



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA E
AMBIENTAL**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
EMPREGANDO DLLME, SPE, HPLC-DAD E
LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUA SUBTERRÂNEA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sergiane Souza Caldas

**Rio Grande - RS, Brasil
2009**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO
DLLME, SPE, HPLC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA
DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
EM ÁGUA SUBTERRÂNEA**

por

Sergiane Souza Caldas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel

Rio Grande, RS, Brasil

2009

Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Escola de Química e Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO DLLME,
SPE, HPLC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE
AGROTÓXICOS EM ÁGUA SUBTERRÂNEA**

elaborada por
Sergiane Souza Caldas

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel
(Orientador - Presidente)

Prof. Dr. Renato Zanella (UFSM)

Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani (FURG)

Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves (FURG)

Rio Grande, 06 de fevereiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pela oportunidade, pela orientação, pelo seu apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos, e pela amizade cultivada no decorrer desses dois anos. Obrigada!

Ao **Prof. Dr. Renato Zanella** pela participação na defesa da dissertação, e pelas suas valiosas sugestões para o final deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani** pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da dissertação, e pelos ensinamentos enquanto professor.

A **Dr^a. Márcia Helena Scherer Kurz** pelas valiosas contribuições no exame de qualificação e por todo saber compartilhado desde que chegou ao LACOM.

Aos **Prof. Dr. Fábio Ferreira Gonçalves** pela disposição em participar e pela contribuição na qualificação e no exame de defesa da dissertação, suas sugestões contribuíram muito para o final deste estudo.

Aos meus pais, **Sérgio e Vânia**, fontes de minha inspiração, exemplos de vida, pelo amor, pelo apoio, pela minha educação, por acreditarem em mim. Pai e mãe, obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus amores, **Aiessa e Fred**, meus amados irmãos, que sempre torcem por mim, agradeço pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu noivo, **Márcio**, por seu companheirismo de todas as horas, pelas palavras que me deram força para vencer cada etapa. Pela compreensão de todos os dias não tão bem humorados (pré-prova, pré-trabalho...) e horas de estudo ausentes. Pelo teu apoio, mais uma das nossas etapas chegou ao fim. Gordo, te amo.

A todos os meus amigos, que sempre me proporcionam momentos de descontração e torcem por mim. Em especial a minha grande amiga, **Sheron**, minha irmã de todas as horas, e de todos os momentos. Obrigada pela forma alegre e agradável que compartilhamos cada uma das nossas vitórias.

À minha amiga **Adri**, pelos ótimos e já inesquecíveis momentos compartilhados na frente de cromatógrafos, pelo companheirismo e todo apoio

durante esta jornada. Por todas as longas horas de trabalho e de descontração. Obrigada!

À minha amiga **Lizi**, pelos seus muitos préstimos e sua boa vontade. Pelo sua calorosa receptividade de quando cheguei no **LACOM**. Sentirei saudades das muitas horas de convívio, descontração e bons papos durante estes dois anos.

À **Fabi**, minha grande companheira de coletas e de extrações em fase sólida. Pelos bons momentos compartilhados, pela amizade, carinho e apoio.

Aos meus colegas do LACOM com os quais convivi, e que contribuíram de diversas formas, tenho um carinho muito grande por todos. **Ana Laura, Lizi, Adri Demoliner, Adri Dias, Luis, Sherol, Vivi, Fabi, Ana Raisal, Flávio, Maristela, Ednei, Márcia e Fábio**. Agradeço principalmente às laconetes **Sherol e Adri Dias** pela amizade e disposição em ajudar de sempre.

As **colegas da primeira turma do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, pelos momentos vividos durante o decorrer desses dois anos.

À **FURG** pela oportunidade, principalmente pelo ensino gratuito e de qualidade.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica, proporcionando-me esta realização e formação com qualidade.

Aos **moradores da Quitéria**, que sempre me receberam de forma tão agradável, contribuindo para o bom andamento do trabalho;

Agradeço à **Deus**, pela proteção e por me conceder mais esta vitória.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS EMPREGANDO DLLME, SPE,
HPLC-DAD E LC-ESI-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM
ÁGUA SUBTERRÂNEA
AUTORA: SERGIANE SOUZA CALDAS
ORIENTADOR: PROF. Dr. EDNEI GILBERTO PRIMEL
Rio Grande, 06 de fevereiro de 2009

A preocupação com a poluição das águas por agrotóxicos tem aumentado, visto que aumentou o número de detecções de agrotóxicos em águas. A falta de avaliação da qualidade da água consumida pela população de áreas rurais onde não existe o abastecimento público de água potável, deve ser considerada, pois essas águas se encontram próximo a áreas de cultivo, onde há intensa aplicação de agrotóxicos. Nessas regiões, o abastecimento de água para as residências e para a irrigação é feito geralmente através das águas de poços. Neste trabalho, um método para determinação dos agrotóxicos carbofurano, clomazona, 2,4-D e tebuconazol em água subterrânea foi desenvolvido e validado. O método utilizou a Extração em Fase Sólida (SPE) e determinação por Cromatografia Líquida de Alta eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) e confirmação por Cromatografia Líquida *tandem* Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). Para a SPE utilizou-se cartuchos C18 de 200 mg, e eluição com 1 mL de metanol. Após a otimização dos parâmetros de extração e separação dos compostos, o método foi validado avaliando-se curva analítica, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99. Os LOQs para o método, considerando a etapa de pré-concentração de 250 vezes, foram de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os agrotóxicos por HPLC-DAD e, por LC-MS/MS, $4,0 \text{ ng L}^{-1}$ para clomazona, carbofurano e tebuconazol e de $40,0 \text{ ng L}^{-1}$ para 2,4-D. As recuperações foram entre 60,3 e 107,7% para a repetitividade e entre 67,5 e 115,3% para a precisão intermediária, com RSD de 0,8 a 20,7% para todos os compostos por HPLC-DAD. Para o LC-MS/MS a precisão em termos de repetitividade, variou entre 0,97 e 20,7%, e as recuperações entre 67,0 e 108,9%. O método foi aplicado na determinação de agrotóxicos em amostras de águas subterrâneas durante um ano. Nas amostras foram detectados agrotóxicos em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. Dentro do contexto atual da Química Analítica, de desenvolver métodos mais rápidos, que utilizem menor quantidade de solvente, de amostra e com altos fatores de enriquecimento, foi otimizado um método de extração para os agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol utilizando a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) e determinação por LC-MS/MS. Foram otimizados alguns parâmetros que influenciam no processo de extração, como: tipo e volume dos solventes dispersores e extratores, tempo de extração, força iônica e velocidade de centrifugação. Nas condições otimizadas, as recuperações para os níveis de concentração entre $0,02$ e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ variaram entre 62,7 e 120,0%, com valores de RSD entre 1,9 e 9,1%. O LOQ do método foi de $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os compostos. Quando comparado com a SPE se demonstrou rápido, simples, de baixo custo, além de necessitar de menores volumes de amostra para determinação de agrotóxicos em águas. O método mostrou-se adequado à análise dos agrotóxicos em água subterrânea e todos os parâmetros de validação obtidos estão dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos

Palavras-chave: agrotóxicos; água subterrânea; SPE; DLLME; HPLC-DAD; LC-MS/MS

ABSTRACT

Master's Thesis

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental
Universidade Federal do Rio Grande

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHODS USING DLLME, SPE,
HPLC-DAD AND LC-ESI-MS/MS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE IN
GROUNDWATER

AUTHOR: SERGIANE SOUZA CALDAS

ADVISOR: EDNEI GILBERTO PRIMEL, M. S., Ph. D.

February 06th, 2009, Rio Grande, RS, Brazil

The concern about water polluted by pesticides has increased due to the fact that large amounts of pesticides have been detected in these waters. The lack of evaluation of the quality of the water consumed by the population in rural areas, where there is no public supply of drinking water, should be considered, because these waters are close to agricultural areas, where the use of pesticides is intense. In these regions, the water for homes and irrigation is usually supplied by wells. In this research, a method for the determination of the pesticides carbofuran, clomazone, 2,4-D and tebuconazole in groundwaters was developed and validated. The method involves Solid Phase Extraction (SPE) and determination by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD), besides confirmation by Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). A SPE with 200-mg C18 cartridges was used and the analytes were eluted with 1 mL methanol. After the optimization of the extraction and separation parameters, the method was validated by evaluating the analytical curve, linearity, limits of detection and quantification, precision (repeatability and intermediate precision), and accuracy (recovery). All the analytical curves presented r values above 0.99. The LOQs for the method, considering the 250-fold pre-concentration step, were $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ for all pesticides by HPLC-DAD and 4.0 ng L^{-1} for clomazone, carbofuran and tebuconazole and 40.0 ng L^{-1} for 2,4-D by LC-MS/MS. By HPLC-DAD, the recoveries ranged between 60.3 and 107.7% for repeatability and between 67.5 and 115.3% for intermediate precision, with RSD from 0.8 to 20.7% for all compounds. The precision in terms of repeatability for the LC-MS/MS ranged between 0.97 and 20.7%, and recoveries, between 67.0 and 108.9%. The method was applied to the determination of pesticides in groundwater samples during one year. Pesticides were detected in levels of $\mu\text{g L}^{-1}$. In the current context of Analytical Chemistry, in order to develop fast methods that use smaller amount of solvent and sample, and have high enrichment factors, a method was optimized for the extraction of the pesticides carbofuran, clomazone and tebuconazole using the Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction (DLLME) and determination by LC-MS/MS. Some parameters that influence the extraction process, such as the type and volume of extraction and disperser solvents, the time of extraction, ionic strength and speed of centrifugation, were optimized. Under the optimized conditions, the recoveries ranged between 62.7 and 120.0% with RSD values between 1.9 and 9.1% ($n = 3$) for the concentration levels between 0.02 and $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$. The LOQ of the method was $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ for all compounds. In comparison with SPE, DLLME has shown rapidity, simplicity, lower cost and has required lower volumes of samples for the determination of pesticides in waters. The method proved to be adequate for the analysis of pesticides in groundwaters and all the validation parameters were within the limits suggested for the validation of chromatographic methods

Key words: Pesticides; groundwater; SPE; DLLME; HPLC-DAD; LC-MS/MS

Lista de Figuras

Figura 1 - Percentual de municípios que informaram a ocorrência de problema ambiental impactante, segundo o tipo de problema - Brasil - 2008 (Fonte: IBGE, 2008a)	6
Figura 2 – Consumo nacional de agrotóxicos e afins no ano de 2005 (Fonte: IBGE 2008b)	9
Figura 3 – Diagrama esquemático do movimento dos agrotóxicos (Fonte: BEYRUTH; TOMITA, 2003).....	13
Figura 4 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.	26
Figura 5 – Etapas envolvidas no procedimento da DLLME.....	29
Figura 6 - Diagrama de um detector de Arranjo de Diodos	37
Figura 7 – Componentes básicos de um espectrômetro de massas	44
Figura 8 – Diagrama da ESI, da formação dos íons na solução antes de serem introduzidos no MS.....	46
Figura 9 – Sistema SPE utilizado para pré-concentração dos agrotóxicos	60
Figura 10 – Procedimento DLLME utilizado para extração e pré-concentração dos agrotóxicos	62
Figura 11 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ	69
Figura 12 – Foto dos dois diferentes tipos de poços encontrados na região de estudo: cacimba (esquerda) e tubular (direita)	72
Figura 13 - Zona de amostragem e pontos de coleta.....	73
Figura 14 – Efeito dos diferentes solventes extratores na recuperação de agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; volume do solvente extrator, 40 µL; volume do solvente dispersor, 1,5 mL de acetonitrila.....	78
Figura 15 - Efeito do solvente dispersor na recuperação dos agrotóxicos. Condição de extração: volume de amostra, 5 mL; volume de solvente dispersor, 1,5 mL; solvente extrator, 40 µL CCl ₄	79
Figura 16 - Efeito do volume de solvente extrator (CCl ₄) na recuperação. Condições de extração: volume de amostra, 5,0 mL; volume de solvente dispersor (acetonitrila), 2,0 mL	79

Figura 17 - Efeito do volume de CCl ₄ no volume de fase sedimentada. Condições de extração, idem Figura 16.....	80
Figura 18 - Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente dispersor, acetonitrila; volume de solvente extrator, 40 µL de CCl ₄	81
Figura 19 - Efeito do pH na extração dos compostos expressa em termos de recuperação. Condições de extração: volume de amostra, 5,0 mL; solvente dispersor (acetonitrila) 2,0 mL e solvente extrator (CCl ₄) 60 µL.....	82
Figura 20 - Efeito da velocidade de centrifugação na recuperação dos agrotóxicos. Condições de extração, idem Figura 15.....	82
Figura 21 - Espectros de absorção obtidos por HPLC-DAD de uma solução analítica contendo 2,5 mg L ⁻¹ de cada agrotóxico: (a) carbofurano, (b) 2,4-D , (c) clomazona e (d) tebuconazol.....	87
Figura 22 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD a 220,3 nm, a partir de uma solução analítica 2,5 mg L ⁻¹ de carbofurano, 2,4-D , clomazona e tebuconazol.....	88
Figura 23 – Cromatograma total obtido para uma solução analítica contendo a mistura dos agrotóxicos (a) no modo ESI+ (carbofurano, t _R = 1,01; clomazona, t _R = 1,37 e tebuconazol, t _R = 2,01) e (b) no modo ESI- (2,4-D t _R = 1,16).....	90
Figura 24 – Espectro de massas para os compostos obtido no modo <i>full scan</i> , (a) carbofurano, (b) 2,4-D, (c), clomazona e (d) tebuconazol	92
Figura 25 - Cromatograma MRM obtido para uma solução analítica contendo 1,0 mg L ⁻¹ dos agrotóxicos: carbofurano (t _R 1,01 min), 2,4-D (t _R 1,16 min), clomazona (t _R 1,37 min) e tebuconazol (t _R 1,97 min)	93
Figura 26 - Cromatogramas de uma amostra de água: (pontilhado) branco da amostra num comprimento de onda de 220,3 nm e (linha) amostra fortificada com 5 µg L ⁻¹ de uma mistura dos agrotóxicos, e os espectros de absorção dos compostos estudados.....	100
Figura 27 - Concentração de carbofurano nos poços por mês de coleta	101
Figura 28 - Concentrações de clomazona nos poços por mês de coleta	101
Figura 29 - Concentrações de tebuconazol nos poços por mês de coleta	102
Figura 30 – Gráfico da concentração máxima e mínima encontrada de cada composto <i>versus</i> a profundidade do poço amostrado.....	104
Figura 31 - (a) cromatograma obtido por HPLC-DAD e espectro de absorção do composto correspondente a análise de uma amostra água subterrânea onde foi detectado o agrotóxico clomazona e (b) cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, no modo MRM da mesma amostra	105

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Variação na taxa de aplicação de herbicidas ocorrida no século XX	11
Tabela 2 - Agrotóxicos com os VMP estabelecidos pela legislação brasileira, europeia e americana para água potável	16
Tabela 3 – Valores Máximos Permitidos (VMP) e Limite de Quantificação Praticável (LQP), em $\mu\text{g L}^{-1}$ para os agrotóxicos em estudo, segundo Resolução nº 396	17
Tabela 4 – Revisão dos trabalhos publicados que utilizaram a DLLME para extração de agrotóxicos em amostras de água e os principais parâmetros de extração	33
Tabela 5 – Resultado do levantamento de poços na região da Quitéria, Rio Grande, em 2007	71
Tabela 6 – Poços escolhidos para a coleta das amostras	72
Tabela 7 - Risco de contaminação da água subterrâneas baseada em critérios estabelecidas pela U.S. EPA.....	73
Tabela 8 - Recuperações obtidas utilizando diferentes cartuchos de fase estacionária (C18 - Strata® C18 e polimérico - Strata®-X)	75
Tabela 9 – Densidade e Solubilidade em água dos solventes extratores	77
Tabela 10 - Recuperação para os agrotóxicos em diferentes níveis obtidos por DLLME	84
Tabela 11 - Comparação entre a DLLME e a SPE para determinação dos agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol	85
Tabela 12 – Composições de fase móvel e vazões testadas na otimização da separação dos agrotóxicos para o HPLC-DAD e as influências nos parâmetros cromatográficos k , R_s e α	86
Tabela 13 – Condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-DAD.....	88
Tabela 14 – Condições cromatográficas otimizadas para o LC-ESI-MS/MS	89
Tabela 15 - Resultados da otimização das condições de análises no espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos (tempo dwell 0,3 ms)	91
Tabela 16 – Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos agrotóxicos em uma solução de concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ nas condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-DAD.....	94

Tabela 17 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos no sistema HPLC-DAD.....	95
Tabela 18 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos no sistema LC-ESI-MS/MS	95
Tabela 19 - Resultados de LOD e LOQ, do instrumento e do método, para os agrotóxicos estudados	96
Tabela 20 - Precisão instrumental (RSD%) – repetitividade e precisão intermediária para o HPLC-DAD e repetitividade para o LC-ESI-MS/MS	97
Tabela 21 – Recuperação (R%), RSD_r e RSD_{pi} do método SPE e HPLC-DAD para os agrotóxicos em amostras de água fortificadas em diferentes níveis, e recuperação e RSD_r do método por SPE e LC-ESI-MS/MS	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ – comprimento de onda

α - fator de separação

2,4,5-T - ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACN - acetonitrila

ANA - Agência Nacional das Águas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

API – Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*

C12 - sílica modificada com hidrocarboneto linear C12

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

C18-E – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, E, *end capped*

C8 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C8, octilsilano

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CID - célula de colisão induzida, do inglês *Collision Induced Cell*

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

d.i. – diâmetro interno

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detection*

DDT – 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

DVB - divinilbenzeno

ECD – Detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detection*

EEC – Comunidade Econômica Européia, do inglês *European Economic Community*

EPA – Agência de Proteção Ambiental, do inglês *Environmental Protection Agency*

ESI – Ionização por *Electrospray*, do inglês *Electrospray Ionization*

ESI- – Ionização por Eletrospray no modo negativo, do inglês *Electrospray Ionization Negative Mode*

ESI+ – Ionização por Eletrospray no modo positivo, do inglês *Electrospray Ionization Positive Mode*

eV – elétron-Volt

FE – fase estacionária

FLD – detecção por fluorescência, do inglês *fluorescence detection*

FM – fase móvel

FPD – Detecção Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detection*

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GUS – *Groundwater Ubiquity Score*

ha – hectare

HF-LPME - Microextração em Fase Líquida com Fibras Ocas, do inglês *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH – International Conference on Harmonisation

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO – International Standard Organisation

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k - fator de retenção

k_H = Constante de Henry

K_{oc} – Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

K_{ow} – Coeficiente de partição octanol-água

LACOM – Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

LC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Eletrospray acoplada à Espectrometria de Massas *tandem* Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

LPME – Microextração em Fase Líquida, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*

LQP – Limite de Quantificação Praticável
M – molar (mol L^{-1})
 m/z – razão massa-por-carga
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEOH – metanol
MRM – Monitoramento de múltiplas reações, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*
MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
MWCNTs – nanotubos de carbono de parede múltiplas, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*
n – Número de medidas
NPD – Detecção por Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detection*
OMS – Organização Mundial da Saúde
p.a. – grau pró-análise
Pa – Pascal (unidade de pressão)
PC – provável contaminante
PDMS – polidimetilsiloxano
PMTDS – poli(metiltetradecilsiloxano)
pH – potencial hidrogeniônico
 pK_a – potencial de dissociação ácida
PMOS - polimetiloctilsiloxano
PS-DVB – copolímero de estireno divinilbenzeno
PTFE – politetrafluoretileno
QqQ – triplo quadrupolo
r - Coeficiente de correlação
R – Recuperação
RE – Resolução (legislação)
rpm – rotação por minuto
Rs – resolução cromatográfica
RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
 RSD_{pi} – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
 RSD_r – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
s – estimativa do desvio padrão absoluto
SBSE - Extração em Barra Magnética, do inglês *stir bar sorptive extraction*
SDME - Microextração em Gota Suspensa, do inglês *Single Drop Microextraction*
SIM – Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*
 t'_R – tempo de retenção ajustado
 $t_{1/2}$ – tempo de meia-vida
THF – tetrahidrofurano
TIC – Cromatograma Total, do inglês *total ion chromatogram*
 t_M – tempo de retenção do analito não retido
ton – tonelada
 t_R – tempo de retenção
US – Estados Unidos, do inglês *United States*
UV – ultravioleta
 v/v – volume por volume
VMP – Valor Máximo Permitido
 W_b – largura do pico na base
 w_h – largura do pico a meia altura
 x_m – média de medidas em réplicas

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Dados referentes às entrevistas realizadas com os moradores da localidade rural da Quitéria, localizada na cidade de Rio Grande, RS.....	121
Apêndice B – Resultados mensais referente às coletas realizadas de setembro de 2007 a agosto de 2008.....	123

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Qualidade das águas	5
3.1.1	Águas subterrâneas.....	6
3.2	Agrotóxicos	7
3.2.1	Produção e uso de agrotóxicos	8
3.2.2	O impacto no meio ambiente	10
3.2.3	Avaliação do potencial de risco da poluição ambiental por agrotóxicos	14
3.2.4	A legislação para agrotóxicos	15
3.2.5	Agrotóxicos selecionados neste estudo.....	17
3.2.5.1	Carbofurano	17
3.2.5.2	Clomazona	19
3.2.5.3	Tebuconazol.....	20
3.2.5.4	2,4-D.....	21
3.3	Técnicas de extração e pré-concentração de agrotóxicos em águas	22
3.3.1	Extração em Fase Sólida.....	24
3.3.2	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva	29
3.4	Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em águas	34
3.4.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos.....	36
3.4.2	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas.....	42
3.5	Parâmetros cromatográficos	47
3.5.1	Fator de retenção (k)	48
3.5.2	Resolução (R_s)	49
3.5.3	Fator de separação (α)	49
3.6	Validação de métodos cromatográficos	50

3.6.1	Curva analítica e linearidade	51
3.6.2	Sensibilidade	52
3.6.3	Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	53
3.6.4	Precisão (repetitividade e precisão intermediária)	53
3.6.5	Exatidão (recuperação).....	54
3.6.6	Seletividade e Confirmação dos Resultados	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1	Instrumentação	57
4.2	Reagentes, solventes e materiais	58
4.3	Preparo das soluções analíticas	59
4.4	Amostras de água.....	59
4.5	Otimização do sistema SPE.....	59
4.5.1	Escolha do sorvente	60
4.5.2	Volume de amostra.....	61
4.5.3	Ajuste do pH da amostra	61
4.5.4	Escolha do solvente de condicionamento.....	61
4.5.5	Escolha do eluente	61
4.6	Otimização do procedimento DLLME	61
4.6.1	Escolha do solvente extrator.....	62
4.6.2	Escolha do solvente dispersor	63
4.6.3	Escolha do volume do solvente extrator	63
4.6.4	Seleção do volume de solvente dispersor	63
4.6.5	Efeito do pH.....	63
4.6.6	Efeito da velocidade de centrifugação	63
4.6.7	Outros parâmetros avaliados.....	64
4.7	Otimização do sistema cromatográfico HPLC-DAD	64
4.7.1	Preparo e escolha da fase móvel	65
4.7.2	Escolha da vazão da fase móvel	65
4.7.3	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	66
4.8	Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS	66
4.8.1	Preparo e escolha da fase móvel	66
4.8.2	Escolha da vazão da fase móvel	66
4.8.3	Acidificação da fase móvel	67
4.8.4	Condições do sistema de detecção	67
4.9	Avaliação da separação cromatográfica por HPLC-DAD	67

4.10 Validação dos métodos	68
4.10.1 Curva analítica e linearidade	68
4.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação	68
4.10.3 Precisão.....	69
4.10.4 Exatidão.....	70
4.11 Aplicação do método desenvolvido em águas subterrâneas	70
4.11.1 Poços amostrados na região de estudo.....	70
4.11.2 Escolha dos agrotóxicos em estudo	72
4.11.3 Amostragem	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1 Estudo da extração em fase sólida para os agrotóxicos	75
5.2 Estudo da microextração líquido-líquido dispersiva para os agrotóxicos	77
5.2.1 Seleção do solvente extrator	77
5.2.2 Escolha do solvente dispersor	78
5.2.3 Seleção do volume do solvente extrator	79
5.2.4 Escolha do volume de solvente dispersor.....	80
5.2.5 Efeito do pH.....	81
5.2.6 Efeito da velocidade de centrifugação	82
5.2.7 Outros parâmetros.....	83
5.2.8 Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME	83
5.2.9 Avaliação do desempenho do método.....	84
5.3 Comparação entre as técnicas de extração DLLME e SPE	84
5.4 Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos por HPLC-DAD	85
5.4.1 Composição da fase móvel.....	85
5.4.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção.....	87
5.5 Condições cromatográficas para análise dos agrotóxicos por LC-ESI-MS/MS	89
5.5.1 Condições do sistema de injeção e de detecção.....	90
5.6 Avaliação da separação cromatográfica	93
5.7 Validação dos métodos analíticos	95
5.7.1 Curva analítica e linearidade	95
5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação	95
5.7.3 Precisão.....	97

5.7.4 Recuperação	98
5.8 Aplicação do método.....	100
5.8.1 Análises de amostras reais.....	100
6 CONCLUSÕES	106
TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO	120

1 INTRODUÇÃO

A água é essencial para o planeta, pois a sobrevivência de todas as formas de vida existentes na Terra dependem dela. A água de qualidade é um direito de todos e deve possuir características de pureza, isto é, deve satisfazer a uma série de exigências que constituem as condições de potabilidade, entendendo-se como água potável aquela que não contém germens patogênicos, não possui substâncias químicas tóxicas e é dotada de aspecto físico agradável, sem cor, cheiro ou sabor.

A disponibilidade de recursos hídricos é abundante, mas é necessário levar em consideração que menos de 3% da água no mundo é doce, e subtraindo a parcela de água doce que se encontra em locais de difícil acesso ou aquela já muito poluída, restam para utilização direta, apenas 0,003% do volume total de água do planeta.

O Brasil ostenta uma posição privilegiada perante a maioria dos países, sendo considerado um país rico em disponibilidade de recursos hídricos, com cerca de 10% da água doce disponível no mundo (REBOUÇAS *et al.*, 2002).

A água que se encontra no subsolo é chamada de água subterrânea. A água subterrânea está disponível em todas as regiões da Terra, constituindo importante recurso natural, e tem sido utilizada para irrigação em áreas rurais, para fins industriais e principalmente como fonte alternativa de abastecimento de água para o consumo humano. Em algumas áreas do Brasil, a água subterrânea representa o principal recurso hídrico, desempenhando importante papel no desenvolvimento socioeconômico do país.

Os agrotóxicos além de serem úteis na produção agrícola, são poluidores potenciais tanto das águas superficiais como das subterrâneas, principalmente quando utilizados de forma inadequada. É importante ressaltar que, em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de agrotóxicos aplicados alcançam o alvo, enquanto que o restante (99,9%) tem potencial para se mover para outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas (RIBEIRO *et al.*, 2007).

Em decorrência do crescimento populacional e do aumento da demanda por alimentos, o uso de agrotóxicos vem se intensificando a cada ano. O uso destes compostos na atividade agrícola é considerada uma atividade difícil de ser avaliada,

uma vez que o comportamento dos diversos agrotóxicos é ainda pouco conhecido, e varia muito de região para região.

Quase nenhum conhecimento existe, por exemplo, quanto à concentração de agrotóxicos nas águas que abastecem a população, constituindo uma crescente preocupação. Dessa forma, como muitos poluentes orgânicos são direta ou indiretamente introduzidos no ambiente aquático, à determinação de resíduos de agrotóxicos em água tornou-se de importância fundamental para identificar, quantificar e solucionar problemas ambientais, biológicos e de saúde pública.

Por isso, um esforço conjunto entre governo, academia e sociedade visando estabelecer limites seguros de concentração aceitáveis para as águas foram estabelecidos.

No Brasil, a Portaria nº 518/04 do Ministério da Saúde, e a Resolução nº 357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelecem limites para águas superficiais; e para as águas subterrâneas, em 2008, foi publicada a Resolução nº 396/08 do CONAMA.

Devido ao padrão de pureza estabelecido pelas agências regulamentadoras, é necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos sensíveis, seletivos, exatos e precisos que permitam determinar quantitativamente os agrotóxicos. Assim como, existe a necessidade de técnicas de preparo de amostra que possibilitem extrair e/ou pré-concentrar os analitos presentes na matriz de forma compatível com o sistema de detecção.

Desta forma, pode-se compreender o papel importante desempenhado pela Química Analítica, ciência que estuda e desenvolve novos métodos capazes de identificar e quantificar constituintes de uma amostra.

Nesse sentido, técnicas de preparo de amostra como a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) vêm sendo amplamente utilizadas, e novas técnicas, miniaturizadas, como a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) desenvolvidas.

Para determinação destes compostos, técnicas cromatográficas bem estabelecidas, como a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) e a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) são usadas. Por sua vez, estas técnicas cromatográficas podem ser acopladas a diversos sistemas de detecção, entre eles, a Detecção por Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detection*) e a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*).

O desenvolvimento de novos métodos que possam ser utilizados para o monitoramento destes compostos no meio ambiente é de grande importância, pois a qualidade da água influencia também na saúde da população.

A localidade rural da Quitéria, situada na cidade do Rio Grande, no estado do Rio Grande do Sul (RS) desenvolve diversas atividades agrícolas, onde é feita aplicação de agrotóxicos. Não há dados de caracterização das águas dos poços da localidade, as quais são utilizadas para abastecimento doméstico sem nenhum tratamento prévio.

Considerando-se a importância da utilização de águas subterrâneas como fontes de abastecimento, a importância do uso de agrotóxicos para o controle de pragas para atender a demanda mundial crescente de alimentos; e a conseqüente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver e validar um método simples, sensível e eficiente para determinar os agrotóxicos carbofurano, 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético), clomazona e tebuconazol em águas subterrâneas empregando SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS; (ii) otimizar um método para determinar os agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol em águas subterrâneas por DLLME e determinação por LC-ESI-MS/MS; (iii) aplicação do método desenvolvido por SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para monitorar amostras de águas subterrâneas utilizadas para abastecimento doméstico, a fim de avaliar a possível contaminação por resíduos dos agrotóxicos selecionados.

Ressalta-se que este estudo torna-se importante como forma de proteção à saúde da população usuária e imprescindível, diante da inexistência de dados de caracterização destas águas. Além de contribuir para o desenvolvimento de metodologias analíticas validadas empregando técnicas modernas de extração e determinação de agrotóxicos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foram:

Geral

✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica empregando pré-concentração e extração por SPE e DLLME e determinação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS dos agrotóxicos carbofurano, clomazona, tebuconazol e 2,4-D em águas de poços de uma área rural do município de Rio Grande.

Específicos

- ✓ Testar diferentes composições de fase móvel e de fases estacionárias a fim de obter a melhor separação dos analitos;
- ✓ Otimizar os parâmetros para o HPLC-DAD e para o LC-ESI-MS/MS;
- ✓ Comparar a eficiência de extração entre dois tipos de cartuchos de SPE contendo diferentes sorventes;
- ✓ Otimizar a metodologia de extração das amostras por SPE e por DLMME;
- ✓ Fazer um comparativo entre a SPE e a DLLME;
- ✓ Validar as metodologias, avaliando: curva analítica, linearidade, sensibilidade, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão;
- ✓ Verificar os poços existentes na localidade rural da Quitéria (sub distrito da Vila da Quinta – Município do Rio Grande - RS) e caracterizá-los quanto a profundidade e localização;
- ✓ Escolher 10 poços dentre os caracterizados para avaliar a qualidade da água através da qualificação e quantificação de agrotóxicos;
- ✓ Investigar a ocorrência dos agrotóxicos clomazona, 2,4-D, carbofurano e tebuconazol, nas águas subterrâneas empregando SPE e HPLC-DAD, e confirmação por LC-ESI-MS/MS;
- ✓ Informar a comunidade da Quitéria sobre a qualidade da água por eles consumida em relação à presença de resíduos de agrotóxicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Qualidade das águas

A água encontra-se disponível sob várias formas e é um dos recursos mais comuns existentes na natureza, cobrindo 70% da superfície do planeta. Todos os organismos necessitam de água para sobreviver, sendo a sua disponibilidade um dos fatores mais importantes a moldar os ecossistemas. Apesar de existir em abundância, nem toda água é diretamente aproveitada pelo homem. Do total estimado de 265.400 trilhões de toneladas de massa total de água existentes no planeta, somente 0,5% representa água doce extraível do ponto de vista tecnológico e econômico (BRAGA *et al.*, 2005).

Além dos problemas relacionados com a quantidade de água, como estiagens, cheias e escassez, há também aqueles relacionados com a qualidade da água. A poluição de mananciais aquáticos impede, por exemplo, seu uso para abastecimento humano. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 25 milhões de pessoas morrem por ano no mundo em virtude de doenças transmitidas pela água. A OMS indica que nos países em desenvolvimento 70% da população rural e 25% da população urbana não dispõem de abastecimento adequado de água potável (BRAGA *et al.*, 2005); e de acordo com estimativas das Nações Unidas, entre 2 a 7 bilhões de pessoas serão afetadas pela sua falta até 2050 (ROCHA *et al.*, 2004). Por isso é necessário que a sociedade brasileira se mobilize para garantir a saúde e a vida das nossas fontes de água doce, como por exemplo: os rios, açudes, lagos, riachos, córregos e nascentes (PRIMEL, 2003).

A Figura 1 apresenta o percentual de municípios que informaram a ocorrência de problema ambiental impactante no Brasil; e como pode ser observado, a poluição do recurso água foi indicada por 41,7% dos municípios brasileiros, e de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2008a) sua ocorrência foi mais informada por municípios das regiões mais urbanizadas e economicamente mais desenvolvidas do País, como o Sudeste (43,6% dos municípios da região) e o Sul (43,2%).

