidade da fase rica e facilitar a separação por inversão, 6) Retirada da fase aquosa e solubilização da fase orgânica em acetonitrila e, nas análises colorimétricas, adição de ditionito de sódio, 7) Quantificação por espectrofotometria UV-Vis.



Fonte: modificado de Zhang & Shi (2010)

**Figura 10:** Separação de fases após o ponto nuvem e centrifugação, utilizando Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup> e 6 mmol L<sup>-1</sup>.

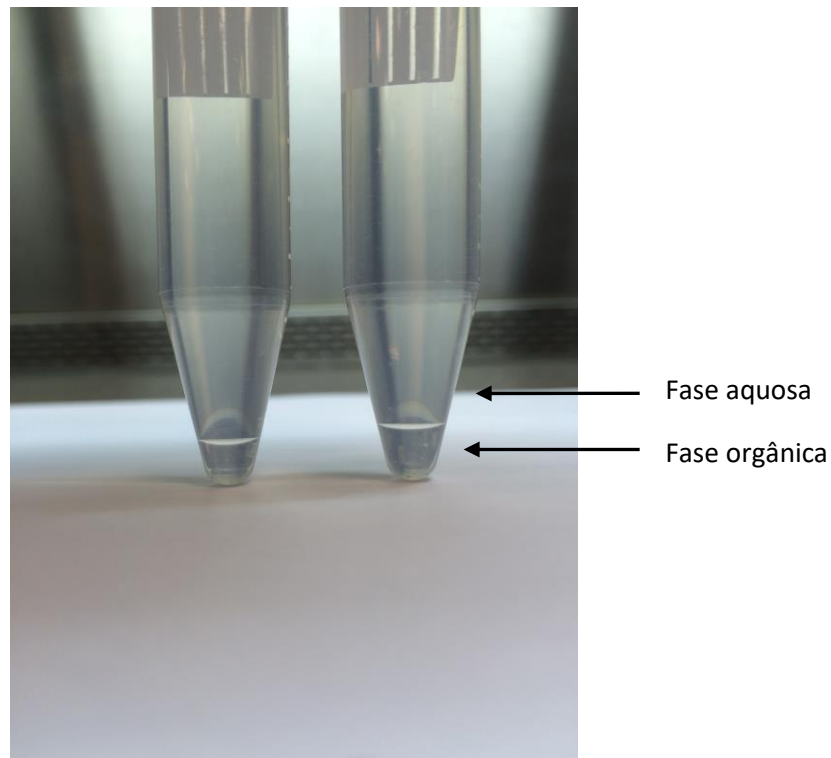


Foto da autora (2016)

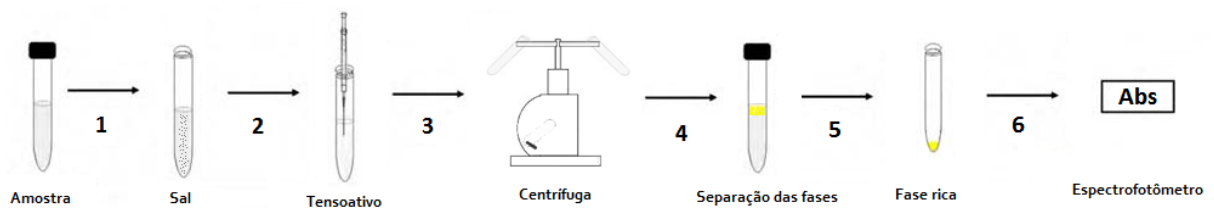
#### 4.5.2. Extração em ponto nuvem e fluxograma da metodologia – SDS/CTAB.

A extração e pré-concentração do herbicida Paraquat com o auxílio dos surfactantes SDS e CTAB foi realizada homogeneizando-se, com o auxílio de um agitador vortex, 9,5 mL de amostra e 1 g de cloreto de sódio, com posterior adição de 0,2 mL do surfactante SDS  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e 0,1 mL do surfactante CTAB  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , para concentrações finais de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente (Seebunrueng & Santaladchaiyakit, 2012). Fez-se agitação manual por inversão e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos para melhor separação das fases. A fase orgânica (menos densa e, conseqüentemente, ficando na parte superior do sistema) foi diluída em metanol até o volume de 3 mL para posterior análise em espectrofotômetro. A Figura 11 apresenta este processo de extração e pré-concentração.

O ponto nuvem do sistema SDS/CTAB foi atingido alterando-se a força iônica da solução.

As medidas foram obtidas por espectrofotômetro, na faixa do ultravioleta, de 190 a 400 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm.

**Figura 11:** Esquema de extração e pré-concentração por ponto nuvem para os surfactantes SDS/CTAB: 1) Adição de NaCl à amostra, 2) Adição dos surfactantes SDS/CTAB, 3) Centrifugação da solução para facilitar a separação das fases, 4) Separação das fases aquosa e orgânica, 5) retirada da fase aquosa e solubilização da fase orgânica em metanol e 6) Quantificação por espectrofotometria UV-Vis.



Fonte: modificado de Zhang & Shi (2010)

#### 4.5.3. *Efeito da força iônica*

Foi testada a influência da força iônica na separação das fases causada pela adição de cloreto de sódio nas soluções com surfactante. Foram avaliadas diferentes concentrações do sal: 10 e 20% (m/v). Em um tubo contendo 1 ou 2 g do sal, foi adicionado 9,5 ou 9,3 mL de amostra, respectivamente. Após homogeneização em agitador vortex, adicionou-se 0,5 mL de surfactante e, em seguida, a mistura final foi homogeneizada por inversão.

As medidas foram obtidas por espectrofotômetro, na faixa do ultravioleta, de 190 a 400 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm.

#### 4.5.4. *Estudo de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade*

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico ( $R^2$ ), que deve ser próximo de 1, porém, observando que a inclinação da reta deve ser diferente de zero (INMETRO, 2007).

A equação da reta que relaciona as variáveis resposta analítica e concentração está representada na Equação 2.

$$y = ax + b$$

(Equação 2)

Onde:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = coeficiente angular da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

Fonte: INMETRO (2007)

Para tanto, foram construídas curvas de calibração na faixa de 0,05 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> para os diferentes sistemas de extração em ponto nuvem e para a determinação direta do Paraquat por espectrofotometria ou após reação com ditionito de sódio.

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular do gráfico analítico, ou pode ser expressa como na Equação 3 (Amarante, *et al.*, 2001).

$$S = \frac{dx}{dc}$$

(Equação 3)

Onde:

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

Fonte: INMETRO (2007)

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito.

A repetibilidade, também conhecida como precisão intra-ensaios, é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmos procedimento, operador, equipamento e condições experimentais) em curto espaço de tempo. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, porém efetuadas sob condições variadas de medição, neste caso, em dias diferentes (INMETRO, 2007).



#### **4.5.5. Aplicação em amostra de água de manancial**

A metodologia de CPE foi aplicada em uma amostra do Parque Natural do Pedroso, para verificar o comportamento do herbicida Paraquat em uma matriz real. O Parque do Pedroso, localizado no município de Santo André, é uma região de área florestada, possui cerca de 8 km<sup>2</sup>, com baixa densidade urbana e industrial, e é uma reserva regional situada às margens da represa Billings, principal corpo aquático potabilizável pertencente à Região Metropolitana de São Paulo. Cerca de 6,6% da água de abastecimento do município de Santo André é captada na represa do Parque do Pedroso (Brito, 2009).

Segundo a CONAMA 357/05, as águas doces podem ser classificadas em:

- Classe especial: águas destinadas ao abastecimento para consumo humano (com desinfecção), para a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas, e, para a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral;
- Classe 1: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano (após tratamento simplificado), para a proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário (como natação, esqui aquático e mergulho), para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e para a proteção das comunidades aquáticas em terras indígenas;
- Classe 2: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano (após tratamento convencional – clarificação com utilização de coagulação e floculação, seguida de desinfecção e correção de pH), para a proteção das comunidades aquáticas, recreação de contato primário (como natação, esqui aquático e mergulho), para a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer (com os quais o público possa vir a ter contato direto), e para a aquicultura e a atividade de pesca;
- Classe 3: águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano (após tratamento convencional ou avançado - técnicas de remoção e/ou inativação de constituintes que possam conferir à água características como cor, odor, sabor, atividade tóxica ou patogênica), para a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras, para a pesca amadora, recreação de contato secundário

(contato esporádico ou acidental, onde a possibilidade de ingestão é pequena), e a dessedentação de animais;

- Classe 4: águas que podem ser destinadas a navegação e a harmonia paisagística (CONAMA, 2005).

A classificação das águas é realizada de acordo com a qualidade requerida para o seu uso preponderante (CONAMA, 2005).

A água do Pedroso, segundo determinados parâmetros físicos e químicos analisados por Rabelo & Danna (2014), sendo eles pH, turbidez e condutividade elétrica, pode ser classificada como 1, precisando de tratamento simplificado (por exemplo clarificação por meio de filtração e desinfecção e correção de pH quando necessário). O tratamento é devido à presença de matéria orgânica e da poluição difusa das águas, pois o esgoto é praticamente inexistente (Freitas, 2011).

A amostra foi coletada em 17 de outubro de 2015 com auxílio de uma garrafa de van Dorn de 5 L de capacidade, estocada em frasco de polietileno previamente lavado e armazenada sob refrigeração e ao abrigo da luz.

A escolha dessa amostra de água se deu pela sua disponibilidade no laboratório. Não necessariamente se esperava encontrar Paraquat no local da coleta, mas a composição dessa amostra já serviria para compreender os efeitos de matriz no processo de CPE (presença de carga orgânica e íons dissolvidos, e pH da amostra).

#### ***4.5.6. Alteração do pH da solução***

Alterou-se o pH das soluções padrão com concentrações entre 0,2 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> de Paraquat para verificar se haveria alteração da solubilidade do composto no meio aquoso. As soluções originais que possuíam pH próximo a 7, foram ajustadas para 3 e 11, com ácido clorídrico 1 mol L<sup>-1</sup> e hidróxido de sódio 4 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

As medidas foram obtidas por espectrofotometria, na faixa do visível, de 550 a 650 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm, após reação com ditonito de sódio.

