



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Filipe Fagan Donato

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SORTIVA EM DISCO
ROTATÓRIO (RDSE) PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO
DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POR UHPLC-MS/MS**

Santa Maria, RS

2017

Filipe Fagan Donato

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SORTIVA EM DISCO ROTATÓRIO
(RDSE) PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM
ÁGUA POR UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria - RS

2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fagan Donato, Filipe

Avaliação da técnica de extração sortiva em disco rotatório (RDSE) para determinação multirresíduo de agrotóxicos em água por UHPLC-MS/MS / Filipe Fagan Donato.- 2017.

150 p.; 30 cm

Orientador: Renato Zanella

Coorientador: Osmar Damian Prestes

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2017

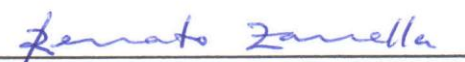
1. Agrotóxicos 2. Água 3. Preparo de amostras 4. RDSE
5. UHPLC-MS/MS I. Zanella, Renato II. Damian Prestes,
Osmar III. Título.

Filipe Fagan Donato

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SORTIVA EM DISCO ROTATÓRIO
(RDSE) PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS
EM ÁGUA POR UHPLC-MS/MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Química**.

Aprovado em 24 de fevereiro de 2017:



Renato Zanella, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Josias de Oliveira Merib, Dr. (UFSC)



Fábio Ferreira Gonçalves, Dr. (FURG)



Sergio Roberto Mortari, Dr. (UNIFRA)



Martha Bohrer Adaime, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2017

Dedico este trabalho aos meus pais (Lenita e Darci), ao meu amor, Luana e aos meus irmãos (Gabi e Diogo) que sempre me apoiam e incentivam para que eu alcance todos os meus objetivos.

Sem vocês nada disso seria possível.

Amo muito vocês!

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.”

Art. 225 da Constituição Federal de 1988

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pela vida, por me guiar, me iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente e não desanimar com as dificuldades, dando-me força, proteção, paciência, mostrando-me que tudo é possível, basta ter fé e acreditar.

Ao Prof. Dr. **Renato Zanella** agradeço pela orientação, pelo aprendizado, pela amizade construída durante os anos de convivência e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), por ter acreditado em mim. Obrigado por todas as oportunidades proporcionadas e pelos seus ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e como pessoa. A você, minha gratidão e admiração.

À Prof^a. Dr^a. **Martha Bohrer Adaime** pelos ensinamentos e aprendizados ao longo dos anos, pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa deste trabalho. Obrigado pelo carinho, atenção, amizade, companheirismo e risadas nas horas de lazer. Muito obrigado por tudo! A você, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. **Osmar Damian Prestes**, pela co-orientação, por estar sempre presente e disposto a ajudar, almejando o sucesso de seus alunos. Agradeço por todo o apoio, dedicação, amizade, parceria, companheirismo e pelos momentos de descontração. A você, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. **Sergio Roberto Mortari**, pela participação e pelas valiosas sugestões e comentários na defesa deste trabalho. Obrigado pelos ensinamentos, amizade desde a graduação e por ter acreditado em mim. A você, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. **Fábio Ferreira Gonçalves**, pela participação e as valiosas sugestões tanto na qualificação, quanto na defesa deste trabalho, bem como pela amizade e parceria ao longo destes anos.

Ao Dr. **Josias de Oliveira Merib**, pela participação na defesa, contribuindo com suas valiosas sugestões e por compartilhar comigo seu conhecimento.

Ao Prof. **Manoel Leonardo Martins**, pela participação e as relevantes sugestões e comentários na banca de qualificação deste trabalho. Obrigado pela amizade, parceria e companheirismo nos anos em que trabalhamos juntos no LARP.

Ao Dr. **Gustavo Mack Teló**, pela participação e as valiosas sugestões na banca de qualificação desta tese e pela amizade.

A **Luana (Lu)**, meu amor, agradeço por estar sempre ao meu lado, por ser minha amiga e companheira de vida, quem escolhi para dividir comigo sonhos e realizações. Obrigado pelo teu amor e carinho, por toda ajuda e dedicação, pela paciência e compreensão nos momentos de minha ausência, pela força e incentivo constantes, por me apoiar nos momentos difíceis e por me fazer acreditar que tudo daria certo. Te amo para sempre!

Aos meus Pais **Darci** e **Lenita** pelo amor incondicional, pela dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida, por me educarem à luz de muita sabedoria, conhecimento e humildade, ensinando-me a respeitar a todos igualmente, minha eterna gratidão e carinho. Esta conquista não teria sentido se vocês não estivessem ao meu lado. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos **Diogo** e **Gabriela**, minha comadre **Daniela** e meus amados e queridos sobrinhos **Davi** e **Miguel**, meu cunhado **Clever** e meu amado e querido afilhado **Murilo**, obrigado por fazerem parte da minha vida, pela amizade, carinho, força, companheirismo, pelo conforto nas horas difíceis e por me proporcionarem muitos momentos de alegria e afeto. Sempre estaremos juntos. Vocês são muito importantes na minha vida. Amo muito vocês!

Aos meus sogros **Elaide** e **José**, juntamente com sua família (**Lauren**, **William** e **Leandro**) obrigado pela amizade, força, incentivo, torcida, carinho, pelos momentos felizes e de descontração. Vocês são muito especiais para mim.

A todos os colegas do LARP pela ajuda, amizade e carinho. Em especial as amigas e colegas **Magali**, **Gabrieli**, **Janice Facco**, **Lucila**, **Pim**, **Nathália**, pela força, incentivo, amizade, carinho, pelo café descontraído na cozinha e momentos alegres que passamos juntos. Podem sempre contar comigo e que tenhamos muito sucesso.

Aos meus amigos **Nelson** e **Gabriel** (*champs*) e meu amigo mexicano **Brian Rodriguez Aguilar** (compa), que estiveram lado a lado comigo no desenvolvimento deste trabalho, obrigado pela força, amizade, empenho e ajuda, pela dedicação e por não medirem esforços para a execução dos trabalhos. O meu desejo para vocês é que sejam muito felizes e com certeza o sucesso de vocês está garantido. Como dizíamos: “gracias compa”. Podem sempre contar comigo.

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

Ao **Ademir** e **Valéria**, funcionários do PPGQ, pela gentileza, amizade, carinho, simpatia e atenção no atendimento das suas tarefas.

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica.

Ao **CNPq**, **CAPES**, **FINEP** e **RENALI** pelo auxílio financeiro.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SORTIVA EM DISCO ROTATÓRIO (RDSE) PARA DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA POR UHPLC-MS/MS

AUTOR: Filipe Fagan Donato
ORIENTADOR: Renato Zanella

O uso de agrotóxicos tanto na agricultura quanto na área urbana, sempre esteve associado a vantagens e desvantagens. Pode-se destacar como benefícios o aumento da produtividade das lavouras e o controle de vetores causadores de doenças. No entanto, a utilização excessiva destas substâncias vem causando malefícios à saúde humana e ao meio ambiente, principalmente no que diz respeito aos recursos hídricos. No presente trabalho, um método para a determinação de resíduos de 62 agrotóxicos em águas superficiais, utilizando extração sortiva em disco rotatório (RDSE) para o preparo de amostra e determinação por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS) foi otimizado e validado. Na otimização do método de extração foram avaliados diversos parâmetros como: diferentes tempos e velocidades de rotação do disco na etapa de extração, tipos e quantidades de sorventes, pH da amostra, força iônica, tempo e velocidade de rotação do disco na etapa de dessorção dos analitos e diferentes solventes de dessorção. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 50 mL de amostra acidificada em pH 2 e adicionando 2,5 g de NaCl. A velocidade de rotação do disco na etapa de extração foi de 1600 rpm por um tempo de 80 min. Na cavidade do disco foi utilizado o sorvente polimérico Oasis[®] HLB (20 mg). A dessorção dos analitos foi realizada com 3 mL de metanol por 60 min usando uma velocidade de rotação de 1600 rpm. As curvas analíticas apresentaram linearidade entre 0,05 ou 0,1 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de r^2 maiores que 0,99 para todos os compostos. O limite de quantificação do método variou entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método apresentou exatidão e precisão adequadas, com recuperações entre 70,1 e 119,9% e RSD $\leq 20\%$ para níveis de fortificação 0,05; 0,1; 0,5 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O método validado foi aplicado em 11 amostras de água superficiais de diferentes bacias hidrográficas do estado do Rio Grande do Sul. Apenas uma amostra não apresentou resíduos de agrotóxicos. As demais apresentaram resíduos de pelo menos um dos seguintes agrotóxicos: atrazina, azoxistrobina, clomazona, difenoconazol, epoxziconazol, propoxur, simazina e tebuconazol. Das seis bacias hidrográficas amostradas todas apresentaram resíduos de agrotóxicos e as concentrações variaram entre 0,06 e 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados indicam que o método proposto é adequado para análise de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais, permitindo o preparo de várias amostras simultaneamente com baixo consumo de material.

Palavras-chave: RDSE. Água. Preparo de amostra. UHPLC-MS/MS.

ABSTRACT**EVALUATION OF THE ROTATING DISK SORPTIVE EXTRACTION (RDSE) TECHNIQUE FOR MULTIRRESIDUE DETERMINATION OF PESTICIDES IN WATER BY UHPLC-MS/MS**

AUTHOR: Filipe Fagan Donato
ADVISOR: Renato Zanella

The use of pesticides in agriculture and urban areas has always been associated with advantages and disadvantages. As benefits, the increase of the productivity of crops and the control of vectors that cause diseases can be highlighted. However, excessive use of these substances has been causing human health damage as well as environmental degradation, especially regarding to water resources. In the present work, a method for the determination of 62 pesticides residues in surface water using rotating disk sorptive extraction (RDSE) as sample preparation and determination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was optimized and validated. Several parameters were evaluated during the development of the extraction method: time and rotational disk velocity in the extraction step, types and amounts of sorbents, sample pH, ionic strength, time and velocity of the rotating disk in the desorption step of the analytes and different desorption solvents. The best results were obtained using 50 mL of acidified sample at pH 2.0 and 2.5 g of NaCl. The velocity of rotation disk in the extraction stage was 1600 rpm in a time of 80 min. Inside the disk cavity the polymeric sorbent Oasis[®] HLB (20 mg) used. The desorption step of the analytes was performed with 3 mL of methanol for 60 min using a rotation velocity of 1600 rpm. The analytical curves showed linearity between 0.05 or 0.1 to 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, with r^2 values greater than 0.99 for all compounds. The method LOQ values ranged from 0.05 to 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$. The method showed suitable accuracy and precision, with recoveries between 70.1 and 119.9% and RSD $\leq 20\%$ for the spiked levels at 0.05; 0.1; 0.5 and 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. The validated method was applied to 11 surface water samples from different river basins of the Rio Grande do Sul state. Only one sample presented no pesticide residues. The other samples presented residues of at least one of the following pesticides: atrazine, azoxystrobin, clomazone, difenoconazole, epoxiconazole, propoxur, simazine and tebuconazole. From the six hydrographic basins, all presented pesticides residues and the concentrations ranged between 0.06 and 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$. Therefore, the results indicate that the proposed method is suitable for the analysis of pesticide residues in surface waters, allowing the preparation of several samples simultaneously with low material consumption.