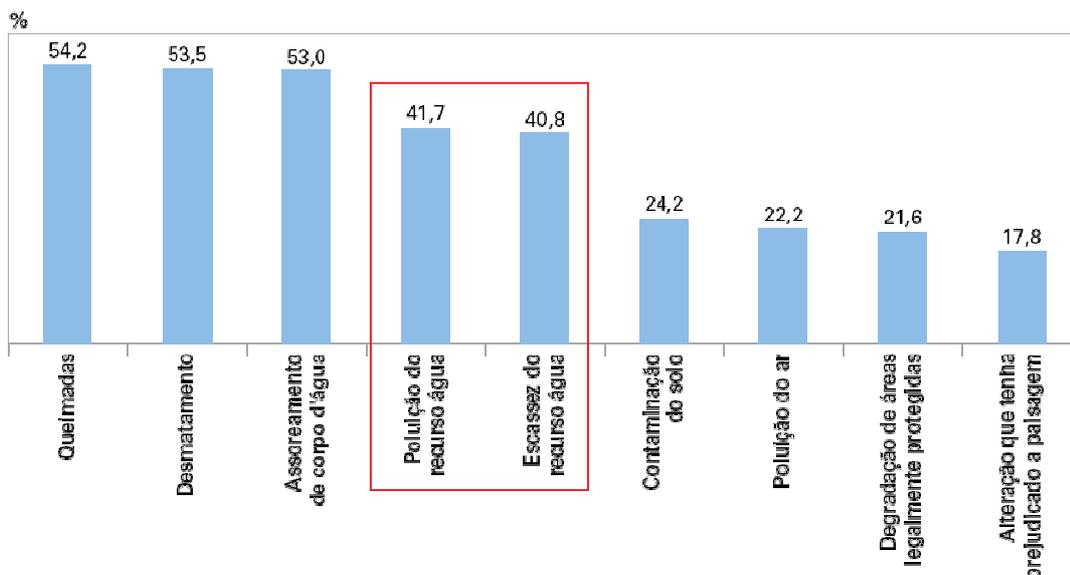


Figura 1 - Percentual de municípios que informaram a ocorrência de problema ambiental impactante, segundo o tipo de problema - Brasil - 2008 (Fonte: IBGE, 2008a)

3.1.1 Águas subterrâneas

A denominação de “águas subterrâneas” para as águas do subsolo é considerada mais apropriada, desde que a abordagem evoluiu do objetivo tradicional de determinação de reservas de água disponíveis no subsolo, para uma análise mais abrangente das suas condições de uso e proteção (REBOUÇAS *et al.*, 2002). Sendo definida recentemente pela legislação como águas que ocorrem naturalmente ou artificialmente no subsolo (BRASIL, 2008).

As águas subterrâneas estão disponíveis em todas as regiões da Terra, constituindo importante recurso natural. Essas são utilizadas freqüentemente para abastecimento doméstico, irrigação em áreas rurais e para fins industriais (TUNDISI, 2003).

Apesar da inexistência de dados completos sobre a dimensão da sua utilização, estima-se que cerca de 51% da água potável do Brasil provém dos aquíferos subterrâneos (MEDEIROS *et al.*, 2003); e que existem no país pelo menos 400.000 poços (ANA, 2007).

No Brasil, 15,6% dos domicílios utilizam exclusivamente água subterrânea, 77,8% usam rede de abastecimento de água e 6,6% usam outras formas de abastecimento. O Brasil não possui uma rede nacional de monitoramento de águas

subterrâneas. Por isso, existe uma grande carência de dados a respeito da qualidade das águas, especialmente de abrangência regional (ANA, 2007).

As águas subterrâneas têm sido consideradas como uma forma pura de água. Devido a sua filtração através do solo e ao longo tempo de permanência no subsolo, ela contém uma quantidade muito menor de matéria orgânica natural e menos microrganismos causadores de doenças que as águas dos rios e lagos (BAIRD, 2002). Entretanto, nas últimas décadas, as atividades antrópicas têm comprometido significativamente alguns aquíferos. Entre as principais fontes de poluição das águas subterrâneas pode-se citar o uso de insumos agrícolas, como agrotóxicos e fertilizantes (ANA, 2007).

O impacto das atividades agrícolas modernas sobre a qualidade das águas subterrâneas tornou-se conhecido em alguns países industrializados durante a década de 1970. (RIBEIRO *et al.*, 2007). A experiência internacional mostra que, em áreas de intensa atividade agrícola, são cada vez mais comuns as ocorrências de agrotóxicos nas águas subterrâneas (ANA, 2007).

3.2 Agrotóxicos

Desde os primórdios da civilização, o homem tem continuamente se esforçado para melhorar sua condição de vida. Seu esforço para aumentar a produção de alimento contrapôs às devastações causadas pelas pragas, dando origem, então, aos compostos denominados de agroquímicos, incluindo fertilizantes e agrotóxicos (SILVA; FAY, 2004).

Pela legislação brasileira, os agrotóxicos são definidos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos abrangem um grande número de moléculas químicas, com diferentes modos de ação e toxicidade podendo ser classificados de acordo com a formulação, emprego, modo de ação e estrutura química (SILVA; FAY, 2004). Quanto a toxicidade os agrotóxicos são divididos em 4 classes: I – extremamente tóxico, II – altamente tóxico, III – mediamente tóxico e IV – pouco tóxico (BARBOSA, 2004).

A principal classificação é quanto ao seu emprego, sendo classificados em inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, moluscicidas, raticidas, entre outros (SILVA; FAY, 2004; KURZ, 2007).

3.2.1 Produção e uso de agrotóxicos

O desenvolvimento da síntese orgânica durante a Segunda Guerra Mundial e a consolidação do padrão tecnológico da agricultura chamada moderna tiveram importância fundamental no desenvolvimento da indústria mundial de agrotóxicos. A descoberta das propriedades inseticidas do organoclorado dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), em 1939, é tida como um marco de transição nas técnicas de controle fitossanitário das culturas agrícolas (SPADOTTO *et al.*, 2004).

A introdução de agrotóxicos organossintéticos no Brasil teve início em 1943, quando chegaram às primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO *et al.*, 2004).

O valor do mercado mundial para agrotóxicos foi estimado em US\$32 bilhões em 2000, correspondendo à comercialização de mais de 3000 ingredientes ativos. As vendas totais de agrotóxicos variam muito com a categoria, sendo que os herbicidas representam 48%, os inseticidas 28%, os fungicidas 19% e os outros produtos 5% (BARBOSA, 2004).

No Brasil, o consumo de agrotóxicos passou de 16 mil toneladas em 1964 para mais de 128 mil toneladas em 1998; portanto, o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700% neste período (SPADOTTO *et al.*, 2004). A partir de 1994, as vendas de agrotóxicos no Brasil vêm crescendo continuamente, tendo ultrapassado os US\$ 2 bilhões, correspondendo a 6% do mercado mundial (BARBOSA, 2004). Em 2001, para 50,7 milhões de hectares plantados, o Brasil

utilizou 158,7 mil toneladas de agrotóxicos, com uma média de 3,13 kg/ha (ANA, 2007).

O consumo desses produtos difere nas várias regiões do país, nas quais se misturam diversas atividades agrícolas (SPADOTTO *et al.*, 2004). Destacam-se quanto à utilização de agrotóxicos os estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso, e Rio Grande do Sul (Figura 2) (IBGE, 2008b).

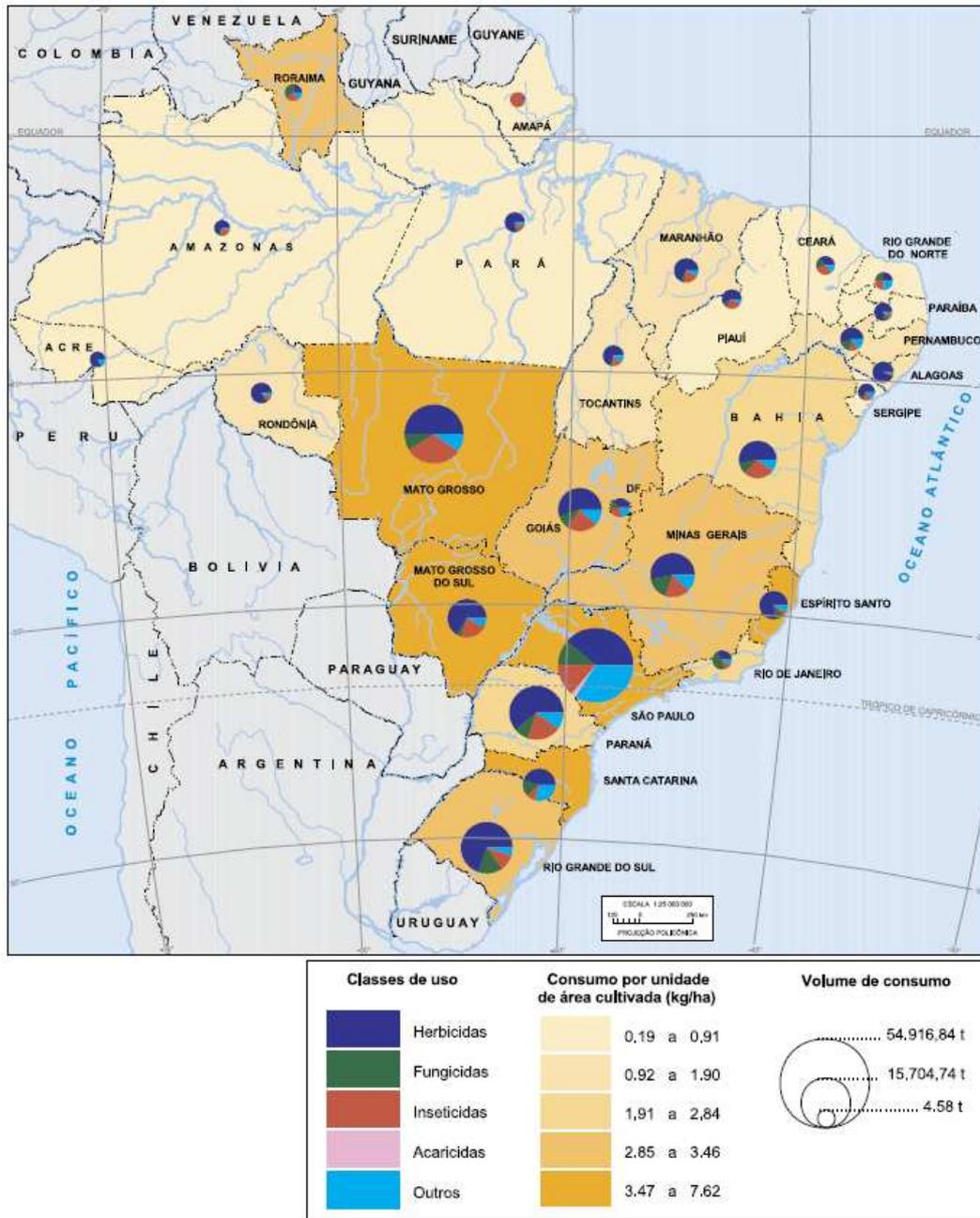


Figura 2 – Consumo nacional de agrotóxicos e afins no ano de 2005 (Fonte: IBGE 2008b)

Como pode ser observado, os agrotóxicos mais intensamente aplicados são os herbicidas, seguidos pelos inseticidas, fungicidas e acaricidas (IBGE, 2008b).

3.2.2 O impacto no meio ambiente

Os agrotóxicos que inauguraram o ciclo que ainda hoje caracteriza a tecnologia predominante no combate às pragas agrícolas têm cerca de 50 anos. Eles foram sintetizados na busca de um efeito duradouro de sua aplicação. Surgiu, então, o DDT, em 1939, como o primeiro inseticida organoclorado de elevada resistência à decomposição no ambiente. Essa resistência justificou o sucesso do DDT em programas de saúde pública e na contribuição para o aumento da produtividade agrícola. Entretanto, essa permanência no ambiente ampliava a oportunidade de sua disseminação na biosfera, seja por meio de fenômenos físicos, ou seja, pelas cadeias alimentares dos ecossistemas presentes no local de sua aplicação original (BRAGA *et al.*, 2005).

Estes compostos são sintetizados para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se deseja controlar ou eliminar, mas determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode então atingir não só o organismo que se espera controlar, como também outros seres do ambiente (BAIRD, 2002).

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e os agrotóxicos acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação à concentração inicial de agrotóxicos, como o leite, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais (BAIRD, 2002).

Devido aos problemas causados ao meio ambiente e a organismos não alvos, um grande número de compostos vem sendo sintetizado, partindo do mesmo objetivo inicial, mas com a preocupação crescente de torná-los cada vez mais eficazes, mais seletivos e menos agressivos ao meio ambiente. Isso foi e está sendo conseguido devido à evolução espetacular em todas as áreas do conhecimento que vem ocorrendo desde o século XX, e que teve reflexo direto na indústria de agrotóxicos (BRAGA *et al.*, 2005; BARBOSA, 2004).

Considerando o número total de produtos, houve nos últimos anos uma redução da produção dos agrotóxicos mais tóxicos, pertencentes às classes I e II (IBGE, 2008b). Dados do IBGE (2008b) mostram que de 1992 para 2004 houve um aumento de 114 agrotóxicos em linha de comercialização, totalizando em 2004 600 agrotóxicos. Nesse mesmo intervalo, a produção de agrotóxicos pertencentes à classe I e a classe II, diminuíram 8 e 10,2% respectivamente; enquanto os pertencentes as classes III e IV, aumentaram em 2,6 e 9,4%.

Para ilustrar a evolução ocorrida no desenvolvimento de produtos mais ativos, alguns dados são apresentados na Tabela 1. Pode ser observado que no início do século XX os herbicidas inorgânicos era os únicos disponíveis comercialmente. Esses compostos eram utilizados em grandes quantidades, chegando-se a aplicar até 5 toneladas por hectare. A partir de 1930 surgiram os agrotóxicos sintéticos, e na década de 1980 herbicidas extremamente potentes como é o caso das sulfoniluréias foram desenvolvidos. Estes compostos chegam a ser aplicado em doses tão baixas quanto 2 g por hectare.

Tabela 1 – Variação na taxa de aplicação de herbicidas ocorrida no século XX

Década	Produto	Dose (g ha ⁻¹)
1900	Metaborato de Sódio	1.900.000 – 5.000.000
1910	Clorato de sódio	22.000 – 600.000
1930	2-metil-4,6-dinitrofenol	11.000
1940	Ácido (4-cloro-2-metilfenóxi)acético	1.000 – 2.000
1960	Trifluralina	500 – 1.000
1980	Fluazifope de butila	250
1980	Sulfoniluréias	2 – 25

Fonte: BARBOSA, 2004

Mesmo com os avanços tecnológicos alcançados nas últimas décadas, é praticamente impossível prever com precisão o real impacto que os produtos químicos poderão causar, no longo prazo, ao meio ambiente. Isso ocorre porque, uma vez liberado para o meio, com o objetivo de controlar a população de uma

praga em particular, o agrotóxico pode contaminar águas, ar, solos e alimentos (BARBOSA 2004).

Parcela considerável do total aplicado para fins agrícolas atinge os rios, lagos, aquíferos e oceanos por meio do transporte por correntes atmosféricas, despejo de restos de soluções, limpeza de acessórios e recipientes empregados na aplicação desses produtos e também pelo carreamento do material aplicado no solo pela ação erosiva da chuva (BRAGA *et al.*, 2005). Graças aos mecanismos de transporte característicos dos meios aquáticos, alguns desses defensivos têm sido detectados em todas as regiões geográficas incluindo aquelas mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e até na região antártica (BAIRD, 2002; SPADOTTO *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2005). Estima-se que aproximadamente 700.000 toneladas de agrotóxicos sejam lançadas anualmente no meio ambiente, sendo boa parte utilizada na agricultura e aplicada diretamente em plantas ou solo (BARBOSA, 2004).

Os agrotóxicos são geralmente aplicados sobre plantas ou diretamente nos solos. Mesmo quando aplicados sobre as plantas, cerca de 50% da dose total aplicada poderá ter como destino final o solo, independentemente da forma como foi realizada essa aplicação (FARIA, 2004). Após a aplicação, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento, como mostra a Figura 3. O destino dos agrotóxicos no meio ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações destes processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental dos agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar estes processos (SPADOTTO *et al.*, 2004).

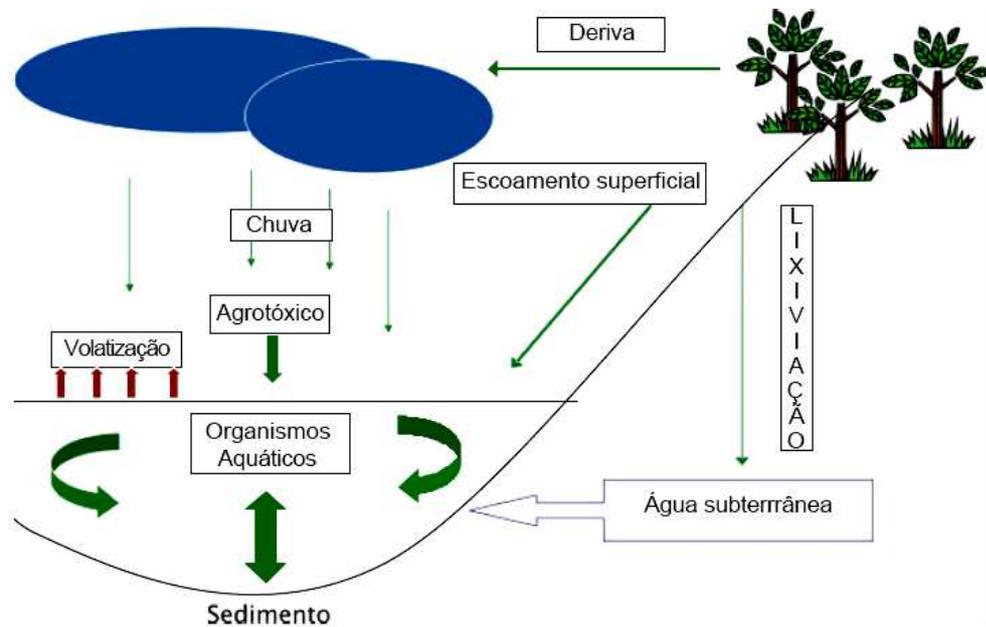


Figura 3 – Diagrama esquemático do movimento dos agrotóxicos (Fonte: BEYRUTH; TOMITA, 2003).

No que diz respeito aos mananciais aquáticos, principalmente os subsuperficiais, a lixiviação desses compostos é uma das principais formas de contaminação. O processo de lixiviação refere-se ao movimento descendente dos agrotóxicos na matriz do solo, ou com a água do solo, sendo sua intensidade dependente das características físico-químicas do produto e das características de solo e clima (INOUE *et al.*, 2003).

Os efeitos para o meio ambiente ocasionados por um agrotóxico dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade a organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do agrotóxico no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004).

O cultivo e manejo do solo exercem grande influência na qualidade das águas subterrâneas e nas taxas de recarga de alguns aquíferos, pois as atividades realizadas neste solo podem ameaçar a qualidade da água subterrânea, uma vez que a recarga das águas no subsolo ocorre, na maioria dos casos, devido à

infiltração da água de chuva em excesso no solo. Sendo assim, deve-se estar atento em relação a poluição dos recursos subterrâneos, pois quando agrotóxicos são aplicados, os recursos hídricos, sejam superficiais ou subterrâneos, são os principais destinos dos agrotóxicos. E, embora a contaminação das águas subterrâneas não seja tão visível e comentada como a das águas superficiais, e sua exploração seja muito distribuída; se a contaminação se torna perceptível tardiamente, geralmente já atingiu uma larga extensão (RIBEIRO *et al.*, 2007).

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Em geral, essas conseqüências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001). A aplicação indiscriminada conduz, geralmente à graves problemas, pois dependendo de sua composição e toxicidade, os agrotóxicos podem ser classificados como cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (BAIRD, 2002).

3.2.3 Avaliação do potencial de risco da poluição ambiental por agrotóxicos

O grau de dificuldade na avaliação de riscos de contaminação de ambientes aquáticos decorrente do uso de agrotóxicos é grande, devido a grande quantidade de processos envolvidos nessa dinâmica (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). A interação entre os solos e agrotóxicos dificulta a avaliação do comportamento no ambiente; isto porque estes compostos apresentam propriedades como tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), constante da Lei de Henry (K_H), coeficiente de adsorção à matéria orgânica (K_{oc}) e solubilidade, que interagem com as propriedades dos solos tais como teor da matéria orgânica, potencial de erosão, etc (FERRACINI *et al.*, 2001). Entretanto, existem modelos de *screening* que permitem uma avaliação preliminar do risco potencial em função das características das substâncias usadas e do ambiente em estudo (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Vários autores têm proposto métodos de seleção para verificar se determinado agrotóxico apresenta possibilidade de lixiviar. Alguns cientistas têm

tentado estabelecer valores limites para uma propriedade física ou conjunto de propriedades que, quando excedidos, indicariam que o agrotóxico apresenta potencial de lixiviação (SCORZA JÚNIOR *et al.*, 2005); mas para predizer o risco potencial de contaminação de águas subterrâneas, os métodos mais utilizados são: o critério da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA; e o critério de GUS – *Groundwater Ubiquity Score* (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; PRIMEL *et al.*, 2005; CABRERA *et al.*, 2008).

Os critérios da EPA apontam que o coeficiente de adsorção, meia-vida no solo, solubilidade em água e constante de Henry são as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos mais relevantes no resultado final para sua classificação em relação à contaminação das águas (FERRACINI *et al.*, 2001).

É importante notar que as propriedades físico-químicas diferem grandemente entre os diversos compostos, tornando extremamente difícil a tarefa de fazer generalizações sobre os destinos e impactos de agrotóxicos no ambiente. Mas é possível avaliar teoricamente, através das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos, se eles apresentam algum risco potencial de poluição das águas superficiais e subterrâneas (PRIMEL, 2003).

3.2.4 A legislação para agrotóxicos

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. Por muitos dos mananciais de água serem fontes de água potável, muitas agências ambientais têm imposto legislação rigorosa a respeito da qualidade dessas águas.

A legislação mais rígida foi estabelecida pela Comunidade Econômica Européia (EEC, do inglês *European Economic Community*), onde, para água potável, a concentração máxima permitida é $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para agrotóxicos individuais e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a soma de agrotóxicos, incluindo produtos de transformação tóxicos (EEC DRINKING WATER DIRECTIVE, 1980).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) estabelece os níveis máximos para agrotóxicos individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; EPA, 2003).

No Brasil, a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade, inclui as concentrações máximas de alguns agrotóxicos em águas para abastecimento humano (BRASIL, 2004). Há também no Brasil, a Resolução nº 357, do CONAMA, de março de 2005, a qual estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra (BRASIL, 2005). No entanto, estas legislações não contemplam a maioria dos agrotóxicos em uso atualmente, como muitos inseticidas, fungicidas e grande parte dos herbicidas.

A Tabela 2 apresenta os Valores Máximos Permitidos (VMP) para os agrotóxicos em estudo, na Portaria nº 518, Resolução nº 357, EEC80 e US-EPA. Observa-se que, de maneira geral, os limites estabelecidos pela Resolução do CONAMA são menores que os estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde. O único composto em estudo que possui limites na legislação brasileira para águas superficiais é o 2,4-D.

Tabela 2 - Agrotóxicos com os VMP estabelecidos pela legislação brasileira, europeia e americana para água potável

Agrotóxico	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	Portaria 518	Resolução 357	EEC/80	EPA/EUA
Carbofurano	-	-	0,1	40,0
Clomazona	-	-	0,1	-
2,4-D	30,0	4,0	0,1	70,0
Tebuconazol	-	-	0,1	-

Com relação às águas subterrâneas, a Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008, a qual dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento, prevenção e controle da poluição das águas subterrâneas, estabelece os VMP para os agrotóxicos com maior probabilidade de ocorrência em águas subterrâneas. Na Tabela 3, pode ser observado o VMP e o Limite de Quantificação Praticável (LQP) para os agrotóxicos em estudo presentes na legislação. Tebuconazol e Clomazona não possuem VMP e LQP nesta legislação.

Tabela 3 – Valores Máximos Permitidos (VMP) e Limite de Quantificação Praticável (LQP), em $\mu\text{g L}^{-1}$ para os agrotóxicos em estudo, segundo Resolução nº 396

Agrotóxico	Usos Preponderantes da água				LQP
	Consumo Humano	Dessedentação de animais	Irrigação	Recreação	
Carbofurano	7,0	45,0	-	30,0	5,0
2,4-D	30,0	-	-	100,0	2,0

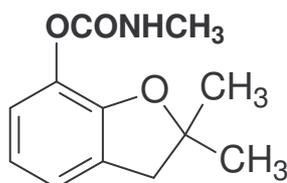
3.2.5 Agrotóxicos selecionados neste estudo

Para escolher os agrotóxicos a serem estudados foi realizada uma entrevista com os agricultores da região da Quitéria, no município de Rio Grande. Além de dados relativos aos agrotóxicos utilizados e as culturas, foram levantados dados sobre a época do ano de plantio, recebimento ou não de informação agrônômica, uso de medicamentos em animais, tipo de poço, profundidade, utilização da água do poço e número de pessoas abastecidas.

Dentre os agrotóxicos empregados na região, optou-se por desenvolver métodos para determinar resíduos dos compostos carbofurano, clomazona, tebuconazol e 2,4-D.

As características dos compostos abaixo foram obtidas no *The e-Pesticide Manual* (TOMLIN, 2003) e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (SIA, 2007).

3.2.5.1 Carbofurano



- ✓ Grupo químico: metilcarbamato de benzofuranila
- ✓ Nome químico (IUPAC): 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-metilcarbamato
- ✓ Classe: inseticida, nematicida

- ✓ Fórmula molecular: $C_{12}H_{15}NO_3$
- ✓ Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 1563-66-2
- ✓ Massa molar: $221,3 \text{ g mol}^{-1}$
- ✓ Log K_{ow} : 1,52
- ✓ Classe toxicológica: I, extremamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Carboran[®], Fersol[®], Diafuran[®], Furacarb[®], Ralzer[®], Furadan[®]

Os agrotóxicos derivados dos carbamatos têm sido sintetizados e vendidos desde 1953. São principalmente utilizados na agricultura, como inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, acaricidas, sendo utilizados também como biocidas industriais e outras aplicações, como para uso doméstico. Atualmente, são uma das maiores classes de agrotóxicos orgânicos sintéticos e são usados em larga escala através do mundo (GOU *et al.*, 2000; SILVA;FAY, 2004).

A maioria dos carbamatos tem alto ponto de fusão e baixa pressão de vapor. Pelo índice GUS, são identificados como potenciais lixiviadores e são normalmente distribuídos nos ambientes aquáticos devido a sua alta solubilidade em água. Estudos têm demonstrado que os carbamatos e seus produtos de degradação são contaminantes de recursos ambientais e alimentos. Eles estão na lista de compostos prioritários do US-EPA e sua determinação em fontes de água merece atenção (GOU *et al.*, 2000).

O agrotóxico carbofurano está incluído no grupo dos derivados dos carbamatos. É um produto fitossanitário no mercado a mais de 30 anos, e registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) sob nº 2088591 (PLESE *et al.*, 2005).

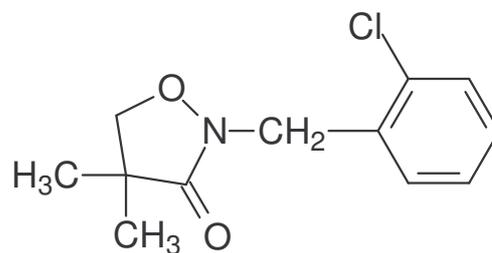
Carbofurano tem sido um dos inseticidas mais usados no mundo, e em 1995 foi reportado o uso de mais de 2 mil toneladas do composto aplicado nos EUA (MAHALAKSHMI *et al.*, 2007). Na cultura do arroz irrigado, é aplicado na água de irrigação, assim que houver o aparecimento de bicheira-da-raiz, mas também é utilizado em culturas como algodão, amendoim, banana, café, cana-de-açúcar, cenoura, fumo, repolho, tomate e trigo (PLESE *et al.*, 2005).

Embora o carbofurano demonstre uma boa eficiência agronômica, esse agrotóxico apresenta restrições ambientais, devido ao risco de contaminação. Seu

uso já é proibido em alguns países devido a sua ecotoxicidade (MAHALAKSHMI *et al.*, 2007).

Os compostos pertencentes à categoria dos carbamatos apresentam mecanismo comum de ação baseado na inibição da acetilcolinesterase e são os responsáveis pelo maior número de intoxicações no meio rural (OLIVEIRA-SILVA *et al.*, 2001; KUSSUMI, 2007). São produtos tóxicos de amplo espectro que afetam diferentes grupos de organismos, tendo potencial para causar efeitos ambientais negativos (SILVA; FAY, 2004).

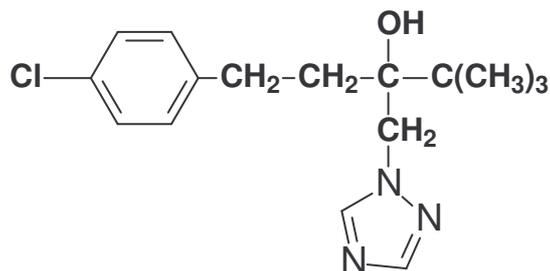
3.2.5.2 Clomazona



- ✓ Grupo Químico: isoxazolidinona
- ✓ Nome químico (IUPAC): 2-[(2-clorobenzil)]-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona
- ✓ Classe: Herbicida
- ✓ Fórmula Molecular: $C_{12}H_{14}ClNO_2$
- ✓ Número no CAS: 81777-89-1
- ✓ Massa molar: $239,7 \text{ g mol}^{-1}$
- ✓ Log K_{ow} : 2,5
- ✓ Classe toxicológica: III, mediamente tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Gamit®, Commence®

O herbicida clomazona, da família das isoxazolidinonas, é um herbicida bastante utilizado no Rio Grande do Sul, principalmente na cultura do arroz irrigado (GONÇALVES, 2007). Clomazona é geralmente utilizado no controle em culturas de soja, algodão, cana de açúcar, milho, fumo, e uma variedade de outros grãos vegetais. A meia vida de dissipação no campo, determinado por estudos em campo com diferentes tipos de solo variou de 4 a 12 semanas. As propriedades físico químicas do clomazona o indicam como um contaminante em potencial de águas subterrâneas (ZANELLA *et al.*, 2002).

3.2.5.3 Tebuconazol



- ✓ Grupo químico: triazol
- ✓ Nome químico (IUPAC): (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-3-pentanol
- ✓ Classe: fungicida
- ✓ Fórmula molecular: C₁₆H₂₂ClN₃O
- ✓ Número no CAS: 107534-96-3
- ✓ Massa molar: 307,8 g mol⁻¹
- ✓ Log K_{ow}: 3,7
- ✓ Classe toxicológica: IV, pouco tóxico
- ✓ Nomes comerciais: Elite®, Folicur®, Icarus®

Antes do desenvolvimento de fungicidas orgânicos sintéticos, a proteção das plantas contra as doenças fúngicas dependia do uso de compostos de enxofre e cobre. Atualmente, muitos tipos diferentes de fungicidas são utilizados, com estruturas químicas bastante diversas. A maioria tem baixa toxicidade aos mamíferos. Seu impacto ambiental mais sério é em microorganismos do solo (SILVA;FAY, 2004).

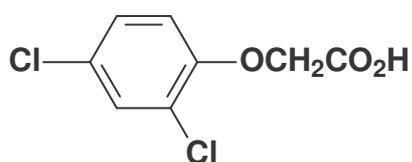
Os compostos do grupo azol, classificados em triazóis ou imidazóis, são vastamente utilizados como fungicidas na agricultura, biocidas em vários produtos, e agentes antifúngicos em fármacos humanos e veterinários. Alguns azóis são também prescritos para terapia de câncer (KAHLE *et al.*, 2008).

Como consequência do seu uso comum, quantidades substanciais de azóis podem atingir o meio ambiente. Fungicidas azóis utilizados na agricultura são moderadamente lipofílicos e bastante persistentes com tempos de meia vida de semanas a meses. Eles podem atingir o ambiente aquático principalmente por escoamento superficial e dispersão na hora da aplicação (*spray drift*) (KAHLE *et al.*, 2008).

O fungicida tebuconazol, pertencente a classe dos compostos azóis, é registrado no Brasil com aplicação foliar nas culturas de abacaxi, abóbora, álamo, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, beterraba, cacau, café, cebola, cenoura, cevada, citros, cravo, crisântemo, feijão, figo, gladiolo, goiaba, maçã, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, morango, pepino, pêsego, rosa, soja, sorgo, tomate, trigo e uva.

Também é utilizado como preservante de madeiras (MIYAUCHI *et al.*, 2005).

3.2.5.4 2,4-D



- ✓ Grupo químico: ácido fenoxiacético
- ✓ Nome químico (IUPAC): ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- ✓ Classe: herbicida
- ✓ Fórmula molecular: C₈H₆Cl₂O₃
- ✓ Número no CAS: 94-75-7
- ✓ Massa molar: 221,04 g mol⁻¹
- ✓ Log K_{ow}: 2,6
- ✓ Classe toxicológica: I, extremamente tóxico
- ✓ Nome comerciais: Aminol[®], DMA 806 BR[®], 2,4-D Isamina[®], Esteron 400 BR[®]

O 2,4-D foi o primeiro herbicida seletivo a ser desenvolvido, e pertence ao grupo químico dos clorofenóxiácéticos. Durante a guerra do Vietnã, e juntamente com o 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) e com o pentaclorofenol ficou conhecido como agente laranja, sendo um agente desfolhante usado pela força aérea americana. Após a segunda guerra mundial, em 1947, ele se tornou o herbicida mais usado no mundo, substituindo a capina mecânica (FARIA, 2004).

Dados recentes demonstram que o composto continua entre os princípios ativos mais consumidos; correspondendo a 12,40% dos herbicidas consumidos no Brasil (IBGE, 2008b).

Os agrotóxicos clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas. Esses, normalmente apresentam longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à sua baixa atividade microbiológica. O 2,4-D membro dessa classe, é altamente seletivo, sistêmico e pós-emergente (SANCHES *et al.*, 2003).

No Brasil, é indicado para as culturas de café, cana de açúcar, soja, milho, trigo, sorgo, arroz, aveia, centeio, cevada e pastagens.

