



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Escola de Engenharia de Lorena – EEL

FELIPE TEIXEIRA PALMA
HOMERO OLIVEIRA GAETA
JOÃO VICTOR FERRAZ LOPES RAMOS
LUCAS MATEUS SOARES
SABRINA LEMOS SOARES

ANÁLISE INSTRUMENTAL

PROFESSORA: MARIA DA ROSA CAPRI

LORENA – SÃO PAULO
2017

OBJETO Análise de pesticidas organoclorados em águas superficiais e leite materno		N. COL-01	REV. 01
VISTO		Águas superficiais e leite materno	APLICAÇÃO Tec. Anal. Quím Aula prática
DATA	INICIAL 01/03/01	Válido para amostras com teor de Endrin entre 0,05 e 0,25 ppm (águas) e 0,07 e 2,08 ppm (leite materno). Método de ensaio	APROVAÇÃO Maria da Rosa Capri
	REVISÃO 06/06/17		

1. OBJETIVO

Esta norma tem por objetivo orientar a determinação de pesticidas organoclorados em leite materno e águas superficiais por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2. APARELHAGEM

- 2.1. Coluna HPLC SUPERSpHER 100 RP-18 acoplada a um espectrofotômetro modelo CECIL 1010;
- 2.2. Extrator Soxhlet;
- 2.3. Ultrassom Branson 5210;
- 2.4. Vórtex Maximix II - Thermolyne Type 37600 mixer;
- 2.5. Centrífuga Excelsa Baby II - Modelo 206 -R;
- 2.6. Rotavapor R144 - Büchi Switzerland;
- 2.7. Colunas de SPE-PACK C_{18} (octadecilsílica) e Florisil (SiO_n)

- 2.8. Frascos de vidro âmbar de 900 mL para coleta e preservação da amostra;
- 2.9. Balão volumétrico de 500 mL;
- 2.10. Balão de evaporação de 250 mL;
- 2.11. Seringa para injeção no CLAE;
- 2.12. Rotor evaporador;
- 2.13. Papel alumínio;
- 2.14. Tubos graduados de 15 mL;
- 2.15. Pipeta volumétrica de 1 mL;
- 2.16. Pipeta graduada de 10 mL;

3. REAGENTES E PADRÕES

3.1. Reagentes e soluções

- 3.1.1. Solução 50% (v/v) metanol – padrão HPLC;
- 3.1.2. Água deionizada;
- 3.1.3. Água destilada;
- 3.1.4. n-Hexano;
- 3.1.5. Diclorometano;
- 3.1.6. Ácido nítrico 10% (v/v);
- 3.1.7. Sulfato de sódio anidro;
- 3.1.8. Acetona 99.4 %;
- 3.1.9. Acetonitrila - grau HPLC, 100,0%;
- 3.1.10. Acetato de Etila 99,6%;
- 3.1.11. Éter de petróleo 15% (v/v)
- 3.1.12. Mistura de extração: acetato de etila/metanol/acetona na proporção 2:4:4, respectivamente;

3.2. Soluções Padrão

- 3.2.1. As soluções padrão devem ser preparadas após a leitura da amostra, proposta no item 4.3.1., de forma a garantir que os padrões analíticos se encontrem dentro de uma faixa adequada para análise;

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Preparo das soluções

- 4.1.1. Misturar 250 mL de metanol de nível HPLC com 250 mL de água destilada em um balão volumétrico de 500 mL;
- 4.1.2. Misturar em um béquer, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 2 ml de n-hexano, 2 ml de acetato de etila, 2 ml de metanol e 2ml de água destilada.
- 4.1.3. Adicionar em um balão de 10 mL, com uma pipeta graduada, 2,5 mL de acetonitrila a 100%. Completar com água destilada até o menisco.

4.2. Coleta e preparação da amostra de água e de sedimentos

É importante que as amostras sejam mantidas em vidro âmbar e em congeladores ou banhos de gelo, de forma a garantir uma temperatura aproximada de 4°C. Também devem ser coletadas amostras de 1 kg de sedimentos, devendo ser envoltas em papel alumínio e mantidas na temperatura supracitada enquanto esperam a análise.