#### **4.5.7. Adição de álcool**

Avaliou-se a estratégia de reduzir a solubilidade do Paraquat presente na fase aquosa, por meio da adição de um álcool à amostra. Utilizou-se etanol, com concentrações finais de 1, 4, 7 e 10 % (v/v) em solução padrão contendo  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de Paraquat.

As medidas foram obtidas após reação com ditionito de sódio, por espectrofotometria, na faixa do visível, de 550 a 650 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm.

#### **4.5.8. Presença de par iônico**

Foi testada a presença de pares iônicos para neutralizar a carga do analito de interesse e favorecer sua partição no meio orgânico. Os reagentes utilizados foram o SDS e o hexanossulfonato de sódio, ambos com concentração final de  $2 \text{ g L}^{-1}$ , em solução padrão de Paraquat  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

As medidas foram obtidas por espectrofotometria, na faixa do visível, de 550 a 650 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm, após reação com ditionito de sódio.

#### **4.5.9. Comparação da eficiência de extração com outro surfactante não iônico**

Comparou-se a extração em ponto nuvem obtida com o surfactante Triton X-114, contra uma extração com Triton X-100 para soluções padrão com concentração entre  $0,05$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de Paraquat, para verificar a possível degradação do surfactante após longos períodos de armazenamento.

As medidas também foram obtidas por espectrofotometria, na faixa do visível, de 550 a 650 nm, com variação do comprimento de onda de 1 em 1 nm, após reação com ditionito de sódio.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

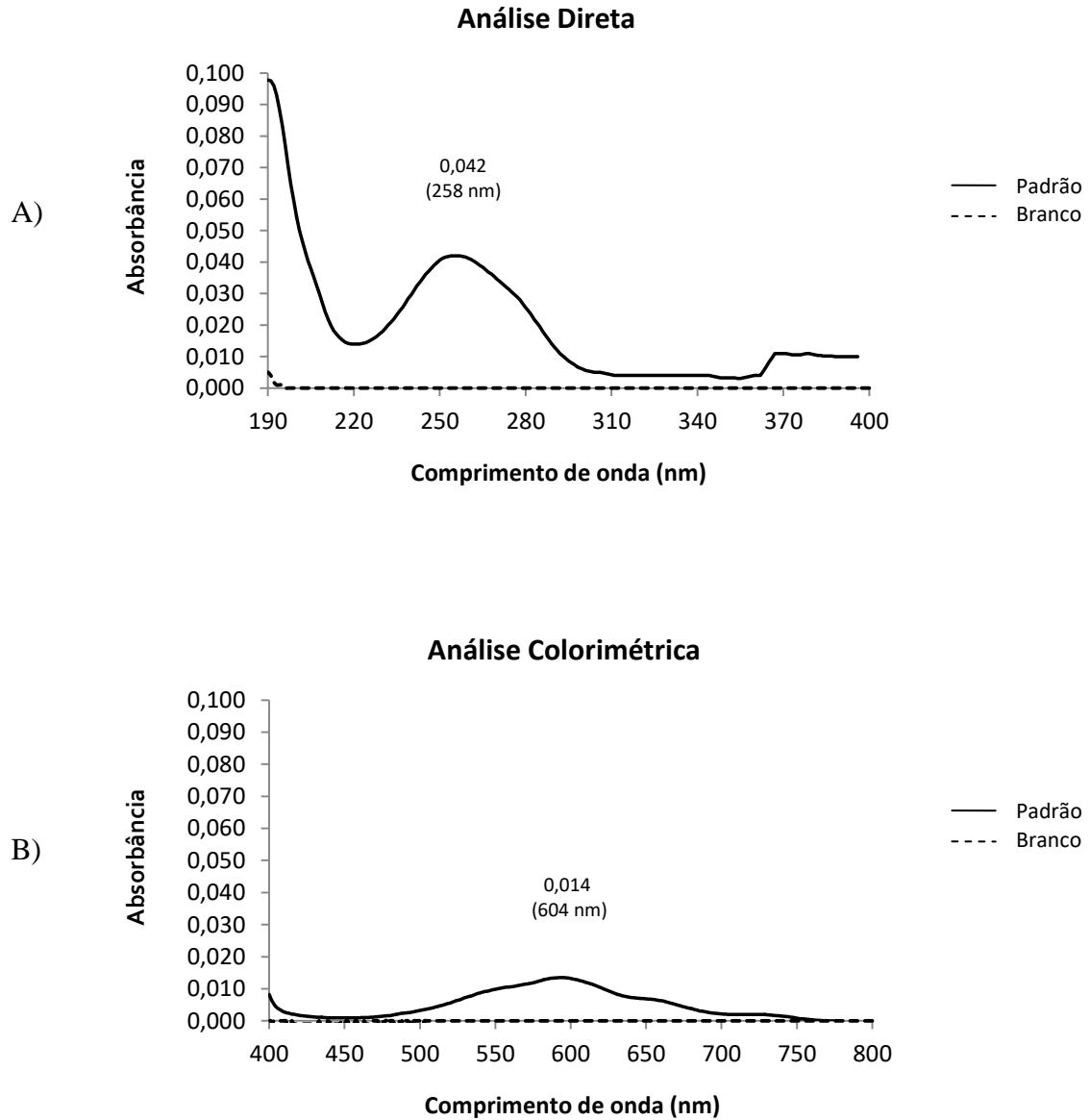
Os parâmetros avaliados foram: limites de detecção e quantificação, influência de aditivo iônico em soluções de surfactantes, linearidade, repetibilidade, reprodutibilidade e seletividade da extração e pré-concentração de soluções contendo concentração conhecida de Paraquat.

### 5.1. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para determinação de Paraquat por espectrofotometria Uv-Vis

Por meio das análises direta e colorimétrica foram estimados os limites de detecção e quantificação dos métodos espectrofotométricos.

A Figura 12 apresenta os espectros obtidos com as análises direta (A) e colorimétrica (B) da solução padrão de Paraquat com concentração  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , ambos em comparação a um branco (água deionizada para análise direta e solução de ditionito de sódio para a determinação colorimétrica). Apesar de a análise colorimétrica ser seletiva, há as desvantagens do tempo de validade da solução de ditionito e da degradação por oxidação, que podem gerar resultados equivocados. Já a análise direta possui uma maior resposta analítica, entretanto, perde-se em seletividade, uma vez que muitos outros compostos presentes em amostras ambientais também podem ser extraídos e absorver nessa região do UV. Na análise direta, o comprimento de onda máximo de absorção foi em 258 nm, enquanto que na análise colorimétrica foi em 604 nm.

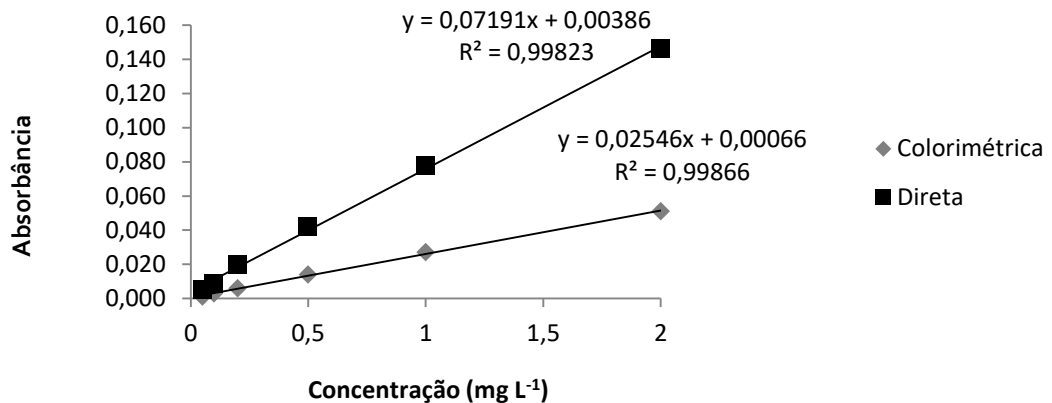
**Figura 12:** Espectros obtidos por análise direta (A) e por redução com ditionito de sódio (B) para a solução padrão de Paraquat 0,5 mg L<sup>-1</sup>.



A sensibilidade de um sistema analítico é uma medida de sua habilidade em discriminar entre pequenas diferenças na concentração de um analito. Dois fatores limitam a sensibilidade: a inclinação da curva de calibração e a precisão do dispositivo de medida. Para dois métodos que tenham a mesma precisão, aquele que tem a curva de calibração mais inclinada será o mais sensível. A Figura 13 compara as curvas de calibração dos dois métodos de determinação de Paraquat (método espectrofotométrico com detecção direta na faixa do UV e método colorimétrico após reação com ditionito na faixa do visível). Pode-se verificar

que o coeficiente angular da curva de calibração para a determinação direta de Paraquat é cerca de 3 vezes maior que a obtida pelo método colorimétrico, sendo 0,07191 e 0,02546, respectivamente.

**Figura 13:** Curvas de calibração das análises direta de Paraquat (■) e após redução com Ditionito de sódio (◆).



O limite de detecção (LD) foi definido como a concentração mais baixa do analito (no caso, o Paraquat) que pode ser distinguida com confiança razoável do branco operacional (uma solução de referência que não contém o analito). Os LDs foram estimados empiricamente ao analisar uma série de amostras contendo quantidades decrescentes do analito, pois nos equipamentos utilizados, os valores do branco se apresentaram como linha de base. O cálculo do LD também pode ser feito pela Equação 4:

$$LD = \frac{3 \times s}{S}$$

(Equação 4)

Onde:

s = desvio-padrão;

S = coeficiente angular da curva de calibração;

Fonte: Brito, *et al.* (2003)

O LD dos sistemas foi identificado mediante absorvância apresentada pelas soluções e registrada pelo equipamento, enquanto que o LQ foi obtido pela multiplicação entre o limite de detecção e o fator 3,33 (considerou-se um fator de 10 vezes o valor do desvio padrão das medidas do branco), para garantia de que neste ponto seja minimizada a interferência do erro instrumental na medida.