Keywords: RDSE. Water. Sample preparation. UHPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos processos que regem a dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente.....	37
Figura 2 - Representação de um cartucho típico empregado em SPE.	50
Figura 3 - Representação (A) da microextração em fase sólida (SPME) e (B) da extração sortiva em barra magnética (SBSE).	54
Figura 4 - Representação da base do dispositivo da RDSE.	54
Figura 5 - Representação dos dispositivos utilizados na RDSE em (a) a versão clássica da técnica com PDMS e em (b) a versão onde uma cavidade no disco é preenchida por um determinado sorvente.	55
Figura 6 - Representação dos pontos de coletas de água nas diferentes bacias hidrográficas.....	78
Figura 7 - Cromatograma de íon total, juntamente com as transições SRM de alguns compostos avaliados neste trabalho, obtidos por UHPLC-MS/MS.....	82
Figura 8 - Efeito do tempo na etapa de extração de dois agrotóxicos avaliados neste estudo.	83
Figura 9 - Efeito da velocidade de rotação do disco na extração dos compostos em amostras de água.....	86
Figura 10 - Efeito do pH da amostra em relação a média das áreas obtidas na extração dos agrotóxicos por RDSE e determinação por UHPLC-MS/MS.....	91
Figura 11 - Resultados dos analitos que apresentaram diferença significativa em relação à adição de diferentes quantidades de NaCl.	93
Figura 12 - Agrotóxicos extraídos por RDSE utilizando diferentes tipos de sorventes.	95
Figura 13 - Resultado dos analitos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sorventes poliméricos testados na etapa de extração por RDSE.....	97
Figura 14 - Compostos que apresentaram diferença significativa em área nos resultados com diferentes quantidades de sorventes para a extração por RDSE.....	99
Figura 15 - Comparação da área dos solventes metanol e acetonitrila utilizados na etapa de dessorção dos agrotóxicos extraídos por RDSE.	101
Figura 16 - Principais etapas envolvidas na extração RDSE de agrotóxicos em amostras de água.....	103
Figura 17 - Cromatograma de íon total de uma fortificação na concentração $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos azinfós metílico e miclobutanil sobreposta ao “branco” da matriz.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores Máximos Permitidos (VMPs) de agrotóxicos em água potável e superficial estabelecidos no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul – RS, considerando a legislação vigente.	30
Tabela 2 - Aplicações da RDSE no preparo de amostras aquosas e determinação por cromatografia.	58
Tabela 3 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia.	62
Tabela 4 - Informações dos compostos, contendo algumas características importantes de cada um deles.	66
Tabela 5 - Gradiente da fase móvel empregado para a eluição dos compostos determinados por UHPLC-MS/MS.	70
Tabela 6 - Experimentos realizados através do planejamento 3 ² , para a otimização da etapa de dessorção dos analitos.	73
Tabela 7 - Compostos em estudo com os respectivos tempos de retenção, íon precursor, íons de quantificação e confirmação, energia do cone e de colisão para cada transição SRM.	79
Tabela 8 - Estimativas do efeito padronizado (SEE, do inglês <i>Standardized Effect Estimate</i>) para os compostos em estudo, para a otimização da etapa de dessorção.	87
Tabela 9 - Faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e razão de íons do método para cada agrotóxico avaliado neste trabalho.	106
Tabela 10 - Resultados de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em diferentes níveis de fortificação.	110
Tabela 11 - Resultados obtidos em amostras reais de águas superficiais na aplicação do método (RDSE e UHPLC-MS/MS) em comparação com os resultados obtidos pela técnica (SPE e UHPLC-MS/MS).	116
Tabela 12 - Resultados de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) utilizando uma amostra real de água superficial e uma amostra branco (água ultrapura), fortificada na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	– Acaricida
ABNT	– Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	– Acaricida
AINEs	– Anti-inflamatórios não esteroidais
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	– Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
API	– Ionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>
APPI	– Fotoionização a Pressão Atmosférica, do inglês <i>Atmospheric pressure Photoionization</i>
C ₁₈	– Sílica modificada com hidrocarboneto linear C ₁₈ , octadecilsilano
CAR	– Carboxeno
CEPEA	– Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CONAMA	– Conselho Nacional de Meio Ambiente
CONAB	– Companhia Nacional de Abastecimento
d.i	– Diâmetro interno
DL 50	– Dose Letal para 50% dos organismos testes
EMBRAPA	– Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPC	– Equipamento de Proteção Coletivo
EPI	– Equipamento de Proteção Individual
ESI	– Ionização por Eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
eV	– Elétrons volt
F	– Fungicida
GC	– Cromatografia gasosa, do inglês <i>gas chromatography</i>
GC-MS/MS	– Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
H	– Herbicida
HCH	– Hexaclorociclohexano

HPLC	– cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>
HPA	– Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HLB	– Balanço hidrofílico lipofílico, do inglês <i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>
I	– Inseticida
IBAMA	– Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA	– Ingestão Diária Aceitável
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K_{oc}	– Coeficiente de adsorção a matéria orgânica do solo
K_{ow}	– Coeficiente de partição octanol água
LARP	– Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas
LC	– Cromatografia líquida, do inglês <i>liquid chromatography</i>
LC-MS/MS	– Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Série, do inglês <i>liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
LOD	– Limite de Detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	– Limite de Quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
LLE	– Extração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>
LMRs	– Limites Máximos de Resíduos
m/v	– Razão massa volume
m/z	– Razão massa carga
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeOH	– Metanol
MIP	– Polímero impresso molecularmente, do inglês <i>molecularly imprinted polymers</i>
MISPE	– Extração em fase sólida molecularmente impressa, do inglês <i>molecularly imprinted solid-phase extraction</i>
MS	– Espectrometria de massas, do inglês <i>mass spectrometry</i>
MS/MS	– Espectrometria de massas em série, do inglês <i>tandem mass spectrometry</i>

n	– Número de replicatas
N	– Nematicida
NaCl	– Cloreto de sódio
N ₂	– Nitrogênio
PA	– Poliacrilato
PARA	– Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PC	– Padrão de controle
PDMS	– Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	– Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
PES	– Polietersulfona
pH	– Potencial hidrogeniônico
PI	– Padrão Interno
PIB	– Produto Interno Bruto
pKa	– Constante de dissociação ácida
pKb	– Constante de dissociação básica
PPA	– Potencial de Periculosidade Ambiental
PS	– Padrão de Substituição
PTFE	– Politetrafluoretileno
PV	– Pressão de Vapor
r	– Coeficiente de correlação
r ²	– coeficiente de determinação
RDSE	– Extração sortiva em disco rotatório, do inglês <i>rotating disk sorptive extraction</i>
rec	– Recuperação
rpm	– Rotação por minuto
RSD	– Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
RSD _{PI}	– Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
S/R	– Relação sinal ruído
SANTE	– Saúde e Proteção do Consumidor, do francês <i>Santé et protection des consommateurs</i>
SEE	– Estimativa do Efeito Padronizado, do inglês <i>Standardized Effect Estimate</i>

SBSE	– Extração sortiva em barra de agitação, do inglês <i>stir bar sorptive extraction</i>
SPME	– Microextração em fase sólida, do inglês <i>solid phase microextraction</i>
SINDAG	– Sindicato Nacional da Indústria de defensivos Agrícolas
SINITOX	– Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas
SPE	– Extração em Fase Sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>
SRM	– Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TPP	– Trifenilfosfato
TQ	– Triplo quadrupolo
t_R	– tempo de retenção
UHPLC-MS/MS	– Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série, do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>
v/v	– Volume por volume
VMP	– Valor Máximo Permitted
WHO	– Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	20
1.1.1 Objetivo geral	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 HISTÓRIA, CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	21
2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS.....	24
2.3 LEGISLAÇÕES BRASILEIRAS DESTINADAS AO CONTROLE DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA	28
2.4 BENEFÍCIOS E PREJUÍZOS DA UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS.....	33
2.4.1 Impacto ambiental pelo uso de agrotóxicos	36
2.4.2 Fontes de contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos.....	39
2.4.3 Casos de contaminação por agrotóxicos em recursos hídricos	41
2.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	44
2.5.1 Ionização por eletronebulização (ESI).....	46
2.5.2 Analisadores de massas	47
2.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA	48
2.6.1 Extração sortiva em disco rotatório (RDSE).....	54
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.....	61
3 MATERIAIS E MÉTODOS	64
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	64
3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	65
3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS	65
3.4 ESCOLHA DO PADRÃO DE CONTROLE E DO PADRÃO INTERNO	68
3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS.....	68
3.6 CONDIÇÕES OTIMIZADAS NO SISTEMA UHPLC-MS/MS.....	69
3.6.1 Escolha da fase móvel e gradiente	70
3.6.2 Otimização da fonte de ionização por eletronebulização	70
3.7 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO POR RDSE PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA.....	71
3.7.1 Preparação do disco rotatório	72
3.7.2 Variáveis hidrodinâmicas otimizadas na etapa de extração	72
3.7.3 Variáveis químicas na extração.....	74
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO RDSE E UHPLC-MS/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRA DE ÁGUA	74
3.8.1 Seletividade.....	75
3.8.2 Linearidade e Curvas Analíticas.....	75
3.8.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ).....	75
3.8.4 Ensaios de recuperação relativa para avaliar a exatidão	75
3.8.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	76

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO.....	77
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
4.1 CONDIÇÕES OTIMIZADAS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA.....	79
4.2 SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA A RDSE	82
4.2.1 Efeito do tempo de extração.....	83
4.2.2 Velocidade de rotação do disco na etapa de extração.....	84
4.2.3 Tempo e velocidade de rotação do disco rotatório na etapa de dessorção.....	87
4.2.4 Efeito do pH.....	89
4.2.5 Efeito da força iônica na extração dos agrotóxicos em amostra de água	92
4.2.6 Avaliação de diferentes tipos de sorventes	94
4.2.7 Estudo da quantidade de sorvente utilizada para a etapa de extração	97
4.2.8 Solvente de dessorção.....	100
4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO	102
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO RDSE PARA A EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS E DETERMINAÇÃO POR UHPLC-MS/MS	103
4.4.1 Seletividade.....	103
4.4.2 Curva analítica e faixa de trabalho	104
4.4.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção do método.....	104
4.4.4 Exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) ...	108
4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS.....	114
5 CONCLUSÕES	119
APÊNDICES	140

1 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura, bem como na área urbana, está atrelado a diferentes vantagens e desvantagens. Os benefícios de sua utilização estão associados, por exemplo, ao controle, prevenção ou destruição de pragas, ervas daninhas e insetos, que em consequência disto, aumentam e melhoram a produtividade agrícola, promovem o desenvolvimento da economia de diferentes países, bem como controlam possíveis surtos epidemiológicos causados por distintos vetores (FARAJZADEH et al., 2011; LONDRES, 2011; MASIÁ et al., 2015).