No Sul do Brasil é amplamente utilizado devido ao seu baixo custo e boa seletividade. Este herbicida tem baixa degradabilidade e tem sido freqüentemente detectado em cursos de água (CHINGOMBE *et al.*, 2006; FONSECA *et al.*, 2007).

O 2,4-D pode ser considerado como tendo um baixo potencial de poluição de águas superficiais e como um poluente potencial para águas subterrâneas no Sul do Brasil (PRIMEL *et al.*, 2005).

Existem alguns estudos sobre a toxicidade deste herbicida, os quais relatam o seu poder carcinogênico, mutagênico, e neurotóxico, entretanto outros estudos afirmam que este compostos não possui este efeito (FARIA, 2004).

3.3 Técnicas de extração e pré-concentração de agrotóxicos em águas

Devido aos baixos níveis permitidos pelos órgãos reguladores e a natureza da matriz onde os agrotóxicos se encontram, são necessárias técnicas de preparo de amostra eficientes, que atinjam detecções em níveis traço, empreguem menor quantidade de solvente, que sejam rápidas e fáceis de executar (NAGARAJU; HUANG, 2007; PICÓ *et al.*, 2007).

Análises de resíduos de agrotóxicos em água são difíceis, uma vez que esses compostos ocorrem em concentrações extremamente baixas, possuem diferentes propriedades físico-químicas, e geralmente estão presentes altas concentrações de compostos interferentes (BRONDI; LANÇAS, 2005). É necessário então, um pré-tratamento da amostra, pois caso as interferências não sejam removidas estas poderão afetar, além da identificação, também a quantificação (LANÇAS, 2004a). O pré-tratamento pode incluir o isolamento e a pré-concentração dos analitos.

Uma das técnicas mais usadas no preparo de amostras complexas é a Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), porém sua

aplicação é tediosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado e é de difícil automação.

Visando eliminar esses problemas, em 1970, foi introduzida, a Extração em Fase Sólida (SPE) (LANÇAS, 2004a), onde os analitos contidos na matriz aquosa são retidos após passarem por um cartucho contendo sorvente e um solvente orgânico seletivo é geralmente utilizado para eluir os analitos (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001). É uma técnica bastante empregada para pré-concentração de agrotóxicos. Segundo PICÓ *et al.* (2007) entre os anos de 2003 e 2006, mais de 100 publicações utilizaram a SPE em análises de resíduos de agrotóxicos em matrizes aquosas.

A técnica de SPE utiliza um volume menor de solvente que a LLE, além de ser mais rápida e poder ser automatizada. Entretanto, os métodos convencionais vêm sendo aprimorados na busca de métodos mais baratos, mais rápidos e que consumam menor quantidade de solvente.

A miniaturização da técnica de LLE pode atingir uma drástica redução do volume de fase extratora, e com esse objetivo, novas metodologias têm sido desenvolvidas, como a Microextração em Gota Suspensa (SDME, do inglês *Single Drop Microextraction*), Microextração em Fase Líquida com Fibras Ocas (HF-LPME, do inglês *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*) e a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva. (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) (PENA-PEREIRA *et al.*, 2008). As principais vantagens destas técnicas são a miniaturização, redução no consumo de solventes e a melhoria na seletividade de extração (GARCÍA; LÓPEZ, 2007).

A DLLME foi desenvolvida recentemente por REZZAE *et al.* (2006). Baseia-se no sistema ternário de extração por solvente. Neste método uma mistura apropriada de pequenos volumes de dois solventes, um extrator e outro dispersor é rapidamente injetada na amostra aquosa, e ocorre a extração dos analitos e a formação de uma solução turva.

Esta técnica é recente e não há registro de publicações nacionais utilizando-a para extração de agrotóxicos; sendo o primeiro trabalho sobre o assunto apresentado no final do mês de outubro de 2008 em Florianópolis (SC), no XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. O trabalho intitulado: "*Determination of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-*

liquid microextraction with liquid chromatography tandem mass spectrometric detection” foi premiado entre os três melhores trabalhos no congresso.

3.3.1 Extração em Fase Sólida

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. É usualmente empregada com o propósito de isolar um ou mais analitos presentes em uma matriz complexa para posterior análise por intermédio do uso de um método instrumental (LANÇAS, 2004a). É uma técnica atrativa para isolamento e pré-concentração de agrotóxicos, onde normalmente a amostra aquosa é percolada por um cartucho recheado contendo o sorvente, onde os analitos são retidos e depois eluídos com uma pequena quantidade de solvente orgânico (FRITZ; MACKA, 2000; RIAL-OTERO *et al.*, 2007). O principal mecanismo de retenção é a partição, devido às interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (LISKA, 2000; PICÓ *et al.*, 2007).

A instrumentação básica empregada em SPE é extremamente simples, podendo, porém, ser sofisticada, dependendo do problema a ser resolvido e do grau de automação desejado (LANÇAS, 2004a).

Existem vários procedimentos de tratamento de amostra por SPE, que variam no emprego de diferentes tipos de sorventes, no volume de amostra, assim como no volume de solvente para ativação dos cartuchos e de eluição dos analitos (FARIA, 2004).

A escolha do sorvente é um passo importante na SPE, onde se deve levar em conta as informações a respeito do analito, a natureza da matriz e o conhecimento das impurezas a serem eliminadas (LANÇAS, 2004a).

O sorbente mais popular para extração de agrotóxicos em água possui o grupo octadecil (C18) ligado à sílica.

Fases sólidas como C8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora iônica, e materiais poliméricos (estireno divinil-benzeno), comercializados em cartuchos e discos, são os sorventes mais usados em SPE, para pré-concentração e *clean up* das amostras aquosas (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007). Em análises ambientais, particularmente no isolamento e pré-concentração de agrotóxicos em águas, o uso

de sorventes hidrofóbicos não seletivos, como C18 e estireno divinil-benzeno são os mais adequados. Essas fases podem diferenciar e isolar o analito de compostos interferentes presentes nas amostras, sendo comum a remoção de compostos interferentes na matriz antes das análises cromatográficas (TRAN *et al.*, 2007).

Os sorventes mais usados na SPE para extração de agrotóxicos em matrizes aquosas são: C18, usado na extração de herbicidas (PALMA *et al.*, 2004; GATIDOU *et al.*, 2005; PRIMEL *et al.*, 2005; BRUZZONITI *et al.*, 2006; MARCHESAN *et al.*, 2007), inseticidas organoclorados (RISSATO *et al.*, 2004; SHUKLA *et al.*, 2006), e em métodos envolvendo compostos com diferentes classes químicas (BORTOLUZZI *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2007); e poliméricos Oasis HLB, que têm sido usados para diversas classes de agrotóxicos, como os herbicidas (VEGA *et al.*, 2005; SHOMAR *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2007) entre eles o grupo das sulfuniluréias (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Trabalhos com outros sorventes, como é o caso do poliestireno-divinilbenzeno (IRACE-GUIGUAND *et al.*, 2004; GUZZELLA *et al.*, 2006) e poli(metiloctilsiloxano) (VIGNA *et al.*, 2006) são menos freqüentes. A escolha de um ou outro sorvente depende da polaridade do analito e da possível co-extração de interferentes.

Existem estudos realizados com o objetivo de utilizar novos sorventes que proporcionem menor custo e boa reprodutibilidade, como no trabalho realizado por FARIA *et al.* (2007), onde um novo material adsorvente baseado no poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) termicamente imobilizado num suporte de sílica apresenta bons resultados na determinação dos agrotóxicos imazetapir, imazaquim, metsulfurom metílico, bentazona, clorimuron e tebuconazol em água.

EL-SHEIKH *et al.* (2008) otimizaram um método de SPE para extração de agrotóxicos comparando três diferentes sorventes: C18, carvão ativado e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs). Os três sorventes foram comparados em termos de desempenho analítico, aplicação em matrizes aquosas, possível reuso do cartucho, capacidade de adsorção e o custo do sorvente. A adsorção do cartucho de nanotubos de carbono foi maior que os contendo carvão ativado e C18, mas o desempenho analítico do carvão ativado pode ser próxima a de outros sorventes apropriados ao procedimento de SPE. Isso foi comprovado, testando a oxidação do sorvente para mostrar que diferentes superfícies químicas apresentam diferentes eficiências de extração. Na aplicação em águas, o uso de carvão ativado não oxidado obteve recuperações satisfatórias em relação ao C18 e aos nanotubos de

carbono, mostrando que se deve fazer um balanço entre custo e benefício na escolha do sorvente apropriado, e que a superfície química tem um efeito direto no processo de SPE.

As etapas típicas da SPE incluem o condicionamento do sorvente (ativação do sorvente), percolação da amostra (sorção dos analitos no sorvente), lavagem e quando necessário *clean up* para remoção dos compostos interferentes e dessorção dos analitos com o solvente apropriado (PICHON, 2000; LANÇAS, 2004a). A Figura 4 ilustra estas etapas. Elas devem ser otimizadas de forma a obter-se uma recuperação máxima.

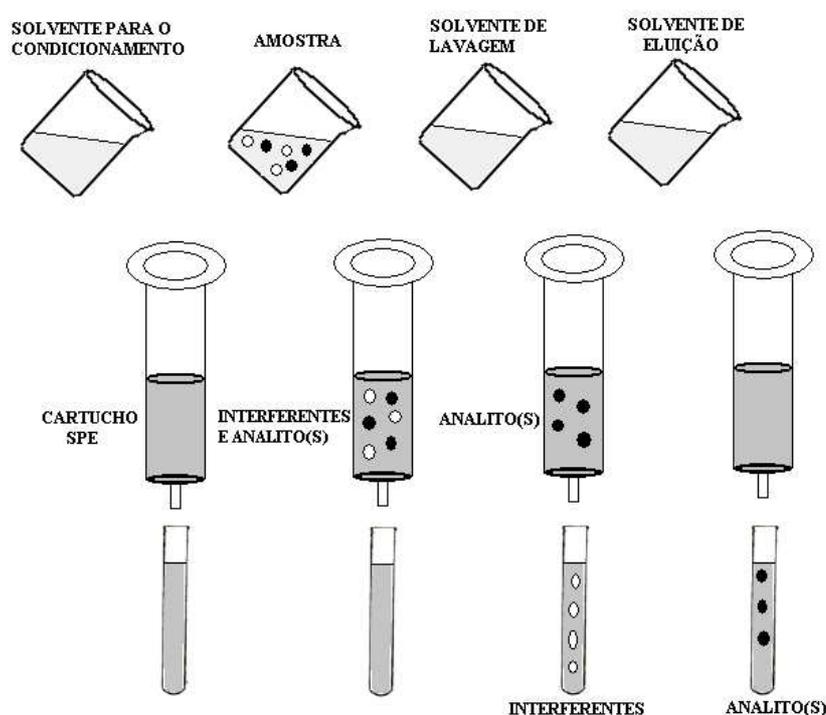


Figura 4 - Etapas envolvidas na SPE: condicionamento do sorvente, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito.

O condicionamento do cartucho destina-se a ativar o sorvente, e o solvente a ser utilizado nessa etapa dependerá principalmente do material a ser ativado (C8, C18, CN, sílica, NH_3 , entre outros) (LANÇAS, 2004a). O condicionamento pode servir também para eluir alguma impureza presente no cartucho (FRITZ; MACKA, 2000).

A percolação da amostra tem como objetivo a concentração dos analitos ou “enriquecimento”, e é feita passando através do cartucho, um grande volume de amostra a fim de reter o analito, deixando passar o restante da amostra e os

interferentes (LANÇAS, 2004a). O pH da amostra pode ser crítico para obtenção de uma retenção adequada dos agrotóxicos no sorvente. Por isso, em alguns casos, o ajuste do pH da amostra é necessário para que os agrotóxicos permaneçam na forma adequada para aumentar sua retenção na fase sólida (VEGA *et al.*, 2005; SHOMAR *et al.*, 2006; BORTOLUZZI *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2007).

A velocidade de aplicação da amostra é importante e pode ser ajustada, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada durante a etapa de adição da amostra. Para pequenos volumes de amostra, esta etapa pode ser realizada somente com o auxílio da gravidade (LANÇAS, 2004a).

A etapa de limpeza (*clean up*) é fundamental para eliminar compostos provenientes da matriz, os quais podem interferir no método analítico. Pode-se utilizar solventes com força de eluição intermediária para eluição de impurezas antes do analito ser eluído. Esses solventes são denominados “solventes de lavagem” (*wash solvent*), e usa-se um solvente que não possua força suficiente para remover o analito do material de empacotamento. O uso desses solventes é necessário quando, particularmente tratando-se de matrizes complexas, é necessário eliminar as impurezas retidas na fase sólida juntamente com os analitos (LANÇAS, 2004a). Diversos solventes de lavagem podem ser usados, mas quando se trata da extração de agrotóxicos em amostras aquosas, usa-se principalmente água ultrapura (TRAN *et al.*, 2007; GATIDOU *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2007; SHOMAR *et al.*, 2006) ou uma mistura de uma pequena porcentagem de metanol com água ultrapura (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007).

Uma vez que os agrotóxicos são retidos nos cartuchos, eles são então eluídos com um solvente orgânico. Na eluição, os analitos são removidos do sorvente, e retornam para a fase líquida adequada para a análise. O ideal é eluir em um pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise. Quanto menor o volume de eluição, maior o fator de pré-concentração. É importante a escolha do eluente, pois ele deve eluir os analitos e minimizar a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no material de empacotamento. Normalmente elui-se de forma que o analito coletado esteja bem mais concentrado que na amostra original. Este tipo de procedimento é muito comum na análise de amostras de interesse em química ambiental, onde, usualmente, o poluente encontra-se extremamente diluído (FRITZ; MACKA, 2000; LANÇAS, 2004a).

A escolha do solvente de eluição é um parâmetro importante e está diretamente relacionada com a polaridade do agrotóxico e o sorvente usado na SPE. Entre os solventes que têm sido utilizados, estão acetonitrila (PALMA *et al.*, 2004; CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2004), metanol (TRAN *et al.*, 2007; GATIDOU *et al.*, 2005; PRIMEL *et al.*, 2005), acetona (BRUZZONITI *et al.*, 2006), acetato de etila (GUZZELLA *et al.*, 2006), hexano (SHUKLA *et al.*, 2006); e as misturas de: metanol-acetonitrila (D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; IRACE-GUIGAND *et al.*, 2004), acetato de etila-diclorometano (RISSATO *et al.*, 2004); metanol-acetona (RODRIGUES *et al.*, 2007); e metanol-metil terbutil éter (SHOMAR *et al.*, 2006).

Os cartuchos de SPE são oferecidos em diversos volumes, e empacotados com diferentes quantidades de fase sólida. A escolha do volume e da massa de fase estacionária depende de vários fatores, entre os quais o volume de amostra a ser extraída, a massa do composto de interesse presente na amostra, o grau de contaminação (interferentes) e a complexidade da matriz (LANÇAS, 2004a). Entre os mais usados estão cartuchos contendo 200 mg (VEGA *et al.*, 2005; GUZZELLA *et al.*, 2006; SHOMAR *et al.*, 2006) e 500 mg de sorvente (RISSATO *et al.*, 2004; SHUKLA *et al.*, 2006).

Um trabalho completo de otimização do processo de extração em fase sólida foi desenvolvido por BAUGROS *et al.* (2008). Foi avaliado o desempenho de diferentes materiais de SPE, testando os seguintes cartuchos: Envi-Carb (200 mg), Strata-X polimérico (200 mg) e três sorventes idênticos, baseados em C18, provenientes de diferentes fabricantes: LC-18 (500 mg), Bond Elut (500 mg) e Strata-C18 (500 mg). Os testes foram realizados com águas residuárias fortificadas com 33 compostos, entre eles, agrotóxicos da classe dos carbamatos, organofosforados e organoclorados. Foram obtidas baixas recuperações com os cartuchos de carbono grafitizado e os poliméricos. O Strata C-18 obteve as melhores recuperações. O pH ideal para eluição dos analitos foi testado e a vazão foi otimizada para determinar o efeito da cinética na extração dos compostos. Uma perda dos analitos foi verificada quando foram utilizadas vazões baixas, na faixa de 1 mL min^{-1} , e melhores recuperações foram obtidas quando foi utilizada uma vazão de 4 mL min^{-1} . A capacidade de saturação do cartucho Strata C-18 (500 mg) também foi estimada, utilizando volumes de 300 mL e 500 mL de amostra. Acima de 300 mL os valores de recuperação diminuem, devido à saturação da fase sólida. E como estava trabalhando com compostos de diferentes propriedades físico-

químicas, foi testado o solvente de eluição mais adequado. Os solventes testados foram: acetato de etila, acetona, metanol, acetonitrila e diclorometano. Diclorometano e acetonitrila não apresentaram uma completa eluição para os agrotóxicos carbamatos e organofosforados, sendo que a acetona e o acetato de etila apresentaram boas recuperações para todos os compostos em estudo.

3.3.2 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

O princípio básico da técnica DLLME é a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator (REZZAE *et al.*, 2006).

As etapas do procedimento estão ilustradas na Figura 5. Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa. Após leve agitação, uma solução turva com microgotas é formada. As microgotas consistem do solvente extrator mais o analito já extraído. Após centrifugação ocorre a sedimentação das microgotas, formando uma fase sedimentada, a qual é retirada com o auxílio de uma seringa e após, é efetuada a quantificação dos analitos pelo método mais apropriado.

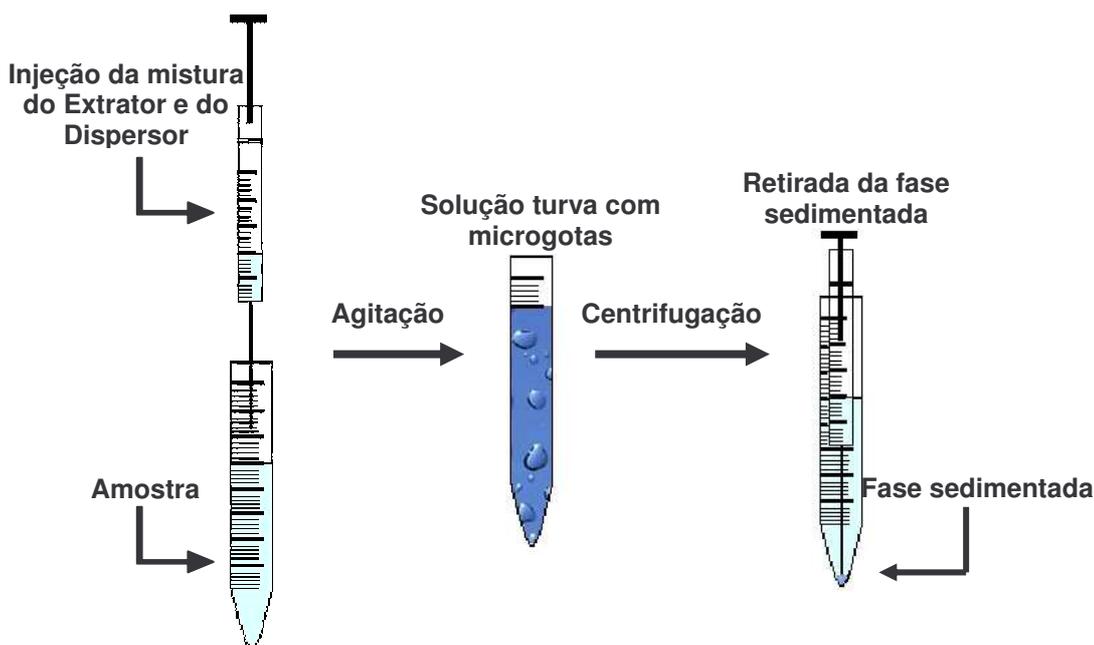


Figura 5 – Etapas envolvidas no procedimento da DLLME

Do ponto de vista comercial, econômico e ambiental, as vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração com solvente são a simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, baixo consumo de solventes orgânicos, alta recuperação, alto fator de enriquecimento e compatibilidade com os métodos analíticos como GC (NAGARAJU; HUANG, 2007; XIONG, HU; 2008) e HPLC (WEI *et al.*, 2007; MELWANK; FUH, 2008).

O método tem sido aplicado na extração de compostos orgânicos como plastificantes (FARAHANI *et al.*, 2007), fármacos (YAZDI *et al.*, 2008), agrotóxicos (ZHAO *et al.*, 2007) e inorgânicos (JAHROMI *et al.*, 2007).

O processo de extração por DLLME é influenciado por alguns parâmetros, entre os quais podemos ressaltar: o volume e o tipo do solvente extrator, o volume e o tipo do solvente dispersor, o tempo de extração, força iônica e pH.

O solvente extrator deve ser selecionado por apresentar maior densidade que a água, capacidade de extração dos compostos de interesse e um bom comportamento cromatográfico. A seleção de um solvente extrator apropriado é o parâmetro mais importante na DLLME (REZZAE *et al.*, 2006). Na extração de agrotóxicos em águas por DLLME os solventes extratores que vem sendo mais utilizados são os clorados, entre eles se destacam o clorobenzeno (NAGARAJU; HUANG, 2007), tetracloreto de carbono (BIRJANDI *et al.*, 2008) e tetracloroetileno (REZZAE *et al.*, 2006).

O volume do solvente extrator deve ser suficiente para extrair o analito e é escolhido o menor volume em função de ser obtido um alto fator de enriquecimento e menor uso de solventes tóxicos (REZZAE *et al.*, 2006). Os volumes descritos na literatura para extração de agrotóxicos variam entre 9,5 e 116 μL .

O principal parâmetro na escolha do solvente dispersor é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (REZZAE *et al.*, 2006). A necessidade destas características limita geralmente ao uso de metanol, acetonitrila, acetona e tetrahidrofurano (THF).

A variação no volume de solvente dispersor influencia no volume de fase sedimentada, então, é possível considerar a influência do solvente dispersor na eficiência da extração (REZZAE *et al.*, 2006). O solvente mais utilizado nos estudos com agrotóxicos é a acetona, e os volumes variam entre 500 e 2000 μL .

O tempo de extração é um dos parâmetros mais importante no procedimento de extração, especialmente em métodos de microextração, como a Microextração

em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Micro Extraction*) e a LPME. O tempo de extração na DLLME também deve ser otimizado, e é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na fase aquosa e a centrifugação (REZZAE *et al.*, 2006).

REZZAE *et al.* (2006) examinaram o tempo de extração entre 0 e 60 min para a extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de águas, e concluíram que o tempo de extração é muito rápido. Isso pode ser explicado devido à área superficial entre o solvente extrator e a amostra, a qual é infinitamente grande, o que foi confirmado através de fotografia microscópica ótica. Isso comprova que a transferência dos analitos para a fase orgânica é rápida, sendo o estado de equilíbrio atingido quase que instantaneamente, resultando em um tempo de extração muito curto. Isto foi comprovado em outros estudos, como no realizado por NAGARAJU; HUANG (2007). Pode ser concluído, que nesta técnica, o equilíbrio é atingido imediatamente, e a etapa que consome mais tempo é a centrifugação.

A influência da força iônica também deve ser considerada, uma vez que influencia na separação das fases. O aumento na concentração de cloreto de sódio (NaCl), aumenta o volume de fase sedimentada, devido a diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal (BIRJANDI *et al.*, 2008). Esta influência será de acordo com as características de cada analito.

A injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor na amostra é recomendada por REZZAE *et al.* (2006) que seja feita com o auxílio de uma seringa, e que esses solventes sejam injetados juntos, pois quando o dispersor e o extrator são adicionados separadamente na amostra aquosa, não se observa a formação de uma fase sedimentada. Para verificar se havia diferença com o uso de uma micropipeta ao invés de uma seringa, GARCÍA-LÓPEZ *et al.* (2007) realizaram experimentos com seringas e com micropipetas. Dados experimentais mostraram que não há diferença entre os experimentos. O que deve ser feito é a agitação do tubo de extração, após a adição da mistura de solventes e antes da centrifugação, para que ocorra o contato íntimo e prolongado entre a fase aquosa e a orgânica.

A centrifugação na DLLME é essencial para que se obtenha duas fases distinguíveis nos tubos de extração (GARCÍA-LÓPEZ *et al.*, 2007).

Depois da retirada da fase sedimentada, esta pode ser injetada diretamente no equipamento ou evaporada e redissolvida em um solvente apropriado.

Normalmente em trabalhos com HPLC em fase reversa, quando são utilizados solventes extratores como tetracloreto de carbono, é necessária a mudança de solvente. Este procedimento foi realizado por FARAJZADEH *et al.* (2007), uma vez que o tetracloreto de carbono como solvente da amostra não apresentou um bom comportamento cromatográfico, causando alargamento dos picos e aumento do ruído. A fase sedimentada foi evaporada em banho maria e redissolvido em 50 µL de metanol .

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração é o pH, que é otimizado em função da acidez ou basicidade dos compostos. Compostos ácidos, normalmente requerem uma acidificação da amostra para permanecerem na forma molecular e facilitar a partição dos analitos nas microgotas do solvente extrator.

Na Tabela 4 podemos observar as principais características dos trabalhos que utilizaram a DLLME para extração de agrotóxicos em águas.

Tabela 4 – Revisão dos trabalhos publicados que utilizaram a DLLME para extração de agrotóxicos em amostras de água e os principais parâmetros de extração

Classe dos Agrotóxicos	Volume de Amostra	Solvente Dispersor (Volume)	Solvente Extrator (Volume)	Tempo de centrifugação (Velocidade)	Volume de fase sedimentada	Acidificação	Força Iônica	R%	RSD%	LOD método ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Análise	Referência
Carbamatos	5 mL	Metanol (500 μL)	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ (20 μL)	2 min (4000 rpm)	8 μL	-	-	-	2,6	1,0	HPLC-DAD	WEI <i>et al.</i> , 2007
Carbamatos	6 mL	Metanol (565 μL)	CH_2Cl_2 (116 μL)	10 min (4000 rpm)	-	-	-	99,1	5,7	1,0	HPLC-UV	XIA <i>et al.</i> , 2008
Carbamatos	5 mL	Acetonitrila (1000 μL)	CHCl_3 (40 μL)	5 min (4000 rpm)	20 μL	-	-	86,0 - 97,6	3,5 - 8,7	0,1 - 0,5	HPLC-DAD	LIU <i>et al.</i> , 2009
Carbamatos e organofosforados	5 mL	Acetonitrila (1000 μL)	$\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ (15 μL)	3 min (3500 rpm)	5 μL	-	-	80,4 - 114,2	1,12 - 6,05	0,012 - 0,016	HPLC-FLD	FU <i>et al.</i> , 2009
Clorobenzenos	5 mL	Acetona (500 μL)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ (9,5 μL)	2 min (5000 rpm)	5 μL	-	-	92,2 - 107,8	1,3 - 8,6	0,005 - 0,04	GC-ECD	KOZANI <i>et al.</i> , 2007
Clorofenóxiacéticos	5 mL	THF (1920 μL)	C_2Cl_4 (80 μL)	10 min (4000 rpm)	270 μL	0,2 M com HCl	3% NaCl	-	2,8 - 3,5	2,3 - 3,3	HPLC-UV	MELWANKI; FUH, 2008
Clorofenóxiacéticos	5 mL	Acetona (1000 μL)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ (25 μL)	5 min (5000 rpm)	-	pH 1,5	10% NaCl	94,0 - 102,9	4,96 - 7,08	0,16	HPLC-DAD	FARHADI <i>et al.</i> , 2009
Organoestanhos	5 mL	Etanol (500 μL)	CCl_4 (11,5 μL)	2 min (5000 rpm)	5 μL	pH 5 com ácido acético	-	82,5 - 104,7	2,3 - 5,9	0,0002 - 0,001	GC-FPD	BIRJANDI <i>et al.</i> , 2008
Organofosforados	5 mL	Acetona (1000 μL)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ (12 μL)	2 min (5000 rpm)	5 μL	-	-	78,9 - 107,0	1,2 - 5,6	0,003 - 0,02	GC-FPD	BERIJANI <i>et al.</i> , 2006
Organosulfurados	5 mL	Metanol (800 μL)	CCl_4 (10 μL)	15 min (3000 rpm)	-	-	-	78,5 - 117,2	0,6 - 11,9	0,21 - 3,05	GC-FPD	XIONG; HU, 2008
Triazinas	5 mL	Acetona (1000 μL)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ (12 μL)	5 min (6000 rpm)	8 μL	-	4% NaCl	24,2 - 115,6	1,36 - 8,67	0,021 - 0,12	GC-MS	NAGARAJU; HUANG, 2007

3.4 Métodos para determinação de resíduos de agrotóxicos em águas

Dentre uma enorme variedade de poluentes que podem estar presentes nas águas, estão os agrotóxicos. As concentrações dos agrotóxicos no meio ambiente são extremamente baixas, assim como os níveis máximos permitidos pelas agências regulamentadoras, o que demanda métodos analíticos de sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de agrotóxicos.

Os métodos de análise química são, em geral, seletivos e poucos são realmente específicos. Conseqüentemente, a separação do analito de potenciais interferências, é, na maioria dos casos, uma etapa crucial nos procedimentos analíticos. Até a metade do século 20, as separações analíticas eram feitas conforme métodos clássicos, como precipitação, destilação e extração. Entretanto, hoje em dia, essas separações são mais comumente feitas por Cromatografia e Eletroforese, particularmente em amostras multicomponentes e complexas (SKOOG *et al.*, 2002).

A cromatografia é um poderoso método de separação que encontra aplicação em todos os ramos da ciência, e pode ser conceituada como um método físico-químico de separação no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel, um fluído insolúvel na fase estacionária, que percola através da primeira (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002).

Técnicas cromatográficas são utilizadas para identificar e quantificar resíduos de agrotóxicos em águas. A HPLC complementa a GC, pois para alguns agrotóxicos a determinação por GC é impossível devido a sua baixa estabilidade térmica e ou sua insuficiente volatilidade sem sofrer um processo de derivatização (PADRÓN *et al.*, 2006).

A técnica foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail S. Tswett no início do século 20, em 1903. Ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas como clorofila e xantofila, passando soluções desses componentes através de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio finamente dividido. A passagem do solvente era feita por gravidade. As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que colaborou para a

escolha do nome da técnica (em grego *chroma* significa cor e *graphein* significa escrever) (CIOLA, 1998; SKOOG *et al.*, 2002).

O processo clássico da cromatografia era demorado, às vezes dias, e a monitorização era visual ou pela análise química das frações coletadas (CIOLA, 1998). No final dos anos 1960 foi desenvolvida uma tecnologia para aumentar a eficiência da coluna, o que foi conseguido com a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetros menores, de 3 a 10 μm . Esta tecnologia exigiu equipamentos sofisticados operando a altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é empregado para distinguir esses procedimentos mais novos dos métodos básicos, ainda usados para finalidades preparativas (SKOOG *et al.*, 2002).

As aplicações da cromatografia cresceram de modo explosivo nos últimos anos e isto se deve não somente ao desenvolvimento de várias técnicas cromatográficas, mas também a necessidade crescente dos cientistas de melhores métodos para caracterizar misturas complexas (SKOOG *et al.*, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação, com vendas anuais de equipamentos de HPLC se aproximando da marca de um bilhão de dólares. As razões para a popularidade da técnica são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação a separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, sua ampla aplicabilidade (SKOOG *et al.*, 2002). É uma técnica aplicada na análise de rotina em muitas áreas, como por exemplo, farmacêutica, biológica, ambiental e análise de alimentos. Na maioria dos casos é muito eficiente para determinação dos compostos de interesse (BRAGA *et al.*, 2007).

O primeiro e mais usado parâmetro para identificação dos compostos, é o tempo de retenção, que é descoberto com a injeção do padrão analítico. Esse método de identificação está sujeito a erros, pois este tempo de retenção característico dos compostos sob certas condições analíticas, não é único, e isso significa que outro composto pode ter o mesmo tempo de retenção, e pode haver uma identificação equivocada. A cromatografia líquida tem sido usada para determinação de agrotóxicos acoplada a diversos detectores, entre eles podemos citar o DAD (CEREJEIRA *et al.*, 2003; GATIDOU *et al.*, 2005; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007) e o MS (MARÍN *et al.*, 2006; SHOMAR *et al.*, 2006; FERRER; THURMAN,

2007; RODRIGUES *et al.*, 2007), os quais auxiliam na identificação e quantificação dos compostos (BRAGA *et al.*, 2007).

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos

Embora, através dos anos, um grande número de detectores tenha sido desenvolvido e descrito, a maioria das análises por HPLC contemporâneas são realizadas usando detectores ultravioleta em alguma de suas formas, condutividade elétrica, fluorescência, índice de refração e/ou espectrômetro de massas (CARABIAS-MARTINEZ *et al.*, 2004; SANCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005; D'ARCHIVIO *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2009).

Os compostos que absorvem no UV são aquelas substâncias que absorvem luz na faixa de 180 a 350 nm. As substâncias que absorvem nessa faixa incluem as que possuem uma ou mais duplas ligações (elétrons π) e substâncias que possuem elétrons não ligantes, como: todas olefinas, todos aromáticos, e os compostos que contém bromo, iodo ou enxofre, grupo carbonila ($>C=O$), grupo nitro ($-NO_2$), íons inorgânicos (Br^- , I^- , NO_3^- , NO_2^-) e duas duplas conjugadas ($>C=C-C=C<$). (SCOTT, 2003b; COLLINS *et al.*, 2006).

Entre os detectores espectrofotométricos ultravioleta mais poderosos, encontram-se os equipamentos com arranjo de diodos. Os detectores DAD permitem a coleta de dados de um espectro inteiro, na região do ultravioleta e do visível (90 a 800 nm), em aproximadamente 1 segundo. Assim, dados espectrais para cada pico cromatográfico podem ser coletados e armazenados à medida que aparecem na saída da coluna (SKOOG *et al.*, 2002). Com o uso de detectores como o DAD, acoplados com HPLC, o espectro de cada composto pode ser obtido, providenciando um caminho adicional para confirmar a identidade do pico (LANÇAS, 2003).