A análise colorimétrica por redução do Paraquat com ditonito é bastante vantajosa por não ser necessária a utilização de cubeta de quartzo, pois o comprimento de onda absorvido pelo composto reduzido está na faixa do visível (604 nm) e conseqüentemente, elimina-se o processo de silanização, reduzindo o custo e o tempo da análise. Em contrapartida, o LD e LQ são maiores que aqueles obtidos pela análise direta do Paraquat, obtendo-se valores cerca de 3 vezes superiores, conforme apresentado na Tabela 4. Apesar da proposta do presente projeto visar a pré-concentração do analito, a técnica de quantificação deve apresentar elevada sensibilidade para a determinação do mesmo, uma vez que se espera encontrar o Paraquat em baixas concentrações nas amostras ambientais (na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

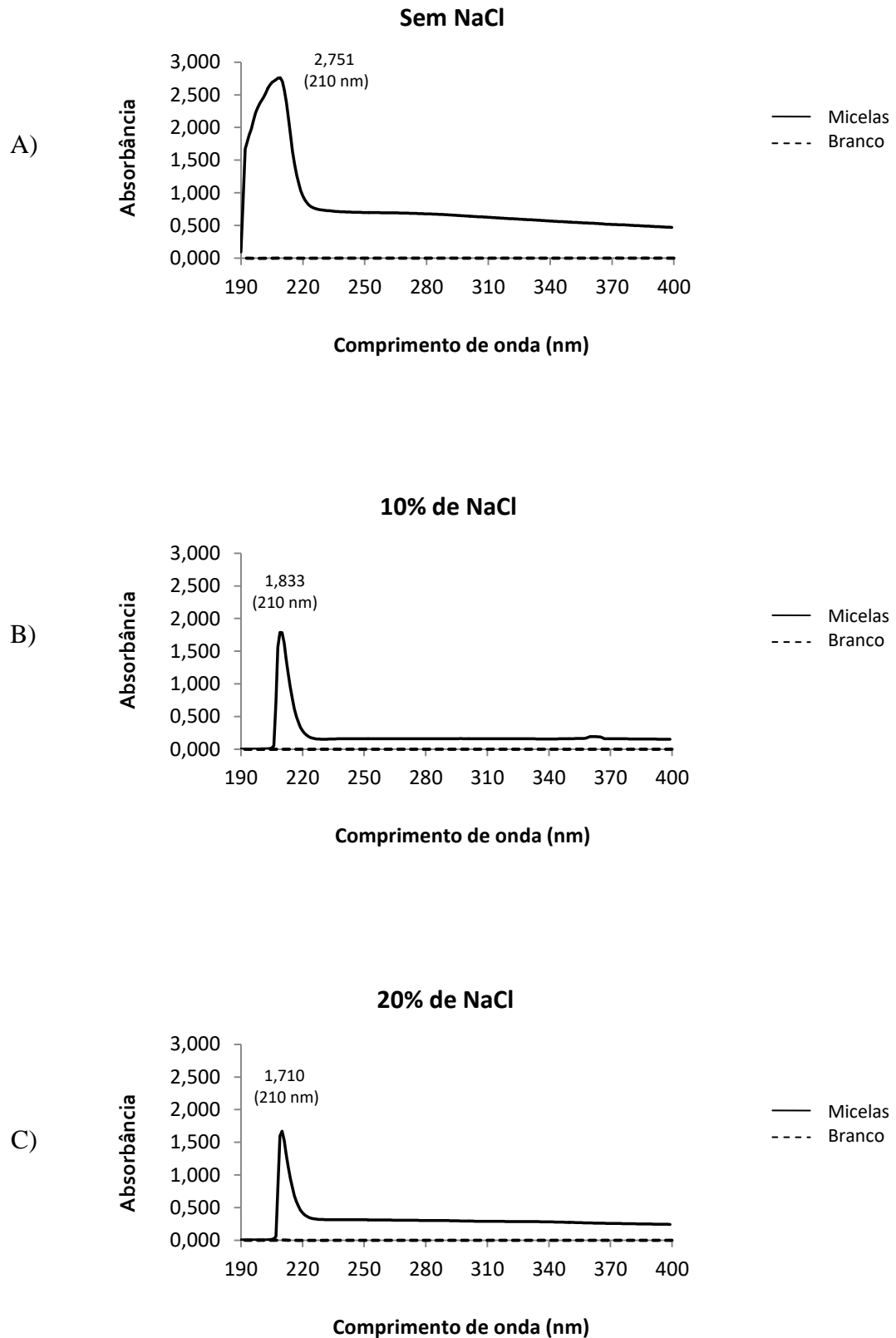
**Tabela 4:** Limites de detecção e quantificação obtidos para a determinação de Paraquat nos estudos de análise direta e por redução (colorimétrica).

<b>Método</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>
Análise direta	15 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Análise colorimétrica	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	167 $\mu\text{g L}^{-1}$

## 5.2. Efeito da força iônica

No estudo sobre a influência da adição de sal nas soluções com surfactante, para favorecimento da separação das fases, verificou-se que, no sistema SDS/CTAB, quando se adiciona 10% (m/v) de NaCl às soluções, há diminuição da presença de micelas nas fases aquosas, e conseqüentemente, estas estarão mais concentrado na fase rica. Adicionando-se 20% (m/v) de NaCl, não houve ganho significativo na separação das fases, o que não justifica a utilização de maior quantidade de sal. A Figura 14 apresenta as diferenças de absorvância das micelas formadas pelos surfactantes SDS/CTAB, devido à diminuição da sua presença nas fases aquosas de soluções com 10  $\text{mg L}^{-1}$  de Paraquat. O comprimento de onda máximo de absorção das micelas em fase aquosa foi em 210 nm.

**Figura 14:** Absorbâncias dos surfactantes SDS/CTAB, em fase aquosa, na presença de diferentes quantidades de NaCl. (A) sem NaCl, (B) com 10% (m/v) de NaCl e (C) com 20% (m/v) de NaCl.

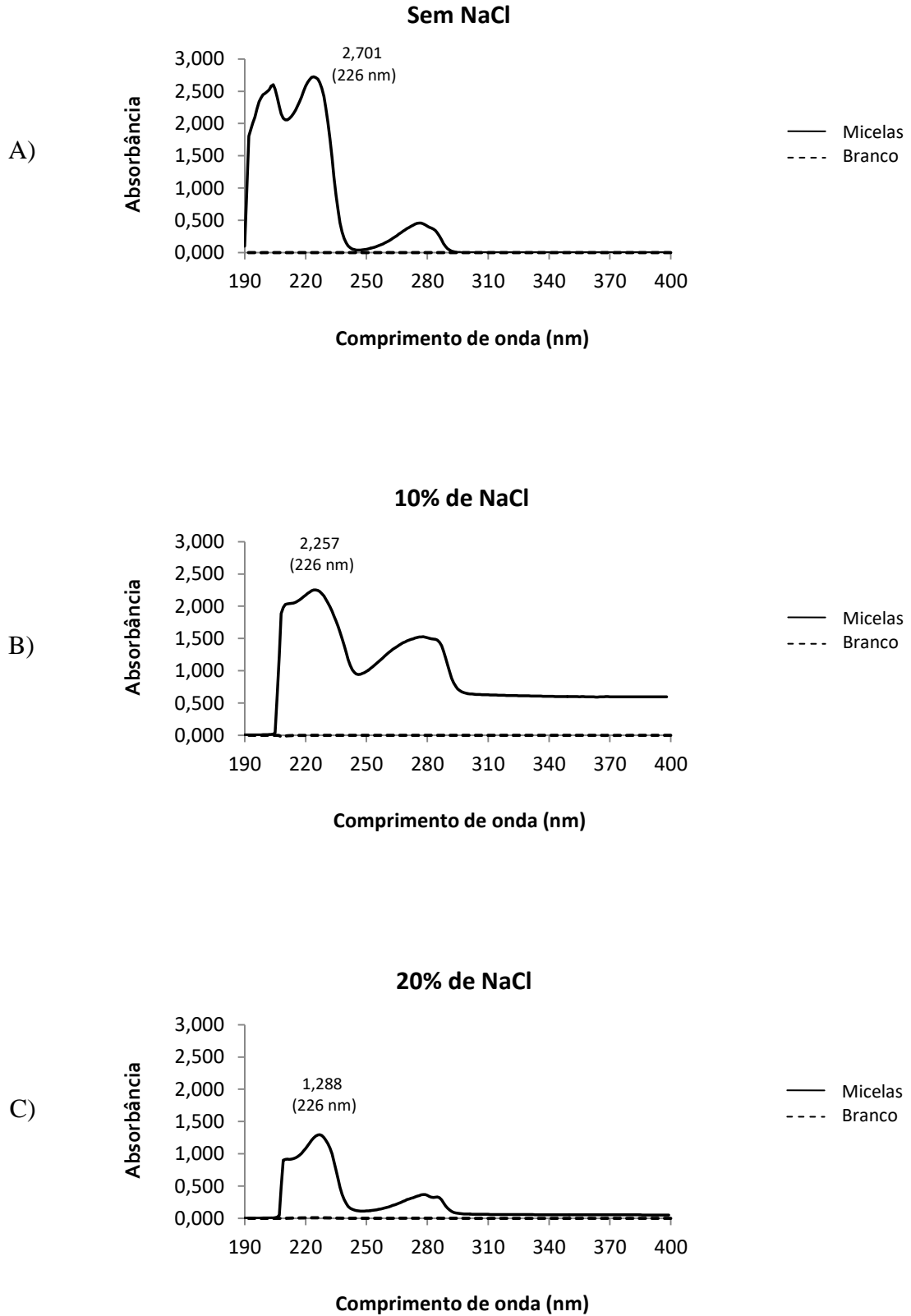




No estudo da força iônica com o surfactante Triton X-114, a presença do NaCl com concentração de 10% (m/v) não influenciou na separação das fases, portanto a quantidade de micelas existente na fase aquosa sem a adição de sal, continuou presente na amostra com sal. Uma alteração visual que ocorreu, foi o aumento da densidade da fase aquosa, e com isso, a fase orgânica ficou na parte superior do tubo. Na condição de 20% (m/v) de NaCl, houve a diminuição da presença de micelas na fase aquosa, porém a fase orgânica também foi afetada. Com o aumento da concentração do sal, houve o aumento da solubilização das micelas nas duas fases, e somente algumas gotículas de fase orgânica foram formadas na parte superior do tubo. Os gráficos a seguir (Figura 15) apresentam os valores de absorbância das micelas presentes nas fases aquosas de soluções com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Paraquat. O comprimento de onda de máxima absorção foi em 226 nm.