Contudo, a utilização intensiva e indiscriminada destas substâncias ao longo dos anos tem provocado preocupações quanto aos possíveis efeitos nocivos tanto para saúde humana quanto para o meio ambiente. Esses problemas estão relacionados principalmente ao acúmulo de resíduos de agrotóxicos no solo, no ar e na água. Neste aspecto, os recursos hídricos superficiais aparecem como principal destino em termos de dispersão dos agrotóxicos no meio ambiente. Destacando-se o escoamento superficial e a lixiviação, pois estes representam as maiores rotas de dispersão dos agrotóxicos para os sistemas aquáticos, o que pode causar implicações na qualidade das águas superficiais e também subterrâneas (MENEZES, 2005; GLIESSMAN & ROSEMEYER, 2010; BRITTO *et al.*, 2012; BORTOLOZO *et al.*, 2016)

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta principalmente quando a água é destinada para o consumo humano (RODRIGUES et al., 2013). No Brasil, a Resolução nº 357, de 17/3/2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece limites máximos para contaminantes em águas, de acordo com o seu uso. Por outro lado, a Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelece os limites máximos permitidos de agrotóxicos em água destinada ao consumo humano. Assim, o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em recursos hídricos é necessário para avaliar os riscos destes poluentes no meio ambiente. Por esse motivo, o desenvolvimento de métodos analíticos como ferramenta para efetivação deste controle torna-se imprescindível.

Na determinação de resíduos e contaminantes em água um dos passos mais importantes é o desenvolvimento do preparo de amostras, onde os analitos são extraídos e/ou separados da matriz. Dessa forma, as técnicas de extração têm sido foco de intensa pesquisa nos últimos anos, visando avanços na miniaturização,

simplificação e automação desta etapa. Algumas técnicas são baseadas no mecanismo de sorção e já estão bem difundidas sendo aplicadas em extrações exaustivas ou dinâmicas, como é o caso da largamente difundida extração em fase sólida (SPE).

No entanto, existem técnicas não exaustivas ou estáticas como, por exemplo, a técnica de extração sortiva em disco rotatório (RDSE) desenvolvida por Richter e colaboradores (2009). O princípio de funcionamento da RDSE baseia-se nos princípios gerais da microextração em fase sólida (SPME) e extração sortiva em barra de agitação (SBSE). Assim, esta técnica consiste em duas etapas fundamentais, a extração ou enriquecimento do analito para a fase extratora, seguida da retroextração ou dessorção dos solutos empregando um solvente adequado, para posterior determinação.

Dentre as diferentes técnicas existentes para a determinação de resíduos de agrotóxicos e contaminantes orgânicos em água, destacam-se as técnicas cromatográficas, como, por exemplo, a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC). O uso da UHPLC acoplada à espectrometria de massas em série (MS/MS), tem apresentado bons resultados na determinação de resíduos de agrotóxicos com alta seletividade e detectabilidade, menor volume de amostra, menor consumo de fase móvel e reduzidos tempos de análise (OSHITA & JARDIM, 2015).

Neste contexto, é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de identificar e quantificar possíveis resíduos de agrotóxicos presentes na água. Além disso, estes métodos devem ao mesmo tempo, priorizar a eficiência, a rapidez, a confiabilidade bem como, serem capazes de analisar diversos analitos de diferentes classes de resíduos de agrotóxicos em baixos níveis de concentrações.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade da técnica de extração sortiva em disco rotatório RDSE como preparo de amostras na determinação multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes em água por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (UHPLC-MS/MS, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*).

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Estudar as melhores condições cromatográficas para a determinação dos agrotóxicos por UHPLC-MS/MS.
- ✓ Avaliar as melhores condições de tempo e velocidade de rotação do disco na etapa de extração.
- ✓ Otimizar a velocidade de rotação do dispositivo e o tempo na etapa de dessorção dos analitos.
- ✓ Avaliar o efeito do pH e da força iônica das amostras na etapa de extração.
- ✓ Avaliar a quantidade e os diferentes tipos de sorventes para a extração dos analitos: Oasis[®] HLB; Strata[®] X; Strata[®] SDB-L; Bond Elut Nexus e Strata[®] C₁₈.
- ✓ Estudar o efeito de diferentes solventes de dessorção.
- ✓ Avaliar os parâmetros envolvidos para a validação do método analítico.
- ✓ Aplicar o método em amostras reais de águas superficiais de diferentes bacias hidrográficas, localizadas na região central e norte do estado do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA, CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os termos agrotóxicos, defensivos agrícolas, biocidas, venenos e pesticidas, segundo a Organização Mundial da Saúde (2009), são qualquer substância ou mistura de substâncias utilizadas na prevenção, controle ou destruição de pragas (incluindo vetores de doenças), infestantes ou animais indesejáveis que interfiram com a produção, armazenamento, transporte, distribuição e transformação de gêneros alimentícios, produtos agrícolas, madeira ou alimentos para animais. Estão incluídos também neste conceito os reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes ou agentes para prevenção da queda prematura dos frutos ou ainda, substâncias utilizadas antes e após a colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem. Nesta definição não estão incluídos fertilizantes, aditivos ou medicamentos veterinários (WHO, 2009).

No Brasil, a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, define toda atividade relacionada aos agrotóxicos e estabelece sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização. Esta lei define o termo “agrotóxico” da seguinte forma:

“Os 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 também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e 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 do crescimento (BRASIL, 1989).

Para a *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC* (2012), os agrotóxicos são substâncias pertencentes a uma ampla classe de compostos bioativos empregados principalmente na produção de alimentos, os quais possuem funções básicas de prevenir, controlar e destruir pragas de origem animal, vegetal ou

microbiológica que, de um modo ou outro, afetam a produção e o armazenamento de alimentos.

De acordo com o capítulo II do Decreto lei 4074 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802/89 estabelecem os órgãos oficiais e suas competências. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem competência de avaliar a eficácia agrônômica dos agrotóxicos (produtos formulados), ao Ministério da Saúde cabe avaliar e classificar a nível toxicológico, e ao Ministério do Meio Ambiente, por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) possui aptidão para realizar avaliação e classificação quanto ao potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o responsável pela avaliação do impacto dos agrotóxicos na saúde humana e pelo estabelecimento dos limites máximos de resíduos (LMRs) (ANVISA, 2011). Os LMRs referem-se a valores provenientes de experimentos de campo, exigidos para cada cultura, levando em consideração a ingestão diária aceitável (IDA), que é a quantidade máxima de uma substância, que é ingerida diariamente durante toda a vida que não oferece risco a saúde (FERMAM & ANTUNES, 2009).

A classificação dos agrotóxicos constitui tema de polêmica devido às várias denominações que tem sido aplicada para indicar sua ação. Dentre as diversas classificações, tem-se quanto a toxicologia, com base no grau de toxicidade para o homem, segundo a LD_{50} que é a dose capaz de provocar a morte de, pelo menos, 50% das espécies estudadas (geralmente ratos ou camundongos). Os compostos são sempre classificados na classe mais restritiva, ou seja, quando a LD_{50} dérmica de um composto for mais baixa do que a LD_{50} oral a classificação final baseia-se na toxicidade dérmica e vice-versa (ANVISA, 2005a).

A ANVISA realiza a classificação de um agrotóxico quanto a sua toxicidade. Esta classificação permite a interpretação do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, facilitando a identificação e a dimensão do risco na utilização destes produtos. As classes variam de I a IV, ou seja, quando um composto for classe I (extremamente tóxico) estará presente uma faixa na cor vermelha em seu rótulo, quando for classe II (altamente tóxico) a faixa será amarela, para compostos classificados na classe III (mediamente tóxico) estará presente em seu rótulo a cor

azul e quando for classe IV (pouco tóxico) a cor indicativa será verde (ANVISA, 2005a).

A competência para avaliar o comportamento ambiental dos agrotóxicos e estabelecer suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental (PPA) é do Ministério do Meio Ambiente, conforme definido na Lei dos Agrotóxicos (BRASIL, 1989). O IBAMA dispõe da Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996 para a classificação do PPA para cada agrotóxico. Esta classificação indica a potencialidade de determinado agrotóxico causar impacto ambiental e, para isso, tal potencialidade é baseada nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (BRASIL, 1996). Desta forma, a periculosidade ambiental é atribuída a características do agrotóxico que promovem contaminação e danos aos compartimentos bióticos e abióticos dos ecossistemas, conforme a seguinte graduação de classes: Classe I – Altamente Perigoso ao meio ambiente ($DL_{50} \leq 5 \text{ mg kg}^{-1}$); Classe II – Muito Perigoso ao meio ambiente ($DL_{50} = 5-50 \text{ mg kg}^{-1}$); Classe III – Perigoso ao meio ambiente ($DL_{50} = 50-500 \text{ mg kg}^{-1}$); Classe IV – Pouco Perigoso ao meio ambiente ($DL_{50} \geq 500 \text{ mg kg}^{-1}$).

É importante salientar que o objetivo da classificação é comunicar o perigo do produto ao usuário, independentemente do uso de Equipamentos de Proteção Individuais (EPIs) ou Coletivos (EPCs). Não é benéfico ao usuário receber informações superestimadas ou subestimadas. Dessa forma, não é razoável a classificação de um produto com base em um parâmetro que não representa o seu perigo real. Por exemplo, quando os estudos de toxicidade inalatória aguda forem realizados dentro das condições e de protocolos internacionalmente reconhecidos, e não causarem 50% de mortalidade, não é razoável utilizar este parâmetro para a classificação toxicológica de um produto, pois dessa forma o perigo seria superestimado, prejudicando, conseqüentemente, a comunicação do perigo (ANVISA, 2016).

Do ponto de vista técnico, os agrotóxicos podem ser classificados, de acordo com a praga que eles combatem, as principais classes são:

- Herbicidas: são aqueles destinados ao combate de ervas daninhas. Podem ser classificados pelo tipo de atividade (contato ou sistêmico), usos (pré-emergentes ou pós-emergentes), modo de ação sobre o mecanismo bioquímico das plantas, e também como herbicidas seletivos e não-seletivos.

- Inseticidas: substâncias químicas destinadas à eliminação de insetos. Dentro dessa classe pode-se destacar três grandes famílias de compostos químicos: os organossintéticos, os inorgânicos e os bioinseticidas.
- Fungicidas: agentes químicos, físicos e biológicos utilizados para o controle de fungos.
- Nematicidas: São aqueles que controlam nematoides, organismos extremamente pequenos que podem causar danos às plantas cultivadas, atacando caules, folhas e flores.
- Bactericida: produtos químicos destinados ao controle de bactérias (ALVES FILHO, 2002).

Ainda, cabe ressaltar que o desenvolvimento de novos compostos é muito rápido, surgindo novas classes como, por exemplo, triazinas, benzonitrilos, tiocarbamatos, dinitroanilinas, fenoxiácidos, éteres difenil, piridazinonas, compostos bipyridinas, uréias e uracilos, sulfoniluréias, imidazolinonas, ácidos carboxílicos halogenados, bem como organometálicos (MARONI *et al.*, 2000; PLIMMER, 2001).

2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS

Cada agrotóxico, em função de sua estrutura molecular, possui uma série específica de propriedades físico-químicas. A própria estrutura molecular dos compostos determina potencialidades de seu grau de interação com o meio ambiente (PEREIRA *et al.*, 2016).

O conhecimento das características físicas, químicas, biológicas e estrutura química presentes nos agrotóxicos é importante para o conhecimento dos mecanismos de contaminação, reatividade, toxicidade e mobilidade, sendo estas informações importantes para tomadas de decisões no caso de contaminações. Os processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam o comportamento de um agrotóxico após sua aplicação no ambiente, sendo este governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação biológica e decomposição química) transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial) e pelas interações desses processos (SPADOTTO & GOMES, 2014).