Um diagrama de funcionamento do DAD é ilustrado na Figura 6. A luz de uma fonte de emissão (lâmpada de deutério ou xenônio) é colimada através de um sistema de lentes sobre a amostra. A luz total que passa através da célula contendo a amostra incide sobre uma grade holográfica. Esta grade irá difratar a radiação, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá

incidir sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão. Através de um circuito de calibração adequado, esta corrente será transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no espectro de absorção da substância (SCOTT, 2003a, SCOTT, 2003b).

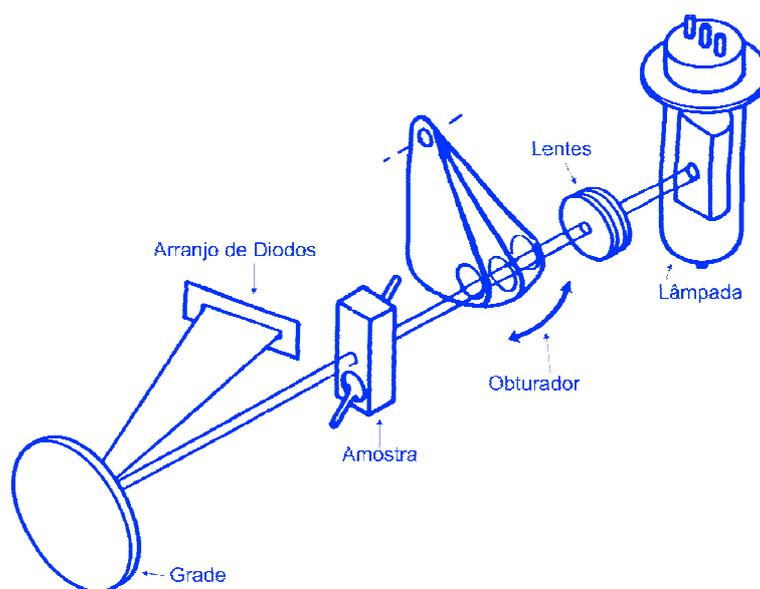


Figura 6 - Diagrama de um detector de Arranjo de Diodos

Detectores UV convencionais, que monitoram um único comprimento de onda, permitem apenas informações quantitativas sobre a amostra; e aqueles que permitem monitorar vários comprimentos de onda fixos permitem apenas checar a pureza do pico, pela proporção no cálculo entre o sinal adquirido em dois comprimentos de onda diferentes. Já um DAD, possui alta resolução espectral e em adição a informações qualitativas, a qualidade da análise é aumentada, permitindo checar a identidade do composto e a pureza do pico (JAUFMANN,1998). A pureza do pico é examinada comparando os espectros em diversos pontos do pico cromatográfico, como por exemplo, no início, no ápice e no fim. Se eles se sobrepõem o pico é puro. Isto fornece um dado extra para o analista que assim saberá se há ou não interferentes eluindo ao mesmo tempo que o analito (SOARES, 2001; COLLINS *et al.*, 2006). Para tal comparação é necessária alta resolução espectral para que estruturas moleculares similares, que podem absorver de maneira semelhante, possam ser diferenciadas. A resolução espectral aconselhada para se garantir alta resolução é tipicamente menor que 1 nm (JAUFMANN,1998).

Com este detector é possível obter espectro tridimensionais, mostrando absorvância, comprimento de onda e tempo de retenção (COLLINS *et al.*, 2006).

A detecção na região do UV é ressaltada na literatura como sendo a melhor região para análise de agrotóxicos por HPLC. Na maior parte das análises, o DAD é utilizado a fim de monitorar diferentes comprimentos de ondas, podendo obter o espectro de UV de cada composto e comparar com os espectros obtidos para cada padrão puro, tornando mais fácil a identificação dos picos detectados (SOARES, 2001, FARIA, 2004).

A detecção por arranjo de diodos é bastante usada para análises de agrotóxicos, devido a sua versatilidade, alta seletividade e resolução espectral dos compostos (RIAL-OTERO *et al.*, 2007). O DAD pode ser usado para fazer uma varredura do espectro UV/Vis, identificando interferentes e picos sobrepostos bem como confirmando a presença de agrotóxicos. (DEAN *et al.*, 1996; SCOTT, 2003b). A verificação da pureza dos picos em análises de rotina aumenta a qualidade da informação dos resultados das análises (JAUFMANN,1998). A identidade dos compostos pode ser confirmada em comparação com a livreria de espectros (JAUFMANN,1998).

Diversos trabalhos têm sido publicados utilizando o detector DAD em conjunto com a LC para determinação de resíduos de agrotóxicos em matrizes aquosas. A aplicação dessa técnica descrita em alguns artigos desde 2004 está resumida nos próximos parágrafos.

Uma das vantagens do DAD é o fato de ser não-destrutivo e poder ser acoplado com outros detectores. Na análise de 22 agrotóxicos e seus metabólitos em águas de superfície, IRACE-GUIGAND *et al.* (2004) utilizaram HPLC-UV-DAD e LC-MS. Os agrotóxicos foram separados numa coluna polimérica de 25 cm, a 25 °C, utilizando eluição por gradiente, variando a proporção de fase móvel entre acetonitrila e água pH 3,0 (acidificada com ácido perclórico para o DAD e com ácido acético para o LC-MS) com uma vazão de 1 mL min⁻¹. O tempo de análise foi de 80 min. Para detecção no UV-DAD foi selecionado o comprimento de onda de máxima absorvância de cada composto. A extração foi feita através de cartuchos de SPE com sorvente PSDVB e C18, os limites de detecção ficaram na faixa de 20 a 90 ng L⁻¹ e para o sistema LC-MS ficaram entre 6 e 15 ng L⁻¹. As recuperações ficaram entre 43 e 93%.

CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.* (2004) compararam HPLC-DAD com LC-MS, para determinação simultânea de 10 herbicidas da classe das sulfoniluréias e feniluréias. Foi desenvolvido um método para análise de amostras aquosas, e testado em amostras de águas de rios fortificadas. Foi utilizada coluna Synergi MAX C12, mantida a 25°C, fase móvel constituída de acetonitrila e tampão fosfato pH 7,2, modo de eluição por gradiente e vazão de 1 mL min⁻¹. O espectro foi adquirido entre 190 e 400 nm, mas foram selecionados dois comprimentos de onda para quantificar os compostos, 210 e 245 nm. A etapa de extração foi realizada utilizando cartuchos de SPE. As recuperações ficaram entre 70 e 95%. Em relação aos limites de detecção, foram de 50 ng L⁻¹, para os dois métodos; mas, com o detector DAD, o tempo total de corrida foi de 27 min, enquanto com o MS, o tempo foi menor que 13 min.

PALMA *et al.* (2004) analisaram resíduos de cinco agrotóxicos em águas de superfície, no Chile, entre 2001 e 2003. As amostras foram analisadas por HPLC-DAD, utilizando coluna de C18, de 25 cm, volume de injeção de 20 µL, eluição isocrática e vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda variou entre 220 a 230 nm dependendo do composto a ser analisado. A extração por SPE utilizando cartuchos contendo C18, atingiu recuperações acima de 80% para todos os agrotóxicos estudados e limites de detecção para todos os compostos de 0,10 µg L⁻¹.

SANCHEZ-ORTEGA *et al.* (2005) também utilizaram dessa vantagem do DAD, e desenvolveram um método para análise de inseticidas em águas, utilizando o detector em linha com um amperométrico. A coluna usada para separação foi Spherisorb ODS2, com fase móvel composta por acetonitrila/ácido cítrico e tampão de hidrogenofosfato dissódico (50:50, v/v), e eluição isocrática com vazão de 1 mL min⁻¹. A detecção no DAD foi feita em 220 nm com exceção de um composto, o qual foi detectado no seu segundo comprimento de onda de máxima absorção para evitar interferências de coeluição. O método foi aplicado para determinação destes agrotóxicos em águas de rios, e os limites de detecção ficaram entre 1,2 e 1,8 µg L⁻¹. Para extração utilizaram a SPME com fibra de PDMS-DVB e as recuperações ficaram entre 93 e 108%.

GATIDOU *et al.* (2005) desenvolveram um método utilizando HPLC-DAD para determinação simultânea de dois biocidas, diuron e irgarol 1051, e seus metabólitos em água marinha empregando coluna cromatográfica de 15 cm e pré-coluna de

C18, aquecidas a 30 °C, e alça de injeção de 100 µL. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água, a uma vazão de 1,7 mL min⁻¹. O detector foi fixado em 224 nm para o irgarol 1051 e 2-metiltio-4-ter-butilamino-s-triazina, e em 244 nm para o diuron e seus metabólitos. Os limites de detecção ficaram entre 0,005 e 0,026 µg L⁻¹. Nesse método, o uso da eluição por gradiente foi otimizado, possibilitando uma diminuição no tempo de corrida de 28 para 13 minutos.

A utilização de uma coluna de C8 foi usada no trabalho desenvolvido por LIANG *et al.* (2005), para determinação do inseticida foxim em amostras aquosas. Foram obtidos limites de detecção de 10 µg L⁻¹. A fase móvel foi acetonitrila/água, numa vazão de 0,8 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 25 °C, e o detector foi fixado em 210 nm.

O modo de eluição é um parâmetro que pode ser otimizado. A eluição isocrática foi utilizada por RODRÍGUEZ-CUESTA *et al.* (2005) no desenvolvimento de um método para determinação de agrotóxicos em águas subterrâneas. Foi utilizado sistema cromatográfico constituído de coluna C18, fase móvel formada por acetonitrila e água com vazão de 1 mL min⁻¹. Os compostos foram monitorados em comprimentos de onda que variaram de 200 a 280 nm, e foram alcançados limites de detecção entre 0,3 e 12,0 µg mL⁻¹.

O monitoramento de dois anos, da contaminação por 5 ingredientes ativos e 17 metabólitos em águas subterrâneas na Itália foi feita por GUZZELLA *et al.*, 2006. Dos 22 compostos em estudo, 12 foram determinados por HPLC-DAD. Foram otimizados dois métodos para separação de grupos diferentes de agrotóxicos, utilizando HPLC-DAD. Um método utilizou coluna polimérica, fase móvel constituída de dihidrogenofosfato de potássio e acetonitrila e eluição por gradiente numa vazão de 0,8 mL min⁻¹. O outro, para separação do grupo formado por linurom e metabólitos utilizou coluna C18, eluição por gradiente e fase móvel composta por água e acetonitrila. A quantificação dos compostos foi realizada num comprimento de onda de 205 nm, exceto para o deisopropil-atrazina, que foi quantificado em 210 nm e o 2-hidroxi-terbutilazina em 240 nm. Utilizaram para a extração cartuchos de SPE com sorvente C18 e o limite de detecção ficou entre 0,01 e 0,05 µg L⁻¹.

PADRÓN *et al.* (2006) otimizaram um método utilizando HPLC-DAD para determinação de uma mistura de seis agrotóxicos organoclorados em amostras de águas, com coluna C18, de 15 cm, fase móvel constituída de metanol e água com modo de eluição isocrática e vazão de 1 mL min⁻¹. Foram selecionados dois

comprimentos de onda para quantificar os compostos, 238 nm para a família dos DDTs e 220 nm para a do dieldrin e aldrin. Os compostos foram extraídos por SPME, e os limites de detecção variaram entre 0,3 e 9,6 ng mL⁻¹.

VIGNA *et al.* (2006) utilizaram HPLC–DAD na determinação dos agrotóxicos imazetapir, nicosulfurom, diurom, linurom e clorimurom-etílico em água. O sistema consistiu de coluna C18 de 15 cm, e pré-coluna de 4 cm. Foi utilizado eluição por gradiente com fase móvel de acetonitrila/água pH 3,0, numa vazão de 0,8 mL min⁻¹. Foi utilizado um comprimento de onda de 220 nm para quantificação e o espectro de absorção foi obtido numa faixa de 190 a 400 nm. Na etapa de extração foram comparados valores de recuperação para cartuchos comerciais (C18, EN, NH₂, Oasis, ENVI-8) e cartuchos feitos no laboratório com polimetiloctilsiloxano (PMOS). Para os cartuchos com PMOS foram obtidas recuperações na faixa de 72 a 111%.

ZHOU *et al.* (2006) desenvolveram um método empregando SPE e HPLC-DAD para determinação dos agrotóxicos simazina e atrazina em amostras aquosas. A separação foi realizada numa coluna Zorbax Extend C18. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água (70:30, v/v), com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e tempo de análise de 10 min. Os dados cromatográficos foram adquiridos num comprimento de onda de 223 nm. Os limites de detecção alcançados foram de 33,0 e 9,0 ng L⁻¹ para a atrazina e simazina, respectivamente.

Alguns dos agrotóxicos utilizados no tabaco (imidacloprido, atrazina, simazina e clomazona) foram determinados por HPLC-DAD em águas superficiais e subterrâneas, no trabalho desenvolvido por BORTOLUZZI *et al.*, 2007. A coluna analítica utilizada foi uma Bondesil C18, e o volume de injeção de 20 µL. A fase móvel utilizada foi composta por metanol: água (55:45; v/v) ajustada a pH 3,0 com ácido fosfórico e os agrotóxicos detectados a 220 nm. Os limites de detecção alcançados considerando a pré-concentração por SPE foram entre 0,05 e 0,2 µg L⁻¹.

A análise simultânea de 16 agrotóxicos de diferentes classes em águas subterrâneas foi feita por D'ARCHIVIO *et al.* (2007), utilizando HPLC-DAD. Nesse procedimento foi utilizado eluição isocrática e fase reversa, com coluna C18, de 25 cm, com pré-coluna C18 de 4 cm. As análises foram realizadas a temperatura ambiente com fase móvel de acetonitrila e água acidificada com 0,1% de H₃PO₄ numa vazão de 1 mL min⁻¹. Nesse trabalho, o detector foi bastante explorado. O espectro UV dos analitos foi obtido entre 210 e 400 nm. Mas, para as determinações, o comprimento de onda de trabalho foi o de máxima absorbância de

cada analito, para obtenção de uma melhor resolução dos picos. Chegaram a limites de detecção entre 0,003 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$. A etapa de extração foi realizada por SPE utilizando 5 diferentes sorventes: C18, carbono grafitizado, polimérico de PSDVB (poliestireno divinilbenzeno), Oasis HLB e Strata X. As recuperações foram acima de 70% para todos os compostos, exceto para fenmedifam que é rapidamente degradado na água.

CARBO *et al.* (2008) desenvolveram um método multirresíduos empregando SPE e HPLC-DAD para a determinação de doze agrotóxicos em águas subterrâneas em lavouras de algodão. O método empregou coluna e pré-coluna contendo C18, mantidas a temperatura ambiente. O volume de injeção foi de 10 μL . A fase móvel foi composta por acetonitrila e água, modo de eluição por gradiente com um tempo total de análise de 58 minutos, com vazão de 1 mL min^{-1} . A detecção e quantificação dos compostos foi feita no comprimento de onda de 230 nm, sendo os analitos identificados pelo tempo de retenção e a confirmação feita pela comparação do espectro UV do composto com o do padrão. A extração por SPE obteve recuperações entre 73 e 113%, desvio padrão relativo entre 2 e 16% e limites de detecção variando de 0,06 a 0,57 $\mu\text{g L}^{-1}$.

PORTUGUAL *et al.* (2008) desenvolveram um método utilizando a Extração Sortiva em Barra Magnética (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*) e determinação por HPLC-DAD de sete herbicidas triazínicos. Uma coluna de C18 foi utilizada. O volume de injeção foi de 20 μL . As análises foram realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$, com eluição isocrática e vazão de 1 mL min^{-1} , utilizando fase móvel composta por acetonitrila e tampão de acetato de amônio (pH 6). O espectro UV foi adquirido entre 220 e 300 nm. O método apresentou recuperações entre 20,4 e 62,0% e Desvio Padrão Relativo (RSD) < 7,0%, com limites de detecção entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.4.2 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

É possível atingir um elevado grau de certeza na identificação molecular pelo acoplamento de sistemas cromatográficos ou afins, a diversos espectrômetros. Embora a informação quantitativa obtida de um cromatograma seja usualmente boa, a certeza da identificação baseada apenas nos parâmetros de retenção pode ser insuficiente. As técnicas espectroscópicas proporcionam uma informação qualitativa

excelente e permitem a identificação de uma substância pura. Assim, a combinação de técnicas cromatográficas e espectroscópicas oferece mais informação sobre a amostra do que é possível se obter com cada uma isoladamente (NETO; NUNES, 2003).

A espectrometria de massas é uma ferramenta que tem sido utilizada há muito tempo para a medida de isótopos e para determinar estrutura de moléculas orgânicas. É, atualmente, uma técnica poderosa de detecção para a cromatografia, pois o espectrômetro é sensível a pequenas quantidades do analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna, e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2003).

Um problema fundamental no acoplamento de cromatografia líquida com espectrometria de massas foi o enorme descompasso entre os volumes relativamente grandes de solvente da primeira e os requisitos de vácuo da segunda, uma vez que o espectrômetro de massas opera em condições de alto vácuo (10^{-5} a 10^{-8} torr) (SKOOG *et al.*, 2002). Mas, depois que as deficiências com as interfaces foram parcialmente superadas, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) vem sendo cada vez mais utilizada (ALDER *et al.*, 2006).

A espectrometria de massa é uma técnica usada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. Para obter um espectro de massa, as moléculas no estado gasoso ou as espécies desorvidas a partir de fases condensadas são ionizadas. Os íons obtidos são acelerados por um campo elétrico e separados de acordo com a razão entre a sua massa e sua carga elétrica, m/z (HARRIS, 2003).

O sistema básico de um espectrômetro de massas, representado na Figura 7, é composto por: sistema de injeção da amostra, fonte de íons, analisador/separador de massas, detector e sistema de aquisição de dados.

A interface é um dispositivo colocado entre o LC e o MS com o objetivo de remover o solvente e transferir a amostra para a fonte de íons. A principal interface utilizada na análise de agrotóxicos polares é baseada na Ionização a Pressão Atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) e engloba a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a Ionização por *Electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*). Apesar de uma enorme variação nas propriedades químicas dos poluentes

aquáticos, a maioria pode ser ionizado por métodos com API (COLLINS *et al.*, 2006; ROSEN, 2007).

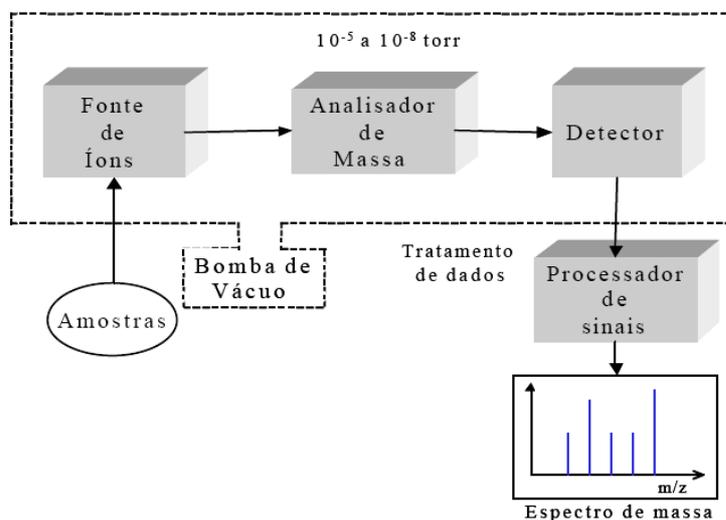


Figura 7 – Componentes básicos de um espectrômetro de massas

Em várias interfaces, muitas vezes, também é realizada a ionização do analito por métodos que permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis, e por esse motivo muitos autores referem-se a algumas dessas interfaces simplesmente como fontes de ionização (ARDREY, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008).

No caso do LC-MS existem diferentes métodos para introduzir o eluato da coluna no espectrômetro de massas, sendo que os íons já podem estar presentes na solução ou serem formados no processo de transferência (HARRIS, 2001; KUSTER *et al.*, 2006). Entre os métodos para introdução do eluato, podem ser citadas a APCI e ESI, as quais representam a melhor escolha hoje em dia para análise de agrotóxicos (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

A sensibilidade de resposta em Espectrometria de Massas é claramente dependente da tecnologia da interface empregada. Em geral, APCI e ESI permitem uma melhor calibração linear com várias ordens de grandeza e uma eficiente ionização para compostos de diferentes polaridades (HOGENBOOM *et al.*, 2001). A seleção da fonte de ionização mais apropriada para análise de agrotóxicos depende muito das classes de compostos investigados. A ionização não só depende dos parâmetros da interface, mas também das condições usadas no LC como a fase móvel. A composição da fase móvel e o seu pH influenciam diretamente na

eficiência de ionização dos analitos (KUSTER *et al.*, 2006). O uso de sais não voláteis na fase móvel (comum em outros métodos cromatográficos) tem que ser descartado, pois interferem na fonte de ionização (HOGENBOOM *et al.*, 2001). A seleção dos componentes do LC e da API são determinados pelas propriedades físico-químicas dos analitos, sua polaridade e acidez. Analitos que ocorrem como íons em solução são melhor analisados por ESI, enquanto que analitos não iônicos podem ser analisados por APCI (REEMTSMA, 2003).

A fonte de ionização mais comum para determinação de resíduos de micropoluentes no ambiente por LC-MS/MS é a ESI. Compostos menos polares que podem ser separados por cromatografia de fase reversa, requerem maiores energias de ionização. Para estes compostos, APCI é usualmente o método escolhido nas análises com LC-MS/MS (ROSEN, 2007).

A ESI gera, em solução, íons dos analitos antes que eles cheguem ao espectrômetro de massas (Figura 8) (KUSTER *et al.*, 2006). O eluato é pulverizado (nebulizado) dentro de uma câmara que está sob pressão atmosférica, na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido. O aquecimento causa a evaporação do solvente das moléculas do analito. O gás aquecido promove aglomeração do solvente dentro da gota para evaporação. Com a diminuição da gota, ocorre à concentração da carga dentro da gota, e o processo acima descrito se repete. Os íons são transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho. Algumas reações da fase gasosa, a maioria de transferência de prótons e troca iônica, também podem ocorrer no intervalo de tempo em que os íons são ejetados de dentro das gotas até alcançarem o analisador de massas (NIESSE; TINKE, 1995; FERNADEZ-ALBA, 2005).

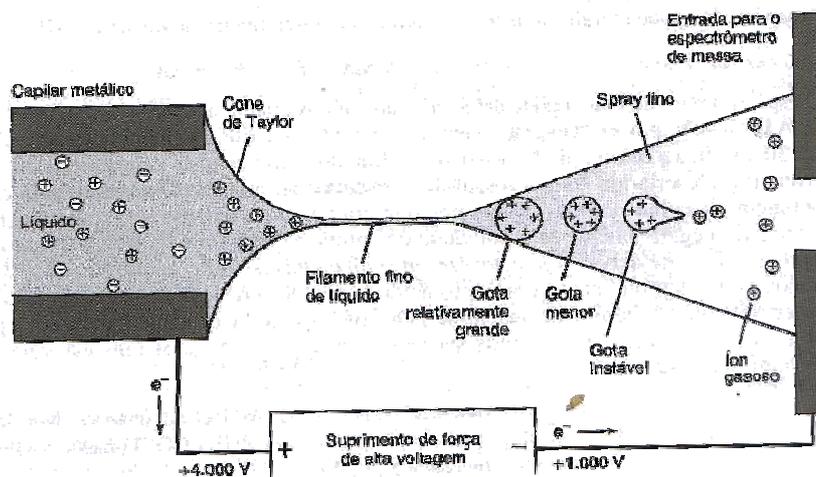


Figura 8 – Diagrama da ESI, da formação dos íons na solução antes de serem introduzidos no MS

O LC-MS pode ser equipado com diversos analisadores, cada um com propriedades características para identificar, quantificar e resolver ambigüidades pela seleção de parâmetros adequados de ionização e aquisição (ROSEN, 2007).

Existem diferentes sistemas empregados para separação dos íons gerados durante o processo de ionização. Entre eles o sistema triplo quadrupolo (QqQ).

O espectrômetro de massas do tipo QqQ é formado por junção de três quadrupolos em seqüência, dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. No primeiro, o íon selecionado é separado da corrente de íons vinda da fonte de íons. No segundo quadrupolo, este íon sofre nova fragmentação por colisão com íons de N_2 ou argônio. O terceiro quadrupolo seleciona então um dos íons formados para enviar ao detector (HARRIS, 2001). As principais vantagens de empregar um QqQ para análise de agrotóxicos estão na alta sensibilidade e seletividade.

Os modos de operação são as maneiras como o espectrômetro de massas pode ser programado para a aquisição de dados. No modo *scan* o MS é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de m/z (VÉKEY, 2001). No modo SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o MS faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade, uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

No modo de operação de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reactions Monitoring*) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados e estes íons são novamente fragmentados. É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VEKEY, 2001).

O monitoramento seletivo de íons e o monitoramento seletivo de reações aumentam a seletividade da espectrometria de massas para determinados analitos e melhoram a sensibilidade, diminuindo a resposta dos interferentes a tudo o que interfira na medida, reduzindo o ruído de fundo (HARRIS, 2003).

Uma análise quantitativa dos compostos requer sensibilidade e seletividade numa vasta faixa de concentração. Espectrômetros triplo quadrupolo com sua habilidade de executar monitoramento de múltiplas reações são mais adequados (REEMTSMA, 2003). A seletividade e a razão sinal/ruído podem ser expressivamente melhoradas pelo monitoramento seletivo de reações, com um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (HARRIS, 2003).

Não há dúvidas que instrumentos (QqQ) operando no modo MRM, proporcionarão melhor sensibilidade para os analitos. Devido a essas razões, e a simplicidade relativa das análises realizadas no modo MRM, essa tecnologia tem se tornado o método mais comum na determinação de resíduos de contaminantes em análises ambientais e de alimentos por LC-MS/MS. Análises por MRM introduzem alta especificidade, pois baseia-se na detecção do íon precursor e de um fragmento conhecido (ROSEN, 2007)

KUSTER *et al.* (2006) mostraram que aproximadamente 70% dos métodos revisados na literatura estão baseados nesta configuração. LC-MS/MS aliado a um analisador com triplo quadrupolo que opera no modo MRM por meio de interfaces de API.

3.5 Parâmetros cromatográficos

Está implícito no processo de validação do método que o equipamento utilizado deve atender as especificações, trabalhar corretamente e estar adequadamente calibrado; assim como o operador que irá realizar os estudos. O analista deve ter domínio do assunto e ser capaz de estabelecer que o sistema

HPLC e o procedimento são capazes de gerar dados de qualidade aceitável (EURACHEM, 1998; SHABIR *et al.*, 2003).

Parâmetros como fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α) são empregados para avaliar a separação cromatográfica dos compostos.

3.5.1 Fator de retenção (k)

O fator de retenção é um parâmetro importante, amplamente usado para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas (SKOOG *et al.*, 2002). O fator de retenção é determinado pela razão entre a fração de tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e a fração em que percorrem a coluna na fase móvel, de acordo com a Equação (1) (COLLINS *et al.*, 2006).

Quanto mais um componente é retido pela coluna, maior é o seu fator de retenção. Para monitorar o desempenho de uma determinada coluna, uma boa prática é medir periodicamente o fator de retenção de um padrão, pois mudanças nesse parâmetro podem estar relacionadas com a degradação da coluna (HARRIS, 2003).

$$k = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

Onde:

t_R = tempo de retenção de um analito, que é o tempo transcorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico;

t_M = tempo de retenção de um analito não retido;

t'_R = tempo de retenção ajustado.

O k pode ser estabelecido diretamente do cromatograma, baseado nos tempos de retenção totais dos constituintes de interesse (NETO; NUNES, 2003). Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 (HARRIS, 2003; COLLINS *et al.*, 2006). Quando o fator de retenção for maior do que talvez 20 ou 30, os tempos de eluição tornam-se exageradamente longos para serem aplicados experimentalmente (NETO; NUNES, 2003).

3.5.2 Resolução (Rs)

O soluto em movimento através de uma coluna cromatográfica tende a se dispersar de acordo com uma distribuição gaussiana. Quanto mais tempo um soluto demora para passar através de uma coluna, mais larga se torna sua banda (HARRIS, 2003).

A resolução refere-se à separação de dois picos adjacentes e pode ser obtida pela Equação (2) (RIBANI *et al.*, 2004). A Rs traduz a eficiência da coluna e da fase estacionária (HARRIS, 2003). A resolução é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da soma das larguras de suas respectivas bases ou largura a meia altura.

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right) \quad (2)$$

Onde:

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b1} e W_{b2} = largura dos picos na base, em unidades de tempo;

W_{h1} e W_{h2} = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Quando $R_s=1$, os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de sobreposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de R_s indicam melhor separação: $R_s=1,25$ é suficiente para fins quantitativos e com $R_s>1,5$ há 100% de separação para picos gaussianos (COLLINS *et al.*, 2006).

3.5.3 Fator de separação (α)

Para dois componentes quaisquer α é a razão entre seus tempo de retenção ajustados. Quanto maior o valor de α , maior a separação entre os dois componentes. O fator de separação é razoavelmente independente da vazão, e pode, portanto, ser usada para auxiliar na identificação dos picos quando muda a vazão (HARRIS, 2003). É calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a Equação (3):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, quanto mais seletiva for a retenção pela fase estacionária para o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação. Se $\alpha=1$, os picos não estão separados, se $\alpha>1$ não há garantia de que os picos estejam totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem sobrepostos. Consequentemente, um valor elevado de α só implica em boa separação se os picos forem estreitos (COLLINS *et al.*, 2006; MARTINS, 2004).

3.6 Validação de métodos cromatográficos

Um laboratório deve produzir resultados analíticos confiáveis. O analista, no seu dia a dia, deve preocupar-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida com respeito a sua exatidão e que possuam precisão adequada para a finalidade a que se destinam (SOARES, 2001). Para que esta confiabilidade seja atingida, o primeiro passo está na validação do método analítico escolhido. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003).

A validação de um método é uma exigência na prática de análises químicas, e tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Vários autores definem validação de métodos e os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias

para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

Órgãos como *International Conference on Harmonisation (ICH)*, *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, *International Standard Organisation (ISO)* e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (RIBANI *et al.*, 2004). A maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação

O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação (RIBANI *et al.*, 2004). Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes, que garantam a funcionalidade do método, bem como do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação (VALENTINI *et al.*, 2007).

3.6.1 Curva analítica e linearidade

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, a precisão e a exatidão podem ser comprometidas (ZANELLA *et al.*, 2003).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida a priori. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (RIBANI *et al.*, 2004). Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica. A curva analítica deve ser definida por no mínimo cinco pontos em ordem crescente de concentração, no mínimo três vezes cada, com estimativa do RSD entre as injeções inferior a 5% (RIBANI *et al.*, 2004, BRASIL, 2003).

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático

conhecido como regressão linear (Equação 4) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003).

$$y = ax + b \quad (4)$$

Onde b é a intersecção e a é a inclinação da reta. Idealmente, a deve ser reprodutível e b não deve ser estatisticamente diferente de zero (INMETRO, 2003; SANCO, 2007).

A linearidade refere-se à capacidade de uma metodologia analítica de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em uma faixa analítica especificada (BRASIL *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI *et al.*, 2007).

O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003). O coeficiente de correlação r permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI *et al.*, 2004). A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

3.6.2 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2003). No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método (LANÇAS, 2004b).

3.6.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Ao trabalhar com análise de constituintes traços, o conhecimento da menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método é um fator muito importante.

O Limite de Detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) e o Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) referem-se a menor concentração do analito presente em uma amostra que possa ser detectado e quantificado, respectivamente, sob as condições experimentais estabelecidas, em um nível aceitável de precisão e exatidão. São expressos em percentual ou em unidades de concentração (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003; VALENTINI *et al.*, 2007).

O LOD e o LOQ podem ser estimados por diferentes meios: pelo método da relação sinal/ruído, do desvio padrão e por processos estatísticos. O método mais utilizado para técnicas analíticas em geral é o da relação sinal-ruído (RIBANI *et al.*, 2004).

O procedimento sinal/ruído pode ser aplicado somente para processos analíticos que exibem linha de base. É determinada a razão sinal/ruído por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito com as do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado e quantificado. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada aceitável para estimar o LOD e com valor 10 para estimar o LOQ (BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003).

O LOD e o LOQ são expressos como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão devem ser consideradas (BRASIL, 2003).

3.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra é a precisão do processo analítico. Precisão é a medida de quão próximo os resultados estão uns dos outros, ou seja, é o grau de concordância entre os resultados de cada teste quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra, e é geralmente expressa como desvio padrão, variância ou

coeficiente de variação de diversas medidas (EURACHEM, 1998; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; VALENTINI *et al.*, 2007).

A precisão pode ser considerada no nível de repetitividade e de precisão intermediária (BRITO *et al.*, 2003).

A repetitividade expressa a precisão nas mesmas condições de operação (mesmo equipamento, analista, reagentes e dia) em pequeno espaço de tempo (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI, 2007). Pode ser avaliada, de acordo com o INMETRO, que recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, ou de acordo com a ANVISA, que recomenda no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três diferentes concentrações e três replicatas cada, ou com no mínimo seis determinações para uma única concentração-teste (BRASIL, 2003). O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (INMETRO, 2007), sendo utilizado pelo INMETRO, e a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

A precisão intermediária expressa o efeito das variações no mesmo laboratório que envolvem diferentes dias, diferentes analistas e/ou diferentes equipamentos, entre outros (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; VALENTINI, 2007). A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada (RIBANI *et al.*, 2004). Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método (BRASIL, 2003). Para análise de resíduos de agrotóxicos, por exemplo, são considerados aceitáveis coeficientes de variação de até 20% (BRITO *et al.*, 2003; SANCO, 2007).

3.6.5 Exatidão (recuperação)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (EURACHEM, 1998;

BRASIL, 2003; BRITO *et al.*, 2003; INMETRO, 2003; VALENTINI *et al.*, 2007). É normalmente expressa em termos de percentagem (EURACHEM, 1998).

O estudo da exatidão pode ser realizado baseados em diferentes metodologias, entre elas o uso de ensaios de recuperação, o qual constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO *et al.*, 2003).