Desta forma, optou-se por utilizar a quantidade de 10% (m/v) de cloreto de sódio no sistema de extração e pré-concentração com SDS/CTAB para auxiliar a separação das fases e não utilizar sal no método com o surfactante Triton X-114 devido ao favorecimento da solubilização das micelas (perda da fase orgânica).

**Figura 15:** Absorbâncias do surfactante Triton X-114 na presença de diferentes quantidades de NaCl. (A) Sem NaCl, (B) com 10% (m/v) de NaCl e (C) com 20% (m/v) de NaCl, em fase aquosa.

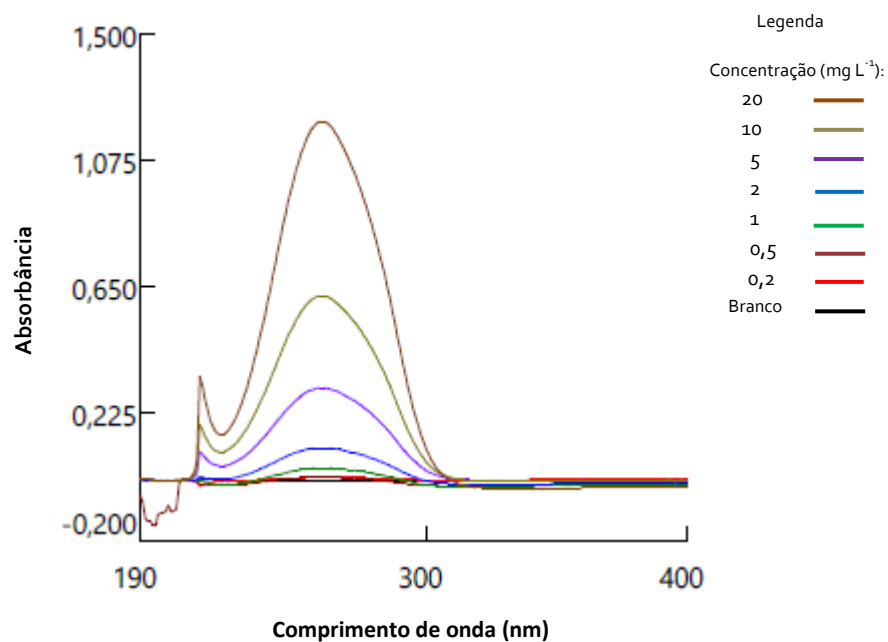


### 5.3. Estudos de linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade

Uma ampla faixa de trabalho (duas ordens de grandeza em concentrações de solução padrão de Paraquat - 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 mg L<sup>-1</sup>), foi analisada por espectrofotometria (sem reação com ditionito) para verificar a linearidade dos processos de extração e pré-concentração dos surfactantes empregados.

Foram analisadas as fases orgânicas e aquosas de cada sistema a fim de verificar os fatores de enriquecimento alcançados. Com a fase aquosa das soluções padrão com SDS/CTAB verificou-se que, mesmo em baixas concentrações, não houve extração quantitativa ( $\geq 90\%$ ) do Paraquat para a fase micelar, e nas concentrações mais elevadas, a maior parte do analito não foi extraída, permanecendo em fase aquosa (Figura 16). O sistema SDS/CTAB apresenta uma fase micelar de caráter coloidal e de difícil remoção, o que resulta em perdas durante a manipulação e conseqüente não linearidade nas análises da fase orgânica ( $R^2 = 0,0008$ ). A Tabela 5 apresenta as porcentagens de pré-concentração obtidas na fase orgânica, e, com isso, é possível concluir que o sistema SDS/CTAB não é o mais eficaz para o tratamento de amostras contendo Paraquat.

**Figura 16:** Espectros obtidos a partir da análise da fase aquosa das soluções padrão de Paraquat utilizando o sistema SDS/CTAB ( $\lambda$  de máxima absorção em 260 nm).

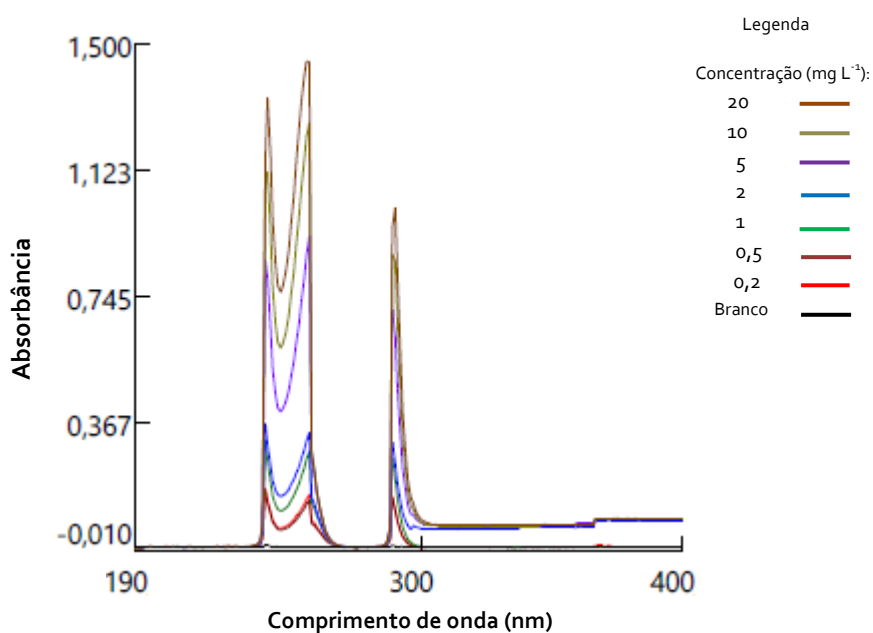


**Tabela 5:** Porcentagem de Paraquat concentrado na fase orgânica após extração com SDS/CTAB.

SDS / CTAB	
Paraquat (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração na fase orgânica (%)
0,2	80
0,5	71
1	44
2	24
5	12
10	11
20	13

O Triton X-114 com concentração final de 3 mmol L<sup>-1</sup> apresentou considerável linearidade, especialmente para a faixa de concentração entre 0,2 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de Paraquat. Considerando que, pela lei de Lambert-Beer, absorbâncias acima de 1 podem não se correlacionar linearmente com a quantidade de analito, para uma maior precisão na curva de calibração, somente as soluções cuja absorção se limitou a 1 foram utilizadas, neste caso, soluções de Paraquat com concentração entre 0,2 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 17). A equação da reta da curva de calibração é  $y = 0,17115x + 0,06083$  com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,97323$ .

**Figura 17:** Espectros da fase orgânica das soluções padrão de Paraquat após extração com Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup> e região linear da curva de calibração.



O fator de enriquecimento (FE) foi calculado por meio da razão entre a inclinação da curva estabelecida usando padrões aquosos submetidos ao procedimento de extração no ponto nuvem e da curva estabelecida usando padrões aquosos sem pré-concentração. O FE foi estimado em 71, considerando-se que foram realizadas diluições de 30 vezes no sistema micelar para permitir a medição por espectrofotometria.

Após a análise das fases aquosas das soluções, foi observado que somente nas soluções com baixas concentrações de Paraquat (0,2 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) houve extração quantitativa, enquanto que parte dos analitos não foi extraída das demais soluções, especialmente do padrão de 20 mg L<sup>-1</sup>. A Tabela 6 apresenta a porcentagem do analito de interesse presente nas fases orgânicas após a extração e pré-concentração com Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6:** Porcentagem de Paraquat presente na fase orgânica após pré-concentração com Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup>.

<b>Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup></b>	
<b>Paraquat (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração na fase orgânica (%)</b>
0,2	> 100
0,5	> 100
1	78
2	62
5	69
10	62
20	44

Para verificar se o que ocorreu é uma limitação do sistema ou ausência de surfactante para completar a extração, realizou-se um teste com o dobro da concentração de Triton X-114, 6 mmol L<sup>-1</sup>, e observou-se que o aumento da concentração de surfactante melhorou a extração de Paraquat em favor da fase orgânica, pois menor quantidade do analito permaneceu na fase aquosa. Nesta condição, somente parte dos analitos da solução com concentração 20 mg L<sup>-1</sup> não foram extraídos. Para as demais concentrações, o composto de interesse foi quantitativamente extraído para a fase micelar (Tabela 7).

**Tabela 7:** Porcentagem de Paraquat presente na fase orgânica após pré-concentração com Triton X-114 6 mmol L<sup>-1</sup>.

<b>Triton X-114 6 mmol L<sup>-1</sup></b>	
<b>Paraquat (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração na fase orgânica (%)</b>
0,2	> 100
0,5	> 100
1	> 100
2	> 100
5	> 100
10	> 100
20	62

Considerando que as fases orgânicas deste sistema foram diluídas 15 vezes, o fator de enriquecimento para este sistema foi estimado em 45 para a faixa de concentração com resposta linear (de 0,2 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>). O decréscimo do FE ocorre devido a diluição por maior quantidade de fase orgânica.