Segundo Cabrera e colaboradores (2008), as principais propriedades físico-químicas dos agrotóxicos relacionadas com a persistência na água são: solubilidade

em água, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), constante de dissociação ácida do composto (K_a), pressão de vapor (PV), coeficiente de adsorção normalizado pelo carbono orgânico (K_{oc}) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) no solo e na água.

Dentre os vários fatores que controlam o comportamento ambiental de uma substância química a solubilidade destaca-se como um dos mais importantes. A solubilidade em água indica a máxima dissolução de uma substância em água pura a uma determinada temperatura. Assim, quanto maior a quantidade de grupos hidrofílicos a substância possuir, maior será sua afinidade com a água e maior será sua solubilidade (MARTINS *et al.*, 2013). Em geral, moléculas hidrossolúveis apresentam baixa sorção por partículas do solo e conseqüentemente, são facilmente incorporadas no ciclo hidrológico e, por isso, apresentam maior potencial de contaminação de águas superficiais e/ou subterrâneas (BARRIGOSI *et al.*, 2005; OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011). A unidade utilizada para expressar a solubilidade de um agrotóxico em um determinado solvente é $mg L^{-1}$, ou seja, a massa de agrotóxico (miligramas) que se dissolve em um litro de água (L). Os agrotóxicos que possuem valores de solubilidade menores ou iguais a $10 mg L^{-1}$ apresentam baixa solubilidade em água; aqueles com valores entre 10 e $1000 mg L^{-1}$ são considerados de moderada solubilidade e acima de $1000 mg L^{-1}$ são agrotóxicos com alta solubilidade em água (NEY, 1995).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow} ou Log P) é a medida de como uma substância química se distribui entre duas fases imiscíveis: fase polar (representada pela água) e apolar (representada pelo 1-octanol) em uma determinada temperatura e pressão específica (MACKAY *et al.*, 2006). Esta unidade é uma medida da lipofilicidade da molécula. O K_{ow} é importante para definir o destino das moléculas orgânicas no ambiente e as combinações entre as substâncias. Agrotóxicos apolares ou lipofílicos com altos valores de $\log K_{ow}$ ($\log K_{ow} > 4$) sofrem interações fortes com os lipídios, por exemplo. Portanto, eles possuem um alto potencial de bioacumulação nos tecidos gordurosos dos organismos, materiais orgânicos degradados e matéria orgânica (CALDAS; ZANELLA; PRIMEL, 2011a; BARRIGOSI *et al.*, 2005). Por outro lado, os agrotóxicos polares ou hidrofílicos com valores de $\log K_{ow}$ baixos ($\log K_{ow} < 1$), interagem fracamente com os materiais lipídicos e, claramente, são mais solúveis em água. Devido a estas características apresentam baixos fatores de bioacumulação, por exemplo, em organismos aquáticos (PEREIRA *et al.*, 2016).

A constante de equilíbrio ácido-base (K_a ou K_b) ou o potencial de dissociação ácido/base (pK_a/pK_b) são empregados para moléculas que possuem caráter ácido fraco ou base fraca, respectivamente, e representam a maior ou menor tendência que o agrotóxico tem em se ionizar, ou seja, a possibilidade da molécula do agrotóxico sofrer uma dissociação. Assim, valores mais elevados de pK_a indicam ácidos mais fracos ou menor potencial para dissociar-se (MINGUELA & CUNHA, 2011). Ainda, quanto mais baixo o valor de pK_a , maior é o grau de dissociação iônica, e conseqüentemente mais solúvel é a substância.

Os agrotóxicos quando no ambiente estão sujeitos a numerosas reações que levam à sua degradação. Estas reações incluem a hidrólise, oxidação, degradação biológica, e fotodegradação (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011). Os processos de degradação de uma molécula no solo ou em solução aquosa podem ser medidos através do tempo de meia vida ($t_{1/2}$) (MACKAY *et al.*, 2006). O $t_{1/2}$ de um agrotóxico é o tempo necessário para que a concentração diminua a metade, independentemente da concentração inicial no meio (SILVA & FAY, 2004; MINGUELA & CUNHA, 2011). Assim, se o $t_{1/2}$ de um composto for de 30 dias, isto significa, que após 30 dias da aplicação, permanecerá no ambiente (solo) a metade de sua concentração inicial (BARRIGOSSI *et al.*, 2005). Portanto, o $t_{1/2}$ de um agrotóxico é uma medida da sua persistência no meio ambiente e a compreende seus possíveis impactos ambientais. Além disso, a determinação destes valores é fortemente influenciada pelas condições ambientais (solo, localização, clima, atividade biológica). Assim, o $t_{1/2}$ só pode ser usado como estimativa e como comparação entre diferentes agrotóxicos (MINGUELA & CUNHA, 2011). Considera-se persistência curta até 90 dias; média de 91 a 180 dias e longa maior que 180 dias. O deslocamento dos agrotóxicos no solo durante sua meia vida pode ser pequeno (até 20 cm); médio (21 a 60 cm) ou grande (maior que 60 cm) (SANCHES *et al.*, 2003).

A pressão de vapor (PV) de um agrotóxico é a propriedade física mais significativa em relação às perdas deste por volatilização. Esta propriedade mede a tendência que a molécula tem de passar para fase vapor e é importante para avaliar o transporte dos compostos químicos para a atmosfera e, portanto, é utilizada para a determinação do potencial de volatilização do composto (SILVA & FAY, 2004). Esta propriedade é dependente do tamanho e dos grupos funcionais de um composto orgânico. Apenas a pressão de vapor não permite uma previsão das taxas de volatilização. Um grande número de fatores, como as condições ambientais do solo

e a técnica de aplicação utilizada, são importantes e afetam a volatilização do composto. Em situações práticas, a pressão de vapor "efetiva" é provavelmente inferior à pressão de vapor "pura", pois podem ocorrer, por exemplo, interações do agrotóxico com a superfície do solo (PEREIRA *et al.*, 2016). De forma geral, os agrotóxicos que possuem pressão de vapor (20 °C) menor que 1×10^{-6} Pascal (Pa) apresentam baixa volatilidade; valores entre 1×10^{-4} e 1×10^{-6} Pa indicam volatilidade moderada e os que possuem valores maiores que 1×10^{-4} Pa são considerados voláteis (SILVA & FAY, 2004).

O coeficiente de adsorção (K_{oc}) é a razão entre a massa de um composto químico que é adsorvido no solo por unidade de massa de carbono orgânico do solo. Através deste parâmetro é possível prever, por exemplo, se o agrotóxico possui tendência de ficar adsorvido na matéria orgânica do solo. Portanto o K_{oc} possui grande relevância ambiental, uma vez que, através deste valor pode-se avaliar a possível lixiviação dos analitos até águas subterrâneas (CALDAS; ZANELLA; PRIMEL, 2011a). Segundo Zanella e colaboradores (2011), valores mais elevados de K_{oc} (> 5000) indicam menos mobilidade, enquanto valores menores de K_{oc} (< 100) determinam maiores mobilidades de compostos orgânicos no solo (mais propensos a serem lixiviados do que aqueles com alto K_{oc}). Diferentes estudos demonstraram que a adição de resíduos orgânicos ou sub-produtos das plantações no solo aumentam a interação dos agrotóxicos com o solo, ou seja, aumentam sua adsorção. Em 2010, Dick e colaboradores, afirmaram que em solos do tipo argissolo vermelho, vertissolo ebânico, latossolo vermelho e planossolo háplico a matéria orgânica, embora presente em quantidades pequenas ($12 \leq C \leq 33 \text{ g kg}^{-1}$), é o principal sorvente do agrotóxico atrazina, contribuindo com mais de 56% para a sorção. Pereira-Junior e colaboradores (2015) constataram que a presença de palha (matéria orgânica) sobre o solo de cultivo de cana-de-açúcar, aumentou em média a adsorção dos agrotóxicos hexazinona (1,8 vezes) e tebutiuron (1,9 vezes). Ainda, Giori e colaboradores (2014) observaram que a adição de cinzas de caldeiras na plantação de cana-de-açúcar, causou um aumento na sorção de alaclor (4 vezes) e diuron (10 vezes). De acordo com Rocha e colaboradores (2013), a persistência do herbicida diuron é dependente dos atributos físicos e químicos dos solos, sendo a sua dissipação menor em solos com maior teor de matéria orgânica.

2.3 LEGISLAÇÕES BRASILEIRAS DESTINADAS AO CONTROLE DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

No Brasil, assim como nos demais países emergentes, as preocupações com os recursos naturais aumentaram nos últimos anos, mais especificamente com os recursos hídricos, principalmente aqueles potencialmente utilizados pelas populações para abastecimento (NETO & SARCINELLI, 2009).

Neste contexto, cresce a importância de aplicações de instrumentos de gestão ambiental que induzam à modificação do comportamento dos diversos usuários de recursos hídricos de forma a racionalizar o consumo e controlar possíveis contaminações. Na maioria dos países, os instrumentos de comando e controle permanecem como ferramenta essencial de gestão ambiental por parte do setor público de forma a mitigar os impactos ambientais. Eles implicam a imposição de normas para o acesso e uso de recursos naturais, tais como padrões de emissão, licenças e controle do uso do solo e da água (DEMAJOROVIC *et al.*, 2015).

Em janeiro de 1997, entrou em vigor a Lei nº 9.433, também conhecida como Lei das Águas. O instrumento legal instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Segundo esta lei, a água é considerada um bem de domínio público e um recurso natural limitado, dotado de valor econômico. Ainda, tem por finalidade assegurar às futuras gerações a disponibilidade de água necessária, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos, promover a utilização racional e integrada dos recursos hídricos com vistas ao desenvolvimento sustentável e garantir a proteção dos recursos hídricos (BRASIL, 1997).

Em 2005 foi criada a Resolução 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. O enquadramento tem por objetivo assegurar às águas qualidades compatíveis com os usos mais exigentes a que foram destinadas e diminuir os custos de combate à poluição das águas, mediante ações permanentes (BRASIL, 2005). Nesta Resolução são adotadas diversas definições, dentre elas destaca-se o enquadramento dos corpos hídricos em classes. As classes que fazem parte do enquadramento são: especial, classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4. Cabe ressaltar que, quanto maior o número da classe menor é a

qualidade da água e conseqüentemente menos exigentes são os padrões ambientais.

O enquadramento é o estabelecimento da meta ou o objetivo de qualidade da água a ser, obrigatoriamente, alcançado ou mantido em um corpo de água, de acordo com os usos preponderantes pretendidos, ao longo do tempo (BRASIL, 2005). De acordo com a Agência Nacional da Água (2009), o enquadramento é um instrumento de planejamento, pois deve tomar como base os níveis de qualidade que deveriam possuir ou ser mantidos para atender às necessidades estabelecidas pela sociedade e não apenas a condição atual do corpo d'água em questão. Dentre os diversos parâmetros desta resolução que são utilizados no enquadramento dos corpos hídricos, alguns agrotóxicos também possuem valores máximos de concentração permitidos. Na Tabela 1, observam-se os limites referentes a classe 1, que são águas que podem ser utilizadas para consumo humano, após tratamento simplificado, segundo a Resolução do CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005).