O estudo da recuperação consiste na "*fortificação*" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito seguida pela determinação da concentração do analito adicionado (BRITO *et al.*, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (SANCO, 2007). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 40 a 120%, com precisão de até $\pm 30\%$ (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

3.6.6 Seletividade e Confirmação dos Resultados

Seletividade do método é uma das medidas que garantem a credibilidade das medidas na presença de interferentes (EURACHEM, 1998), e é geralmente estudada investigando a sua habilidade em determinar o analito em testes onde os interferentes normalmente presentes nas amostras estão presentes. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Onde não está claro o que é ou não interferência, a seletividade do método pode ser investigada pelo estudo de sua habilidade em medir o analito

comparando com outras técnicas/métodos independentes (EURACHEM, 1998; INMETRO, 2003).

É necessário estabelecer que o sinal produzido durante a análise, o qual foi atribuído ao analito, é realmente devido ao analito e não devido à presença de alguma substância química ou fisicamente similar. Isso é a confirmação da identidade (EURACHEM, 1998).

A cromatografia é um poderoso método de separação de compostos mas não de identificação. A cromatografia apenas fornece dados auxiliares na identificação de compostos (SOARES, 2001), por isso, em métodos cromatográficos, é preciso tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos (BRASIL, 2003). A confirmação do resultado não é obrigatória, e deve ser decidida pelo laboratório e em cada caso.

Para comprovar que um composto com um certo tempo de retenção é o que se julgava ser pode ser comparado o tempo de retenção do composto com o dos padrões, ou utilizar a co-cromatografia, que consiste em adicionar uma quantidade de padrão na amostra e depois verificar se há aumento do pico ou há surgimento de outro pico (SOARES, 2001).

Outra maneira de realizar a confirmação é através de uma técnica ou conjunto de técnicas. O uso de sistemas com detectores altamente específicos, como os espectrômetros de massas, é recomendado. Detectores seletivos acoplados com técnicas de GC e LC, como detecção por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detection*), fotométrico de chama (FPD, do inglês *flame photometric detection*), de nitrogênio e fósforo (NPD, do inglês *nitrogen-phosphorus detection*), DAD e fluorescência, também oferecem especificidade (SANCO, 2007).

A utilização de testes de pureza de pico, com auxílio de detectores DAD e MS são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

Alguns procedimentos analíticos são específicos o suficiente para dispensar maiores esforços de confirmação, isto é, o processo de extração do analito da matriz, a remoção de interferentes e a etapa cromatográfica são suficientemente específicas para dar ao analista a segurança necessária para afirmar qual a identidade do composto. Tais situações, no entanto, são a exceção e não a regra em química analítica (SOARES, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de um método para determinar resíduos de agrotóxicos em águas subterrâneas, empregando SPE e DLLME para extração e pré-concentração das amostras, e determinação por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.1 Instrumentação

- ✓ Balança Analítica de precisão modelo FA 2104N, Bioprecisa;
- ✓ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ✓ Centrífuga Centribio 80-2B (Curitiba, PR, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 – 1000 μL) (Labmate, Polônia; Digipet);
- ✓ pHmetro Hanna pH20 pH21 – eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- ✓ Sistema de filtração em membrana Phenomenex;
- ✓ Sistema de Purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3® Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ✓ Sistema manifold para SPE Phenomenex (Torrance, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de até 12 amostras;
- ✓ Ultrassom Quimis modelo Q335D (Diadema, SP, Brasil);
- ✓ Cromatógrafo a Líquido Waters (Milford, MA, USA) equipado com bomba quaternária modelo 600, com sistema de eluição por gradiente, Detector por Arranjo de Diodos 2996, sistema de aquisição de dados software Empower PDA e coluna analítica Hyperclone BDS C18 5 μm , 130 Å (250 x 4,6 mm de d.i.) (Phenomenex, Torrance, CA, USA);
- ✓ Cromatógrafo a Líquido Alliance Separations modelo 2695 Waters (Milford, MA, USA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters com fonte API, utilizando o modo de ionização por Electrospray, Sistema de

aquisição de dados através do software Masslynx 4.0 Waters e coluna analítica XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.) (Waters, Milford, MA, USA);

✓ Sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

4.2 Reagentes, solventes e materiais

- ✓ Ácido fórmico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Ácido fosfórico p.a. (Merck, RJ, Brasil);
- ✓ Água destilada;
- ✓ Água Ultrapura purificada em sistema Direct-Q UV3® Millipore (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Cartuchos para SPE Strata® C18-E 200 mg/3,0 mL (55 µm, 70 Å) (Phenomenex, EUA);
- ✓ Cartuchos para SPE Strata® X 200 mg/3,0 mL (33 µm, 85 Å) (Phenomenex, EUA);
- ✓ Diclorometano, clorofórmio (grau espectroscópico) e cloreto de sódio Merck (Darmstadt, Germany);
- ✓ Extran® neutro (Merck, Brasil);
- ✓ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-ESI-MS/MS (White Martins, Brasil);
- ✓ Gás Nitrogênio 99,99% de pureza (White Martins, Brasil);
- ✓ Membrana filtrante de acetato de celulose 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius Biolab products, Goettingen, Alemanha);
- ✓ Membrana filtrante de nylon 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Millipore, SP, Brasil);
- ✓ Metanol, acetona e acetonitrila, grau HPLC (J.T Baker, Mallinckrodt, NJ, USA);
- ✓ Padrões analíticos: 2,4-D 99,6%, carbofurano 99,5%, clomazona 97,4% e tebuconazol 99,6% (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil).
- ✓ Tetracloreto de carbono, tetraclorotetileno, monoclorobenzeno e 1,2-diclorobenzeno, grau espectroscópico, Vetec (Rio de Janeiro, Brasil);

4.3 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque, contendo 1000 mg L⁻¹ de cada agrotóxico (carbofurano, 2,4-D, clomazona e tebuconazol) foram preparadas em metanol grau HPLC partindo da dissolução do padrão sólido, armazenado em frasco âmbar e estocado a -18 °C. Para os padrões com teor de pureza inferior a 99%, efetuou-se a correção das pesagens. A partir das soluções estoques foram preparadas soluções estoque de concentrações de 100 mg L⁻¹, em metanol, de cada princípio ativo. Foi preparada também uma solução trabalho de 10 mg L⁻¹ da mistura dos quatro agrotóxicos. Esta solução foi utilizada para preparar as diluições as quais foram usadas para a otimização da metodologia, para a obtenção da curva analítica e nos ensaios de recuperação. A solução padrão de trabalho foi preparada mensalmente, e as diluições utilizadas foram preparadas diariamente.

4.4 Amostras de água

As amostras de água utilizadas para a validação dos métodos, tanto por SPE quanto por DLLME, foram coletadas na torneira do laboratório. Essas amostras possuem características semelhantes às amostras reais do experimento, apresentando resposta semelhante no equipamento. Com essa água podemos avaliar durante a validação os possíveis interferentes que poderiam prejudicar a quantificação por HPLC-DAD.

Estas amostras foram analisadas preliminarmente (em branco, sem a adição dos agrotóxicos) para verificação da possível presença de alguns dos compostos em estudo. Para a extração por SPE, foram realizadas também avaliações preliminares dos cartuchos e dos solventes.

4.5 Otimização do sistema SPE

No sistema SPE comercial é utilizado um dispositivo *manifold*, que é um sistema formado por uma caixa de vácuo (Figura 9), com espaço simultâneo para 12 cartuchos de SPE. Este sistema é muito conveniente para análise de rotina, já que

várias amostras são extraídas ao mesmo tempo. As amostras, colocadas em balões volumétricos, são transferidas para os cartuchos SPE através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorre por sucção em função do vácuo que é aplicado no sistema, controlado em cada cartucho através de válvulas. Foi adotada uma vazão da ordem de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ para a pré-concentração das amostras.

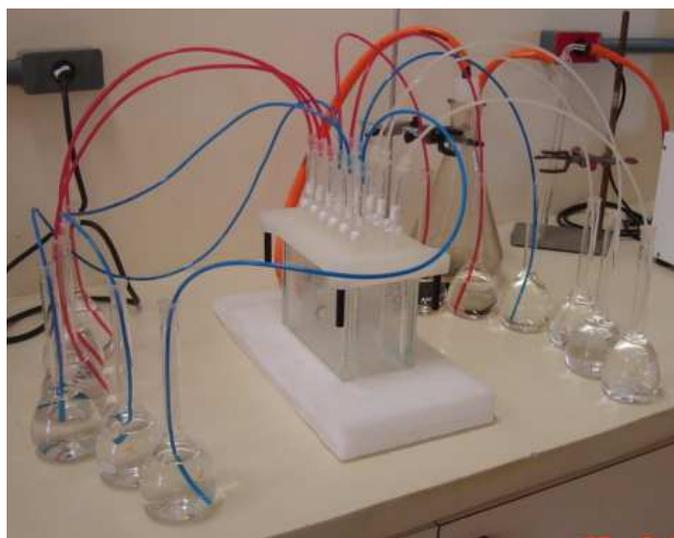


Figura 9 – Sistema SPE utilizado para pré-concentração dos agrotóxicos

4.5.1 Escolha do sorvente

Na escolha do sorvente para extração dos compostos foram consideradas as informações do analito e a natureza da matriz, bem como a sua capacidade de interação.

Foram avaliados dois diferentes sorventes, Strata® C18-E contendo 200 mg do sorvente em tubos de 3 mL e, Strata-X® (polímero do estireno-divinilbenzeno com superfície modificada com estireno divinilbenzeno) contendo 200 mg do sorvente em tubos de 3 mL.

Os experimento foram realizados condicionando os cartuchos com C18 e polimérico, com 3,0 mL de metanol; 3,0 mL de água Ultrapura e 3,0 mL de água Ultrapura pH 3,0. Um volume de 250 mL de água fortificada em um nível de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ com pH ajustado em 3,0 utilizando uma solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v), foi percolada através do sorvente à uma vazão de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. A eluição dos analitos retidos no sorvente C18 foi feita com 1,0 mL (2 x 500 μL) de metanol puro.

O eluato foi recolhido e analisado por HPLC-DAD ou LC-ESI-MS/MS. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5.2 Volume de amostra

O volume de amostra foi definido baseado na revisão da literatura (PRIMEL, 2003; ZANELLA *et al.*, 2003).

4.5.3 Ajuste do pH da amostra

Na pré-concentração dos agrotóxicos foi testado o valor de pH da amostra ajustado em 3,0. O pH da amostra foi ajustado com uma solução de água:ácido fosfórico (1:1, v/v).

4.5.4 Escolha do solvente de condicionamento

A escolha do solvente de condicionamento foi feita baseada na literatura e nas propriedades dos compostos em estudo (ZANELLA *et al.*, 2000; ZANELLA *et al.*, 2003).

4.5.5 Escolha do eluente

Para a eluição dos cartuchos foram testado diferentes solventes: metanol (100%), acetonitrila (100%) e mistura de metanol e acetonitrila (50:50, v/v).

4.6 Otimização do procedimento DLLME

O procedimento realizado na DLLME pode ser observado na Figura 10.

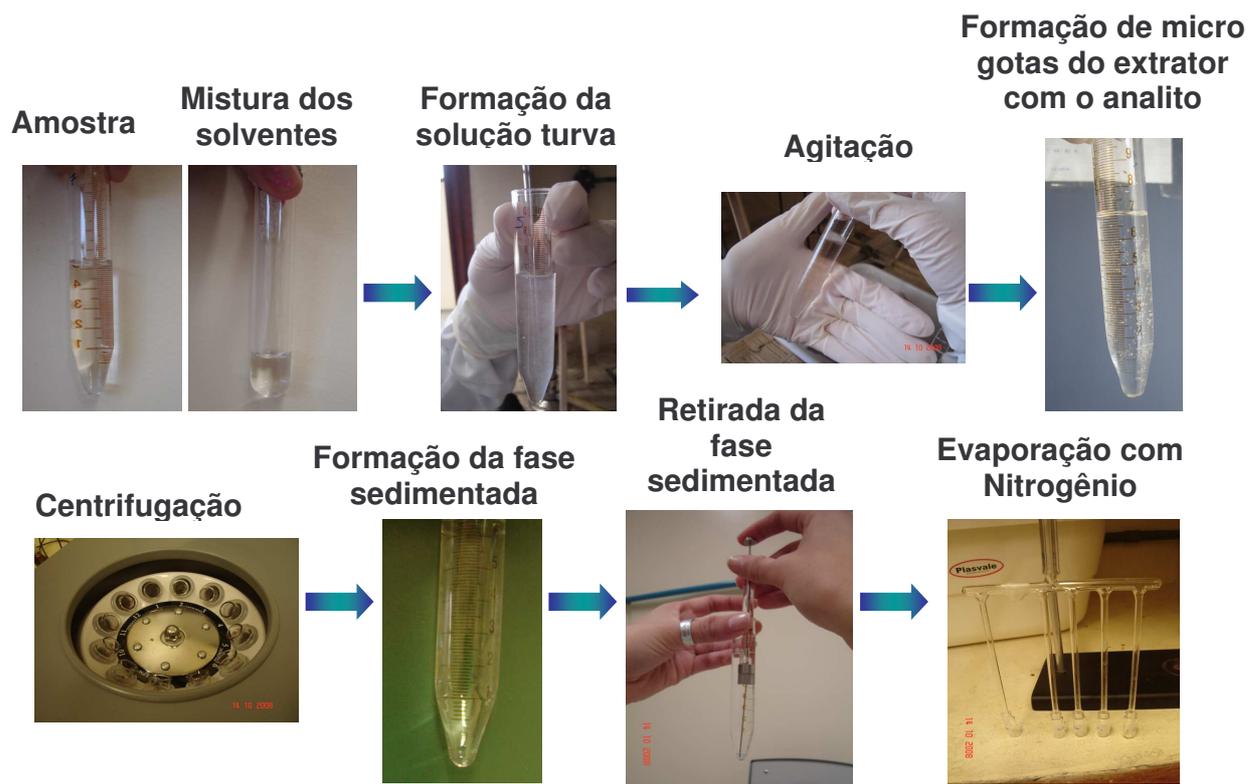


Figura 10 – Procedimento DLLME utilizado para extração e pré-concentração dos agrotóxicos

4.6.1 Escolha do solvente extrator

Entre os solventes com densidade maior que a água, monoclorobenzeno (C_6H_5Cl), diclorometano (CH_2Cl_2), 1,2-diclorobenzeno ($C_6H_4Cl_2$), clorofórmio ($CHCl_3$), tetracloroetileno (C_2Cl_4) e tetracloreto de carbono (CCl_4) foram testados, com o objetivo de escolher o solvente mais apropriado para a DLLME. Os valores de densidade dos solventes orgânicos selecionados são $1,62 \text{ g mL}^{-1}$ (C_2Cl_4), $1,59 \text{ g mL}^{-1}$ (CCl_4), $1,48 \text{ g mL}^{-1}$ ($CHCl_3$), $1,32 \text{ g mL}^{-1}$ (CH_2Cl_2), $1,31 \text{ g mL}^{-1}$ ($C_6H_4Cl_2$) e $1,11 \text{ g mL}^{-1}$ (C_6H_5Cl).

Para a escolha do solvente extrator foram realizados experimentos com $40 \mu\text{L}$ de C_2Cl_4 , CCl_4 , $CHCl_3$, CH_2Cl_2 , $C_6H_4Cl_2$ e C_6H_5Cl combinados com $1,50 \text{ mL}$ de metanol, acetonitrila e acetona.

4.6.2 Escolha do solvente dispersor

O solvente dispersor deve ser solúvel em água e também dissolver o solvente extrator. Acetona, acetonitrila e metanol apresentam estas características e foram selecionados para a otimização. Foram realizados experimentos utilizando 1,5 mL de cada solvente dispersor contendo 40 µL do solvente extrator (tetracloreto de carbono).

4.6.3 Escolha do volume do solvente extrator

Para a escolha do volume do solvente extrator, soluções contendo diferentes volumes de CCl_4 foram submetidas ao procedimento. As condições experimentais foram fixadas incluindo o uso de 2,0 mL de acetonitrila contendo diferentes volumes de CCl_4 (10 – 100 µL variando em intervalos de 10 µL).

4.6.4 Seleção do volume de solvente dispersor

Para avaliar o efeito do volume de acetonitrila na extração, foram feitos experimentos variando o volume de acetonitrila entre 0,75 e 2,0 mL.

4.6.5 Efeito do pH

No trabalho, o efeito do pH na extração dos agrotóxicos pela DLLME foi investigado pela variação do pH entre 2,0 e 6,0 com adição de H_3PO_4 1:1 (v/v).

4.6.6 Efeito da velocidade de centrifugação

Na centrifugação, as microgotas do extrator dispersas na solução são sedimentadas no fundo do tubo cônico. Foi investigado a influência da velocidade de sedimentação na recuperação dos analitos variando a velocidade entre 2000 e 4200 rpm.

4.6.7 Outros parâmetros avaliados

O tempo de extração é um dos fatores mais importantes em processos de extração. Na DLLME, o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura dos solventes extrator e dispersor, antes de iniciar a centrifugação (REZAEI *et al.*, 2006). O efeito do tempo de extração dos analitos na DLLME foi investigado, entre intervalos de 0 a 10 min.

A força iônica da amostra tem grande efeito na eficiência de extração. O aumento da força iônica do meio, ou seja, a adição de uma determinada quantidade de sal na amostra pode diminuir a solvatação das moléculas do analito, devido a dois fatores: a solvatação preferencial das moléculas de sal pela água e a polaridade do analito. Para investigar este parâmetro, vários experimentos foram realizados pela adição de diferentes quantidades de NaCl (0–5%) na solução aquosa.

4.7 Otimização do sistema cromatográfico HPLC-DAD

A polaridade dos agrotóxicos em estudo definiu a utilização do método cromatográfico de fase reversa, desenvolvido por HPLC, no qual os analitos de polaridade intermediária são analisados (COLLINS *et al.*, 2006). Por isso, na otimização, foram utilizadas como fase estacionária (FE) colunas contendo C18 e como fase móvel (FM), diferentes proporções de solventes polares: metanol, acetonitrila e água ultrapura.

Para a otimização das condições cromatográficas primeiro foram injetadas, individualmente, as soluções analíticas dos agrotóxicos selecionados para este estudo, observando o tempo de retenção e o espectro de absorção molecular de cada composto, obtido pelo DAD. Durante as outras etapas do estudo, a ordem de eluição dos compostos foi feita comparando os tempos de retenção (t_R) e o espectro dos picos na mistura com o t_R e o espectro dos picos dos padrões, injetados individualmente.

4.7.1 Preparo e escolha da fase móvel

Os solventes utilizados foram preparados individualmente. A água ultrapura foi acidificada com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v). Os solventes foram filtrados à vácuo através de membranas de nylon 0,45 μm e degaseificados em ultrassom durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes, rotulada com informações a respeito da sua composição e valor de pH. As soluções foram degaseificadas diariamente e a água ultrapura preparada diariamente.

Para a definição da composição da fase móvel para a separação cromatográfica foram testadas misturas contendo diferentes proporções de diferentes solventes, utilizando metanol, acetonitrila e água ultrapura pH 3,0.

Em HPLC de fase reversa, quanto mais hidrofóbico for o analito, mais ele é retido. Quando o analito se ioniza, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui (KURZ, 2007). Devido às características dos agrotóxicos em estudo, é necessária a acidificação da fase móvel e da amostra, a fim de garantir uma maior interação dos agrotóxicos com a fase estacionária, sem comprometer a separação.

A fase móvel foi acidificada com ácido fosfórico, pois este composto apresenta uma baixa absorção na região do UV, principalmente em comprimentos de onda próximos a 220 nm, o qual foi utilizado no estudo.

4.7.2 Escolha da vazão da fase móvel

A função da bomba é enviar um fluxo constante e reprodutível de FM para a coluna, produzindo uma vazão que permita que as análises sejam realizadas em um tempo curto e a uma vazão constante para não interferir no sistema de detecção (COLLINS *et al.*, 2006). A escolha da vazão da fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções padrões, testando vazões entre 0,8 e 1,2 mL min⁻¹.

4.7.3 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada agrotóxico, foi injetada no HPLC-DAD a solução padrão individual contendo 2,5 mg L⁻¹, e a partir do espectro de absorção molecular, monitorado entre 190 e 400 nm, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção dos agrotóxicos. O espectro do padrão foi utilizado para confirmar a identidade dos picos nas amostras.

Com esse detector e software também é possível verificar a pureza dos picos. Para isto, foram comparados os espectros de absorção obtidos em três diferentes pontos do pico cromatográfico, no início, no meio e no fim. Se o espectro desses três pontos coincidirem o pico é considerado puro. Isso foi realizado durante todo o procedimento analítico.

4.8 Otimização do sistema cromatográfico LC-ESI-MS/MS

4.8.1 Preparo e escolha da fase móvel

O procedimento de preparo da fase móvel foi o mesmo realizado para o HPLC-DAD, como descrito no item 4.7.1.

Como a composição da fase móvel já havia sido otimizada para as análises por HPLC-DAD, esta condição foi testada para o LC-ESI-MS/MS, para verificar a possibilidade de uso da mesma composição de fase móvel em diferentes condições de vazão e coluna analítica, sem que houvesse perda da resolução cromatográfica.

4.8.2 Escolha da vazão da fase móvel

A escolha da vazão da fase móvel foi baseada na separação cromatográfica das soluções padrões, testando as vazões de 0,2 e 0,4 mL min⁻¹.

4.8.3 Acidificação da fase móvel

Para o LC-ESI-MS/MS a fase móvel foi acidificada com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Em sistemas de cromatografia líquida acoplada com detectores de massas é indicado o uso de ácidos orgânicos, mais voláteis para evitar que estes cristalizem na interface, e esta acidificação também influencia na eficiência de ionização dos compostos a serem determinados (KUSTER *et al.*, 2006).

4.8.4 Condições do sistema de detecção

Para otimizar as condições no espectrômetro de massas foram feitas infusões, ou seja, injeção direta no espectrômetro de massas com solução analítica padrão individual de 1,0 mg L⁻¹ de cada agrotóxico. A partir das infusões foi definido o modo de ionização da fonte (*eletronspray* positivo ou *eletronspray* negativo), voltagem do cone e energia de colisão, temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente, voltagem do capilar e do cone extrator.

Após a definição destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação.

4.9 Avaliação da separação cromatográfica por HPLC-DAD

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos compostos em estudo foram: fator de retenção (k), resolução (R_s) e fator de separação (α). Estes parâmetros foram calculados utilizando as equações (1), (2) e (3), que estão descritas nos itens 3.5.1, 3.5.2 e 3.5.3 (COLLINS *et al.*, 2006) Foi utilizada uma solução da mistura na concentração de 2,5 mg L⁻¹. O tempo de saída do analito não retido (t_M) foi tomado como o tempo de saída da acetonitrila.

4.10 Validação dos métodos

Uma vez definidas as melhores condições para determinação dos agrotóxicos, foi feita a validação da metodologia. Neste trabalho os parâmetros utilizados para a validação dos métodos analíticos foram: curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão (recuperação) e precisão (repetitividade e precisão intermediária) (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2003).

4.10.1 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas para os agrotóxicos foram construídas com um total de 10 níveis de concentração, 0,05; 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg L⁻¹ para o HPLC-DAD e de 7 níveis 0,001; 0,005, 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 a 1,0 mg L⁻¹ para o LC-ESI-MS/MS. Cada solução foi injetada três vezes nos dois equipamentos, e o gráfico da área do pico *versus* a concentração foi obtido com auxílio dos softwares dos equipamentos. A partir das curvas analíticas foi avaliada a linearidade do método, avaliando o coeficiente de correlação linear (*r*).

4.10.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Foi medido com auxílio de um paquímetro, a altura do ruído próxima ao tempo de retenção dos compostos e determinada a concentração que corresponde a 3 e 10 vezes essa altura. Para o HPLC-DAD os limites foram obtidos com base na Figura 11.

No LC-ESI-MS/MS a relação sinal/ruído foi calculada pelo software do equipamento.

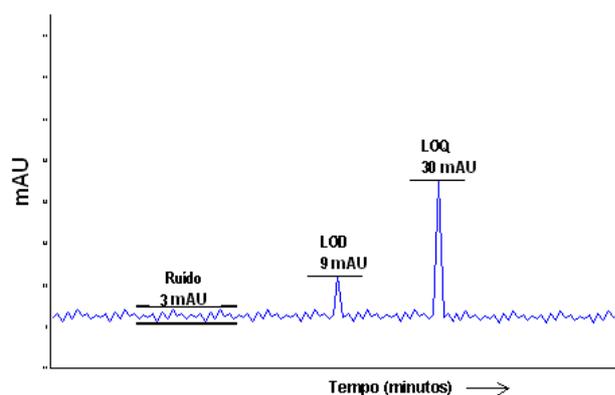


Figura 11 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ

4.10.3 Precisão

O estudo da precisão do instrumento, em termos de repetitividade (RSD_r), foi realizado para os dois instrumentos; efetuando seis injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema cromatográfico.

A precisão do instrumento, em termos de precisão intermediária (RSD_{pi}), foi realizada apenas para o HPLC-DAD, efetuando seis injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema cromatográfico em dias diferentes.

A precisão do método em termos de repetitividade, realizada para o HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS, foi obtida através da extração e análise de amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e cada extrato injetado três vezes. Para avaliar a precisão intermediária do método para o HPLC-DAD, diferentes ensaios e operadores foram usados, para níveis de fortificação de 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O valor numérico para avaliar a precisão, $RSD\%$, foi calculado através da equação (5).

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

x_m = média de uma série de medidas (replicatas).

4.10.4 Exatidão

A recuperação foi determinada em quatro concentrações para o HPLC-DAD e em três concentrações para o LC-ESI-MS/MS, de acordo com as recomendações do ICH e da ANVISA (BRASIL, 2003), pela adição de concentrações conhecidas do padrão analítico no início do processo.

Para os ensaios de recuperação empregando SPE e HPLC-DAD e SPE e LC-ESI-MS/MS foram utilizadas amostras de água conforme descrito no item 4.4. As amostras foram fortificadas com adição de pequenos volumes de uma solução trabalho contendo a mistura dos agrotóxicos avaliados no estudo, a fim de obter os níveis de fortificação desejados. Para o HPLC-DAD os níveis de fortificação foram 0,2; 1,25; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para o LC-ESI-MS/MS 0,004; 0,04 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para os ensaios de recuperação empregando DLLME e LC-ESI-MS/MS foram utilizadas amostras de água conforme descrito no item 4.4. Os níveis de fortificação foram 0,02; 0,1; 0,2 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os cálculos foram feitos de acordo com a Equação (6), onde é expressa em porcentagem de recuperação.

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (6)$$

onde:

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = concentração da fortificação

4.11 Aplicação do método desenvolvido em águas subterrâneas

4.11.1 Poços amostrados na região de estudo

Foi realizado um levantamento dos poços existentes na localidade rural da Quitéria, situada no município de Rio Grande, RS. Foram identificados um total de 28 poços no local. Em todas as casas foi feito uma entrevista para coletar

informações a respeito das espécies cultivadas, agrotóxicos utilizados, e informações sobre a profundidade dos poços (Apêndice A). Na Tabela 5 estão listados os tipos de poços e suas profundidades.

Para fins de padronização foram utilizados dois nomes para os tipos de poços encontrados: cacimba e tubulares. Os poços tipo cacimba são os abertos; e os tubulares os que são perfurados (rasos ou fundos) e puxam água com o auxílio de bombas (Figura 12).

Tabela 5 – Resultado do levantamento de poços na região da Quitéria, Rio Grande, em 2007

Número de Identificação	Tipo de poço	Uso	Profundidade (m)	Número de Identificação	Tipo de poço	Uso	Profundidade (m)
1	tubular	Geral	37	15	cacimba	Geral	9,5
2	cacimba	Casa	4	16	cacimba	Casa	6
3	tubular	Geral	35	17	tubular	Casa	3,5
4	tubular	Geral	9	18	tubular	Geral	7
5	cacimba	Geral	4	19	tubular	Geral	31
6	tubular	Geral	5,5	20	tubular	Geral	29
7	tubular	Geral	11	21	tubular	Geral	20
8	tubular	Geral	12	22	tubular	Geral	30
9	cacimba	Geral	5,5	23	tubular	Geral	8
10	cacimba	Geral	20	24	cacimba	Geral	2
11	tubular	Geral	10	25	cacimba	Geral	6 a 7
12	tubular	Geral	6	26	tubular	Geral	34,5
13	cacimba	Geral	3	27	cacimba	Geral	2,5
14	cacimba	Casa	6	28	cacimba	Geral	6

Pode ser observada uma grande variação na profundidade dos poços. Em todas as casas a água do poço é utilizada para o abastecimento da casa, e em alguns casos, para o uso geral como durante o plantio.



Figura 12 – Foto dos dois diferentes tipos de poços encontrados na região de estudo: cacimba (esquerda) e tubular (direita)

Os poços onde foram coletadas as amostras de água estão apresentados na Tabela 6. Os pontos de amostragem foram definidos procurando abranger diferentes profundidades, para identificar se haveria diferenças nos resultados encontrados.

Tabela 6 – Poços escolhidos para a coleta das amostras

Número de Identificação	Poço	Tipo de poço	Profundidade (m)
1	1	tubular	37
4	2	tubular	9
10	3	cacimba	20
12	4	tubular	6
17	5	tubular	3,5
18	6	tubular	7
19	7	tubular	31
20	8	tubular	29
27	9	cacimba	2,5
26	10	tubular	34,5

4.11.2 Escolha dos agrotóxicos em estudo

Os agrotóxicos incluídos nesse estudo foram selecionados devido ao seu vasto uso em áreas agrícolas e, por serem utilizados na área de estudo. De acordo com CABRERA *et al.* (2008) eles são utilizados na região sul do Rio Grande do Sul e o estudo deles neste compartimento é indicado. Outro fator de extrema relevância, é que de acordo com US EPA (BARCELO; HENNION, 1997), os compostos demonstram potencial para atingir as águas subterrâneas (Tabela 7).

Tabela 7 - Risco de contaminação da água subterrâneas baseada em critérios estabelecidas pela U.S. EPA

Agrotóxicos	Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos em estudo					Resultados
	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	K _{oc} (cm ³ g ⁻¹)	K _H (Pa m ³ mol ⁻¹)	t _{1/2} solo (d)	t _{1/2} água (d)	
2,4-D	20031 (pH 5)	39	1,3.10 ⁻⁵	8	7,5	PC
Carbofurano	320	22	5,1.10 ⁻⁴	30-60	121 pH 7	PC
Clomazona	1100	150-560	4,2.10 ⁻³	30-135	>30	PC
Tebuconazol	36	4300	1.10 ⁻⁵	430	7-28	PC

Fonte: CABRERA *et al.*, 2008

PC = provável contaminante de águas subterrâneas

4.11.3 Amostragem

A zona de amostragem foi localizada numa área agrícola no município de Rio Grande, RS, Brasil (Figura 13).

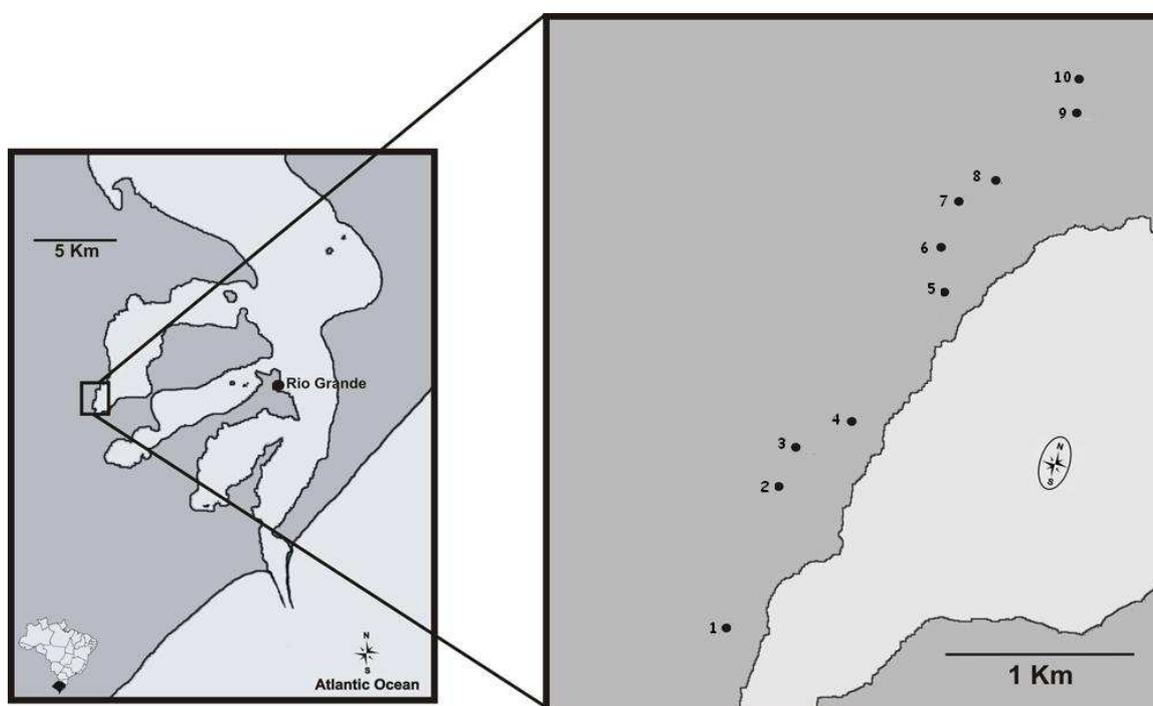


Figura 13 - Zona de amostragem e pontos de coleta

O método desenvolvido foi aplicado para determinações dos agrotóxicos em águas subterrâneas. As amostras foram provenientes da região da Quitéria, onde a atividade agrícola é intensa, sendo cultivados principalmente hortifrutigranjeiros. De

2007 a 2008, amostras de águas de poços com profundidade entre 2,5 e 37 m foram analisadas para o carbofurano, 2,4-D, clomazona e tebuconazol. Em cada poço, a amostragem foi realizada uma vez por mês durante o período de um ano.