Trabalhos conduzidos por Silva et al. (2000) e Maranhão et al. (2005) avaliaram a influência da concentração de Triton X-114 para pré-concentração de metais em amostras de água, utilizando concentrações de surfactante entre 1 e 4 mmol L<sup>-1</sup>. Apesar de ampliar a faixa de trabalho, ambos os trabalhos concluíram que as concentrações maiores de surfactante resultam em uma diminuição do sinal analítico, pois, após a separação das fases, o volume da fase rica em surfactante fica maior e, conseqüentemente, o analito fica diluído, diminuindo sua detectabilidade. Em contrapartida, trabalhar com concentrações mais baixas de surfactante resultam em menor quantidade de fase micelar gerada, o que pode suscitar em maior desvio padrão entre as replicatas por erros no preparo e na transferência da fase orgânica para análise.

Como a intenção deste trabalho era determinar Paraquat em amostras ambientais de água – e nestas a concentração provavelmente estaria na ordem de µg ou ng L<sup>-1</sup> – optou-se por utilizar o surfactante Triton X-114 com concentração final de 3 mmol L<sup>-1</sup> para economia de surfactante e também por conta do maior fator de enriquecimento alcançado. Assim, uma amostra que contém 10 µg L<sup>-1</sup> de Paraquat, após pré-concentração por extração em ponto

nuvem com FE = 71, resultaria em uma solução com cerca de 700  $\mu\text{g L}^{-1}$ , satisfatoriamente detectável por espectrofotometria UV-Vis, com ou sem adição de ditonito.

Determinada a linearidade do sistema de extração em ponto nuvem com o surfactante Triton X-114 3  $\text{mmol L}^{-1}$ , a repetibilidade e a reprodutibilidade foram verificadas utilizando-se o padrão Paraquat 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  e medindo-se, em três dias diferentes, cinco amostras por dia.

Para verificar a proximidade dos valores de absorvância obtidos no comprimento de onda de 258 nm, foram obtidos os desvios-padrão dos três dias de teste (apresentados na Tabela 8) e os respectivos coeficientes de variação, conforme Equação 5.

$$CV(\%) = \frac{s}{M} \times 100$$

(Equação 5)

Onde:

CV = coeficiente de variação;

s = desvio-padrão;

M = média das medidas de absorvância.

Fonte: Brito, *et al.* (2003)

**Tabela 8:** Absorvâncias, desvios-padrão relativo e coeficientes de variação obtidos no teste de repetibilidade.

Paraquat 0,2 $\text{mg L}^{-1}$	Absorvância em 258 nm		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	0,244	0,205	0,322
2	0,292	0,147	0,252
3	0,234	0,221	0,249
4	0,330	0,170	0,344
5	0,323	0,182	0,335
<b>Desvio-padrão Relativo</b>	4,42%	2,90%	4,62%
<b>Coefficiente de Variação</b>	15,52%	15,70%	15,39%

Para resíduos de pesticidas, consideram-se aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (Brito, *et al.*, 2003), portanto os resultados de CV em torno de 15% foram satisfatórios para o teste de repetibilidade.

Na verificação da reprodutibilidade dos experimentos, utilizou-se a equação 3 com o desvio-padrão médio dos três dias e a média das médias diárias. O coeficiente de variação encontrado foi de 24,38% (Tabela 9), demonstrando que as análises não foram reprodutíveis com três dias de teste, sendo necessário realizar mais dias de experimento para minimizar possíveis interferências por variáveis ambientais e para que o resultado possa afirmar a significância do método.

**Tabela 9:** Absorbância, desvio-padrão relativo e coeficientes de variação obtidos no teste de reprodutibilidade.

<b>Média das Absorbâncias</b>	0,2567
<b>Desvio-padrão Relativo</b>	6,26%
<b>Coefficiente de Variação</b>	24,38%

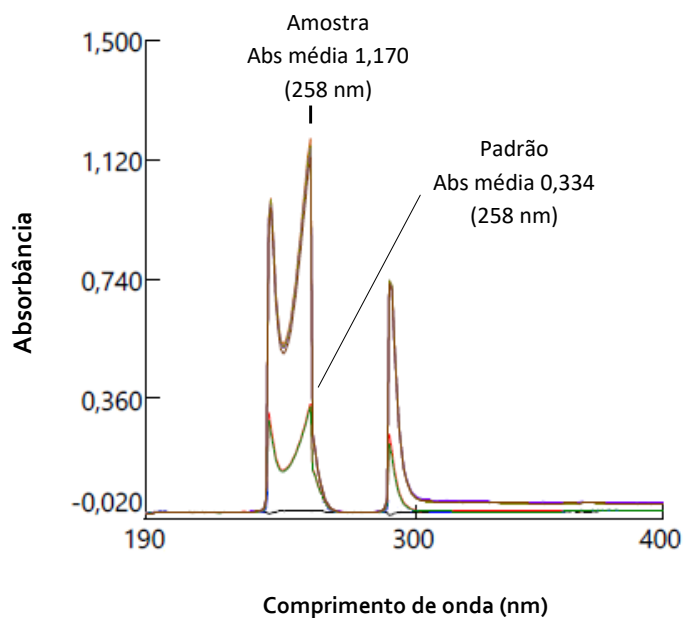
#### 5.4. Amostra real de água de manancial

Para avaliar o comportamento da extração em ponto nuvem em amostras de água naturais, utilizou-se uma amostragem do Parque do Pedroso, coletada no dia 17 de outubro de 2015.

À amostra, foi adicionado Paraquat para obtenção de uma concentração final conhecida de 0,2 mg L<sup>-1</sup> e, em seguida, submetida ao sistema de extração em ponto nuvem com Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi comparado com o obtido na solução-padrão, sendo apresentado no espectro da Figura 18.



**Figura 18:** Espectros obtidos após extração em ponto nuvem com solução-padrão e amostra do Parque do Pedroso.



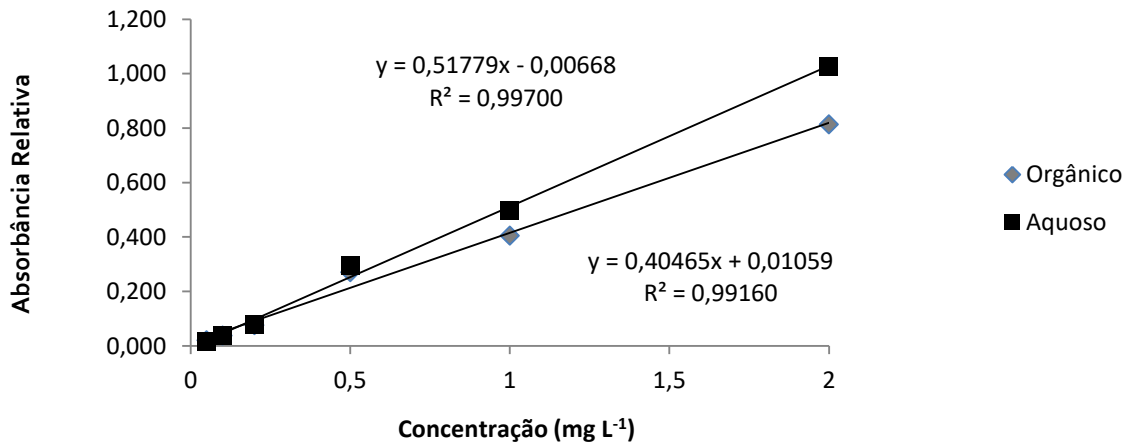
As respostas analíticas da amostra de água natural do Parque do Pedroso apresentaram aproximadamente 4 vezes mais intensidade que as da solução padrão. Devido à falta de seletividade do sistema, outras substâncias presentes no ambiente também foram extraídas e absorveram no mesmo comprimento de onda (258 nm). Optou-se, então, por realizar a reação com ditionito de sódio 1% (m/V) em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> após a extração em ponto nuvem. Obtida a fase orgânica após a extração, aproximadamente 100 µL, a mesma foi solubilizada em 200 µL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 300 µL da solução redutora de ditionito. Os valores de absorvância relativa (média de três análises), em 604 nm, esperados após uma extração quantitativa de soluções com concentração na faixa de 0,05 a 2,0 mg L<sup>-1</sup> de Paraquat, e posterior redução com ditionito, estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Absorbâncias relativas esperadas para extrações quantitativas após reação com ditionito.

Paraquat (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbância Relativa
0,05	0,020
0,1	0,038
0,2	0,075
0,5	0,270
1,0	0,405
2,0	0,813

Para verificar se a curva de calibração a ser utilizada na determinação quantitativa do herbicida Paraquat em amostras ambientais poderá ser preparada em fase aquosa ou deverá ser obtida na mesma matriz, em fase orgânica, foi realizada a comparação entre as curvas de calibração das soluções padrão após reação com ditionito nos dois meios (Figura 19). Verificou-se que é possível a utilização de uma curva de calibração preparada em fase aquosa, pois para as concentrações do analito na faixa de 0,05 a 2,0 mg L<sup>-1</sup>, a média dos desvios-padrão foi de 4%.

**Figura 19:** Comparação entre as curvas de calibração para a determinação de Paraquat em fases aquosa e orgânica com Triton X-114 3 mmol L<sup>-1</sup>.



Entretanto, para a amostra real, o sistema de extração não respondeu mais quantitativamente, e apenas 10% do analito presente nas soluções padrão passaram a ser extraídos. Possivelmente, a quantidade de compostos orgânicos dissolvidos na matriz da amostra, que também são extraídos por CPE, competem com o Paraquat adicionado, reduzindo sua incorporação na fase micelar. Tal fato pode ser corroborado pela elevada solubilidade do Paraquat em água (cerca de  $620 \text{ g L}^{-1}$ ; Embrapa, 2006) que ficará preferencialmente em fase aquosa em comparação a macromoléculas orgânicas potencialmente presentes numa amostra real (proteínas, carboidratos, entre outros).