Em dezembro de 2011, o Ministério da Saúde publicou a Portaria 2914, substituindo a Portaria MS nº 518/2008. Esta nova portaria é a quinta versão da norma brasileira de qualidade da água para consumo, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2011a). No anexo VII da Portaria 2914/11 são exigidas, com frequência semestral, o monitoramento de resíduos de 27 agrotóxicos por parte dos responsáveis pelo abastecimento público de água. Observa-se na Tabela 1 os valores máximos permitidos de cada agrotóxico. Nesta última versão da Portaria de potabilidade da água, pode-se observar diversos avanços como, por exemplo, a necessidade da estruturação e habilitação de laboratórios, nos mais diversos níveis de governo e na área privada, uma vez que, ocorreu um avanço em relação aos parâmetros avaliados. Além disso, prevê competências específicas para a União, os Estados e Municípios e amplia a necessidade de capacitação e atualização técnica aos profissionais que atuam no fornecimento e controle da qualidade da água.

A Secretaria Estadual da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES/RS), considerando as atribuições estaduais conferidas pela Portaria MS nº 2914/11, elaborou e publicou em 2014 a Portaria SES RS 320. Esta portaria estadual estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade, no

grupo das substâncias químicas para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS. As substâncias a serem monitoradas encontram-se na Tabela 1. Esta Portaria foi criada, considerando que o estado do Rio Grande do Sul, por suas características climáticas e edafológicas, possui sua produção agrícola diversificada e de grande relevância à sua economia. Neste sentido, a SES RS fez uma avaliação identificando e quantificando quais eram os agrotóxicos utilizados nas principais culturas agrícolas de cada bacia hidrográfica do RS, tendo como objetivo adequar o monitoramento da qualidade da água para consumo humano à realidade de uso dos agrotóxicos no estado.

Tabela 1 - Valores Máximos Permitidos (VMPs) de agrotóxicos em água potável e superficial estabelecidos no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul – RS, considerando a legislação vigente.

Agrotóxicos	continua		
	Portaria 2.914/11 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Portaria SES RS 320/14 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Res. CONAMA 357/05 ($\mu\text{g L}^{-1}$) ¹
2,4 D	30	-	4,0
2,4,5 T	-	-	2,0
Abamectina	-	12	-
Alaclor	20	-	20
Aldicarbe + Aldicarbe sulfona + Aldicarbe sulfóxido	10	-	-
Aldrin + Dieldrin	0,03	-	0,005
Atrazina	2,0	-	-
Bifentrina	-	120	-
Carbaril	-	18	0,02
Carbendazim + benomil	120	120	-
Carbofurano	7,0	-	-
Cianamida	-	12	-
Cipermetrina	-	300	-
Ciproconazol	-	60	-
Cletodim	-	60	-
Clordano	0,2	-	0,04
Clorimurom etílico	-	120	-

continuação

Agrotóxicos	Portaria 2.914/11 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Portaria SES RS 320/14 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Res. CONAMA 357/05 ($\mu\text{g L}^{-1}$)¹
Clorotalonil	-	180	-
Clorpirifós + clorpirifós-oxon	30	-	-
Cresoxim metílico	-	2400	-
DDT + DDD + DDE	1	-	0,002
Diazinona	-	12	-
Difenoconazole	-	60	-
Diflubenzuron	-	120	-
Dimetoato	-	12	-
Ditianona	-	60	-
Diuron	90	-	-
Endossulfan (α , β e sais)	20	-	0,056
Endrin	0,6	-	0,004
Epoxiconazole	-	18	-
Etoxosulfuron	-	240	-
Fenitrotona	-	30	-
Fenoxaprop etílico	-	15	-
Fentiona	-	42	-
Fipronil	-	1,2	-
Flutriafol	-	60	-
Folpet	-	600	-
Fomesafem	-	18	-
Gama-cialotrina	-	6	-
Glifosato + AMPA	500	-	65
Gution	-	-	0,005
Heptacloro	-	-	0,01
Hexaclorobenzeno	-	-	0,0065
Hidrazida maleica	-	1800	-
Imazetapir	-	1500	-
Imidacloprido	-	300	-
Indoxacarbe	-	60	-
Iodosulfurom metílico	-	180	-
Ioxinil octanoato	-	30	-

Agrotóxicos	conclusão		
	Portaria 2.914/11 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Portaria SES RS 320/14 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Res. CONAMA 357/05 ($\mu\text{g L}^{-1}$) ¹
Lambda-cialotrina	-	30	-
Lindano (gama HCH)	2,0	-	0,02
Malationa	-	-	0,1
Mancozebe	180	180	-
Mesotrina	-	30	-
Metalaxil	-	480	-
Metamidofós + Acefato	12	4,8	-
Metamitrona	-	150	-
Metidationa	-	6	-
Metolacloro	10	-	10
Metoxicloro	-	-	0,03
Metsulfuron metílico	-	60	-
Molinato	6,0	-	-
Parationa metílica	9,0	-	0,04
Pendimetalina	20	-	-
Pentaclorofenol	-	-	0,009
Permetrina	20	-	-
Picoxistrobina	-	258	-
Profenofós	60	-	-
Simazina	2,0	-	2,0
Tebuconazol	180	-	-
Tembotriona	-	2,4	-
Terbufós	1,2	-	-
Tetraconazole	-	30	-
Tiametoxam	-	120	-
Tiodicarbe	-	180	-
Triciclazol	-	180	-
Trifluralina	20	-	0,2

¹ Valores de agrotóxicos referentes ao enquadramento de classe 1. Fonte: Ministério da Saúde (2011a); SES RS (2014) e Brasil (2005)

É importante salientar que na Tabela 1 encontram-se agrotóxicos cujo uso foi proibido no país e no mundo, a exemplo dos organoclorados, que apresentam

grande estabilidade química e acentuada ação residual e devido a elevada persistência no meio ambiente ainda são monitorados (PRATES *et al.*, 2011).

Outrossim, a União Europeia de acordo com a Diretiva 98/83 CE estabeleceu o valor de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ como concentração máxima permitida para qualquer agrotóxico individualmente e de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o total de agrotóxicos em águas destinadas para o consumo humano (GRIZA *et al.*, 2008). O monitoramento das concentrações de agrotóxicos nas águas é um passo necessário para a avaliação dos riscos destes poluentes no meio ambiente, e, atualmente, faz parte das legislações ambientais nacionais e internacionais.

2.4 BENEFÍCIOS E PREJUÍZOS DA UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS

Quando o tema “agrotóxicos” é tratado por diferentes autores na literatura, sempre está relacionado nos seus textos as vantagens e desvantagens da utilização destas substâncias. A seguir serão descritos alguns pontos positivos e negativos da aplicação dessas substâncias.

Uma das vantagens apresentadas pela utilização dos agrotóxicos é o aumento significativo na produtividade das lavouras e, conseqüentemente, aumento na produção agrícola. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2017) o Brasil obteve, em 2016, uma produção de 215,3 milhões de toneladas de cereais, leguminosas e oleaginosas. Isto tudo em uma área de 59 milhões de hectares. As principais culturas, que somadas representam 93,1% de toda produção são o arroz, o milho e a soja, que respondem 86,4% da área colhida. O grande sucesso de toda essa produção está diretamente associado aos avanços tecnológicos, juntamente com o uso de fertilizantes químicos, que enriquecem a terra e recuperam os solos empobrecidos pela constante utilização, bem como o uso de agrotóxicos que permite controlar diversas pragas, potencializando o cultivo (LONDRES, 2011). Aliado a isto, tem-se um incremento na disponibilidade de alimentos, além do aumento do lucro dos agricultores (ALVES FILHO, 2002). Ainda, segundo Alves Filho (2002), a utilização dos agrotóxicos funciona melhor e mais rápido que outras alternativas, ou seja, se comparado com outras medidas alternativas de controle de pragas, os agrotóxicos controlam a maioria das pragas de forma mais rápida.

O desenvolvimento econômico no Brasil sempre esteve ligado à agricultura, em 2015, este setor representou 23% do PIB (Produto Interno Bruto). A receita bruta para a agricultura nacional para o ano de 2015 foi de aproximadamente 866 bilhões de reais, com alta de 1,6% sobre a de 2014 (CEPEA, 2016). Outro ponto favorável, seria devido à utilização dos agrotóxicos no controle de doenças transmitidas aos seres humanos por vetores como, por exemplo, o combate contra o mosquito *Aedes Aegypti*, o qual transmite doenças como dengue e febre amarela.

Ao mesmo tempo, o mercado dos agrotóxicos movimenta a economia Brasileira. Segundo pesquisas recentes publicadas pelo SINDIVEG (2015) – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, a venda de agrotóxicos, no ano de 2015, movimentaram aproximadamente US\$ 9,6 bilhões, isto representa 17,5% do consumo mundial. Os inseticidas, os herbicidas e os fungicidas foram as classes de agrotóxicos que tiveram as maiores vendas no Brasil, em 2015, correspondendo a 33, 32 e 30%, respectivamente. Em termos de produto comercializado, no Brasil, estas três classes foram responsáveis por 95% da quantidade total, que foi de 558.556 toneladas de produto.

Apesar dos benefícios obtidos pelo uso dos agrotóxicos, diversos problemas associados à aplicação dessas substâncias têm sido constantemente observados. Estes problemas estão principalmente relacionados ao acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos; aparecimento de pragas resistentes; interrupção do controle biológico por inimigos naturais, ocasionando surtos de insetos-pragas; intoxicação de produtores rurais, bem como contaminação do solo, ar e água (KIM *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2004; MENEZES, 2005; GLIESSMAN & ROSEMEYER, 2010). Portanto, a aplicação de agrotóxicos está diretamente relacionada com a qualidade de vida da população.

Em termos de intoxicação por agrotóxico a divulgação em âmbito nacional é de responsabilidade do Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), vinculado a Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), disponibilizar anualmente dados de notificações de intoxicações em humanos e animais. Em 2013, foram registrados 1907 casos de intoxicação por agrotóxicos de uso agrícola, sendo que 75 pessoas vieram a óbito. Ainda, 967 casos de intoxicação por agrotóxicos de uso domésticos (SINITOX, 2016). No entanto, os efeitos da exposição a longo prazo destes princípios ativos são menos discutidos, pois é difícil estabelecer os possíveis

efeitos em função de que as consequências aparecem após anos de exposição de baixa intensidade repetidos ao longo de muitos anos (MULTIGNER, 2005).

A exposição a agrotóxicos pode estar associada a uma série de efeitos adversos à saúde humana, incluindo teratogenicidade e carcinogenicidade (BAPAYEVA *et al.*, 2016). Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*), órgão da Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), divulgou a classificação de mais cinco agrotóxicos como prováveis agentes carcinogênicos (provocam câncer) em humanos, dentre estas substâncias encontram-se a parationa, diazinona, malationa, tetraclorvinfós e o glifosato (IARC, 2015). Os agrotóxicos organoclorados, por exemplo, comportam-se como disruptores endócrinos, mas também são igualmente capazes de induzir o estresse oxidativo celular (GRAY *et al.*, 2016; PATHAK *et al.*, 2010). Estes compostos podem acumular no organismo humano, devido à sua solubilidade em lipídios e resistência ao metabolismo. Isto faz com que o seu tempo de meia-vida no tecido adiposo seja de aproximadamente 10 anos (REN *et al.*, 2011; OUYANG *et al.*, 2005).