As amostras foram coletadas, armazenadas em frascos de vidro âmbar com capacidade de 1 L e transportadas até o laboratório em caixas de isopor à 4 °C e ao abrigo da luz. As amostradas foram filtradas em filtro de acetato de celulose 0,45 µm e extraídas pela SPE, o que aconteceu no mesmo dia da coleta. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

O armazenamento das amostras, necessário devido ao grande número de amostras coletadas por dia, foi feito diretamente nos cartuchos de SPE, os quais foram envoltos em papel alumínio e armazenados em freezer a -18 °C até o momento da quantificação por HPLC-DAD, as quais foram realizadas em no máximo uma semana.

O armazenamento das amostras pode ser realizado de diversas formas, entre elas em cartuchos de SPE. A estabilidade dos compostos vai depender das propriedades físico-químicas dos compostos e do material do cartucho (BARCELO; HENNION, 1997). Estudo da estabilidade de agrotóxicos armazenados em cartuchos com C18, foi realizado em trabalho realizado por Colina *et al.* (1997). Foi comprovada a estabilidade de agrotóxicos de diferentes classes por períodos de até 30 dias.

As amostras nas quais foram detectados agrotóxicos, foram analisadas por LC-ESI-MS/MS para a confirmação da identidade dos compostos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo da extração em fase sólida para os agrotóxicos

Para a pré-concentração dos agrotóxicos foram testados diferentes sorventes – C18 e polimérico (Strata X). Os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Recuperações obtidas utilizando diferentes cartuchos de fase estacionária (C18 - Strata® C18 e polimérico - Strata®-X)

Agrotóxicos	Recuperação (%)*	
	C18	Polimérico
Carbofurano	95,0 ± 3,6	129,3 ± 2,8
2,4-D	52,0 ± 2,4	34,5 ± 7,9
Clomazona	113,0 ± 6,0	15,1 ± 17,2
Tebuconazol	116,0 ± 5,3	56,1 ± 24,0

*Nível de fortificação: 5 µg L⁻¹; amostra: pH ajustado em 3,0; 250 mL de água da torneira; volume de eluição 1 mL (2 x 500 µL) metanol

O sorvente C18 apresentou recuperações para os agrotóxicos próximos a faixa entre 70-120% (RIBANI *et al.*, 2004). Trabalhos realizados por ZANELLA *et al.* (2003) e RODRIGUES *et al.* (2007) também apresentaram boas recuperações para estes compostos com o uso de C18. PICHON (1998) indica o uso do sorvente C18 para agrotóxicos com log K_{ow}>2,5. Dos compostos em estudo, com exceção do carbofurano, todos possuem valores de log K_{ow} maior que 2,5. Por essas razões, o sorvente C18 foi o escolhido para a pré-concentração da mistura dos agrotóxicos em água.

Metanol foi utilizado como eluente, passando 2 alíquotas de 500 µL, pois estes compostos apresentam boa solubilidade neste solvente, sendo necessário um pequeno volume para eluição, sem necessidade de evaporação do extrato para pré-concentração.

Agrotóxicos com caráter ácido, como o 2,4-D são normalmente determinados em amostras com valores de pH entre 2,0 e 3,0 (PALMA *et al.*, 2004; TRAN *et al.*, 2007). Quando o pH da amostra torna-se menor, os compostos ácidos passam a ter maiores interações com o sorvente e por este motivo tendem a ficarem mais retidos

no sorvente. Por outro lado, quando as amostras de águas são acidificadas a baixos valores de pH surgem nos cromatogramas picos interferentes, devido a eluição dos ácidos húmicos e fúlvicos. Com pH ajustado em 3,0 foram obtidas recuperações entre 60 e 100% para o 2,4-D, sendo esse o valor de pH utilizado, para garantir a retenção dos compostos mais ionizáveis. Em trabalho realizado por ZANELLA *et al.* (2003) o uso de água acidificada a pH 3,0 demonstrou bons valores de recuperação, entre 86 e 105%, para o clomazone e 2,4-D, também analisados neste estudo.

O volume de *breakthrough* pode ser baixo quando os agrotóxicos não são fortemente retidos pelo sorvente e está relacionado com a hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada (SIMPSON; WELLS, 2000). Os compostos em estudo, apresentam valores K_{ow} elevados, ou seja, possuem alta hidrofobicidade; com exceção do composto carbofurano, o qual é menos hidrofóbico ($K_{ow} = 33$). Entretanto os valores de recuperação para este composto, em todos os níveis de fortificação, ficaram entre 66,7 e 101,4%; percebendo então que o volume de *breakthrough* não foi ultrapassado.

No procedimento experimental otimizado para análise dos agrotóxicos em amostras reais o sistema de extração em fase sólida foi condicionado passando 3,0 mL de metanol; 3,0 mL de água ultrapura e 3,0 mL de água ultrapura pH 3,0. Um volume de 250 mL de água com pH ajustado em 3,0 utilizando uma solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v), foi previamente filtrada em sistema de filtração com membranas de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 μm e percolada através do sorvente à uma vazão de 5,0 mL min^{-1} , sob vácuo de 20 mmHg. Após pré-concentração foi feito vácuo por mais 10 min. Os analitos ficaram então armazenados nos cartuchos e foram eluídos conforme a seqüência das análises. A eluição do analito retido no sorvente C18 foi feita com 1,0 mL (2 x 500 μL) de metanol puro, sendo ajustado o volume quando necessário, resultando em um fator de pré-concentração de 250 vezes. O eluato foi recolhido e analisado por HPLC-DAD nas condições cromatográficas otimizadas (Tabela 13), e após por LC-ESI-MS/MS (Tabela 14).

5.2 Estudo da microextração líquido-líquido dispersiva para os agrotóxicos

Os estudos foram desenvolvidos para determinar quais os parâmetros envolvidos na extração (tipo e volume do solvente extrator e do dispersor, tempo de extração, força iônica, pH) são determinantes na extração dos agrotóxicos em amostras de águas.

5.2.1 Seleção do solvente extrator

Nos ensaios realizados com CH_2Cl_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ e CHCl_3 como solventes extratores combinados com todos os solventes dispersores testados, não foi observado a formação de duas fases quando injetados em 5 mL de uma solução aquosa. Com CCl_4 , $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ e C_2Cl_4 como solventes extratores, um sistema com duas fases foi formado e a fase sedimentada pode ser removida facilmente com o auxílio de uma microseringa.

Tabela 9 – Densidade e Solubilidade em água dos solventes extratores

Solvente	Densidade (g/cm^3)	Solubilidade em água ($\text{g}/100\text{mL}$)
1,2 diclorobenzeno	1,31	0,015
Tetracloroeto de Carbono	1,59	0,8
tetracloroetileno	1,63	0,0165

Os resultados revelaram que o CCl_4 tem a maior eficiência de extração, variando de (50,4 – 73,1%) em comparação com o $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}_2$ (9,4 - 18,9%) e C_2Cl_4 (13,0 – 39,4%) (Figura 14). Provavelmente, isso deve ao fato de o CCl_4 apresentar alta densidade e maior solubilidade em água (Tabela 9). Embora, a principal característica do solvente extrator seja que ele deve ser imiscível em água; devido as características polares dos analitos, uma certa solubilidade em água favoreceu a extração dos compostos. Por isso, CCl_4 foi selecionado como solvente extrator para as análises.

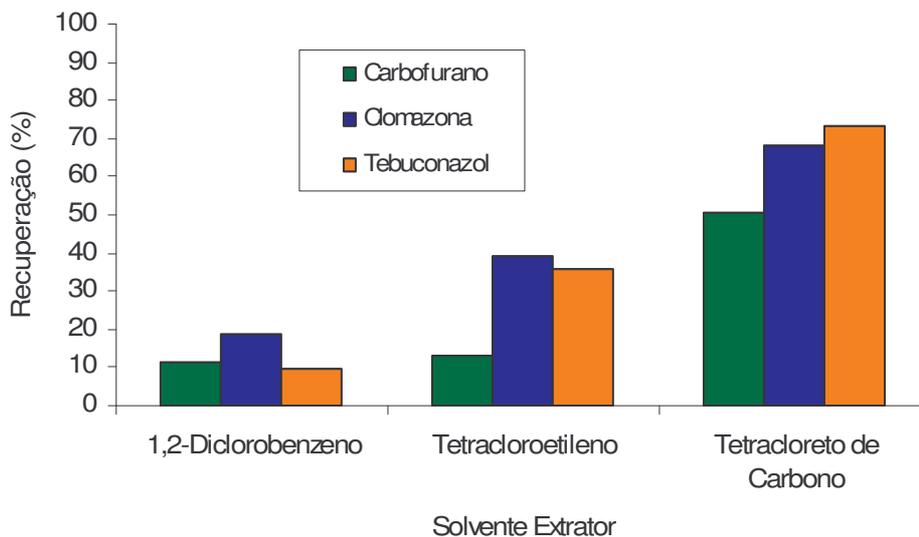


Figura 14 – Efeito dos diferentes solventes extratores na recuperação de agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; volume do solvente extrator, 40 μ L; volume do solvente dispersor, 1,5 mL de acetonitrila

5.2.2 Escolha do solvente dispersor

Com CCl_4 como solvente extrator, um sistema com duas fases foi formado com os três solventes dispersores testados e as recuperações foram maiores para todos os compostos com acetonitrila como dispersor (Figura 15). Em outros trabalhos, como os realizados por Liu *et al.* (2009) e Fu *et al.* (2009), a acetonitrila também foi o solvente dispersor utilizado para extração de agrotóxicos em amostras de água. Por esta razão tetracloreto de carbono e acetonitrila foram escolhidos como solventes extratores e dispersores, respectivamente.

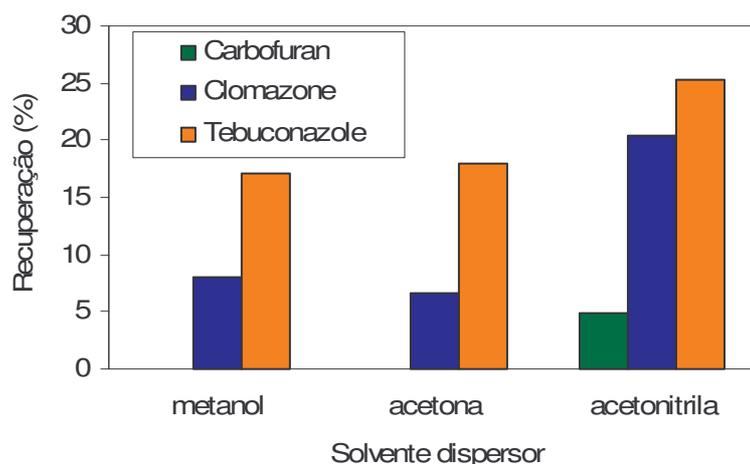


Figura 15 - Efeito do solvente dispersor na recuperação dos agrotóxicos. Condição de extração: volume de amostra, 5 mL; volume de solvente dispersor, 1,5 mL; solvente extrator, 40 μL CCl_4

5.2.3 Seleção do volume do solvente extrator

Para a seleção do volume do solvente extrator, soluções contendo diferentes volumes de CCl_4 foram submetidos ao procedimento. Na Figura 16 pode-se observar o gráfico da recuperação *versus* o volume de solvente extrator (CCl_4) e na Figura 17 a curva do volume de fase sedimentada *versus* o volume do solvente extrator (CCl_4).

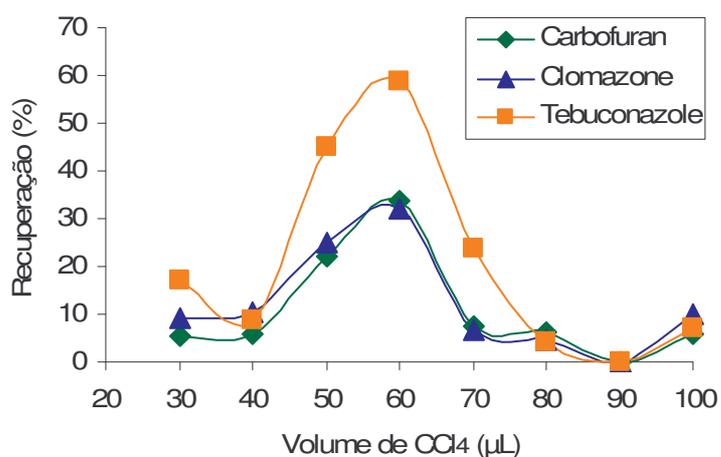


Figura 16 - Efeito do volume de solvente extrator (CCl_4) na recuperação. Condições de extração: volume de amostra, 5,0 mL; volume de solvente dispersor (acetoneitrila), 2,0 mL

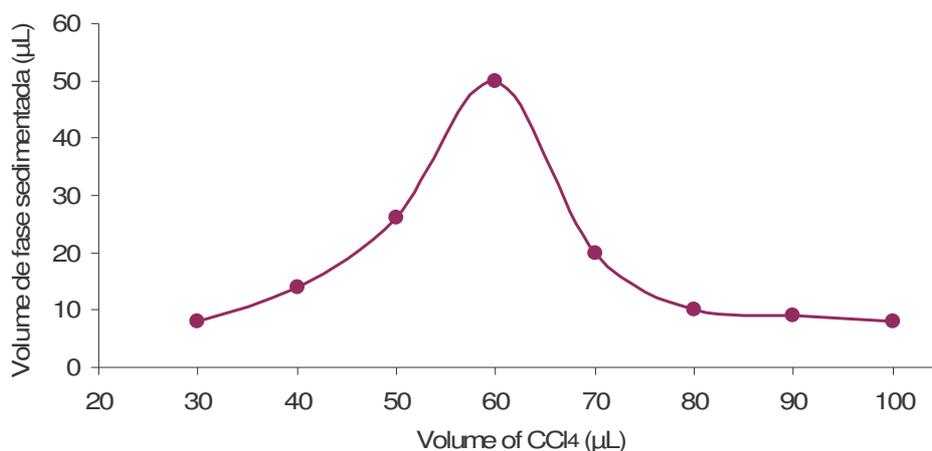


Figura 17 - Efeito do volume de CCl₄ no volume de fase sedimentada. Condições de extração, idem Figura 16

Com o uso de volumes menores que 30 µL de tetracloreto de carbono, não foi observada a formação de duas fases. Aumentando o volume de CCl₄ de 30,0 a 60,0 µL, o volume de fase sedimentada aumentou de 8,0 para 50,0 µL, e após, o volume diminuiu até 8 µL com um volume de 100 µL de CCl₄.

De acordo com a Figura 16, foi observado que a eficiência de extração aumentou com o aumento do volume de CCl₄ até 60 µL, onde foram obtidos maiores valores de recuperação para os analitos. Esse comportamento pode ser explicado devido ao aumento da partição do analito e da acetonitrila no CCl₄.

Um decréscimo foi observado em valores acima de 60 µL provavelmente devido ao decréscimo da proporção entre o solvente dispersor e o solvente extrator. O decréscimo da proporção diminuiu a formação do número de gotas disponíveis para a extração, deste modo, diminuindo a eficiência de extração.

Baseado nestas observações, um volume de 60 µL foi utilizado.

5.2.4 Escolha do volume de solvente dispersor

Em volumes pequenos de dispersor a formação das microgotas pode não ser efetiva, e, adicionalmente, a falta de disponibilidade de acetonitrila para a partição na fase do CCl₄ pode ocorrer. Ambos fenômenos vão diminuir a eficiência de extração. Quando o volume de solvente dispersor aumenta, dois processos competitivos podem ocorrer. Um é o aumento na solubilidade dos analitos na fase aquosa,

conduzindo a uma diminuição da partição dos compostos polares nas microgotas do extrator. Ao contrário, um aumento no volume da fase de acetonitrila particionada conduz a um aumento na eficiência de extração. Os resultados obtidos para escolha do solvente dispersor estão ilustrados na Figura 18. Aumentando o volume de acetonitrila, as recuperações foram maiores com um volume de 2,0 mL. Pelos resultados obtidos, 2,0 mL foi escolhido como o volume ótimo do solvente dispersor.

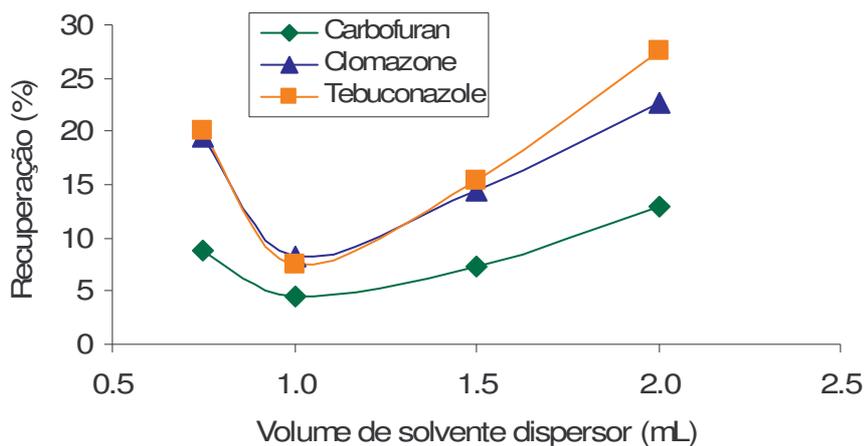


Figura 18 - Efeito do volume de solvente dispersor na recuperação dos agrotóxicos. Condições de extração: volume de amostra, 5 mL; solvente dispersor, acetonitrila; volume de solvente extrator, 40 μ L de CCl_4

5.2.5 Efeito do pH

Na Figura 19 pode ser observado as recuperações obtidas em função de diferentes valores de pH. Melhores eficiências de extração para todos os compostos foram observadas em pH 2,0. Em condições de baixos valores de pH, a forma neutra dos analitos é favorecida, e esta forma dos compostos orgânicos têm maior tendência de extração para o solvente orgânico que a forma ionizada. Então, pela adição de H_3PO_4 na solução os analitos são convertidos em sua formas moleculares, e suas extrações facilitadas.

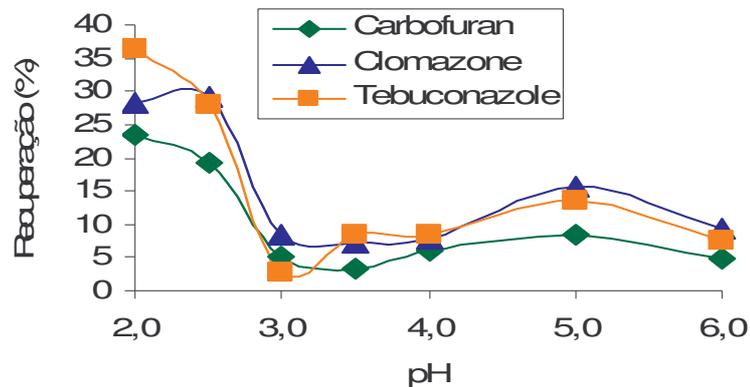


Figura 19 - Efeito do pH na extração dos compostos expressa em termos de recuperação. Condições de extração: volume de amostra, 5,0 mL; solvente dispersor (acetonitrila) 2,0 mL e solvente extrator (CCl₄) 60 µL

5.2.6 Efeito da velocidade de centrifugação

Pode ser observado (Figura 20) que o valor de 2000 rpm é suficiente para separar as fases, com boa extração dos analitos. Em velocidades maiores que 2000 rpm os valores de recuperação decresceram, provavelmente devido à redissolução dos analitos na fase aquosa.

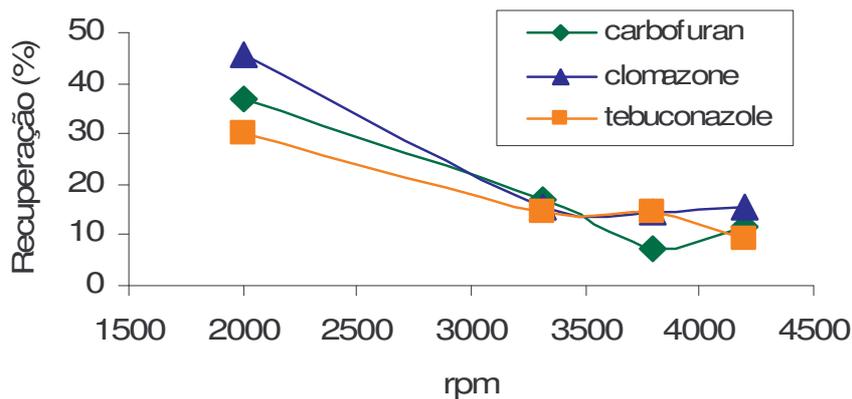


Figura 20 - Efeito da velocidade de centrifugação na recuperação dos agrotóxicos. Condições de extração, idem Figura 15

5.2.7 Outros parâmetros

O efeito do tempo de extração dos analitos na DLLME não mostrou influência significativa na recuperação dos analitos entre 0 e 10 min, indicando que a extração na DLLME ocorre em poucos segundos, o que foi observado também pelos trabalhos realizados por REZAEI *et al.*, 2006 e NAGARAJU; HUANG, 2007, para a extração de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e triazinas, respectivamente. Os autores evidenciam que a área superficial entre o solvente extrator e a fase aquosa é extremamente grande, o que facilita a transferência dos analitos da fase aquosa (amostra) para a fase extratora.

A adição de NaCl aumentou o volume de fase sedimentada, diminuindo o fator de enriquecimento dos compostos, mas os valores de recuperação permaneceram constante, e por esta razão, não foi utilizada a adição de sal nos experimentos.

5.2.8 Procedimento experimental otimizado para a extração dos agrotóxicos por DLLME

O método foi baseado na injeção rápida, com auxílio de uma seringa, de um mistura apropriada dos solventes extrator (60 μL de CCl_4) e dispersor (2,0 mL acetonitrila) numa amostra aquosa (5,0 mL) acidificada a pH 2,0 com H_3PO_4 (1:1, v/v). No momento da mistura, uma solução turva é formada onde as microgotas do solvente extrator são dispersadas na fase aquosa. Após centrifugação, 5 minutos a 2000 rpm, as microgotas são sedimentadas no fundo do tubo cônico ($50,0 \pm 2,0 \mu\text{L}$). Como o tetracloreto de carbono, como solvente da amostra não possui um bom comportamento cromatográfico nas condições de análise deste estudo, a fase sedimentada foi então removida com auxílio de uma seringa, transferida para um frasco onde foi evaporada com auxílio de nitrogênio e redissolvida em metanol. O volume utilizado para redissolução foi de 100 μL , com o objetivo de se obter maior fatores de pré-concentração.

5.2.9 Avaliação do desempenho do método

Para avaliar o desempenho do método estabelecido, ensaios de recuperação foram feitos pela fortificação de amostras de águas com a mistura dos agrotóxicos. Para cada nível de concentração, foram realizadas triplicatas. Os resultados são mostrados na Tabela 10. As recuperações ficaram entre 62,7 e 120,0% para os níveis de 0,02 a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, e os valores de RSD variaram entre 1,9 e 9,1%, mostrando que a DLLME pode ser aplicada antes de análises cromatográficas, permitindo a quantificação dos agrotóxicos num nível de até 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$, atendendo os limites estipulados pelas legislações mais rígidas.

Tabela 10 - Recuperação para os agrotóxicos em diferentes níveis obtidos por DLLME

Agrotóxicos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	RSD (%)
Carbofurano	0,02	120,0	7,2
	0,1	74,8	2,8
	0,2	77,4	9,1
	2,0	62,7	1,9
Clomazona	0,02	75,1	6,1
	0,1	73,4	5,7
	0,2	76,2	5,7
	2,0	79,8	3,2
Tebuconazol	0,02	100,6	5,8
	0,1	82,3	4,7
	0,2	78,0	7,8
	2,0	63,7	3,1

5.3 Comparação entre as técnicas de extração DLLME e SPE

Foi feito um comparativo entre os métodos otimizados, SPE e LC-ESI-MS/MS e DLLME e LC-ESI-MS/MS.

A Tabela 11 ilustra algumas diferenças entre os métodos. Podemos observar que a DLLME possui algumas vantagens como menor tempo de extração e menor

consumo de volume de amostra, e embora a SPE alcance limites de quantificação menores que a DLLME, esta, quando acoplada com LC-ESI-MS/MS atinge os limites estabelecidos pela rígida legislação europeia. Em termos de recuperação, os métodos apresentaram valores, na mesma faixa.

Tabela 11 - Comparação entre a DLLME e a SPE para determinação dos agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol

Método	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R%	RSD (%)	Tempo de extração (min)	Volume de amostra (mL)	Volume final (μL)
SPE	0,004	66,94 – 108,9	1,0 – 20,7	60	250,0	1000
DLLME	0,02	62,7 – 120,0	1,9 – 11,0	15	5,0	100

5.4 Condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos por HPLC-DAD

5.4.1 Composição da fase móvel

Na Tabela 12, pode ser visualizado as diferentes proporções de fase móvel testadas e as influências no tempo de retenção dos compostos. Todas as análises foram feitas com modo de eluição isocrático.

Dentre as composições apresentadas na Tabela 12, a que forneceu melhor separação dos analitos foi a mistura acetonitrila:água (52:48, v/v), acidificada a pH 3,0 com solução aquosa de ácido fosfórico (1:1, v/v).

A acidificação da fase móvel se faz necessária, pois os compostos mais ácidos como o 2,4-D têm diferentes interações entre a FE e a FM de acordo com o valor de pH. Com fases móveis em pH baixos, os compostos ácidos têm maior interação com a FE, ficando mais tempo retidos, pois em FM neutras estes compostos praticamente não têm interação com a FE, e acabam eluindo rapidamente.

Após a escolha da fase móvel, foi feita uma programação de vazão, o que contribuiu para uma melhor separação (resolução) e um menor tempo de retenção. A vazão começou com $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ até 8 min, aumentando para $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ até 14

min e voltando para $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ permanecendo até 15 min. Esta programação de vazão permitiu a melhor separação num tempo total de 15 min.

Tabela 12 – Composições de fase móvel e vazões testadas na otimização da separação dos agrotóxicos para o HPLC-DAD e as influências nos parâmetros cromatográficos k , R_s e α

Proporção dos solventes utilizados			Vazão (mL min^{-1})	Tempo de retenção dos agrotóxicos				Observações
MEOH	ACN	Água ultrapura pH 3,0		Carbofurano	2,4-D	Clomazona	Tebuconazol	
70		30	0,8	3,55	4,84	6,56	14,81	Compostos eluindo muito rápido, valores de k menor que 0,5 para o carbofurano
65		35	0,8	5,8	9,1	10,19	Mais de 30 min	Tempo de corrida muito longo
	70	30	0,8	4,31	4,41	5,32	6,54	Co-eluição dos compostos Carbofurano e 2,4-D, valores do α menores ou igual a 1.
	60	40	0,8	5,18	5,53	6,87	9,31	
	65	35	0,8	4,50	4,93	5,94	7,68	
	56	44	0,8	5,69	6,27	7,90	11,30	α não ideal, picos muito próximos.
	52	48	0,8	6,48	7,36	9,45	14,52	Boa R_s entre os picos, mas tempo entre os dois últimos compostos grande.
	52	48	0,8 até 8 min, 1,2 até 14 min e 0,8 até 15 min	6,56	7,48	9,49	13,50	Diminuição do tempo entre os dois últimos picos, diminuindo o tempo total de análise

5.4.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção

Nas condições cromatográficas otimizadas, o perfil dos espectros de absorção molecular dos agrotóxicos, injetados individualmente no sistema HPLC-DAD na concentração $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, pode ser observado na Figura 21.

Os espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para soluções individuais dos agrotóxicos foram utilizados para confirmar a identidade dos analitos e foram comparados os espectros obtidos para os padrões e os espectros obtidos para as amostras, na faixa de 190 a 400 nm.

Com base nos espectros, foi escolhido um comprimento de onda, no qual foram quantificados os agrotóxicos em cada análise. Como pode ser observado na Figura 21, todos os compostos absorvem com alta intensidade no comprimento de onda de 220,3 nm e o composto que possui menor intensidade, o tebuconazol, tem sua absorção máxima neste comprimento de onda, por isso, este foi o comprimento de onda escolhido para a quantificação dos analitos.

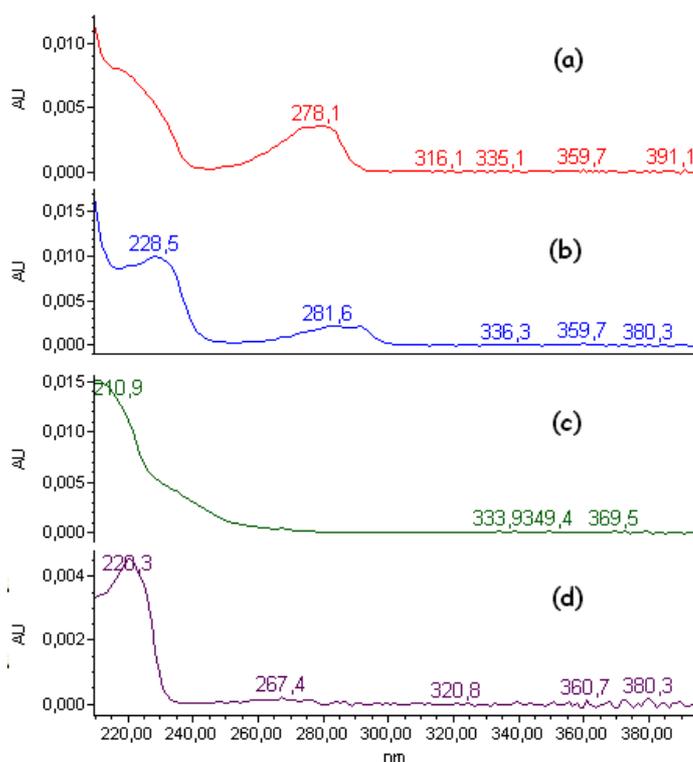


Figura 21 - Espectros de absorção obtidos por HPLC-DAD de uma solução analítica contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cada agrotóxico: (a) carbofurano, (b) 2,4-D , (c) clomazona e (d) tebuconazol

As melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e quantificação dos agrotóxicos no sistema HPLC-DAD estão demonstradas na Tabela 13.

Tabela 13 – Condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-DAD

Coluna Analítica	Phenomenex Hyperclone BDS C18 5 μ m 130 Å (250 x 4,6 mm d.i.)
Fase móvel	Acetonitrila:Água pH 3,0 (52:48, v/v), acidificada com H ₃ PO ₄ (1:1, v/v) a pH 3,0
Vazão da fase móvel	0,8 mL min ⁻¹ até 8 min, 1,2 mL min ⁻¹ em 14 min e 0,8 mL min ⁻¹ em 15 min
Volume de injeção	20 μ L
Detector	DAD
Comprimento de onda para quantificação	220,3 nm
Identificação	t _R e espectro de absorção

Nestas condições, o perfil de um cromatograma de separação dos compostos em estudo pode ser observado na Figura 22, de uma solução contendo 2,5 mg L⁻¹ da mistura dos compostos.

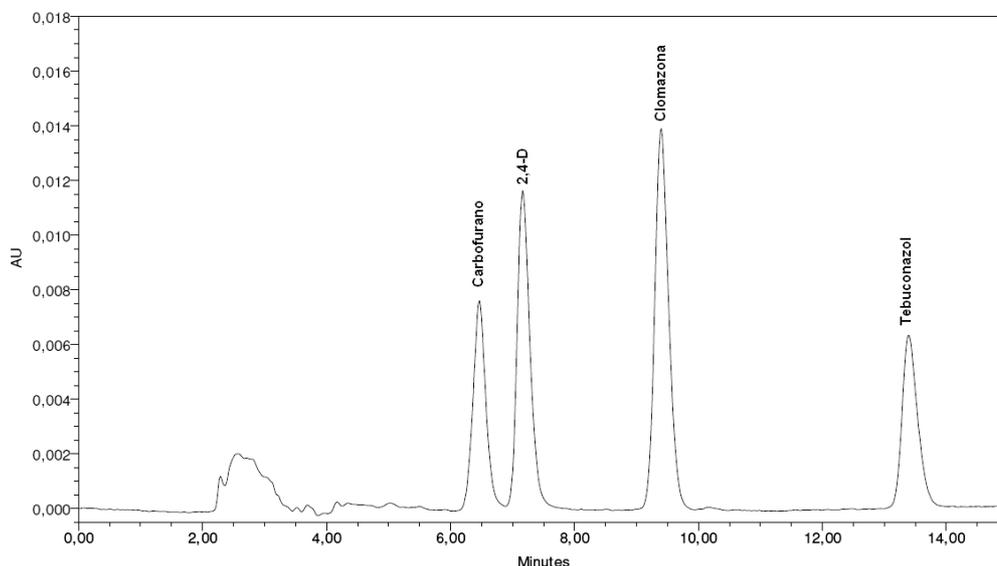


Figura 22 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD a 220,3 nm, a partir de uma solução analítica 2,5 mg L⁻¹ de carbofurano, 2,4-D , clomazona e tebuconazol

5.5 Condições cromatográficas para análise dos agrotóxicos por LC-ESI-MS/MS

A fase móvel utilizada consistiu dos mesmos solventes utilizados no sistema HPLC-DAD, acetonitrila: água (52:48, v/v) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O uso de fases móveis acidificadas é recomendado para a análise de alguns compostos, para isso, compostos voláteis como acetato de amônio, formiato de amônio ou ácido fórmico são preferidos como aditivos da fase móvel (PETROVIK *et al.*, 2005). Com esse objetivo o ácido fórmico foi adicionado na fase móvel para aumentar a ionização das moléculas que possuem íons positivos, e, desse modo, melhorar a detecção destas espécies (QUEIROZ, 2001).

A vazão utilizada foi de 0,4 mL min⁻¹, resultando num tempo total de análise de 3 minutos.

Esta proporção de fase móvel, mesmo em diferentes condições de coluna cromatográfica e vazão, proporcionou boa separação dos compostos em tempo de corrida rápido.

Na Tabela 14 estão as condições cromatográficas otimizadas para o LC-ESI-MS/MS. Os cromatogramas totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*) obtidos no modo positivo e negativo, para uma solução analítica contendo os agrotóxicos numa concentração de 1,0 mg L⁻¹ podem ser observados na Figura 23.

