

3. Materiais, amostras, procedimentos analíticos:

3.1 Materiais:

A Tabela 3.1 apresenta os equipamentos e materiais utilizados, suas características principais, fornecedores, e em quais procedimentos os respectivos itens foram utilizados.

Tabela 3.1 – Listagem de equipamentos e materiais.

| <i>Equipamentos:</i> | <i>Marca / Fornecedor</i> | <i>Técnica</i> |
|--|--|----------------|
| Sistema cromatográfico líquido de alta eficiência, detector de ultravioleta com faixa espectral de 160 a 600 nm. | Agilent 1100 | C |
| Coluna cromatográfica (HPLC) (5µm; 150 mm x 4,6 mm Di)* ¹ e (5µm; 250 mm x 4,6 mm Di)* ² | Zorbax ODS C18 | C |
| Espectrofotômetro de feixe duplo com faixa espectral de 190 a 900 nm. | DMS 100 (UV-Visível) Varian. | E |
| Banho ultra-som | Unique USC-2800 | C / E |
| Sistema para filtração de solventes | Millipore | C |
| Balança semi-analítica (resolução 0,01g) | Marte AS 5500 | C |
| Balança analítica (resolução 0,1mg) | Mettler Toledo AB 204S | C / E |
| Purificador de água | Milli-Q Gradiente | C / E |
| Medidor de pH | Analyser 300M | C |
| Agitador magnético | Marconi, MA-085. | C |
| Pipetas volumétricas | Classe -A | C / E |
| Balões volumétricos | Classe - A | C / E |
| Microseringa de 100 µL | Hamilton (Nevada, USA). | C |
| Injetor, com alças de amostragem de (20 µL)* ¹ e (5 µL)* ² . | Rheodyne | C |
| <i>Reagentes e Soluções</i> | <i>Composição (fornecedor)</i> | <i>Técnica</i> |
| Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄) | Grau PA (Merck, Darmstadt, Alemanha). | C |
| Ácido fosfórico 85% (H ₃ PO ₄) | Grau PA (Tedia, Fairfield, USA). | C |
| Água | Solvente Grau 1 | C / E |
| Metanol | Grau HPLC (Tedia, Fairfield, USA). | C / E |
| Solução tampão de fosfato | 13,6 g de KH ₂ PO ₄ dissolvidos em 1000 mL de água. pH ajustado para 2,1 com H ₃ PO ₄ 85%. | C |
| Fase móvel | Solução tampão fosfato: metanol. | C |
| <i>Controles e padrões</i> | <i>Fornecedor</i> | <i>Técnica</i> |
| Padrão certificado de imidacloprid com pureza de (99,0±0,5)% | ChemService Inc. (certificado n°138261-41-3). | C / E |
| Legenda: C – Técnica cromatográfica; E – Técnica espectrofotométrica; * ¹ → Análise de soluções aquosas; * ² → Análise de produtos técnicos e formulados. | | |

Com exceção para o espectrofotômetro, que pertence ao Departamento de Química da PUC-RJ, todos os demais equipamentos, utilizados neste trabalho, pertencem ao LADM e são mantidos de acordo com os procedimentos vigentes de controle, calibração e manutenção de equipamentos.

3.2 Amostras

Todas as amostras relacionadas a este trabalho contêm como ingrediente ativo o imidacloprid. Dois tipos distintos de amostras estão envolvidos e são claramente definidos a seguir:

3.2.1 Amostras de produtos técnicos e formulados.

As amostras de produtos formulados e técnicos avaliadas neste estudo são amostras experimentais, visto que os produtos envolvidos ainda estão em fase de registro. Na Tabela 3.2 são listadas todas as amostras de produtos técnicos e ou formulados, utilizados neste trabalho.

Tabela 3.2 – Listagem de amostras de produtos formulados e técnicos.

| Tipo de Produto | Identificação | Teor de ingrediente ativo | Tipo de Formulação | Referência da amostra |
|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Técnico | Produto técnico | > 970 g/kg | Não aplicável | REA 836 |
| Formulado | 350 SC | 350 g/L | Suspensão concentrada | REA 845 |
| Formulado | 600 SC | 600 g/L | Suspensão concentrada | REA 843 |
| Formulado | 700 WG | 700 g/kg | Grânulos dispersíveis | REA 846 |

3.2.2 Amostras para estudos toxicológicos (soluções aquosas).

As amostras de soluções aquosas avaliadas neste trabalho são empregadas na realização de testes toxicológicos que envolvem ensaios com peixes, algas e *Daphnia*. O preparo das amostras consistiu na simples diluição dos produtos técnicos ou formulados em diferentes tipos de águas, que variam de acordo com o tipo de ensaio a que as amostras se destinam. Segundo informação do cliente, a concentração de IA nas amostras utilizadas pode variar de 1 a 50 mg/L.