Realizou-se diferentes experimentos na tentativa de melhorar a eficiência da extração, todos com detecção através da redução com solução de ditonito e análise espectrofotométrica, para conferir seletividade ao sistema. O primeiro teste foi realizado alterando-se o pH das soluções padrão de de aproximadamente 7, para 3 e 11. Os diferentes pHs não surtiram efeito na eficiência da extração. Este resultado está de acordo com os obtidos por Chen & Teo (2001) que avaliaram o efeito do pH para CPE em águas naturais entre 2 e 10, definindo que as melhores faixas de trabalho são as encontradas no pH natural da água (entre 6 e 8), no qual, em sua maioria, está presente a forma neutra das substâncias, e estas são mais hidrofóbicas do que a forma iônica.

Dada a elevada solubilidade do Paraquat e a competição dos compostos orgânicos pela extração por CPE, avaliou-se a estratégia de reduzir a solubilidade do composto pela adição de um álcool – etanol – à amostra de água, pois sua solubilidade neste solvente é maior que a do Paraquat, além de possuir a tendência em permanecer na solução aquosa, porém tal estratégia também não melhorou a eficiência de extração.

Avaliou-se, também, a presença de pares iônicos para neutralizar a carga do analito e favorecer sua partição no meio orgânico. A utilização de contra-íons para formação de pares-iônicos aumenta a hidrofobicidade do composto, podendo permitir uma melhoria nas condições experimentais. Os resultados também não foram satisfatórios. Por último, comparou-se a extração em ponto nuvem obtida com o surfactante Triton X-114, contra uma extração com Triton X-100, para verificar se o surfactante havia se degradado, pois, de acordo com Bezerra & Ferreira (2006), após longos períodos de armazenagem, a composição do surfactante pode ter sido afetada em decorrência de reações de degradação. Os resultados obtidos com os diferentes surfactantes foram próximos, descartando a hipótese do Triton X-114 estar degradado.

Dessa forma, pode-se dizer que o uso de CPE, para determinação de Paraquat em amostras reais de água, tem pouca aplicabilidade prática, uma vez que este composto compete com as demais moléculas orgânicas dissolvidas no meio, reduzindo o FE e impossibilitando a detecção por técnicas como espectrofotometria, mesmo após reação com ditionito para conferir seletividade ao sistema. A amostra de água natural utilizada para esse estudo tem, por característica, ser mais limpa e com baixa carga orgânica, uma vez que essa água é utilizada para abastecimento público. Amostras de água mais contaminadas ou até mesmo de efluentes teriam esse mesmo impeditivo ao possuírem maior quantidade de matéria orgânica dissolvida. Assim, a extração em fase sólida descrita pela metodologia de referência para quantificação de Paraquat preconizada pela EPA, ainda se apresenta como a melhor solução de compromisso entre sensibilidade e repetibilidade para a pré-concentração desse analito em águas naturais.

Apesar da aplicabilidade técnica de uso de CPE para extração e pré-concentração de Paraquat em amostras de água ter sido descartada, a quantificação por colorimetria é uma alternativa interessante à determinação por HPLC por ser mais rápida, menos laboriosa e de menor custo, além de gerar um resíduo de mais fácil disposição que os solventes orgânicos convencionalmente utilizados em cromatografia.

A CPE oferece benefícios como segurança ao operador, já que muitos dos surfactantes tipicamente utilizados no processo são classificados como relativamente não-tóxicos e inofensivos ao homem. A toxicidade crônica para o homem e a biodegradabilidade desses surfactantes ainda é objeto de estudo pela área de ecotoxicologia, entretanto sabe-se que os surfactantes não iônicos do tipo polioxietilenados são parcialmente biodegradáveis por bactérias do gênero *Pseudomonas* (Scott & Jones, 2000).

Adicionalmente, pode-se dizer que a CPE apresenta melhor relação custo-benefício quando comparado às técnicas convencionais de extração: por exemplo, o cartucho comercial de C<sub>18</sub>, recomendado pela EPA como estratégia de pré-concentração do Paraquat (EPA, 1997(a)) é descartável e tem custo aproximado de R\$ 100,00 por unidade, enquanto que um frasco de 500 mL de Triton X-114 tem custo aproximado de R\$ 200,00 (Sigma Aldrich, 2015), sendo utilizados poucos microlitros de solução diluída em cada determinação.

A escolha do Paraquat como composto alvo para esses estudos de viabilidade analítica da CPE foi um desafio por não haver estudos preliminares e por conta da elevada solubilidade desse composto em meio aquoso, o que dificultaria a sua extração para um meio orgânico e demandaria soluções de contorno para esse problema. As diversas alternativas

propostas no trabalho (variação de pH, presença de pares iônicos para neutralizar a carga do analito e favorecer sua partição no meio orgânico e uso de solventes orgânicos para alterar a partição do Paraquat entre fase aquosa e orgânica) não produziram resultados satisfatórios quando aplicados na amostra real. Possivelmente, outros pesticidas de menor solubilidade em água poderiam ser avaliados e apresentar melhores resultados para a pré-concentração por CPE.

Uma aplicação da técnica do ponto nuvem, ainda pouco explorada, é a extração de pesticidas presentes em amostras sólidas (Choi, *et al.*, 2003; Martinez, *et al.*, 2003). Evdokimov & Wandruska (1998) propuseram a mistura de surfactantes Igepal ICO-630 e Triton X-114 3% (m/v), para a extração de DDT de solos poluídos e obtiveram recuperações superiores a 83%. Outro método bastante eficiente foi desenvolvido por Stangl & Niessner (1994), no qual utilizou-se Genapol X-080 para extração de tiabendazol e napropamida de solos, com quantificação por cromatografia a líquido e detecção por fluorescência. Mais de 95% dos resíduos dos agrotóxicos foram extraídos da amostra, e o limite de detecção ficou abaixo de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## 6. CONCLUSÃO

A degradação ambiental causada pela interferência humana sobre o meio ambiente é provavelmente um dos maiores problemas da atualidade. Com isso, faz-se necessário o constante aprimoramento e desenvolvimento de técnicas para serem aplicadas na minimização dos impactos ambientais ou recuperação de áreas degradadas.

O uso da extração por ponto nuvem para a extração e pré-concentração de compostos orgânicos apresenta grande potencial como alternativa aos métodos convencionais de extração em fase sólida e extração líquido-líquido. O Paraquat, quando presente em quantidade traço na amostra, necessita pré-concentração para sua determinação. Quando em quantidades acima de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ , há possibilidade de determinação direta por espectrofotometria, mas pode haver interferência de contaminantes que absorvam no mesmo comprimento de onda (258 nm). Acima de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , pode-se determiná-lo colorimetricamente, de forma mais seletiva, por redução com ditionito de sódio em meio alcalino. Tal alternativa é interessante quando se considera que, tipicamente, se utilizam técnicas cromatográficas (de alto custo e mais demoradas) para a quantificação desse composto.

O sistema que utilizou os surfactantes SDS e CTAB não se demonstrou apropriado para a extração e pré-concentração do Paraquat, pois não apresentou extração quantitativa do herbicida para a fase orgânica, além de possuir a desvantagem da difícil separação das fases, ocasionando maiores erros na transferência da amostra e, conseqüentemente, no resultado da análise espectrofotométrica.

O método utilizado para a extração e pré-concentração em ponto nuvem com o surfactante Triton X-114 se mostrou simples, rápido e ambientalmente amigável, pois diminuiu a utilização de solventes orgânicos e a produção de resíduos, atendendo aos requisitos da química verde. Atingiu-se um fator de enriquecimento do herbicida Paraquat, para este surfactante, de 71 para concentração  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  e 45 para  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  e ambas apresentaram recuperações quantitativas para o analito de interesse, principalmente para soluções com baixas concentrações de Paraquat (até  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Na aplicação em análises ambientais, houve a extração de outro(s) composto(s) presente(s) na matriz da amostra com absorção máxima no mesmo comprimento de onda que o Paraquat, 258 nm, por isso a reação com ditionito fez-se necessária para conferir seletividade ao analito de interesse.

Neste trabalho, os limites de detecção foram superiores ao encontrado na literatura ( $0,68 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (EPA, 1997 (a)), com extração e pré-concentração em fase sólida, e, apesar de a

técnica de extração e pré-concentração em ponto nuvem ter apresentado repetibilidade, ela não foi reprodutível.

Pelo fato deste composto possuir alta solubilidade em água, a aplicação foi limitada a amostras sintéticas, concluindo-se que a técnica não se mostrou a mais adequada para a extração do herbicida Paraquat em amostras de água natural. É necessário, em testes futuros, adaptar a metodologia visando maior estabilidade no sistema de extração, estudar em maior profundidade as soluções de contorno e sua viabilidade para aplicação dessa metodologia em águas naturais, considerando os efeitos de matriz da amostra.

Uma possível alternativa é realizar um *clean up* para eliminar os interferentes orgânicos da matriz que competem com o Paraquat na extração em ponto nuvem. Pode-se utilizar uma etapa de limpeza para retirada das substâncias interferentes, desde que não remova também o analito de interesse, para posterior aplicação da extração em ponto nuvem.

O fator de enriquecimento pode ser otimizado pela modificação do tipo e da concentração do surfactante, bem como as condições experimentais sob as quais a separação de fases e a extração são realizadas. Além disso, os surfactantes mais frequentemente usados estão disponíveis comercialmente, sendo menos tóxicos e mais baratos que os solventes tradicionais. Outra característica é o fato de evitar a manipulação de grandes quantidades de solventes orgânicos, sendo uma alternativa menos prejudicial à saúde do analista.

As operações experimentais envolvidas na metodologia do ponto nuvem são muito simples e os resultados obtidos na literatura para a extração de pesticidas por ponto nuvem indicam que essa técnica oferece diversas vantagens altamente interessantes sob o ponto de vista analítico. Uma delas envolve a possibilidade de extração e pré-concentração de analitos com diferentes polaridades (diferentes classes de compostos) numa única etapa.