Tabela 14 – Condições cromatográficas otimizadas para o LC-ESI-MS/MS

Coluna Analítica	XTerra® MS C18 3,5 µm 144 Å (50 × 3 mm d.i.)
Fase móvel	Acetonitrila:Água (52:48, v/v), acidificadas com ácido fórmico 0,1% (v/v)
Vazão da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Identificação	t _R e as transições monitoradas
Fonte de ionização	ESI
Detector	MS/MS

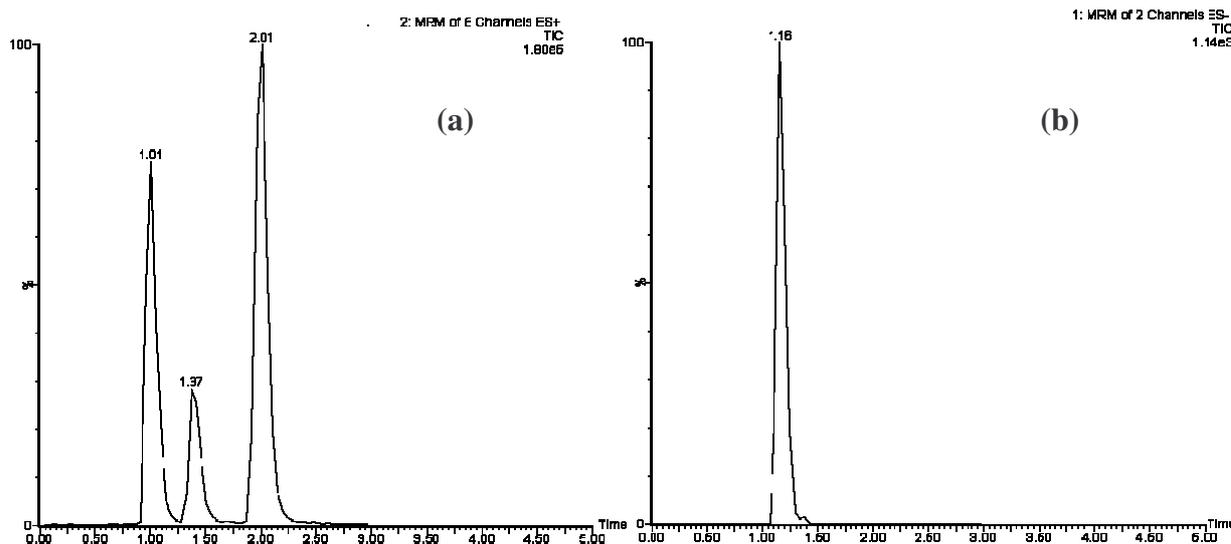


Figura 23 – Cromatograma total obtido para uma solução analítica contendo a mistura dos agrotóxicos (a) no modo ESI+ (carbofurano, $t_R = 1,01$; clomazona, $t_R = 1,37$ e tebuconazol, $t_R = 2,01$) e (b) no modo ESI- (2,4-D $t_R = 1,16$)

5.5.1 Condições do sistema de injeção e de detecção

A partir das infusões das soluções individuais dos agrotóxicos numa concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram determinadas as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados.

Foi utilizada fonte de ionização à pressão atmosférica (API) com interface por *electrospray* (ESI). A ESI é a interface mais indicada para compostos neutros ou polares, que podem ser protonados ou deprotonados em condições apropriadas de pH (ARDREY, 2003). Os compostos em estudo são moderadamente polares ($\log K_{ow}$ entre 1,5 e 4,5), e apresentaram alta sensibilidade nas análises com ESI.

Os compostos clomazona, carbofurano e tebuconazol, responderam melhor no modo *electrospray* positivo e o 2,4-D no modo negativo. Fragmentações no modo negativo são mais difíceis, uma vez que é menos comum a fragmentação retirando um próton, do que adicionando um. O composto 2,4-D foi o único que fragmentou melhor no modo negativo, isso se deve provavelmente a presença de grupamentos ácidos, nesse caso, a carboxila (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

Com temperatura da fonte em $120 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura do gás de dessolvatação foi de $350 \text{ }^\circ\text{C}$ e as vazões do gás nitrogênio para dessolvatação da amostra e para o cone da amostra, respectivamente 450 e 50 L h^{-1} .

A análise dos compostos foi realizada numa mesma corrida, sendo a interface *electrospray* programada para mudar o modo de ionização, entre positivo e negativo, durante a corrida cromatográfica.

A Tabela 15 apresenta os agrotóxicos analisados por LC-ESI-MS/MS, modo de ionização ESI+ e ESI-, modo de aquisição MRM, íons precursores e íons produtos e energia de colisão para as duas transições com uma voltagem do capilar de 3,0 kV.

Tabela 15 - Resultados da otimização das condições de análises no espectrômetro de massas para determinação dos agrotóxicos (tempo dwell 0,3 ms)

Agrotóxico	Modo de ionização	Voltagem do cone (V)	Íon precursor (m/z)	Energia de colisão (eV)	Íon produto (m/z)
Carbofurano	ESI +	20	222	25	165
		20	222	25	123
Clomazona	ESI +	30	240	25	125
		26	240	35	219
Tebuconazol	ESI +	40	308	20	70
		33	308	50	88
2,4-D	ESI -	15	219	20	161
		15	219	30	89

Na Figura 24, pode ser observado o espectro de massas para cada um dos compostos, os quais foram obtidos durante a infusão do padrão individual no detector de massas. Isto permitiu selecionar os íons produtos mais estáveis de cada composto.

Para cada composto foram selecionadas duas energias de colisão ótimas com o objetivo de obter duas transições características no modo MRM com boa intensidade. Isto comprova as vantagens de um analisador de massas em série, *tandem*, pois pode fornecer mais de um fragmento característicos para cada composto. A transição mais intensa foi utilizada para a quantificação e a outra para a confirmação dos compostos. A Figura 25 apresenta os cromatogramas no modo MRM, onde foram monitorados apenas as transições utilizadas para a quantificação dos compostos nas condições selecionadas para o sistema LC-ESI-MS/MS.

O 2,4-D foi o composto que apresentou menor intensidade de fragmentação, provavelmente devido a fase móvel utilizada. Para compostos ácidos, a fase móvel

mais recomendada utiliza NH_4OH ou trietilamina (QUEIROZ, 2001). Como a maioria dos compostos analisados respondeu melhor no modo positivo, e nesse caso, a fase móvel recomendada é com uso de ácidos, como por exemplo, o fórmico, optou-se pelo uso de fase móvel acidificada.

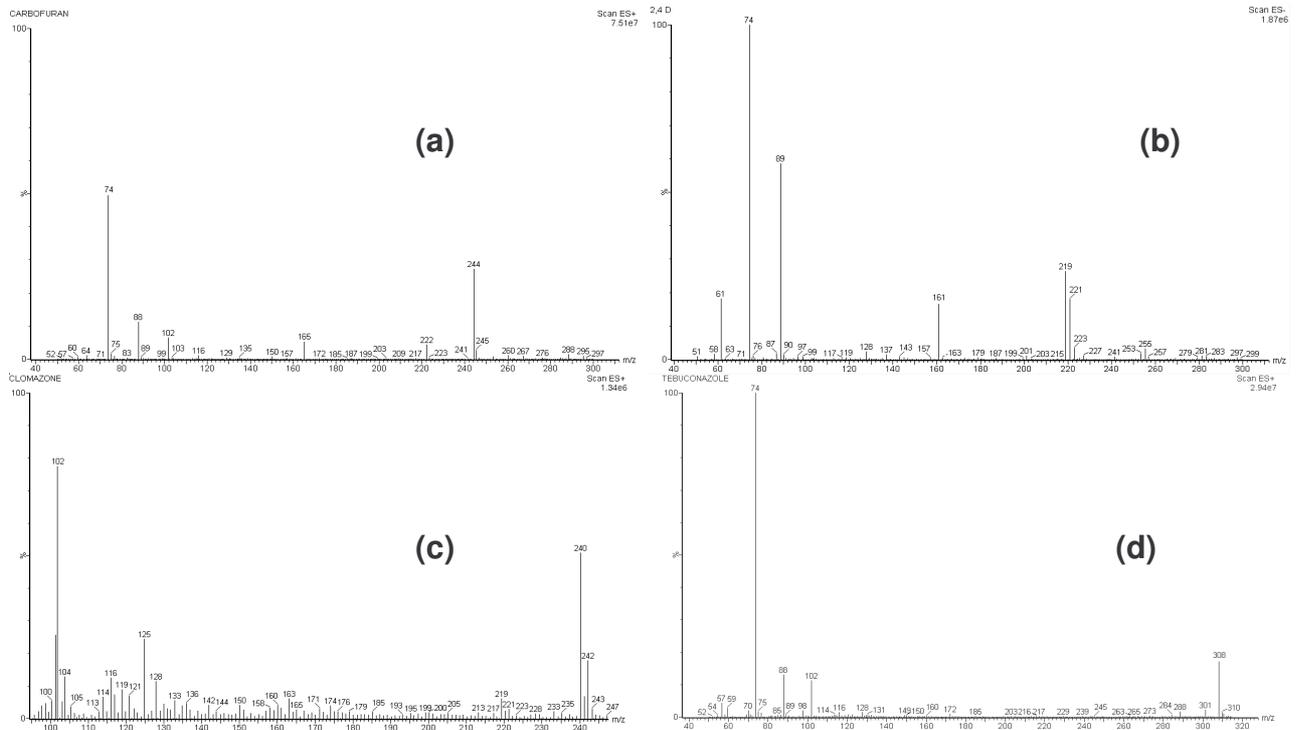


Figura 24 – Espectro de massas para os compostos obtido no modo *full scan*, (a) carbofurano, (b) 2,4-D, (c), clomazona e (d) tebuconazol

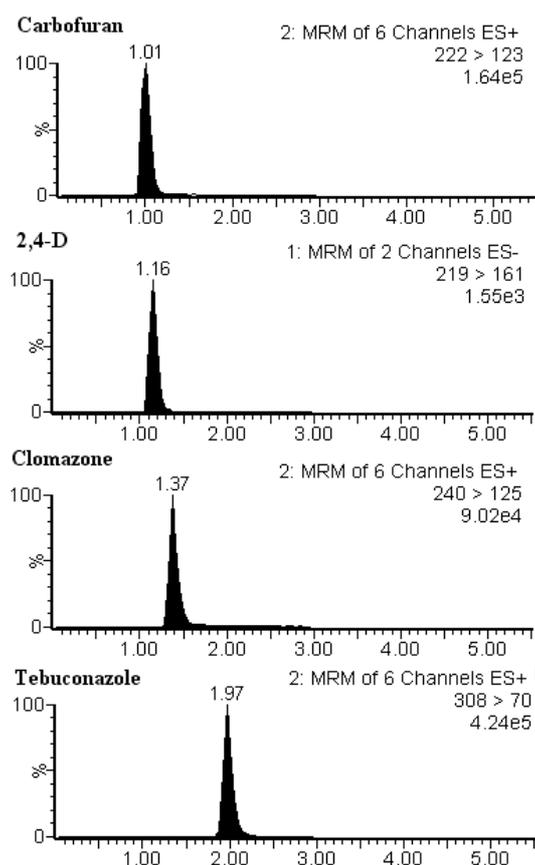


Figura 25 - Cromatograma MRM obtido para uma solução analítica contendo 1,0 mg L⁻¹ dos agrotóxicos: carbofurano (t_R 1,01 min), 2,4-D (t_R 1,16 min), clomazona (t_R 1,37 min) e tebuconazol (t_R 1,97 min)

Devido ao seu alto poder de identificação e sua alta seletividade, o uso do LC-ESI-MS/MS pode eliminar interferências espectrais que ocorrem no DAD em amostras de água e o problema de co-eluição de substâncias encontradas, o que também não é resolvido no DAD, sendo o detector de massas uma ferramenta analítica essencial para confirmação da contaminação das amostras em níveis traços.

5.6 Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros t_R , R_S , k e α foram utilizados para avaliar a separação cromatográfica. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para a mistura dos compostos. O tempo de saída do analito não retido (t_M), nas condições selecionadas, foi de 2,8 min.

Tabela 16 – Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos agrotóxicos em uma solução de concentração de 2,5 mg L⁻¹ nas condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-DAD

Agrotóxico	t _R	k	R _S	α
Carbofurano	6,5	1,32		
			0,84	1,19
2,4-D	7,2	1,57		
			2,5	1,50
Clomazona	9,4	2,36		
			2,3	1,61
Tebuconazol	13,4	3,79		

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 16, pode ser observado que os valores encontrados para o parâmetro k são aceitáveis, uma vez que os intervalos aceitáveis variam entre 0,5 e 20 para múltiplos componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

Para os valores de α obteve-se todos os valores maiores que 1 para todos os pares de compostos, o que é recomendado para separação entre dois picos adjacentes.

Os valores de R_S comprovam uma separação de 100% entre os pares de compostos, já que foram obtidos valores superiores a 1,5, indicando separação completa; com exceção do carbofurano e o 2,4-D onde o valor ficou abaixo do ideal, de acordo com a literatura. No entanto, durante o processo de validação os resultados de precisão para estes compostos não foram afetados, e não ocorreu nenhuma interferência na separação destes dois compostos.

A análise da mistura dos agrotóxicos nas condições determinadas apresenta boa resolução, retenção e seletividade.

5.7 Validação dos métodos analíticos

5.7.1 Curva analítica e linearidade

Os parâmetros de linearidade, obtidos para os agrotóxicos estudados, estão descritos na Tabela 17, para o HPLC-DAD e na Tabela 18, para o LC-ESI-MS/MS.

Tabela 17 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos no sistema HPLC-DAD

Agrotóxicos	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Equação da reta	r
Carbofurano	0,05 – 10,0	$y = 3,75 \cdot 10^4 x + 1,18 \cdot 10^4$	0,9994
2,4-D	0,05 – 10,0	$y = 5,98 \cdot 10^4 x + 5,55 \cdot 10^3$	0,9991
Clomazona	0,05 – 10,0	$y = 7,81 \cdot 10^4 x + 3,53 \cdot 10^3$	0,9993
Tebuconazol	0,05 – 10,0	$y = 3,92 \cdot 10^4 x + 1,77 \cdot 10^3$	0,9995

Tabela 18 - Resultados obtidos para calibração dos agrotóxicos no sistema LC-ESI-MS/MS

Agrotóxico	Faixa linear (µg L ⁻¹)	Equação da reta	r
Carbofurano	1,0 – 1000,0	$y = 175628 x + 66,412$	0,9990
2,4-D	10,0 – 1000,0	$y = 173,058 x - 1,056$	0,9982
Clomazona	1,0 – 1000,0	$y = 109050 x + 61,934$	0,9982
Tebuconazol	1,0 – 1000,0	$y = 191594x + 98,907$	0,9992

Através dos parâmetros obtidos para a construção da curva analítica, no HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS, foi concluído que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo, já que os coeficientes de correlação (r) foram maiores que 0,998. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90.

5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Na Tabela 19 estão listados os valores de limite de detecção e limite de quantificação do instrumento e do método utilizando SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para os agrotóxicos selecionados neste estudo.

Tabela 19 - Resultados de LOD e LOQ, do instrumento e do método, para os agrotóxicos estudados

Agrotóxico	HPLC-DAD				LC-ESI-MS/MS			
	Instrumental ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Método ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Instrumental ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Método (ng L^{-1})	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Carbofurano	17,0	50,0	0,07	0,20	0,3	1,0	1,3	4,0
2,4-D	17,0	50,0	0,07	0,20	3,0	10,0	13,3	40,0
Clomazona	17,0	50,0	0,07	0,20	0,3	1,0	1,3	4,0
Tebuconazol	17,0	50,0	0,07	0,20	0,3	1,0	1,3	4,0

Os valores de LOQ obtidos por HPLC-DAD para os agrotóxicos atendem os limites bastante restritivos como os valores máximos permitidos pela União Européia, que para águas destinadas a tratamento para posterior consumo humano o valor máximo permitido para agrotóxicos individuais é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na legislação brasileira para águas de superfície, o único agrotóxico em estudo que apresenta limites máximos estabelecidos é o 2,4-D. Na Portaria nº 518 o valor máximo permitido para água potável é de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2004), e na Resolução nº 357, o valor máximo permitido para águas doces, enquadrando-a na classe especial, que são aquelas destinadas ao abastecimento para consumo humano com desinfecção, o valor máximo permitido é $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005).

Com relação às águas subterrâneas, os valores de LOQ do método atendem aos VMP e ao LQP tanto para o carbofurano quanto para o 2,4-D.

Portanto, os limites de quantificação para o método desenvolvido atendem as exigências da legislação brasileira e européia, podendo ser empregada para o monitoramento de águas e controle de possíveis contaminações pelos agrotóxicos estudados.

Já os limites obtidos por LC-ESI-MS/MS, são bastante baixos, permitindo a detecção destes compostos em níveis de ng L^{-1} .

Portanto, a utilização dos dois métodos atendem as exigências das legislações. O uso do detector DAD, ainda possui as vantagens de baixo custo e fácil operação comparado ao LC-MS/MS e ao mesmo tempo é um detector seletivo.

5.7.3 Precisão

A precisão foi determinada em termos de repetitividade (RSD_r) e precisão intermediária (RSD_{pi}), e é expressa pelo RSD% das áreas dos padrões após seis injeções. Os resultados para a precisão do instrumento obtidos através das soluções padrões estão na Tabela 20.

Tabela 20 - Precisão instrumental (RSD%) – repetitividade e precisão intermediária para o HPLC-DAD e repetitividade para o LC-ESI-MS/MS

Agrotóxicos	HPLC-DAD						LC-ESI-MS/MS		
	RSD_r (%)			RSD_{pi} (%)			RSD_r (%)		
	c1	c2	c3	c1	c2	c3	c4	c5	c6
Carbofuran	2,0	0,8	2,8	4,7	1,5	2,8	4,5	3,7	10,5
2,4-D	4,6	0,7	1,7	6,2	2,7	4,0	18,0	16,4	7,0
Clomazona	2,3	0,7	3,1	3,6	1,2	3,7	7,1	0,4	9,9
Tebuconazol	2,0	1,5	3,2	6,8	1,8	8,6	9,9	3,5	2,9

c1, c2, c3, c4, c5 e c6 são - 0,625; 2,5; 7,5; 0,005; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ para a mistura dos agrotóxicos .

A repetitividade e a precisão intermediária para o instrumento HPLC-DAD (n=6), para os níveis de concentração 0,625; 2,5 e 7,5 mg L⁻¹ da mistura dos agrotóxicos, ficaram entre 0,7 e 4,6% e 1,2 e 8,6%, respectivamente.

Para o instrumento LC-ESI-MS/MS os valores de repetitividade (n=6), para os níveis de concentração 0,005; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ da mistura dos agrotóxicos, ficaram entre 0,4 e 18,0%. O composto que apresentou maior RSD% foi o 2,4-D, o qual foi o que apresentou menor sensibilidade, isto, provavelmente devido ao uso de uma fase móvel não ideal, o que o tornou mais suscetível a variações.

Os resultados de precisão para o método, utilizando HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, na Tabela 21. A precisão intermediária por HPLC-DAD para os agrotóxicos foi realizada empregando-se dias e operadores diferentes dos estudos de repetitividade. Os valores para a repetitividade dos agrotóxicos em amostras de água ficaram entre 1,0 e 20,7% e para a precisão intermediária ficaram entre 0,8 e 20,6%.

Para LC-ESI-MS/MS foi realizado apenas o estudo de precisão em termos de repetitividade, e os valores ficaram entre 0,97 e 20,7%.

Os valores de RSD_r e RSD_{pi} obtidos tanto para o instrumento quanto para o método estão dentro da faixa aceitável. Ribani *et al* (2004) recomenda uma precisão com $RSD \leq 20\%$ para ser aceitável em métodos cromatográficos.

5.7.4 Recuperação

A recuperação depende da matriz, do procedimento de extração e da concentração do analito (GONÇALVES, 2007; KURZ, 2007).

De acordo com a literatura para a validação de métodos cromatográficos, as recuperações precisam estar entre 70 e 120% (BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Os valores obtidos nos ensaios de recuperação por SPE, utilizando-se o procedimento descrito no item 5.1, apresentaram valores entre 60,3 e 108,9 % (Tabela 21) comprovando a confiabilidade do método. A Figura 26 ilustra cromatogramas obtidos por HPLC-DAD, em 220,3 nm, para um branco e um nível de fortificação de $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 21 – Recuperação (R%), RSD_r e RSD_{pi} do método SPE e HPLC-DAD para os agrotóxicos em amostras de água fortificadas em diferentes níveis, e recuperação e RSD_r do método por SPE e LC-ESI-MS/MS

Agrotóxicos	HPLC-DAD					LC-ESI-MS/MS		
	Nível (µg L ⁻¹)	R (%)	RSD _r (%)	R (%)	RSD _{pi} (%)	Nível (µg L ⁻¹)	R (%)	RSD _r (%)
Carbofurano	0,20	101,4	19,4	-	-	0,004	91,37	20,70
	1,25	66,7	20,7	-	-	0,04	89,97	4,27
	5,00	89,8	5,0	94,2	20,6	2,00	66,94	1,73
	10,00	93,7	12,3	115,3	19,4			
2,4-D	0,20	60,3	12,8	-	-	0,004	-	-
	1,25	88,7	1,0	-	-	0,04	100,0	11,59
	5,00	74,4	13,1	67,5	2,1	2,00	68,11	6,76
	10,00	82,7	5,0	83,5	0,8			
Clomazona	0,20	101,8	16,2	-	-	0,004	85,90	9,86
	1,25	84,4	13,2	-	-	0,04	102,9	2,64
	5,00	101,1	5,7	103,9	2,8	2,00	84,62	5,74
	10,00	104,3	6,6	100,3	3,1			
Tebuconazol	0,20	98,6	17,1	-	-	0,004	108,9	20,10
	1,25	100,3	19,0	-	-	0,04	90,10	0,97
	5,00	107,7	8,4	97,8	4,7	2,00	105,6	2,66
	10,00	92,0	2,8	113,2	2,7			

- Nesses níveis não foram feitos testes para a precisão intermediária n=9 (3 extrações × 3 injeções) de cada extrato

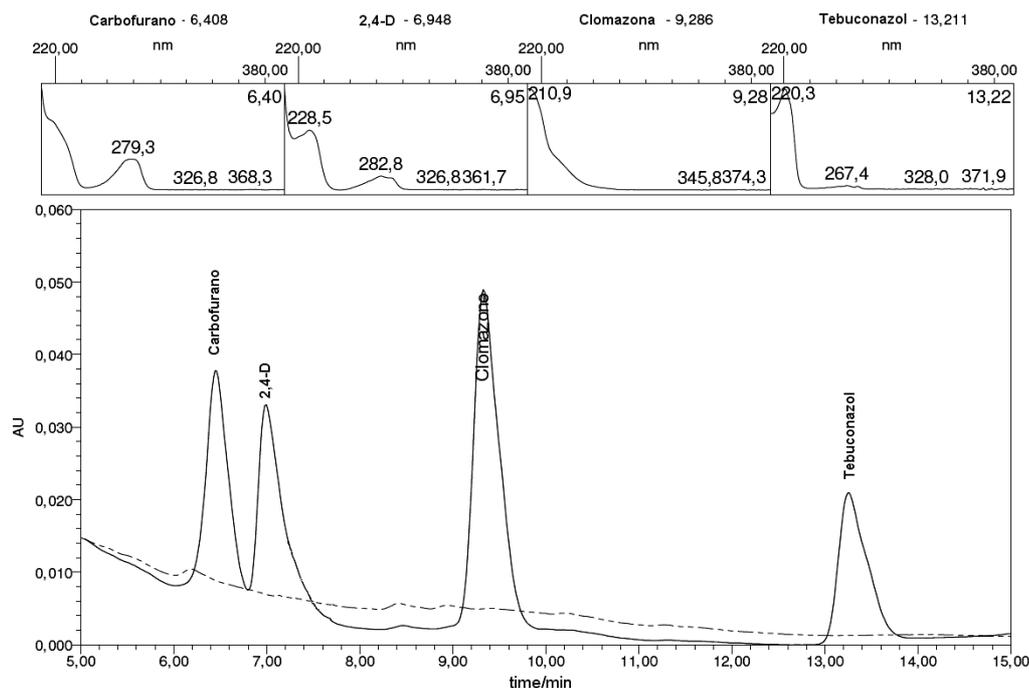


Figura 26 - Cromatogramas de uma amostra de água: (pontilhado) branco da amostra num comprimento de onda de 220,3 nm e (linha) amostra fortificada com $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de uma mistura dos agrotóxicos, e os espectros de absorção dos compostos estudados

5.8 Aplicação do método

5.8.1 Análises de amostras reais

O método desenvolvido foi aplicado na análise de águas de poços na Quitéria, pois esta é a principal fonte de abastecimento de água potável no local onde foi desenvolvido este trabalho.

O principal problema de análise de amostras de água é a presença de substâncias húmicas, como ácido húmicos, que apresentam pouca retenção na coluna C-18 (PRIMEL, 2003). Esta interferência foi observada, em todos os cromatogramas obtidos para as amostras, como um pico de grande intensidade localizado no início do cromatograma; mas este sinal não interferiu na análise qualitativa e quantitativa dos compostos estudados, pois não interfere a integração do sinal do analito.

As Figuras, 27, 28 e 29 apresentam gráficos que ilustram os resultados das análises em que foram detectados os agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol.

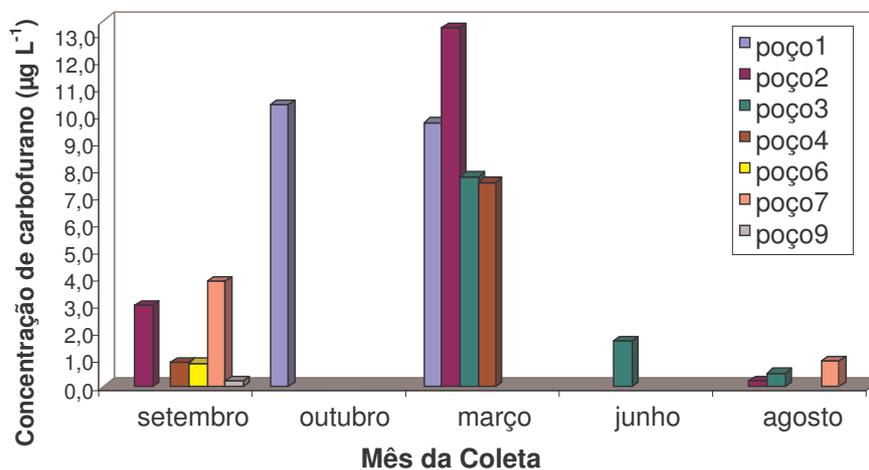


Figura 27 - Concentração de carbofurano nos poços por mês de coleta

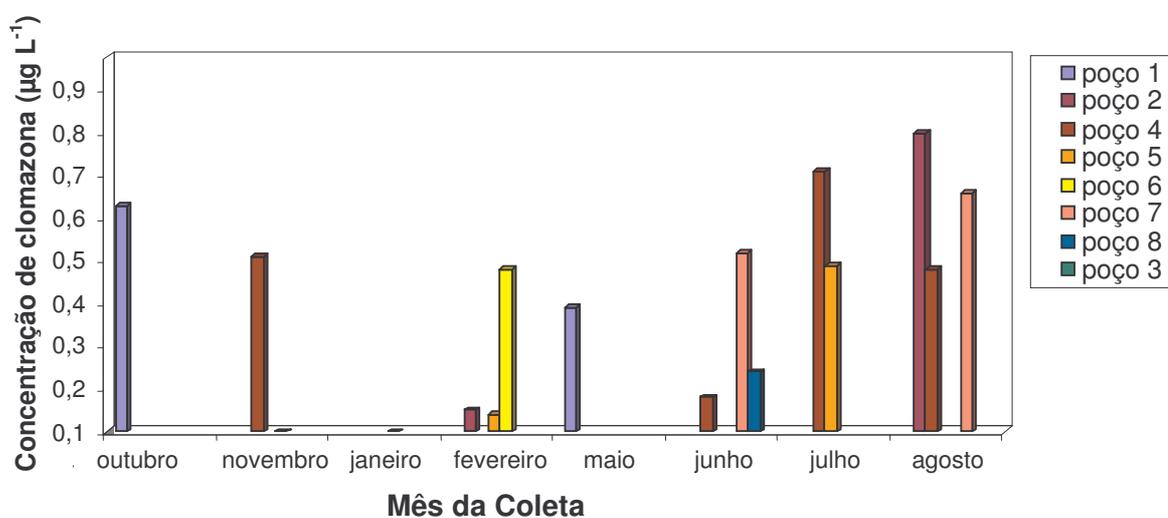


Figura 28 - Concentrações de clomazona nos poços por mês de coleta

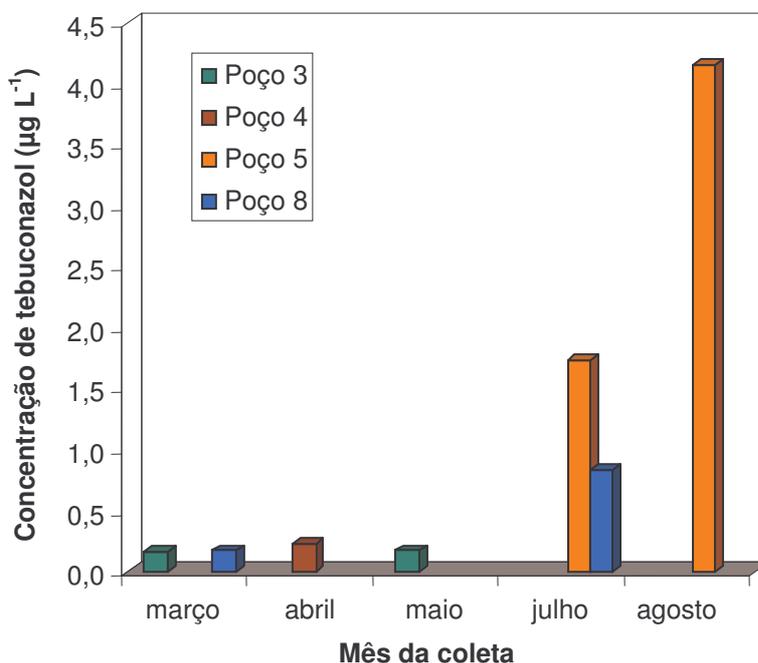


Figura 29 -

Concentrações de tebuconazol nos poços por mês de coleta

Nas águas foram detectados agrotóxicos de três diferentes classes, herbicida, fungicida e inseticida. Os níveis de concentração estimados foram de 0,25 a 13,25 µg L⁻¹. Estes valores estão acima dos valores máximos permitidos pela legislação europeia, e para o carbofurano, acima dos limites estipulados pela legislação brasileira.

As concentrações encontradas em cada poço em várias coletas, de setembro de 2007 a agosto de 2008, estão apresentadas no Apêndice B (Tabela 1). Todas as amostras obtiveram valores de RSD menores que 20%. Carbofurano, clomazona e tebuconazol foram os compostos encontrados.

Em geral, grandes diferenças foram encontradas nos níveis e no perfil de contaminação durante o período de amostragem. A falta de uniformidade nos resultados encontrados se deve principalmente as práticas agrícolas na área de estudo, pois há uma grande diversidade na produção, e nas épocas de plantio.

O herbicida 2,4-D foi o único composto, que não foi detectado, provavelmente por ser, dos agrotóxicos analisados, o menos utilizado e citado pelos agricultores e também por ser usado principalmente em culturas de arroz irrigado, milho, soja e trigo (CAMARA DE AGROTÓXICOS, 2008); as quais não são cultivadas na Quitéria.

O composto possui tempo de meia vida em água menor que os outros determinados e, além disso, apresenta a maior solubilidade em água e o menor tempo de meia vida no solo, provavelmente sendo degradado rapidamente e não atingindo assim as águas subterrâneas.

O agrotóxico carbofurano foi o que apresentou as maiores concentrações, variando de 0,25 a 13,25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os meses em que houve maior ocorrência pelo composto, foram setembro e março, sendo que os poços 2 e 3 foram os que apresentaram maior ocorrência. Estes poços possuem 9 e 20 m de profundidade, respectivamente. O carbofurano, juntamente com o clomazona foram os compostos que apresentaram maior frequência de contaminação. Em trabalho realizado por TARIQ *et al.* (2004) resíduos de carbofurano foram frequentemente detectados em águas de poços, com uma frequência de detecção de 59% no mês de julho e 43 % em outubro. Este fato foi relacionado entre outros fatores com a alta solubilidade em água do composto. A maior concentração encontrada foi de 23,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. BACIGALUPO e MERONI (2007) analisaram águas de poços de uma área agrícola no Sul de Milão, durante 11 meses, e encontraram resíduos de carbofurano em 90% das amostras, em concentrações abaixo de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O herbicida clomazona tem uma alta solubilidade em água, e um tempo de meia vida na água maior que 30 dias, e demonstrou maior concentração no mês de agosto no poço 2. A ocorrência de clomazona pode ser também em consequência de seu uso em outras culturas tais como batata, milho, pimentão, etc, o que pode contribuir para a contaminação das águas tanto de superfície quanto subterrâneas. A alta frequência de contaminação por clomazona em águas subterrâneas foi detectado por BORTOLUZZI *et al.* (2007), onde o composto foi detectado em 50% dos poços amostrados, numa concentração média de 6,76 $\mu\text{g L}^{-1}$. Durante o presente estudo o clomazone foi detectado em 70% dos poços.