- 4.2.1. Extrair um litro da água amostral utilizando extração sônica.
- 4.2.2. Realizar uma extração Soxhlet por 30 minutos, utilizando 20 mL de n-hexano e diclorometano na proporção 3:1;
- 4.2.3. Utilizar um rotor evaporador para concentrar o extrato gerado no item anterior;
- 4.2.4. Realizar uma pré-eluição da amostra com metanol do CLAE;
- 4.2.5. Homogeneizar as amostras de sedimentos;
- 4.2.6. Secar com sulfato de sódio anidro;
- 4.2.7. Separar 20 gramas em um vidro de extração limpo;
- 4.2.8. Adicionar ao vidro diclorometano e n-hexano em uma razão 2:3;
- 4.2.9. Submeter a mistura à agitação vigorosa em banho sônico por 5 horas;
- 4.2.10. Separar e concentrar o solvente com um rotor evaporador;
- 4.2.11. Realizar uma pré-eluição com metanol do CLAE;

4.3. Preparação da amostra de leite materno

O método de análise de leite materno apresenta, fundamentalmente, diferenças quanto ao tratamento da amostra, sendo os procedimentos referentes à coluna semelhantes. Para preparar a amostra:

- 4.3.1. Descongelar a amostra de leite materno e transferir, com uma pipeta volumétrica, 1 mL do conteúdo para tubos graduados de 15 mL;
- 4.3.2. Colocar os tubos em banho maria a 37 °C por 20 minutos;

- 4.3.3. Adicionar à amostra 10 mL de uma solução de acetato de etila, metanol e acetona, nas proporções 2:2:4;
- 4.3.4. Submeter a mistura a vortex por 1 minuto e, posterior, a 20 minutos de ultrassom;
- 4.3.5. Centrifugar a amostra por 15 minutos a 2000 rpm;
- 4.3.6. Adicionar 10 mL de água destilada à fase orgânica;
- 4.3.7. Passar a amostra em uma coluna SPE PACK C_{18} pré-condicionada com 2 ml de n-hexano, 2 ml de acetato de etila, 2 ml de metanol e 2ml de água destilada;
- 4.3.8. Adicionar 10 mL de água destilada ao sobrenadante obtido. Passar o sobrenadante pela coluna SPE PACK de C_{18} , sob um fluxo de 6 a 8 ml/min;
- 4.3.9. Lavar a coluna com 2 ml de solução aquosa de acetonitrila 25% (v/v) e eluir os pesticidas retidos na coluna com 1ml de n-hexano;
- 4.3.10. Passar o eluente por uma coluna de Florisil pré-condicionada com 25 ml de diclorometano, 10 ml de acetato de etila, 10 ml de uma mistura de acetona em éter de petróleo 15% e 10 ml de n-hexano;
- 4.3.11. Eluir o pesticida com 10 ml de hexano mais 5 ml da mistura de acetona em éter de petróleo 15%;
- 4.3.12. Evaporar o volume total à 1ml e adicionar 100 μ l do padrão de endrin;
- 4.3.13. Injetar no cromatógrafo;

4.4. Análise utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance

- 4.4.1. Diluir, com um pouco de metanol uma pequena quantidade da solução de água coletada e realizar sua leitura em um equipamento UV-vis, de forma a conhecer a faixa de absorvância;
- 4.4.2. Ajustar a vazão para 1 mL/min;
- 4.4.3. Diluir os resíduos obtidos anteriormente em 1 mL de metanol;
- 4.4.4. Com uma seringa, injetar pequenas quantidades de amostra diluída em metanol na coluna;
- 4.4.5. Repetir os procedimentos de 4.3.1. à 4.3.4. para as amostras e resíduos obtidos a partir dos sedimentos;
- 4.4.6. Anotar os tempos de retenção do cromatógrafo e os valores de absorvância lidos pelo espectrofotômetro, ao final do processo;
- 4.4.7. Comparar tais valores com a literatura, de forma a determinar todos os pesticidas presentes na amostra;

5. CÁLCULOS E CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS

- 5.1. Com as soluções descritas no item 3.2., construir as curvas de calibração;
- 5.2. Verificar os coeficientes de correlação, que devem ser, no mínimo, iguais a 0,98;
- 5.3. Interpolar o valor de leitura da amostra realizado pelo espectrofotômetro na curva analítica;

TABELAS

Tabela 1 - Condições Operacionais do método

Coluna	Coluna HPLC SUPERSpHER 100 RP-18
Detector	Espectrofotômetro modelo CECIL 1010
Eluente	Metanol
Fluxo de eluente	1 mL/min
Extrator	Soxhlet
Ultrassom	Branson 5210
Vórtex	Maximix II - Thermolyne Type 37600 mixer
Centrífuga	Escelsa Baby II - Modelo 209 - R
Colunas de Extração	SPE-PACK C ₁₈ Florisil (SiO _n)

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Mesquita, S. A. **Avaliação da contaminação do leite materno por pesticidas organoclorados persistentes em mulheres doadoras do Banco de leite do Instituto Fernandes Figueira, RJ.** Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

Akan, J.C.; Sodipo, O.A.; Mohammed, Z.; Abdulrahman, F.I. **Determination of Organochlorine, Organophosphorus and Pyrethroid Pesticide Residues in Water and Sediment Samples by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with UV/visible Detector.** Analytical & Bioanalytical Techniques, 2014. p. 5-6.