O campo de estudo da CPE ainda abre caminho para aplicação dessa metodologia na extração de pesticidas de amostras de solo, folhas e frutos. Sugere-se, ainda, como campo de investigação em potencial a automação da técnica de extração por ponto nuvem e seu acoplamento *on-line* com o sistema de detecção, tornando o processo mais robusto, menos laborioso e, conseqüentemente, fornecendo respostas analíticas mais reprodutíveis e rápidas.

## REFERÊNCIAS

- Abad, F. C. (2006). Determinação multirresíduo de pesticidas em cenouras utilizando extração com líquido pressurizado e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Dissertação de mestrado*, 106. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Abreu, T. C. C. Avaliação do Transporte do Herbicida Paraquat em Solos do Campo Experimental de Bom Jardim – RJ. *Dissertação de mestrado*, 120. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- Alexandratos, S. D. (2009). Ion-exchange resins: a retrospective from Industrial and Engineering Chemistry Research. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48, 388-398.
- Almeida, R. M., & Yonamine, M. (2007). Gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *Journal of Chromatography B*, 853, 260–264.
- Amarante Jr., O. P. de, Caldas, E. P. A., Brito, N. M., Santos, T. C. R. dos, Vale, M. L. B. F. (2001). Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, 12, 116-131.
- Aramendía, M. A., Borau, V., Lafont, F., Marinas, A., Marinas, J. M., Moreno, J. M., Porras, J. M., & Urbano, F. J. (2006). Determination of diquat and paraquat in olive oil by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (MRM). *Food Chemistry*, 97, 181-188.
- Arnold, T., & Linke, D. (2007). Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques*, 43, 427-440.
- Arruda, M. A. Z. (2006). Extraction and pre-concentration techniques for chromatographic analysis. In: *Trends in Sample Preparation* (pp. 137-164). New York: Nova Science Publishers.
- Baird, C., & Cann, M. (2011). *Química Ambiental* (4. ed.). Porto Alegre: Ed. Bookman.
- Bastos, R. K. X., Heller, L., Bevilacqua, P. D., Pádua, V. L., & Brandão, C. C. (2004). Legislação sobre controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano: a experiência brasileira comparada à panamericana. *Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 29, 22-27, San Juan.



- Bezerra, M. A., & Ferreira S. L. C. (2006). *Extração em ponto nuvem: princípios e aplicações em química analítica*. Vitória da Conquista: Edições Uesb.
- Brito, N. M., Junior, O. P. A., Polese, L. & Ribeiro, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 129-146.
- Brito, C. F. (2009). Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em sedimentos: avaliação da represa do Parque Pedroso, Santo André, SP. *Dissertação de mestrado*, 178. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Carraro, G. (1997). Agrotóxico e meio ambiente: uma proposta de ensino de ciências e de química. *Série Química e Meio Ambiente*. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Carvalho, N. L., & Pivoto, T. S. (2011). Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agrônômica. *Monografias Ambientais*, 2(2), 176-192.
- Cecchi, T. (2008). Ion Pairing Chromatography. *Analytical Chemistry*, 38, 161.
- Choi, M. P. K., Chan, K. K. C., Leung, H. W., & Huie, C. W. (2003). Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions. *J. Chromatogr. A*, 983, 153-162.
- Collins, C. H., Braga, G. L., & Bonato, P. S. (2006) *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Ed. UNICAMP. 453p.
- CONAMA - Conselho nacional do meio ambiente. (2005). Resolução nº 357. Publicada no DOU nº 053, de 18 de março de 2005, p. 58-63.
- Duarte, L. J., & Canselier, J. P. (2005). Extração no ponto nuvem de compostos orgânicos homólogos e isômeros. *Química Nova*, 28(3), pp. 426-432.
- Embrapa. (2004). Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004 - Controle das Plantas Daninhas. In.: Embrapa Soja - Sistema de Produção Nº 1. Disponível em <http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/controle.htm>. Acesso em 22 de maio de 2016.
- Embrapa. (2006). Principais herbicidas recomendados para cultura de soja para controle total da vegetação (dessecação pré-semeadura). In.: *Embrapa Trigo* - Documentos online. Disponível em [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do62\\_19.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62_19.htm). Acesso em 22 de maio de 2016.

- EPA, A. E. (1997) (a). Method 549.2. *Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. United States, 21p.
- EPA, A. E. (1997) (b). *Paraquat Dichloride*. United States: R.E.D. Facts.
- Evdokimov, E., & von Wandruska, R. (1998). Decontamination of DDT-polluted soil by soil washing cloud point extraction. *Analytical Letters.*, 31, 2289-2298.
- Faria, A. M., Queiroz, M. E., & Neves, A. A. (2005). Extração por ponto nuvem: técnica alternativa para a extração de resíduos de agrotóxicos. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15, 29-42.
- Fellenberg, G. (2011). Introdução aos problemas da poluição ambiental. São Paulo: Ed. Editora Pedagógica e Universitária – Springer – Ed. Da Universidade de São Paulo.
- Fenik, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M. (2011) Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, 30 (6), 814- 826.
- Freitas, A. P. (2011). Parque Natural do Pedroso: uma unidade de conservação em área urbana. *Dissertação de mestrado*, 230. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Gabriel, P. M. K. C., Gabriel, M. M., Lopes, M., & Escorsin, J. (2002). Proposta para utilização de um método colorimétrico na identificação e quantificação do herbicida paraquat, seguindo os passos da validação metodológica – I Parte. *Visão Acadêmica*, 3 (1), 23-28.
- Galvão, A. C., Robazza, W. S., Silva, I. R., & Almeida, C. M. (2015). Estudo do índice de refração de soluções líquidas binárias formadas por álcool e água em diferentes temperaturas. *Ciência e Natura*, 37 (4), 641-650.
- Gaubeur, I. (2014). Separação e pré-concentração: aplicações na preparação de amostras. Preparação de amostras. Universidade Federal do ABC, 60p.
- Georgakopoulos, P., Zachari, R., Mataragas, M., Athanasopoulos, P., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2011). Optimisation of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology. *Food Chemistry*, 128, 536 – 542.

- González, A. R., González, J.F. N., Heras, M.L. M., Fernández, C. M., Serrano, M.L. R., J. , & Pérez, G. (2001). Intoxicación por paraquat: presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Anales de Medicina Interna*, 18 (4).
- Guerrero, D. Q., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1997). Applications of the ion-pair concept to hydrophilic substances with special emphasis on peptides. *Pharmaceutical Research*, 14 (2), 119-127. Guimarães, G. (1987). Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente. *Série técnica IPEF*, 4(12), pp. 159-180.
- Hara, S., Sasaki, N., Takase, D., Shiotsuka, S., Ogata, K., Futagami, K., & Tamura, K. (2007). Rapid and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of paraquat and diquat in human serum. *Analytical Sciences*, 23, 523-526.
- Halko, R., & Hutta, M. (2002). Cloud point extraction and high-performance liquid chromatographic determination of selected herbicides. *Fresenius Environmental Bulletin*, 11(1), 22-26.
- Halko, R., Sanz, C. P., Ferrera, Z. S., & Rodríguez, J. J. S. (2004). Determination of benzimidazole fungicides by HPLC with fluorescence detection after micellar extraction. *Chromatographia*, 60, 151-156.
- Hao, C., Zhao, X., Morse, D., Yang, P., Taguchi, V., & Morra, F. (2013). Optimized liquid chromatography tandem mass spectrometry approach for the determination of diquat and paraquat herbicides. *Journal of Chromatography A.*, 1304, 169-176.
- Holler, F. J., Skoog, D. A. & Crouch, S. R. (2009). *Princípios de análise instrumental* (Vol. Tradução, 6ª edição). Porto Alegre: Ed. Bookman.
- INMETRO. (2007). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: documento de caráter orientativo. *Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial*, 24p.
- Jakhotiya, S. & Shrivastva, B. (2013). Analytical method development and validation: reverse phase high performance liquid chromatography. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (7), 5443-5451.
- Jardim, I. C. S. F. (2010). Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 13-25.
- Jing, C., Qun, X., & Roher, J. (s.d.). *Sensitive and rapid determination of paraquat e diquat in tap and environmental waters*. Disponível em Dionex - Thermo Scientific:

[http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114400-AN1051-LC-Paraquat-Diquat-Tap-Environmental-Waters-AN70386\\_E.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/114400-AN1051-LC-Paraquat-Diquat-Tap-Environmental-Waters-AN70386_E.pdf). Acesso em 25 de Outubro de 2013

- Kambhampati, I., Roinestad, K. S., Hartman, T. G., Rosen, J. D., Fukuda, E. K., Lippincott, R. L., *et al.*. (1994). Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 688, 67-73.
- Kammerer, J., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2011). Adsorption and ion exchange: basic principles and their application in food processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 22-42.
- Kebbekus, B. B., & Mitra, S. (1998). Sample preparation techniques .In: *Environmental Chemical Analysis* (pp.184-200). Boca Raton: Chapman & Hall / CRC.
- Kolberg, D. I. S., Mack, D., Anastassiades, M., Hetmanski, M. T., Fussell, R. J., Meijer, T., & Mol, H. G. J. (2012). Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. *Anal. Bioanal. Chem.*, 404, 2465-2474.
- Kuo, T. L. (1984). Determination of serum paraquat by XAD-2 resin. *Clinica Chimica Acta*, 144, 273-276.
- Kupiec, T. (2004). Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8 (3), 223-227.
- LeDoux, M. (2011). Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1021-1036.
- Lenardão, E. J., Freitag, R.A., Dabdoub M. J., Batista, A. C. F., & Silveira, C. C. (2003). Green chemistry – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, 26 (1), 123-129.
- Li, J., & Chen, B., (2003) Equilibrium partition of polycyclic aromatic hydrocarbons in a cloud-point extraction process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 63, 625-632.
- Macherey-Nagel GmbH & Co. (s.d.). Efficient SPE – Modern polymer and classical silica phases. Disponível em <http://www.mn-net.com/tabid/11444/default.aspx>. Acesso em 24 de Março de 2015.