A maior frequência de detecção dos agrotóxicos clomazona e carbofurano em águas subterrâneas, tanto em poços rasos quanto nos mais profundos (Figura 30) pode ser explicada pelo seu alto potencial de lixiviação como consequência do baixo coeficiente de sorção ao solo e elevada solubilidade em água, além de meia vida no solo também relativamente elevada. HERNÁNDEZ *et al.* (2001) encontraram carbofurano em águas subterrâneas em 25% das amostras analisadas, em níveis menores que 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

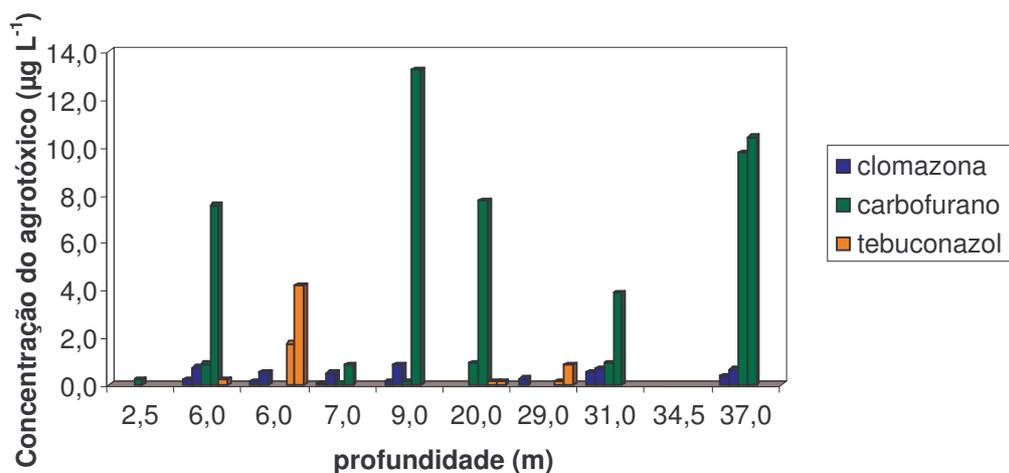


Figura 30 – Gráfico da concentração máxima e mínima encontrada de cada composto *versus* a profundidade do poço amostrado

As concentrações de tebuconazol foram maiores no mês de julho e agosto, e o poço 5 foi o que apresentou as maiores concentrações, sendo $1,73 \mu\text{g L}^{-1}$ no mês de julho e $4,16 \mu\text{g L}^{-1}$ no mês de agosto.

A ocorrência de resíduos de tebuconazol em águas de poços tubulares de profundidade até 29 m, o que embora tenha ocorrido com baixa frequência, em apenas 30% dos poços amostrados; e em níveis baixos, demonstra o potencial de lixiviação deste composto. O poço que apresentou uma maior contaminação por tebuconazol possui profundidade de 6 m. Este composto foi encontrado em águas subterrâneas no trabalho desenvolvido por BAUGROS *et al.* (2008). Os valores encontrados variaram de $0,8947 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,0329 \mu\text{g L}^{-1}$.

Cromatogramas de uma amostra positiva analisada pelo HPLC–DAD e confirmada por LC-ESI-MS/MS são demonstrados na Figura 31. Como podemos observar no cromatograma, um pico no t_R do clomazona e mesmo espectro de absorção foi detectado no HPLC-DAD e também no LC-ESI-MS/MS numa razão m/z 240, monitorando o íon 125, correspondendo ao composto clomazona.

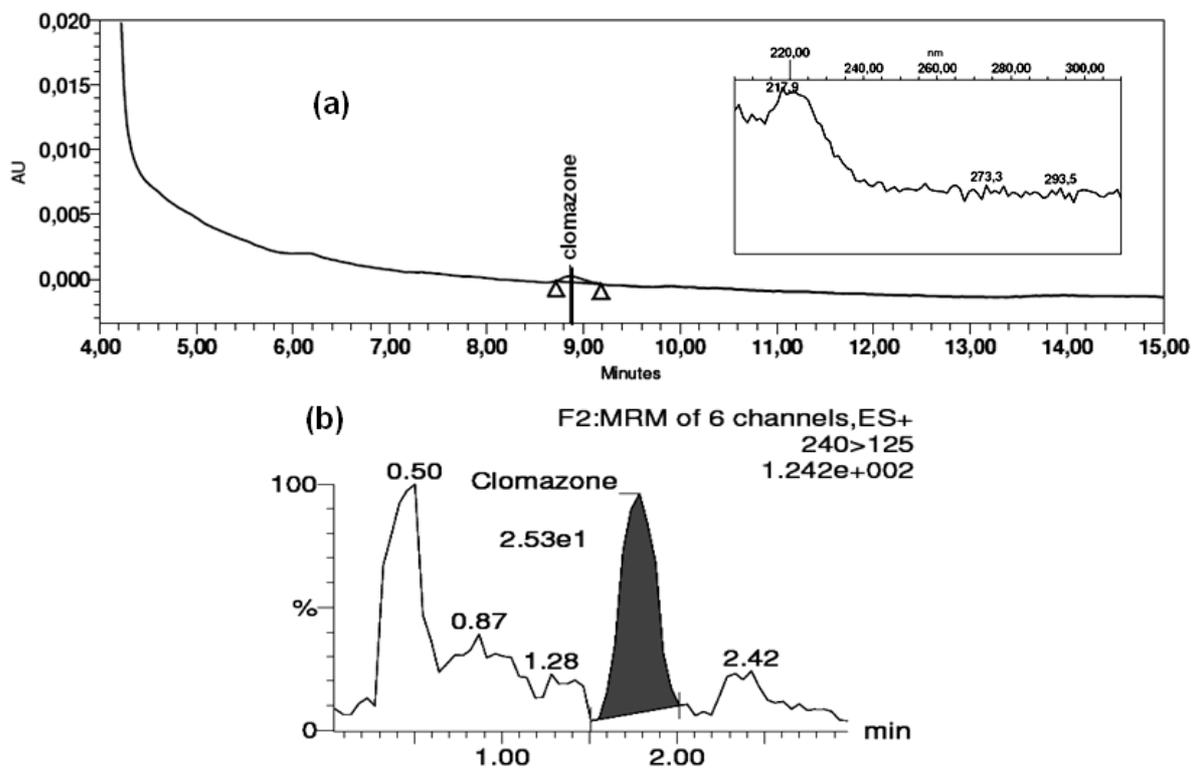


Figura 31 - (a) cromatograma obtido por HPLC-DAD e espectro de absorção do composto correspondente a análise de uma amostra água subterrânea onde foi detectado o agrotóxico clomazona e (b) cromatograma obtido por LC-ESI-MS/MS, no modo MRM da mesma amostra

6 CONCLUSÕES

A SPE provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras aquosas. Os cartuchos contendo 200 mg de C18 possibilitaram a extração dos agrotóxicos carbofurano, 2,4-D, clomazona e tebuconazol com rapidez e eficiência, possibilitando um fator de pré-concentração de 250 vezes.

As condições cromatográficas otimizadas para o HPLC-DAD, permitiram a identificação e quantificação dos compostos em estudo, em um tempo de análise de 15 min. A separação cromatográfica foi avaliada visualmente e através da análise dos parâmetros cromatográficos k , α e R_s , e apresentou boa resolução, retenção e seletividade.

O comprimento de onda utilizado na determinação simultânea dos quatro agrotóxicos foi de 220,3 nm, pois permitiu boa sensibilidade para todos os agrotóxicos em estudo. Este comprimento de onda foi escolhido após análise dos espectros de absorção no UV dos agrotóxicos.

A detecção por DAD foi adequada, sendo atingidos limites de detecção baixos e possibilitando, também, a confirmação da identidade dos compostos pelo espectro molecular.

Para as amostras positivas também foi utilizado sistema LC-ESI-MS/MS no modo de ionização ESI+, para carbofurano, clomazona e tebuconazol e ESI- para o 2,4-D, e modo de aquisição MRM para confirmação dos resultados obtidos por HPLC-DAD.

Pode ser dito que ambas apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que os resultados obtidos por HPLC-DAD foram confirmados por LC-MS/MS. A análise por LC-ESI-MS/MS apresenta a vantagem de fornecer informação qualitativa obtida a partir de fragmentos de massa característicos para cada composto, além de limites de quantificação bem mais baixos.

Na validação dos métodos foram obtidos resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de r maiores que 0,99 para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores de limite de detecção e de quantificação foram adequados para análise de agrotóxicos em água subterrânea. Por HPLC-DAD, os valores de LOQ foram $0,20 \mu\text{g L}^{-1}$. Para o

sistema LC-ESI-MS/MS estes valores foram de 4,0 ng L⁻¹ para os agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol e de 40,0 ng L⁻¹ para o 2,4-D.

Os limites de quantificação encontrados por HPLC-DAD foram próximos a concentração máxima admissível definida pela legislação europeia em águas destinadas ao consumo humano sem tratamento prévio.

Em relação aos valores máximos permitidos na Resolução do CONAMA nº 396, os métodos apresentaram valores adequados ao limite de quantificação praticável estipulado.

O método por SPE e HPLC-DAD apresentou recuperações médias entre 87,9% e 96,9%, com valores de precisão adequados, menores que 20%.

O procedimento empregando a DLMME e LC-ESI-MS/MS foi otimizado para a extração e determinação dos agrotóxicos carbofurano, clomazona e tebuconazol em águas. O procedimento apresentou recuperações entre 62,7 e 120,0%, tempo de extração rápido e limite de quantificação de 0,02 µg L⁻¹. Quando comparado com o método convencional da SPE, apresenta as vantagens como rapidez, simplicidade, facilidade de operação, menor custo e uso de menores quantidades de amostra.

Durante a aplicação da metodologia para análise dos agrotóxicos, três dos quatro compostos selecionados foram detectados nas amostras, que são: carbofurano, clomazona e tebuconazol. Estes foram detectados em concentrações em nível de µg L⁻¹. Dos dez poços onde foram realizadas as coletas, oito apresentaram poluição por agrotóxicos, pelo menos um mês. Pode ser percebido que as concentrações dos agrotóxicos não apresentaram um perfil temporal, indicando que a poluição das águas subterrâneas parece estar relacionada com a frequência de aplicação, permeabilidade do solo, frequência de chuvas, entre outros.

Tendo em vista o uso de águas subterrâneas para abastecimento doméstico e a aplicação intensa de agrotóxicos no entorno da região da Quitéria na cidade de Rio Grande, os resultados desta pesquisa vem trazer subsídios para as autoridades locais no que diz respeito à exploração desses mananciais.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS GERADOS

Estão sendo realizados experimentos com os sorventes contidos nos cartuchos de SPE, para verificar o possível uso em técnicas como a MSPD assim como os cartuchos e os filtros existentes nele.

Os solventes utilizados durante o estudo foram coletados, separados em frascos e rotulados. Estão sendo desenvolvidos e otimizados em conjunto com outro laboratório Processos Oxidativos Avançados para a degradação dos resíduos de agrotóxicos gerados no laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDER, L. *et al.* Residue analysis of 500 high priority pesticides : better by GC-MS or LC-MS/MS? **Mass Spectrometry Review**, v.25, p. 838-865, 2006.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS. **Panorama do Enquadramento dos corpos d'água no Brasil, e, Panorama da Qualidade das Águas Subterrâneas no Brasil**. Brasília: ANA, 2007. 124 p.
- ARDREY, R.E. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2003. 276 p.
- BACIGALUPO, M.A., MERONI, G. Quantitative Determination of Diuron in Ground and Surface Water by Time-Resolved Fluoroimmunoassay: Seasonal Variations of Diuron, Carbofuran, and Paraquat in an Agricultural Area, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 3823-3828, 2007.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.
- BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.
- BARCELÓ, D.; HENNION, M.C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. 3. ed. The Netherlands: Elsevier, 1997. 542 p.
- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE) e Micro Extração em Fase Sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.
- BAUGROS, J. *et al.* Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples, **Analytica Chimica Acta**, v. 607, p. 191–203, 2008.
- BERIJANI, S. *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 1-9, 2006.
- BEYRUTH, Z.; TOMITA, R. Y. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Instituto Biológico, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/tomita.htm>>. Acesso em 20 jun. 2007.
- BIRJANDI, A.P. *et al.* Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 19–25, 2008.
- BORTOLUZZI, E.C. *et al.* Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco, **Química Nova**, v. 30, p. 1872-1876, 2007.
- BRAGA, B. *et al.* **Introdução à Engenharia Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 318 p.
- BRAGA, J. W. B. *et al.* Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 200–210, 2007.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm. Acesso em 21 set 2007.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf:>. Acesso em 23 nov. 2006.

BRASIL. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 março 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em 23 nov. 2006.

BRASIL. Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 abril 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acesso em 10 dez. 2008.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 23 jun. 2006.

BRITO, N. M. *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BRONDI, S.H.G., LANÇAS, F.M. Development and Validation of a Multi-Residue Analytical Methodology to Determine the Presence of Selected Pesticides in Water Through Liquid Chromatography, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 650-653, 2005.

BRUZZONITI, M.C. *et al.* Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography–mass spectrometry in drinking waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, p. 241–249, 2006

CABRERA, L.C. *et al.* Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região Sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, p.1982-1986, 2008.

CAMARA DOS AGROTÓXICOS – CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA DA 5ª REGIÃO. **I mapeamento de agrotóxicos utilizados no Rio Grande do Sul**. 1.ed. Porto Alegre, RS: CRQ-V, 2008. 116 p.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. *et al.* Simultaneous determination of phenyl- and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, p. 71-79, 2004.

CARBO, L. *et al.* Determination of Pesticides Multiresidues in Shallow Groundwater in a Cotton-growing Region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, p. 1111-1117, 2008

CEREJEIRA, M. *et al.* Pesticides in Portuguese surface and ground waters. **Water Research**, v. 37, p. 1055-1063, 2003.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, 2008.

CHINGOMBE, P., SAHA, B., WAKEMAN, R.J. Effect of surface modification of an engineered activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and benazolin from water. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 297, p. 434–442, 2006.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

COLINA, C. *et al.* Effect of Storage on the Recovery of Different Types of pesticides Using a Solid-phase Extraction Method. **Analyst**, v. 122, p. 7-11, 1997.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 456 p.

D'ARCHIVIO, A.A. *et al.* Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with highperformance liquid chromatography. **Talanta**, v.71, p. 25-30, 2007.

DEAN, J. R. *et al.* Determination of triazine herbicides in environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 295-335, 1996.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: Águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar. **Química Nova**, v. 24, p. 27-36, 2001.

EEC Drinking Water Directive (80/778/EEC), EEC No. L229/11-29, European Union, Brussels, 1980.

EL-SHEIKH, A. H. *et al.* Critical evaluation and comparison of enrichment efficiency of multi-walled carbon nanotubes, C18 silica and activated carbon towards some pesticides from environmental waters. **Talanta**, v. 74, p. 1675–1680, 2008.

EPA. National Primary Drinking Water Standards. **Environmental Protection Agency**, junho 2003. Disponível em: <www.epa.gov/safewater>. Acesso em: 30 nov. 2008.

EURACHEM Guide. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. LGC (Teddington) Ltd, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>>. Acesso em: 02 dez 2008

FARAHANI, H. *et al.* Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, p. 105–112, 2007.

FARAJZADEH, M. A., BAHRAM, M., JÖNSSON, J. A. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography–diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 69–79, 2007.

FARHADI, K., MATIN, A. A., HASHEMI, P. LC Determination of Trace Amounts of Phenoxyacetic Acid Herbicides in Water after Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. **Chromatographia**, v. 69, p. 45–49, 2009.

FARIA, A. M. *et al* Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, p. 34–40, 2007.

FARIA, L. J. S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado) – UNICAMP, Campinas, SP.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FERRACINI, V. L. *et al.* Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 11, p. 1-16, 2001.

FERRER, I.; THURMAN, E. M.; Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 24 – 37, 2007.

FONSECA, M. B. *et al.* The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p. 416–420, 2008.

FRITZ, J.S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 137–166, 2000.

FU, L. *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 289-295, 2009.

GARCÍA-LÓPEZ, M., RODRÍGUEZ, I., CELA, R. Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1166, p. 9-15, 2007.

GATIDOU, G. *et al.* Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. **Analytica Chimica Acta**, v. 528, p. 89-99, 2005.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para a determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo do arroz irrigado.** 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

GONZÁLEZ, G., HERRADOR, M. A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 227-238, 2007.

GOU, Y., EISERT, R., PAWLISZYN, J. Automated in-tube solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 137–147, 2000.

GUZZELLA, L., POZZONI, F., GIULIANO, G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 344-353, 2006.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 5.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001. p. 640-645.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2003. 876 p.

HERNÁNDEZ, F. *et al.* Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub- $\mu\text{g/l}$ level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v. 939, p. 1-11, 2001.

HOGENBOOM, A. C., *et al.* T. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 331–354, 2001.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008a. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Pesquisa de Informações Básicas Municipais, **Perfil dos municípios brasileiros 2008.** Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/perfilmunic/2008/munic2008.pdf>>. Acesso em: 04 dez. 2008.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008b. Diretoria de Geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Coordenação de Geografia, **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável, Brasil 2008.** Disponível em:

<<ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/ids/ids2008.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2008.

INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35 p.

INMETRO. Vocabulário internacional de termos fundamentais e gerais de Metrologia, **Portaria INMETRO nº 029 de 1995**. SENAI - Departamento Nacional. 5. ed. Rio de Janeiro: SENAI, 2007. 72 p.

INOUE, M.H. *et al.* Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná, **Planta Daninha**, v. 21, n.2, p.313-323, 2003.

IRACE-GUIGAND, S. *et al.* A comparison of the environmental impact of pesticide multiresidues and their occurrence in river waters surveyed by liquid chromatography coupled in tandem with UV diode array detection and mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 55, p. 973–981, 2004.

JAHROMI, E. Z. *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, p. 305–311, 2007.

JAUFMANN, L. Validation of analysis results using diode array detection combined with a chromatography data system. **Analisis Magazine**, v. 26, p. M22 - M24, 1998.

KAHLE, M. Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 7193-7200, 2008.

KOZANI, R. R. *et al.* Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. **Talanta**, v. 72, p. 387–393, 2007.

KURZ, M. H. S, **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD e GC-ECD para determinação de resíduos de pesticidas em águas e degradação a campo**. 2007. 161 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

KUSSUMI, T.A. **Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem e sua certificação**. 2007. 150 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – IPEN, São Paulo, SP.

KUSTER, M., *et al.* Analysis of in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**; v. 25, p. 900-916, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)** / Fernando M. Lanças – São Carlos: RiMa, 2004a, 96 p.

LANÇAS, F. M. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 183-197, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004b, 62 p.

- LIANG, P. *et al.* Application of liquid-phase microextraction for the determination of phoxim in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detector. **Microchemical Journal**, v. 80, p. 19–23, 2005.
- LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 3-16, 2000.
- LIU, Z. M. *et al.* Novel method for the determination of five carbamate pesticides in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p.213-216, 2009.
- MAHALAKSHMI, M. *et al.* Photocatalytic degradation of carbofuran using semiconductor oxides. **Journal of Hazardous Materials**, v. 143, p. 240-245, 2007.
- MARCHESAN, E. *et al.* Rice herbicide monitoring in two brazilian rivers during the rice growing season. **Scientia Agricola**, v. 64, p.131-137, 2007.
- MARÍN, J. M. *et al.* Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 204-214, 2006.
- MARQUES, M. N. *et al.* Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, São Paulo. **Química Nova**, v. 30, p. 1171-1178, 2007.
- MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.** 2004. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.
- MEDEIROS, G.A. *et al.* Estudo da poluição de águas subterrâneas em nível local. In: IX Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA, 2003, São José dos Campos. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.bibl.ita.br/ixencita/artigos/Infra04.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2007.
- MELWANKI, M. B., FUH, M. Partitioned dispersive liquid–liquid microextraction An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples **Journal of Chromatography A**, v. 1207, p. 24-28, 2008.
- MIYAUCHIA, T., MORIA, M., ITO, K. Application of solid-phase extraction to quantitatively determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 137–141, 2005.
- NAGARAJU, D.; HUANG, S. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 89-97, 2007.
- NETO, F. R. A., NUNES, D. S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas Afins.** 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187 p.

NIESSEN, W.M.A., TINKE, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p. 37-57, 1995.

OLIVEIRA-SILVA, J.J. *et al.* Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p.130-135, 2001.

PADRÓN, M. E. T., FERRERA, Z. S., RODRÍGUEZ, J. J. S. Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 332 – 340, 2006.

PALMA, G. *et al.* Pesticide levels in surface waters in an agricultural-forestry basin in Southern Chile. **Chemosphere**, v. 57, p. 763-770, 2004.

PENA-PEREIRA, F., LAVILLA, I., BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 1-15, 2008.

PETROVIC, M. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 1-14, 2005.

PICHON, V. Multiresidue solid-phase extraction for trace-analysis of pesticides and their metabolites in environmental water, **Analisis**, v. 26, p. M91-M98, 1998.

PICHON, V. Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water, **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 195-215, 2000.

PICÓ, Y., *et al.* Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

PLESE, L. P. M. *et al.* Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. **Chemosphere**, v. 60, p. 149-156, 2005.

PORTUGAL, F. C. M., PINTO, M. L., NOGUEIRA, J.M.F. Optimization of Polyurethane Foams for enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices. **Talanta**, v. 77, p. 765-773, 2008.

PRIMEL, E. G. Aplicação da Extração em Fase Sólida e técnicas **cromatográficas para a determinação de herbicidas em águas de superfície e acompanhamento da degradação a campo e no laboratório**. 2003. 170 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

PRIMEL, E.G. *et al.* Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central de estado do Rio Grande do Sul, Brasil: Predição Teórica e Monitoramento, **Química Nova**, v. 28, p. 605-609, 2005.

QUEIROZ, S.C.N. **Determinação multirresíduos de pesticidas em água por cromatografia líquida de alta eficiência com ênfase em detecção por espectrometria de massas e novos sorventes para a extração em fase sólida**. 2001. Tese (Doutorado em Química) – Unicamp, Campinas, SP.

- REBOUÇAS, A., BRAGA, B., TUNDISI, J. G., **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico Uso e Conservação**. 2. ed. São Paulo: Escritura Editora, 2002. 703 p.
- REEMTSMA, T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 477–501, 2003.
- REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006
- RIAL-OTERO, R. *et al.* Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. **Talanta**, v. 71, p. 503–514, 2007.
- RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, M.L. *et al.* Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: Avaliação Preliminar, **Química Nova**, v. 30, p. 688-684, 2007.
- RISSATO, S. R. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.
- ROCHA, J. C., ROSA, A. H., CARDOSO, A. A. **Introdução a Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004 . 154 p.
- RODRIGUES, A.M. *et al.* Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 267 – 278, 2007.
- RODRÍGUEZ-CUESTA, M.J. *et al.* Development and validation of a method for determining pesticides in groundwater from complex overlapped HPLC signals and multivariate curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 251– 260, 2005.
- ROSEN, R. Mass spectrometry for monitoring micropollutants in water. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 246–251, 2007.
- SANCHES, S.M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água, **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 53-58, 2003.
- SÁNCHEZ-ORTEGA, A. *et al.* Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 70–76, 2005.
- SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 3^a ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.
- SCORZA JÚNIOR, R. P., SILVA, J. P. Potencial de contaminação da água subterrânea por pesticidas na Bacia do Rio Dourados. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 17, p. 87-106, 2007.

SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography**. Chrom-Ed Book Series - library4science, LLC, 2003a. Disponível em: <<http://www.library4science.com/>>. Acesso em: 05 jan 2009.

SCOTT, R. P. W. **Liquid Chromatography Detectors**. Chrom-Ed Book Series - library4science, LLC, 2003b. Disponível em: <<http://www.library4science.com/>>. Acesso em: 05 jan 2009.

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

SHOMAR, B. H. *et al.* Occurrence of pesticides in groundwater and topsoil of the gaza strip. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 171, p. 237-251, 2006.

SHUKLA, G. *et al.* Organochlorine pesticide contamination of ground water in the city of Hyderabad. **Environment International**, v. 32, p. 244-247, 2006.
SIA - SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE AGROTÓXICOS, 2003. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>>. Acesso em: 24 abr. 2007.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Embrapa Informações Tecnológicas - Brasília, 2004, 400 p.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. **Introduction to solid phase extraction**. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) Solid-phase extraction: principles, techniques and applications. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. p.1-17.

SKOOG, D.A. *et al.* **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SOARES, L. M. V. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 79-84, 2001.

SPADOTTO, C.A. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002

SPADOTTO, C.A. *et al.* **Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações**. (Documentos, 42) Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.

TARIQ, M. I., AFZAL, S., HUSSAIN, I. Pesticides in shallow groundwater of Bahawalnagar, Muzafargarh, D.G. Khan and Rajan Pur districts of Punjab, Pakistan. **Environment International**, v. 30 p. 471– 479, 2004.

TOMLIN, C. D. S. **The e-Pesticide Manual, Thirteenth Edition, Version 3.0**. Londres, 2003. CD-ROM.

TRAN, A.T.K. *et al.* Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. **Chemosphere**, v. 67, p. 944-953, 2007.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI: Enfrentando a escassez**. São Paulo: RiMa, IIE, 2003. 247 p.

- VALENTINI, S. R., SOMMER, W. A., MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, p. 26-31, 2007.
- VEGA, A. B., *et al.* Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 538; p. 117–127; 2005.
- VÉKEY, 2001 Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 921, p.227, 2001.
- VIGNA, C. R. M. *et al.* Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 211-215, 2006.
- WEI, G., LI, Y., WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of methomyl in natural waters. *Journal of Separation Science*, v. 30, p. 3089-3324, 2007.
- XIA, J., XIANG, B., ZHANG, W. Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design. **Analytica Chimica Acta**, v. 625, p. 28–34, 2008.
- XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1193, p. 7-18, 2008.
- YAZDI, A. S., RAZAVI, N., YAZDINEJAD, R. F. Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection. **Talanta**, v.75, p. 1293-1299, 2008.
- ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 257–262, 2000.
- ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.
- ZANELLA, R. *et al.* Monitoring of the Herbicide Clomazone in Environmental Water Samples by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. **Chromatographia**, v. 55, p. 573-577, 2002.
- ZHAO, E. *et al.* Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. **Journal of Chromatography A**, v. 1175, p. 137–140, 2007.
- ZHOU, Q. *et al.* Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. **Talanta**, v. 68, p. 1309–1315, 2006.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA REFERENTE AO TRABALHO

ARTIGOS PUBLICADOS

CALDAS, S.S., DEMOLINER, A. PRIMEL, E. G. Validation of a Method using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography for the Determination of Pesticide Residues in Groundwaters. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 1, p. 125-132, 2009.

TRABALHOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

CALDAS, Sergiane Souza, DEMOLINER, A., PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de resíduos de pesticidas em águas de poços artesianos no município de Rio Grande - RS** In: 14^º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa.

CALDAS, Sergiane Souza, DEMOLINER, A., PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento de metodologia empregando SPE e HPLC-DAD para determinação de resíduos de pesticidas em águas de poços artesianos.** In: XV Encontro de Química da Região Sul - Química e a Interdisciplinaridade, Universidade Estadual de Ponta Grossa e SBQ - Secretarias Regionais do RS, SC e PR, 2007.

CALDAS, Sergiane Souza, DEMOLINER, A., PRIMEL, E. G. **Desenvolvimento de metodologia analítica empregando SPE e HPLC-DAD para determinação de resíduos de pesticidas em água de poços artesianos.** In: IX Encontro de Pós Graduação – FURG, 2007.

CALDAS, S.S. DEMOLINER, A., COSTA, F.P., PRIMEL, E.G. **Determinação de agrotóxicos em águas subterrâneas por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.** In: X Encontro de Pós Graduação – FURG, 2008.

CALDAS, S.S. COSTA, F.P., PRIMEL, E.G. **Determination of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography tandem mass spectrometric detection.** In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO. Florianópolis, outubro, 2008.

CALDAS, S.S. DEMOLINER, A., COSTA, F.P., PRIMEL, E.G. **HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS for determination of pesticides in groundwater in the south of Rio Grande do Sul state, Brazil.** In: XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas – COLACRO. Florianópolis, outubro, 2008.

APÊNDICE A – Dados referentes às entrevistas realizadas com os moradores da localidade rural da Quitéria, localizada na cidade de Rio Grande, RS

Tabela 1 – Informações obtidas em entrevista com os moradores da Quitéria, Rio Grande, RS

nº	Nome	Endereço	Tipo de poço	Uso	nº de pessoas	Profundidade (m)	Embalagens de pesticidas
1	Enelda F. de Pinho	km 2 – nº 27	artesiano	Geral	6	37	Entrega fornecedor
2	João Manuel M. Roque	nº 35 – ap 2	ralo	Casa	5	4	Não usa
3	Antonio A. Rodrigues	nº 43	artesiano	Geral	2	35	Entrega fornecedor
4	Priscila M. Rodrigues	nº 41	artesiano	Geral	3	9	Não informou
5	Ana Leda M. Rodrigues	nº 47	ralo	Geral	3	4	Não usa
6	Dinarte Barros	nº 46 – esq.	artesiano	Geral	7	5,5	Entrega fornecedor
7	Luis F. de Lemos	Km 2 - nº 100	artesiano	Geral	3	11	Não usa
8	Iracema M. C. dos Santos	Km 2 - nº 48 ^a	artesiano	Geral	4	12	Entrega fornecedor
9	Getúlio F. da Costa	Km 2 - nº 48	ralo	Geral	3	5,5	Entrega fornecedor
10	Jorge Barroco	Nº 3 – ap 0053	artesiano	Geral	3	20	Entrega fornecedor
11	Oswaldo de Souza	nº 57 e 55	artesiano	Geral	5	10	Entrega fornecedor
12	Rosangela Marchetotti	nº 57 a	ralo	Geral	3	6	Entrega fornecedor
13	Alberto Canteiro	nº 3 ap 65	ralo	Geral	2	3	Entrega fornecedor
14	Mário R. da S. Oliveira	nº 67	absínio	Casa	5	6	Entrega fornecedor
15	Edemar Costa	nº 71	ralo	Geral	9	9,5	Entrega fornecedor
16	Enício Antunes Costa	nº 75	ralo	Casa	2	6	Entrega fornecedor
17	Antonio F. dos Santos	nº 79	ralo	Casa	6	3,5	Entrega fornecedor
18	Jesus Fernandes	nº 81	ralo	Geral	4	7	Não informou
19	Vilson Figueredo	nº 4 – ap 87 BLA	artesiano	Geral	Várias	31	Não usa
20	Vilmar Pereira Neves	nº 117	artesiano	Geral	10	29	Entrega fornecedor
21	Marcela P. de Oliveira	nº121	artesiano	Geral	5	20	Entrega fornecedor
22	Maria de F. S. da Silva	nº 123	artesiano	Geral	3	30	Entrega fornecedor
23	Ana Maria M. de Castro	nº134 – esq.	artesiano	Geral	3		Não usa
24	Adriana Godinho	nº 133	poço aberto	Geral	3	2	Não usa
25	Cristiane da S. Correia	nº132 – esq.	ralo	Geral	6	6 a 7	Entrega fornecedor
26	Edelcir Dias dos Santos	nº 143	artesiano	Geral	5	34,5	Entrega fornecedor
27	Vandir A. de Barros	nº 141	cacimba	Geral	4	2,5	Entrega fornecedor
28	23 Gilberto Lopes Silva	nº 237	ralo	Geral	5	6	Não usa

Tabela 2 – Informações obtidas em entrevista com os moradores da Quitéria, Rio Grande, RS

nº	Data da visita	Tipo de Cultura	Nome e/ou classe do Agrotóxico utilizado	Recebe orientação de algum agrônomo	Época de plantio
1	04/04/2007	Hortigranjeiros, alho poro, batata inglesa, pimentão, cebola, batata, melância caseira	Round up (pasto)		Dezembro e novembro
2	04/04/2007		Acaricidas		Durante o ano todo
3	04/04/2007	Cenoura, pepino, cebola, alho	folidol, vertimex, astro (para legumes, hortaliças); óleo mineral.	da agropecuária	Durante o ano todo
4	04/04/2007	Principalmente cebola	Round up, u46, antracol		
5	Mesmo 4				
6	04/04/2007	alho, cenoura, legumes			
7	04/04/2007	feijão, batata	não usa agrotóxico		Julho
8					
9	04/04/2007	Não estava em casa			
10	04/04/2007	Cebola	afalon, trigardi, ridomil, atracol, triatox		Julho e dezembro
11	04/04/2007	Flor, cebola e batata	Cercobin, glicofosato, confidor		Ano todo
12	04/04/2007	Cebola	polaris, ortocide (captan), orthene		Ano inteiro
13	05/04/2007	Cebola	ninguém em casa		
14	05/04/2007	Cebola, legumes, cenoura, alface, hortifrutigranjeiros	Manzate, antracol, folidol	sim, da agropecuária	ano inteiro
15	05/04/2007	nada de plantação, o vizinho que plantou no ultimo verão, ervilha	Afalon, folidol, folicur		
16	05/04/2007	Alface, couve, cebola, frutas, parreira, bergamota	Afalon		ano inteiro
17	05/04/2007	Tomate, alface, cebola, cenoura	Furadan, gramaxone		ano inteiro
18	05/04/2007	Cebola, tomate, cenoura, etc.	Roundup, stron		ano inteiro
19	05/04/2007	Não planta nada			-
20	05/04/2007	Cebola	Não soube informar		ano inteiro
21	05/04/2007	Cebola, tomate, cenoura	Assist, glifosato, bromoxone, afalon, roundup		ano inteiro
22	05/04/2007	Tomate, feijão, cebola, couve, alface	Manzat, roundup, adubos folhares		ano inteiro
23	05/04/2007	ninguém em casa - não planta nada - perto do arroio			
24	05/04/2007	não quer participar, tem 13 cachorros, e joga o seu esgoto perto do arroio			
25	05/04/2007	ninguém em casa e não planta nada			
26	05/04/2007	Morango, tomate	Glifosato, afalon, deltametrina, furandan		Ano inteiro
27	05/04/2007	Cebola, verduras			Ano inteiro
28	05/04/2007	7 ou 8 anos que não planta nada			

Poço 7 31 m	Carbofurano	3,87 ± 10,1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,94 ± 7,1
	2,4-D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Clomazona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,54 ± 13,6	n.d	0,68 ± 6,7
	Tebuconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Poço 8 29 m	Carbofurano	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	2,4-D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Clomazona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,26 ± 13,9	n.d	n.d
	Tebuconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	<LOQ	n.d	0,21 ± 12,7	n.d	n.d	n.d	0,84 ± 20,2	n.d
Poço 9 2,5 m	Carbofurano	0,21 ± 5,6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	2,4-D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Clomazona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Tebuconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Poço 10 34,5 m	Carbofurano	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	2,4-D	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Clomazona	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	Tebuconazol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d – não detectado

<LOQ – abaixo do limite de quantificação do método