As amostras de soluções utilizadas para comparação dos procedimentos analíticos foram preparadas no LADM utilizando-se amostra de água de represa, fornecida pelo cliente. No total, foram preparadas nove amostras, três a partir de cada produto formulado. Na Tabela 3.3 estão listadas as amostras preparadas, suas respectivas identificações, os produtos formulados utilizados no preparo e concentrações aproximadas de imidacloprid esperadas:

Tabela 3.3 – Amostras de solução aquosa utilizadas para comparação dos procedimentos analíticos

| Identificação das amostras | Produto formulado utilizado no preparo * | Concentração aproximada (mg/L) |
|---|--|--------------------------------|
| Sol A ₁ | 350 SC | 13 |
| Sol A ₂ | 350 SC | 6 |
| Sol A ₃ | 350 SC | 1 |
| Sol B ₁ | 600 SC | 13 |
| Sol B ₂ | 600 SC | 7 |
| Sol B ₃ | 600 SC | 26 |
| Sol C ₁ | 700 WG | 25 |
| Sol C ₂ | 700 WG | 2 |
| Sol C ₃ | 700 WG | 12 |
| * Para mais detalhes sobre o tipo de produto formulado utilizado ver Tabela 3.2 | | |

Amostras dos diferentes tipos de água, utilizados nos ensaios toxicológicos, foram fornecidas pelo cliente, para avaliação de interferências. A avaliação da ocorrência de efeito matriz foi realizada pela comparação da curva de fortificação com a curva de calibração. Ensaios de fortificação foram realizados para três diferentes níveis e sete replicatas [14]. A seguir, são descritos detalhadamente, os tipos de água utilizados em cada ensaio; todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de grau analítico:

Ensaio de *Daphnia*: Para a realização deste ensaio, água de represa previamente filtrada tem sua dureza ajustada pela adição de volume calculado das soluções descritas a seguir:

- Solução A:
 - Sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)1,5 g
 - Água deionizada.1000 mL.
- Solução B:
 - Cloreto de potássio (KCl) 0,2 g
 - Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 4,8 g
 - Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6,1 g
 - Água deionizada 1000 mL

Baseado em informação do cliente, foi necessário adicionar 10 mL da solução A e 5 mL da solução B para cada litro de água de represa, a fim de corrigi-la.

Ensaio de peixes: Para este ensaio, utiliza-se água mole enriquecida de sais, preparada a partir das seguintes soluções:

- Solução A:
 - Sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1,5 g
 - Água deionizada1000 mL
- Solução B:
 - Cloreto de potássio (KCl)..... 0,2 g
 - Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)4,8 g
 - Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 6,1 g
 - Água deionizada..... 1000 mL
- Água mole enriquecida de sais:

A solução final utilizada neste ensaio, denominada água mole enriquecida de sais, é preparada com descrito a seguir:

 - Solução A 20 mL
 - Solução B 10 mL
 - Água970 mL

Ensaio de algas: Para este ensaio, é utilizada água de represa, previamente filtrada, à qual foi adicionada igual quantidade de meio de cultura. A composição do meio de cultura é descrita na Tabela 3.4:

Tabela 3.4 – Composição do meio de cultura utilizado em ensaio de algas.

| Soluções | Reagentes | Massa | Volume* ¹ (mL) | Volume* ² (mL) |
|----------|--|-------|------------------------------|------------------------------|
| | (fórmula química) | (g) | | |
| C | Nitrato de cálcio (Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O) | 4 | 100 | 1 |
| D | Nitrato de potássio (KNO ₃) | 10 | 100 | 1 |
| E | Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) | 3 | 100 | 1 |
| F | Fosfato dibásico de potássio (K ₂ HPO ₄) | 4 | 100 | 1 |
| G | Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O) | 0,03 | 1000 | 0,5 |
| | Molibdato de amônio ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O) | 0,06 | | |
| | Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O) | 0,06 | | |
| | Cloreto de cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O) | 0,06 | | |
| | Nitrato de manganês (Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O) | 0,06 | | |
| | Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₂ .H ₂ O) | 0,06 | | |
| H | Ácido bórico (H ₃ BO ₃) | 0,06 | 1000 | 0,5 |
| | Citrato de ferro (C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O) | 1,625 | | |
| | Sulfato de ferro (FeSO ₄ .7H ₂ O) | 0,625 | | |
| | Cloreto férrico (FeCl ₃ .6H ₂ O) | 0,625 | | |

*¹ → Volume final da respectiva solução.
*² → Volume da alíquota da respectiva solução para o preparo de um litro de meio de cultura.