- Maniasso, N. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24 (1), 87-93.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2015). Ata de reunião da Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Soja. *Reunião Ordinária N. 28*. Disponível em [http://www.agricultura.gov.br/arqeditor/file/camaras\\_setoriais/Soja/28RO/Ata%20de%20reuni%C3%A3o28.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arqeditor/file/camaras_setoriais/Soja/28RO/Ata%20de%20reuni%C3%A3o28.pdf). Acesso em 22 de maio de 2016.
- Maranhão, T. A., Borges, D. L. G., Veiga, M. A. M. S., & Curtis, A. J. (2005). Cloud point extraction for the determination of cadmium and lead in biological samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta – B*, 60, 667-672.
- Martínez, R. C., Gonzalo, E. R., Alvarez, J. D., & Méndez, J.H. (1999). Cloud point extraction as a preconcentration step prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71, 2468-2474.
- Martínez, R. C., Gonzalo, E. R., Cordero, B. M., Pavón, J. L. P., Pinto, C. G., & Laespada, E. F. (2000). Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 902, 251-265.
- Martínez, R. C., Gonzalo, E. R., Álvarez, J. D., Pinto, C. G., & Méndez, J. H. (2003). Prediction of the behaviour of organic pollutants using cloud point extraction. *J. Chromatogr. A*, 1005, 23-34.
- Martins, C. R., Lopes, W. A., & Andrade, J. B. (2013). Solubilidade de substâncias orgânicas. *Química Nova*, 36 (8), 1248-1255.
- McIntire, G. L. (1990). Micelles in Analytical Chemistry. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 21, 257-278.
- Moradi, M. , & Yamini, Y. (2012). Surfactant roles in modern sample preparation techniques: A review, *Journal of Separation Science*, 35 (18), 2319-2340.
- Mukherjee, P., Padhan, S. K., Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. K. (2011). Clouding behaviour in surfactant systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162, 59-79.
- Ni, N., Sanghvi, T., & Yalkowsky, S. H. (2002). Independence of the product of solubility and distribution coefficient of pH. *Pharmaceutical Research*, 19 (12), 1862-1866.
- Nomura, C. S. (2014) (a). Erros no preparo de amostras. Universidade de São Paulo, 65p.

- Nomura, C. S. (2014) (b). Preparo de amostras. Universidade de São Paulo, 38p.
- Oliveira, M. F., & Brighenti, A. M. (2011). Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas* (pp. 263-304). Curitiba: Omnipax.
- Oliveira Junior, R. S. (2011). Mecanismos de ação de herbicidas. In: *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas* (pp. 141-191). Curitiba: Omnipax.
- Otero, R. R., Grande, B. C., Lamela, C. P., Gándara, J. S., & Estévez, M. A. (2006), Simultaneous determination of the herbicides diquat and paraquat in water. *Journal of Chromatographic Science*, 44, 539-542.
- Paleologos, E. K., Giokas, D. L., & Karayannis, M. I., (2005). Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 426 -436.
- Patil, K. D. (2014). Review of green chemical technologies for sustainable developments in chemical process industries. *Journal of Current Trends in Chemical Engineering*, 2 (2), 12-19.
- Pereira, M. G., & Arruda, M. A. Z. (2003). Trends in preconcentration procedures for metal determination using atomic spectrometry techniques. *Microchimica Acta*, 141, 115-131.
- Pereira, W., & Dantas, R. L. (1995). Qualidade de tubérculos de batatas-semente tratados com paraquat e o desenvolvimento de uma metodologia simplificada de detecção de resíduo do herbicida. *Planta Daninha*, 13(1), 32-38
- Peres, F., Moreira, J. C., & Dubois, G. S. (2003). Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: F. Peres, & J. C. Moreira, *É veneno ou é remédio?* (pp. 21-41). Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.
- Picó, Y., Font, G., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2000). Solid-phase extraction of quaternary ammonium herbicides. *Journal of Chromatography A*, 885, 251–271.
- Pinto, C. G., Pavón, J. L. P., & Cordero, B. M. (1995). Cloud point preconcentration and high-performance liquid chromatographic determination of organophosphorous pesticides with dual electrochemical detection. *Analytical Chemistry*, 67, 2606-2612.
- Queiroz, S. C. N., Collins, C. H., & Jardim, I. C. S. F. (2001). Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Química Nova*, 24 (1), 68-76.

- Rabelo, M. C., & Danna, L. (2014). Avaliação da qualidade da água: parâmetros químicos e físicos da sub bacia do rio Tamanduateí e da micro-bacia hidrográfica Parque do Pedroso. *XVIII Congresso Brasileiro De Águas Subterrâneas*. Disponível em <https://aguassubterraneas.abas.org/asubterraneas/article/view/28388>. Acesso em 08 de Agosto de 2016.
- Ramella, J. C. (2009). Comparação das metodologias de extração no ponto nuvem e extração em fase sólida para a determinação de cádmio em amostras de águas. *Dissertação de mestrado*, 58. Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Rocha, J. C., Rosa, A. H., & Cardoso, A. A. (2004). *Introdução à Química Ambiental*. Porto Alegre: Ed. Bookman.
- Rocha, F. R. P.; & Teixeira, L. S. G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. *Química Nova*, 27 (5), 807-812.
- Ruiz, T. P., Lozano, C. M., Sanz, A., & Tomás, V. (1996). Simultaneous determination of diquat and paraquat residues in various matrices by capillary zone electrophoresis with diode array detection. *Chromatographia*, 43 (9/10), 468-472.
- Sanz, C. P., Halko, R., Ferrera, Z. S., & Rodríguez, J. J. S. (2004). Micellar extraction of organophosphorus pesticides and their determination by liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 524, 265-270.
- Schmitt, G. C., Paniz, C., Grotto, D., Valentini, J., Schott, K. L., Pomblum, V. J., & Garcia, S. C. (2006). Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42 (4), 235-243.
- Scott, M.J., & Jones, M.N. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1508 (1–2), 235–251.
- Seebunrueng, K., & Santaladchaiyakit, Y. (2012). Study on the effect of chain-length compatibility of mixed anionic-cationic surfactants on the cloud-point extraction of selected organophosphorus pesticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 1539-1548.
- Serajuddin, A. T. M., & Mufson, D. (1985). pH-solubility profiles of organic bases and their hydrochlorides salts. *Pharmaceutical Research*, 2 (2), 65-68.
- Serra, A., Domingos, F., & Prata, M. M. (2003). Intoxicação por paraquat. *Acta Médica Portuguesa*, 16, pp. 25-32.

- Sigma Aldrich. (2015). Catálogo de produtos. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry.html>. Acesso em 01 de Junho de 2015.
- Silva, M. A. M., Frescura, V. L. A., & Curtis, A. J. (2000). Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. *Spectrochimica Acta – B*, 55, 803-813.
- Silva, C. L. (2003). Desenvolvimento de estratégias de pré-concentração para eletroforese capilar (CE) visando a análise de pesticidas em Frutas e leguminosas. *Tese de doutorado*, 220. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Silva, S. G. (2008). Desenvolvimento de procedimentos limpos para extração de íons metálicos em ponto nuvem. *Dissertação de mestrado*, 83. São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Silva, R. T. P., & Falchetti, S. A. (2011). Congresso virtual brasileiro de administração. Da revolução agrícola ao desenvolvimento sustentável e os princípios do ambientalismo no Brasil. Disponível em [http://www.convibra.com.br/upload/paper/adm/adm\\_3044.pdf](http://www.convibra.com.br/upload/paper/adm/adm_3044.pdf). Acesso em 27 de Julho de 2015.
- Silva, R. T., Razaboni, B. F. S., & Abate, G. (2014). Estudo para a determinação de herbicidas da classe das triazinas por extração no ponto nuvem (CPE). *Scientia Chromatographica*, 6 (3), 175-185.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2007). *Fundamentos de Química Analítica* (Vol. Tradução da 8ª edição norte americana). São Paulo: Ed.Thomson.Soloukides A. L., Moutzouris, D. A., Kassimatis, T., Metaxatos, G., Hadjiconstantinou, V. (2007). A fatal case of paraquat poisoning following minimal dermal exposure. *Renal Failure*, 29 (3), 375-377.
- Souza, D., & Machado, S. A. (2003). Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. *Química Nova*, 26 (5), pp. 644-647.
- Spiro, T. G., & Stigliani. (2009). *Química Ambiental* (2. ed.). São Paulo: Ed. Pearson Education do Brasil.
- Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., & Micke, G. A. (2012). Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. *Scientia Chromatographica*, 4 (4), 287-297.



- Stangl, G., & Niessner, R. (1995). Micellar Extraction—a New Step for Enrichment in the Analysis of Napropamide. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 58, 1-4.
- Steffen, G. P., Steffen, R. B., & Antonioli, Z. I. (2011). Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. *Tecno-lógica*, 15(1), 15-21.
- Taguchi, V. Y., Jenkins, S. W. D., Crozier, P. W., & Wang, D. T. (1998). Determination of diquat and paraquat in water by liquid chromatography-(electrospray ionization) mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9, 830-839.
- Vinner, E., Stievenarte, M., Humbert, L, Mathieu, D., & Lhermitte, M.(2001). Separation and quantification of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis. *Biomedical chromatography*, 15 (5), 342 -347.
- Xie, S., Paau, M. C., Li, C. F., Xiao, D., & Choi, M. M. F., (2010). Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2306–2317.
- Zhang ,H. F., & Shi, Y. P. (2010). Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei samples. *Talanta*, 82 (3), 15, pp 1010-1016.
- Zocolo, G. J. (2012). *Conselho Regional de Química - IV Região (SP)*., disponível em Princípios e aplicações da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): [http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc\\_araraquara\\_2012\\_site.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/hplc_araraquara_2012_site.pdf). Acesso em 03 de Novembro de 2013.