Os impactos na saúde pública são amplos, atingem vastos territórios e envolvem diferentes grupos populacionais, como trabalhadores em diversos ramos de atividades, moradores do entorno de fábricas e fazendas, além de todos nós, que consumimos alimentos contaminados. Em 2013, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), o qual é coordenado pela ANVISA, divulgou o resultado do monitoramento de resíduos de agrotóxicos realizados nos anos de 2011 e 2012 em treze diferentes alimentos, incluindo arroz, alface, feijão, abobrinha, pimentão, tomate e uva, entre outros. Os resultados do monitoramento do PARA (2011/2012) mostram que 36% das amostras de 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados insatisfatórios. Existindo dois tipos de irregularidades, uma quando a amostra contém agrotóxico acima do Limite Máximo de Resíduo (LMR) permitido e outra quando a amostra apresenta resíduos de agrotóxicos não autorizados para o alimento pesquisado. Dentre os agrotóxicos encontrados nos alimentos destacam-se alguns como carbendazim, metomil, cipermetrina, permetrina, azoxistrobina, abamectina, entre outros. Ainda, segundo a ANVISA (2013), foram encontrados pelo menos dois agrotóxicos (azaconazol e tebufempirade) em amostra de uva, que nunca foram registrados no Brasil. Isto sugere que estes produtos podem ter entrado no Brasil de forma ilegal. Este

panorama indica que as boas práticas agrícolas não estão sendo cumpridas por alguns produtores, visto que estas ações devem ser adotadas para que o produto alcance a qualidade adequada. Ainda, evidencia a necessidade intensificada de programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em alimentos (OVIEDO *et al.*, 2003; CORRÊA JUNIOR & SCHEFFER, 2013).

2.4.1 Impacto ambiental pelo uso de agrotóxicos

A utilização negligente de agrotóxicos faz com que muitos sejam encontrados no meio ambiente, levando a alteração no ecossistema, em organismos não alvo, na água, no solo, no ar e conseqüentemente provocando graves problemas para o homem (KÖHNE *et al.*, 2009).

Após a aplicação dos agrotóxicos, estes podem se distribuir, degradar ou acumular em diferentes compartimentos ambientais (ar, solo e sistemas aquáticos) e nos seres vivos, conforme demonstrado na Figura 1. Os fatores que regem a dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente, dependem das formas de uso dos agrotóxicos, das condições e características ambientais (temperatura, radiação solar, volume de chuva, intensidade dos ventos, tipo de vegetação e solo), bem como das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos (PINHEIRO *et al.*, 2011; GOMES; CERDEIRA; SPADOTTO, 2013). Outra causa diz respeito à eficácia da aplicação dos agrotóxicos sobre a cultura, pois, apenas uma fração do que é aplicado realmente irá atingir o alvo esperado, enquanto uma grande parte sofrerá dispersão no meio ambiente.

Figura 1 - Representação dos processos que regem a dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente.



Fonte: (Adaptado de Nakamura, 2015).

Ainda, o destino dos agrotóxicos no ambiente é governado por processos de retenção (adsorção, absorção e dessorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e escoamento superficial), e pela interação entre esses processos (GOMES; CERDEIRA; SPADOTTO, 2013).

Na adsorção têm-se a transferência das moléculas dos agrotóxicos da fase móvel (líquida ou vapor) para a fase estacionária (partículas do solo), o que reduz a mobilidade das moléculas orgânicas no solo. Por outro lado, a dessorção representa o processo inverso. Nesses momentos, dependendo das forças envolvidas, pode haver a liberação de radicais, que contribuem para a degradação das moléculas de agrotóxicos. É também um processo muito importante levando em conta que ele é responsável pela retenção dos produtos em determinadas camadas do solo, liberando-os lentamente para a solução do solo, permitindo a ação de outras forças degradantes, como a biodegradação e a hidrólise. Já o processo de absorção refere-se à captação dos agrotóxicos do solo pelas plantas e é, provavelmente, a maior fonte de bioacumulação na cadeia alimentar e uma fonte importante de exposição à contaminação dos animais e do homem (TONI *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2007).

As características dos solos também são importantes nos processos de interação descritos anteriormente, ou seja, dependendo da textura, permeabilidade, assim como o teor de matéria orgânica exercem influência direta na adsorção/absorção dos agrotóxicos no solo (KAH & BROWN, 2007).

O processo de fotólise, refere-se à quebra das moléculas de agrotóxicos no ambiente pela ação da luz (fótons de vários comprimentos de ondas). Este processo é causado pela luz, em particular ultravioleta, que é mais destrutiva, resultando na excitação dos elétrons e conseqüentemente na quebra de certas ligações moleculares. Portanto, a fotodegradação de certas ligações moleculares ocorre somente se houver luz (específico de cada substância) capaz de romper as ligações moleculares destes compostos (OLIVEIRA & BRIGHENTI, 2011; MINGUELA & CUNHA, 2011). No processo de degradação por hidrólise uma hidroxila é introduzida na molécula inicial. A substância resultante é geralmente mais suscetível à possível biodegradação e fotólise. A hidrólise é considerada um processo físico-químico mais relevante para a degradação de moléculas de agrotóxicos. Uma das condições indispensáveis para ação da hidrólise é a presença de água, por ser um processo que ocorre preferencialmente em ambiente líquido. Entretanto, muitas vezes, a própria umidade presente no solo já é suficiente para ativar o processo (PEREIRA *et al.*, 2016).

Por outro lado, a contaminação do ar por agrotóxicos se deve principalmente devido à volatilização ou perda durante ou após a aplicação (DOBSON *et al.*, 2006). Essa transferência pode resultar da evaporação de um líquido, da sublimação de uma fase sólida, da evaporação de uma solução aquosa, ou da dessorção a partir da matriz do solo. Uma vez no ar, esses compostos podem se associar com a umidade das nuvens percorrendo longas distâncias até precipitarem com água da chuva, colocando em risco mananciais, plantas, peixes, seres humanos, tanto na zona rural, próximo a lavouras aplicadas, quanto em grandes cidades, distantes do local de aplicação (BEDOS *et al.*, 2002). De uma forma geral, a aplicação dos agrotóxicos dá-se por pulverização aérea ou terrestre, podendo ser manual ou mecânica. De acordo com Kosikowska & Biziuk (2010), durante a aplicação de agrotóxico, cerca de 30 a 50% da quantidade aplicada pode ser perdida para a atmosfera. Em contrapartida, Schummer e colaboradores (2010) informam que esta quantidade perdida pode ser acima de 90%, dependendo da tecnologia utilizada

durante a aplicação e portanto podem alcançar de forma significativa todos os compartimentos ambientais, além de outros seres vivos.

Neste sentido, a atmosfera torna-se o provável destino das perdas de agrotóxicos pelos processos de deriva e volatilização. Uma vez na atmosfera, o agrotóxico poderá ser novamente depositado à superfície por meio de vento (deposição seca) e/ou por precipitação (deposição úmida). A deposição seca ocorre quando a velocidade do vento é insuficiente para manter suspensa na atmosfera moléculas de agrotóxicos livres ou adsorvidas em partículas coloidais, ocorrendo a deposição sobre a superfície terrestre, em local não alvo. Já a deposição úmida é caracterizada pelo carregamento de partículas suspensas na atmosfera, pela ação das gotas da chuva, neve, neblina e/ou orvalho, em direção ao solo (GAVRILESCU, 2005). Assim, quando estas substâncias que estavam presentes no ar se depositarem, poderá ocorrer a contaminação do solo, da água, da flora, bem como da fauna.

2.4.2 Fontes de contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos

Os agrotóxicos, quando detectados na água, são definidos como micropoluentes, compostos químicos que, mesmo em baixas concentrações, conferem à água características de toxicidade tornando-a assim imprópria para grande parte dos usos. Muitos destes compostos provocam efeitos no sistema nervoso central humano que são bastante fortes e deletérios à saúde, além de características carcinogênicas, mutagênicas e até mesmo teratogênicas (BRASIL, 2006).

Quando os agrotóxicos são aplicados, parte dos compostos são absorvidos pelas plantas e outra parte chega diretamente no solo, ou ainda, podem ser aplicados diretamente no solo/água dependendo da sua finalidade. Nos ambientes aquáticos, a contaminação por agrotóxicos pode ocorrer através do escoamento superficial, volatilização e lixiviação a partir das áreas onde acontecem as aplicações (De MELO *et al.*, 2010). Além disso, o descarte inadequado das embalagens vazias de agrotóxicos, bem como o processo de limpeza dos equipamentos de pulverização também podem ser considerados como possíveis fontes de contaminação dos recursos hídricos (REICHENBERGER *et al.*, 2007).

O escoamento superficial acontece em razão do excesso de água de chuva que não é absorvida pelo solo, e escoar sobre sua superfície, carreando resíduos de agrotóxicos para as regiões mais baixas, podendo resultar na contaminação de rios, barragens, lagos, além de animais como, por exemplo, os peixes. Esta contaminação pode ser relativamente rápida, dependendo dos fatores que influenciam o escoamento superficial, tais como: relevo e tipo de cobertura vegetal, quantidade de precipitação em função da taxa de infiltração da água no solo, propriedades físico-químicas do solo e do agrotóxico, e taxa de aplicação (De MELO *et al.*, 2010).

Por outro lado, a principal causa da contaminação das águas subterrâneas por agrotóxicos é devido à lixiviação. A movimentação dos agrotóxicos ao longo do perfil do solo, ocorre de tal forma que as moléculas presentes na solução do solo percolam em direção ao lençol freático. Entre os fatores que influenciam o processo de lixiviação, destacam-se as condições ambientais, o grau de sorção do agrotóxico no solo, a condutividade hidráulica do solo e as práticas de manejo do solo e de aplicação do agrotóxico (BARIZON *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2007).

As fontes que lançam poluentes nos recursos hídricos ou no meio ambiente, são classificadas em pontuais ou difusas. Os efluentes industriais ou domésticos, representam a maior fonte artificial de poluição pontual de corpos hídricos. Essas fontes são consideradas pontuais na medida em que os poluentes atingem um determinado corpo d'água de forma concentrada no espaço, com localização definida e frequentemente com regime contínuo de produção. A poluição oriunda da atividade agrícola é considerada do tipo difusa, dificultando, assim, sua identificação, monitoramento e controle. Enquanto os riscos devido à presença de agentes patogênicos constituem problema imediato, agudo e, por vezes, associados a surtos de grandes proporções, os riscos químicos configuram-se, normalmente, como um problema de longo prazo, cujos efeitos crônicos, muitas vezes, são de difícil detecção. A preocupação maior ocorre com a ingestão contínua de água contaminada a baixas concentrações, o que configura um risco crônico (LIMA *et al.*, 2016)

Os ambientes aquáticos são utilizados em todo mundo com distintas finalidades, dentre as quais: o abastecimento de água para consumo humano, o uso industrial, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística, dentre outras. E como é possível observar, ao final do

processo de dispersão dos agrotóxicos no meio ambiente, os recursos hídricos constituem como principal destino dessas substâncias. Dessa forma, a preocupação aumenta, visto que muitos destes recursos hídricos são utilizados para abastecer a população.

O aumento da atividade humana e a industrialização têm elevado a concentração de poluentes físicos, químicos e biológicos em mananciais. Além disso, a população mundial aumenta em um ritmo acelerado. Desta forma, agricultura, indústria e cidades estão utilizando mais água. A demanda por água está dobrando a cada 21 anos, e isso acontece mais rapidamente em algumas regiões específicas (ANIRUDDHA & KUMAR, 2015; AHUJA, 2014). Segundo Ahuja (2014), a água está diretamente vinculada com a qualidade de vida dos seres humanos. Ainda, segundo o autor, aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas ao redor do mundo bebem água sem nenhum tratamento e entre 5 e 10 milhões de pessoas morrem, a cada ano, devido a doenças relacionadas à água, sendo a maioria crianças.