3.3 Procedimentos Analíticos

Os procedimentos analíticos utilizados neste trabalho, separados de acordo com o tipo de amostra, estão descritos resumidamente a seguir:

3.3.1 Análise de amostras para estudos toxicológicos (soluções aquosas):

Procedimento comparativo (método de referência): HPLC-UV

Amostras com concentração esperada acima de 30 mg/L foram diluídas, com água solvente grau 1*¹, para a faixa de 5 a 20 mg/L. Um volume de 20 µL da amostra ou amostra diluída foi injetado no sistema cromatográfico,

*¹ Conforme definido em ISO 3696:1987(E) [31]: Água solvente grau 1 é essencialmente livre de contaminantes dissolvidos ou coloidais iônicos e orgânicos, e é adequada a técnicas analíticas que apresentam requerimentos mais restritivos como, por exemplo, HPLC.

utilizando como fase móvel solução (40:60) metanol:tampão fosfato^{*2}, com vazão de 1 mL/min. A determinação do imidacloprid foi realizada em modo isocrático e a medição de absorvância feita em 268 nm (valor nominal do monocromador de módulo de detecção do instrumento). Para a quantificação do ingrediente ativo, a área dos picos obtidos para as amostras no tempo de retenção de 3,5 minutos foi interpolada, utilizando calibração externa estabelecida com a utilização de soluções de calibração para a faixa de concentração de 0,5 a 30,0 mg/L. As soluções de calibração foram preparadas pela diluição de soluções estoque em água solvente grau 1, estas soluções estoque foram preparadas a partir da dissolução de uma massa conhecida de padrão certificado de imidacloprid em solução metanol:água (1:1).

Procedimento proposto: Espectrofotométrico – UV

Amostras com concentração esperada acima de 10 mg/L foram diluídas, com água solvente grau 1, para a faixa de 3,0 a 7,0 mg/L. A medição de absorvância da amostra, contra solução do branco no feixe de referência, foi realizada utilizando comprimento de 280 nm com banda espectral de passagem de 1 nm. A quantificação do ingrediente ativo foi obtida pela interpolação da absorvância obtida para as amostras com a utilização de curva de calibração externa estabelecida com a utilização de soluções de calibração para a faixa de concentração de 0,5 a 10,0 mg/L. As soluções de calibração foram preparadas pela diluição de soluções estoque em água solvente grau 1, preparadas a partir da dissolução de uma massa conhecida de padrão certificado de imidacloprid em solução metanol:água (1:1).

3.3.2 Análise de produtos técnicos e formulados:

Procedimento comparativo (método de referência): HPLC-UV

Uma massa de amostra correspondente a $0,0500 \pm 0,0050$ g de ingrediente ativo foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. A amostra foi então dissolvida em solução metanol:água (1:1) e diluída à marca. Um volume de 5 μ L da amostra preparada foi injetado no

^{*2} O preparo da solução tampão fosfato está descrito na Tabela 3.1.

sistema cromatográfico, utilizando como fase móvel solução (50:50) metanol:tampão fosfato, com vazão igual a 1 mL/min. A determinação do imidacloprid foi realizada em modo isocrático, pela medição de absorvância em 268 nm (valor nominal do monocromador do módulo de detecção do instrumento). Para a quantificação do ingrediente ativo, a área dos picos obtidos para as amostras no tempo de retenção de 4,5 minutos foi interpolada utilizando calibração externa estabelecida com a utilização de soluções de calibração para a faixa de concentração de 0,2 a 1,0 mg/mL (200 a 1000 mg/L). As soluções de calibração foram preparadas pela diluição de soluções estoque em água solvente grau 1, e estas soluções estoque foram preparadas a partir da dissolução de uma massa conhecida de padrão certificado de imidacloprid em solução metanol:água (1:1).

Procedimento alternativo: Espectrofotométrico –UV

Uma massa de amostra correspondente a $(0,0500 \pm 0,0050)$ g de ingrediente ativo é transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL. A amostra é então dissolvida em solução metanol:água (1:1) e diluída à marca. Uma alíquota de 1 mL é tomada e diluída com água solvente grau 1 para 100 mL. A determinação da absorvância da amostra, contra solução do branco no feixe de referência, é feita utilizando comprimento de 280 nm com banda de passagem espectral de 1 nm. A quantificação do ingrediente ativo é obtida pela interpolação da absorvância obtida para a amostra com a utilização de curva de calibração externa, estabelecida com a utilização de soluções de calibração para a faixa de concentração de 0,002 a 0,010 mg/mL (2 a 10 mg/L). As soluções de calibração são preparadas pela diluição de soluções estoque em água solvente grau 1, e estas soluções estoque são preparadas a partir da dissolução de uma massa conhecida de padrão certificado de imidacloprid em solução metanol:água (1:1).