Dessa forma, toda a problemática em torno da dependência da agricultura em relação ao uso dos agrotóxicos, do uso abusivo e também incorreto destas substâncias, reforça a necessidade de monitoramento mais frequente dos recursos hídricos, principalmente aqueles localizados perto de áreas agrícolas e que são utilizados para o abastecimento humano.

2.4.3 Casos de contaminação por agrotóxicos em recursos hídricos

Estudos realizados por diferentes autores do Brasil e de outros países evidenciam o fenômeno da dispersão e a presença de agrotóxicos em recursos hídricos. COSTA *et al.* (2008) detectaram a presença de alaclor (0,14 a 0,72 $\mu\text{g L}^{-1}$) e propanil (0,02 a 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$) em amostras de água coletadas de mananciais, que são a principal fonte de abastecimento de água potável dos municípios de Turvo e Meleiro, na região sul do Estado de Santa Catarina – SC.

DONATO *et al.*, (2012b) analisaram amostras de água do rio Jacuí coletadas na cidade de Ernestina-RS, monitorando 81 agrotóxicos e 6 antibióticos. Foram detectados os agrotóxicos propoxur (27,2 - 51,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), clomazona (59,7 - 23,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e buprofezina (17,1 - 104,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em uma das amostras foi detectado resíduo de simazina (77,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). A ocorrência destes resíduos em altas concentrações pode ser explicada pelo fato da região possuir intensa atividade agrícola no entorno do rio

Jacuí e o período da coleta das amostras coincidir com a época de aplicação de agrotóxicos nas lavouras.

Em 2013, Masiá e colaboradores, avaliaram a presença de resíduos de 50 agrotóxicos e alguns metabólitos na bacia do rio Guadalquivir, na Espanha, entre 2010 e 2011. As concentrações encontradas variaram de 0,2 a 13 ng L⁻¹.

Bonanseca e colaboradores (2013), monitoraram a presença de resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Suquía, na Argentina. Dentre os compostos avaliados incluíam-se organoclorados, organofosforados, triazinas, piretróides e cloroacetamidas. Os autores comentam que devido a intensa prática agrícola na região, detectou-se a presença predominantemente de atrazina (433,9 ng L⁻¹), cipermetrina (121,7 ng L⁻¹) e de endossulfan sulfato (106,7 ng L⁻¹). Próximo às áreas urbanas, observou-se a predominância do composto cipermetrina.

Yu e colaboradores (2014), monitoraram possíveis fontes de contaminação por agrotóxicos organoclorados na água do rio Chao, na China. Entre os 24 agrotóxicos analisados, os compostos DDT, hexaclorociclohexanos (HCH), e hexaclorobenzeno (HCB) foram predominantes nas amostras. Ainda, os autores relataram a presença de γ -HCH, indicando aplicações recentes de agrotóxicos proibidos como, por exemplo, o lindano, destacando a importância do monitoramento de resíduos de agrotóxicos em águas superficiais. Neste mesmo sentido, Zhi e colaboradores (2015), avaliaram a presença de agrotóxicos organoclorados (OCP) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) nas águas do lago Poyang, na China. As concentrações totais de OCP e HPA encontradas foram entre 19,1 - 111,7 ng L⁻¹ e 5,5 - 266,1 ng L⁻¹, respectivamente. Entre os compostos predominantes, destacaram-se os OCP, endossulfan, e HCH que representaram 21,9, 24,6 e 24,6%, respectivamente do total das amostras. Apesar de apresentarem estas concentrações, os agrotóxicos mantiveram-se abaixo dos limites máximos estabelecidos.

Montagner e colaboradores (2014), desenvolveram um método para a determinação simultânea de 12 agrotóxicos em águas de superfície de rios do estado de São Paulo. As amostras foram coletadas no ano de 2013 nos rios Atibaia, Capivari, Corumbata, Piracicaba, Jaguari, Camanducaia, Mogi Guaçu, Mogi Mirim e Angra Cachoeira, Tabajara, Pires, Pinhal e barragem Tatu, totalizando 46 amostras. Nove dos doze compostos analisados mantiveram-se na faixa de concentração de 3 a 293 ng L⁻¹. Os compostos clorpirifós, profenofós e fipronil estiveram abaixo do

limite de quantificação. A frequente atividade agrícola em torno dos rios, predominantemente culturas de cana de açúcar, café, soja e cítricas evidenciam o aparecimento destes compostos ao longo dos cursos de água estudados.

Donato e colaboradores (2015), avaliaram amostras de água de rio de quatro cidades da região Central do RS. Em uma das amostras analisadas foi detectada a presença dos compostos permetrina e cipermetrina (ambas $< LOQ_m$) e lambda-cialotrina ($0,65 \mu\text{g L}^{-1}$).

Silva e colaboradores (2015) avaliaram 29 agrotóxicos e metabólitos em águas dos rios Mondego, Sado e Tejo, em locais de intensa atividade agrícola em Portugal. Dos compostos analisados, 20 foram detectados nas águas superficiais das bacias hidrográficas, sendo sete substâncias prioritárias: alacloro, atrazina, clorfenvinfós, clorpirifós, endossulfan, simazina e terbutrina.

Cruzeiro e colaboradores (2016), monitoraram 56 resíduos de agrotóxicos oriundos do escoamento superficial agrícola no rio Mondego, em Portugal. O monitoramento ocorreu nos anos de 2010 e 2011, totalizando 42 amostras de águas superficiais. Do total de compostos analisados, 55% estiveram acima do valor máximo permitido pela União Europeia. Os fungicidas difenoconazol (380 ng L^{-1}), PCB (37 ng L^{-1}) e HCB (53 ng L^{-1}) apresentaram concentrações de 4 a 7 vezes acima do estabelecido pela legislação.

Ccancapa e colaboradores (2016) estudaram a ocorrência de resíduos de 50 agrotóxicos em águas dos rios Turia e Júcar, na Espanha, por um período de dois anos consecutivos 2010/2011 e 2012/2013, respectivamente. Os resultados mostraram que a faixa de concentração variou de $< LOQ$ a 200 ng L^{-1} . O composto clorpirifós foi o agrotóxico mais frequentemente encontrado, enquanto imazalil, tiabendazol, tolclofos metílico, etiona e carbofurano foram aqueles encontrados em concentrações mais elevadas.

Ainda, em 2016, Sousa e colaboradores aplicaram um método para análise de resíduos de agrotóxicos em 10 reservatórios de água do estado do Ceará. A partir dos resultados obtidos, os autores observaram que 60% das amostras continham o composto atrazina em concentrações elevadas (aproximadamente $15 \mu\text{g L}^{-1}$), apresentando níveis 3 a 7 vezes maiores do que os valores máximos de resíduos permitidos nacional e internacionalmente.

2.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Existem diferentes técnicas disponíveis para determinação de resíduos de agrotóxicos em água. A escolha da técnica de separação depende das características dos agrotóxicos de interesse a serem analisados. Para compostos voláteis, semi-voláteis e termicamente estáveis aplica-se a técnica da cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*). Enquanto que compostos que apresentam baixa volatilidade e são instáveis termicamente são preferencialmente analisados por cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*). Os agrotóxicos mais utilizados atualmente possuem características mais polares, são instáveis termicamente ou não voláteis, são menos persistentes no meio ambiente e possuem baixas taxas de bioacumulação. Portanto, por apresentar estas particularidades, o uso da LC torna-se a técnica mais adequada para a determinação destes compostos (TETTE *et al.*, 2016, QUEIROZ *et al.*, 2012).

A cromatografia consiste em um método de separação aplicado em amostras contendo dois ou mais componentes, onde seu princípio básico consiste no equilíbrio desses componentes entre uma fase móvel e outra estacionária. Como cada componente presente na amostra sofrerá uma interação distinta entre as duas fases (LC) ou apenas com a fase estacionária (GC), isso resultará em migrações diferenciadas desses compostos. Conseqüentemente, ao final se observam tempos de retenção que são característicos para cada componente, permitindo assim promover a separação dos mesmos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) tem tido grande destaque, uma vez que o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009). A HPLC é uma técnica bem estabelecida e empregada nas mais diversas áreas para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica como, por exemplo, o desenvolvimento de novas fases estacionárias e avanços na instrumentação, o que permite que as análises sejam mais rápidas e mais eficientes (MALDANER & JARDIM, 2012).

O desenvolvimento de novos recheios para as colunas cromatográficas impulsionou o crescimento e a evolução da cromatografia líquida, possibilitou a

execução de análises mais rápidas sem comprometer o desempenho da separação cromatográfica. A utilização de partículas com diâmetro menor que 2 μm e altas pressões (entre 6000 a 15000 psi), estabeleceu o avanço da HPLC, para a técnica de UHPLC. Esta técnica tem permitido realizar análises cromatográficas com elevada eficiência, maior resolução dos picos cromatográficos, análises mais rápidas, com um menor volume de solvente e de amostra, e conseqüentemente menor geração de resíduo (MALDANER & JARDIM, 2009). Outras vantagens apresentadas pela UHPLC é a facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, a grande variedade de colunas analíticas, melhor detectabilidade e maior razão sinal/ruído, que, por sua vez, diminui o valor do LOQ e a menor geração de resíduos (PAÍGA *et al.*, 2015; OSHITA & JARDIM, 2015).

A identificação dos compostos é alcançada com base nos tempos de retenção dos analitos, ou seja, através da comparação. No entanto, este fator não é suficiente para permitir a identificação inequívoca e simultânea dos compostos, uma vez que existe a possibilidade de mais de um composto possuir o mesmo tempo de retenção, principalmente em análise com muitos analitos em matrizes bastante complexas. Assim, o uso de uma técnica mais poderosa e com informações mais precisas que auxilie na identificação dos compostos é necessária. Neste sentido, a utilização da Espectrometria de Massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tem sido bastante empregada em análise de compostos orgânicos em diferentes matrizes. A MS fornece informações estruturais que facilitam a identificação de compostos, as quais são de grande importância para a análise multirresíduo. Por isso, este sistema de detecção proporciona maior seletividade e minimiza a necessidade de separações cromatográficas com grande resolução, uma vez que é possível a quantificação de compostos que coeluem (CALDAS *et al.*, 2011b; TETTE *et al.*, 2016).

O acoplamento de um sistema UHPLC com o MS reúne vantagens como: alta seletividade e eficiência de separação por parte da MS, além da obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade oriundas da MS (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Ainda, a maioria das substâncias podem ser analisadas por MS, uma vez que existem diversos tipos de fontes de ionização, analisadores de massas e detectores (DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007; EKMAN *et al.*, 2009).

Em geral um espectrômetro de massas é constituído basicamente das seguintes partes: sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, analisador

de massas e detector. As fontes de ionização normalmente empregadas na cromatografia líquida são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e a ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray ionization*) (ALDER *et al.*, 2006). Segundo Lanças (2009), a APCI é empregada na análise de moléculas menores e menos polares e a ESI é utilizada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular.

2.5.1 Ionização por eletronebulização (ESI)

Neste trabalho será dado um enfoque na fonte ESI a qual foi utilizada para esse estudo. O eluato da coluna contendo o analito passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída desse capilar são formadas pequenas gotas altamente carregadas (*spray*) que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica. Essa dessolvatação é assistida por um fluxo contínuo de gás seco (geralmente N₂), e à medida que ocorre dessolvatação, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares torna-se maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Nesse momento, ocorre a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas a partir das quais se originaram, são então formados os íons do analito após serem submetidos a uma série dessas explosões, os mesmos são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Na ESI, três tipos de íons podem ser gerados durante o processo de ionização: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas. Os processos que ocorrem no interior do capilar definem como cada íon é formado: reações de oxirredução, que produzem íons moleculares (M⁺) ou (M⁻); reações ácido-base, que resultam na formação de moléculas protonadas [M+H]⁺ ou desprotonadas [M-H]⁻ e, coordenação com cátions (geralmente os da família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), que leva à formação de moléculas cationizadas [M+Na]⁺, [M+K]⁺, ou anionizadas [M+Cl]⁻ (CROTTI *et al.*, 2006).

A eficiência do ESI depende em parte da capacidade da molécula se associar e possuir uma carga. Assim, são formados íons pseudo-moleculares intactos, do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo e $[M-H]^-$ no modo negativo. Estas espécies são complexos não covalentes formados entre um analito e quaisquer outros componentes, como fase móvel, aditivos e impurezas (DANIEL *et al.*, 2002). No caso de ESI positivo, pode-se adicionar ácidos voláteis para favorecer a protonação do analito; os mais comuns são ácido fórmico ou acético. Por outro lado no modo ESI negativo, utiliza-se hidróxido de amônio para favorecer a desprotonação. Além disso, pode-se utilizar tampões voláteis para controle do pH, sendo os exemplos mais comuns acetato e formiato de amônio (CAHILL *et al.*, 2004; CERNY *et al.*, 2003).

A ESI possibilita a ionização de compostos sensíveis à temperatura sem que estes sofram degradação, uma vez que, a ionização ocorre diretamente em solução. Esta técnica de ionização é preferencial para análise de moléculas mais polares e de maior massa molecular (CHIARADIA *et al.*, 2008).

2.5.2 Analisadores de massas

Dentre os principais componentes de um espectrômetro de massas, o analisador de massas possui destaque particular pelo fato de ser o responsável pela seleção e/ou separação dos íons, de acordo com a relação existente entre suas massas (m) e cargas (z), ou seja, a razão m/z de cada íon (LANÇAS, 2013). Conforme o campo elétrico é gerado, consegue-se que, somente íons com relação massas/carga específica atinjam o detector, enquanto os não selecionados são desviados, levando-os a colidir com as hastes, para a sua neutralização (EKMAN *et al.*, 2009).

A escolha do analisador mais apropriado deve ser feita considerando a aplicação (faixa de massas desejada), o desempenho (resolução de massas) e o custo. Segundo VÉKEY (2001), a diferença mais importante entre os espectrômetros de massas é o tipo de analisador utilizado, sendo característica fundamental do instrumento. Alguns exemplos são: quadrupolo, triplo quadrupolo e tempo de voo.

Atualmente, o quadrupolo é o analisador de massas mais popular, principalmente, devido à sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas e facilidade de operação. O quadrupolo é composto de quatro barras, usualmente feitas de metal, dispostas em dois pares.

Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto que o outro, a um potencial negativo. O quadrupolo é constituído de dois pares de hastes conectados eletricamente e colocados paralelamente entre si, sobre as quais são aplicados potenciais combinados de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf), que variam em magnitude durante a passagem dos íons pelo quadrupolo.

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons, mas sim como cela de colisão. O íon de interesse é pré-selecionado no primeiro quadrupolo (Q1). Após, no segundo quadrupolo (Q2), ou cela de colisão, o íon precursor proveniente do Q1 é acelerado por um potencial elétrico para uma região de baixas pressões onde ocorrem repetidas colisões com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) de elevada energia (normalmente argônio, hélio ou nitrogênio), resultando em um aumento de energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação de íons produto. Os fragmentos desta colisão, são analisados no terceiro quadrupolo (Q3) (PICÓ *et al.*, 2004). O analisador triplo quadrupolo é extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa. A ausência da varredura permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a detectabilidade para o monitoramento, que é associado a um aumento na seletividade (CHIARADIA *et al.*, 2008). Kuster *et al.* (2006) apontam a configuração do sistema LC-MS/MS acoplado com um triplo quadrupolo (QqQ) e interface API como a mais usada para análise de resíduos de agrotóxicos no sistema LC.

2.6 PREPARO DE AMOSTRA PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

A etapa de preparo de amostras é um pré-requisito para obtenção de dados precisos, com resultados analíticos de qualidade. É uma das etapas que demanda mais tempo e trabalho no processo analítico empregado na determinação de resíduos de agrotóxicos. Nesta etapa, se removem os componentes interferentes da matriz, concentra-se a substância a ser analisada, proporcionando um aumento na detectabilidade, e converte-se o analito na forma adequada para ser analisado (LAKS *et al.*, 2012). Segundo Yang e colaboradores (2013) 61% do tempo gasto

nas etapas de uma análise cromatográfica, referem-se ao preparo de amostra e que os erros analíticos desta etapa são altos, cerca de 30%.

Um dos passos mais importantes no preparo de amostras visando a determinação de compostos orgânicos em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}) é a extração e/ou separação do composto da matriz. Isto faz com que a detectabilidade do método aumente e as interferências associadas com a matriz sejam minimizadas. A escolha e a otimização de uma técnica adequada de preparo de amostra não são fáceis, principalmente quando matrizes altamente complexas, como os fluidos biológicos (urina, sangue total, plasma), alimentos e amostras ambientais estão envolvidas (BORGES *et al.*, 2015). Neste sentido, técnicas de extração têm sido o foco de intensa investigação ao longo dos últimos anos, com o objetivo de conseguir avanços na miniaturização, simplificação e automação de etapas (MERIB & CARASEK, 2013a; LUCENA, 2012; CRUZ-VERA, 2009).

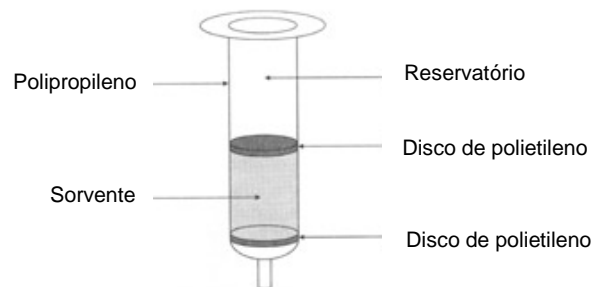
Idealmente, a técnica de preparo de amostra deve ser tão simples quanto possível, não somente porque reduz o tempo de análise, mas também porque um número grande de etapas aumenta a possibilidade de introdução de erros. Assim, é desejável que esta etapa seja: seletiva, elimine o maior número possível de interferentes, empregue instrumentação de baixo custo, permita a automação e inclua, quando necessário, uma etapa de concentração do analito a fim de obter uma concentração adequada para atingir o nível de detecção do instrumento utilizado, atendendo assim, as legislações vigentes (JARDIM, 2010).

Assim, uma variedade de técnicas de preparo de amostra tem sido desenvolvidas, particularmente nas últimas duas décadas, com o foco primário na miniaturização de tais processos e no desenvolvimento de métodos analíticos de acordo com os princípios gerais da química analítica verde (RAYNIE, 2010).

Neste sentido, várias estratégias de preparo de amostra com consumo reduzido de solventes para amostras líquidas foram desenvolvidas, a partir das técnicas baseadas em sorção, as quais são baseadas no uso de sorventes adequados para a extração e a concentração dos analitos (CAÑAS *et al.*, 2014). As técnicas baseadas em sorção e isentas de solventes (*solventless*) são ambientalmente mais favoráveis, permitem ainda a redução da manipulação analítica, elevadas seletividade e detectabilidade, grande reprodutibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automação (BORGES *et al.*, 2015; RAYNIE *et al.*, 2010).

A substituição mais utilizada para o método tradicional de extração, a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) para a separação de poluentes orgânicos em amostras líquidas é a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*). A SPE é uma técnica de extração por sorção que foi introduzida no início dos anos 1970 e está disponível comercialmente desde 1978, na forma de cartuchos descartáveis (LANÇAS, 2004). A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. O formato mais popular em SPE é o de cartuchos. Para tal, usualmente emprega-se o corpo de uma seringa plástica (polipropileno) dentro do qual o material de empacotamento (sorvente) fica retido entre dois discos (“fritas”) de polietileno (Figura 2). Um cartucho típico é constituído por um tubo de polipropileno contendo cerca de 30 a 500 mg de sorvente, com 40 a 60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 µm (LANÇAS, 2004).

Figura 2 - Representação de um cartucho típico empregado em SPE.



Fonte: (DONATO, 2012a).

As vantagens apresentadas pela SPE em comparação com a LLE clássica são: menor consumo de solvente orgânico, ausência de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos e capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito (LANÇAS, 2004 & BORGES *et al.*, 2015).

Diferentes autores descreveram na literatura distintos métodos de extração de poluentes orgânicos em água utilizando a técnica SPE para o preparo de amostra. A combinação da SPE com as técnicas cromatográficas (LC ou GC) permitiu o desenvolvimento de métodos multirresíduo de agrotóxicos, alcançando baixos níveis

de concentrações em diferentes amostras de água. Em 2010, Dujaković e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de 14 agrotóxicos de diferentes classes usando a SPE no preparo de amostra. Neste mesmo contexto, Donato e colaboradores (2012b), validaram um método multiclasse, onde a SPE foi usada para a extração de 81 agrotóxicos em amostras de água de rio. Ainda, em 2015, Donato e colaboradores utilizaram a SPE para o preparo de amostras aquosas visando a extração simultânea de resíduos de agrotóxicos de diferentes propriedades.

Algumas das técnicas baseadas em sorção mais comuns e já bem estabelecidas recorrem a modos de extração exaustivos ou dinâmicos, como é o caso da largamente difundida extração em fase sólida (SPE). No entanto, existem modos de extração não exaustivos ou estáticos como, por exemplo, a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*) (BORGES *et al.*, 2015).

Na década de 1990, Arthur e Pawliszyn desenvolveram a técnica SPME, onde utilizavam um suporte (fibra de sílica fundida) recoberto com filmes de polímeros sorventes (por exemplo, PDMS) com espessura de até 100 µm. Este dispositivo, apresenta dois modos de extração distintos, a imersão direta na amostra (DI-SPME, do inglês *direct immersion solid-phase microextraction*) e o headspace (HS-SPME, do inglês *headspace solid-phase microextraction*). No primeiro modo, a fibra é colocada em contato direto com a amostra para a extração dos analitos, conforme pode-se observar na Figura 3a (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990). Na outra configuração o modo de extração é por *headspace*, onde a seção recoberta com o material sorvente é colocada na fase vapor, ou seja, entre a amostra e a tampa do frasco de extração. Este caso é mais adequado para analitos que apresentam média a alta volatilidade ou baixa a média polaridade (LUIZ *et al.*, 2015).

Independente do modo de extração, os analitos são extraídos na fase extratora nos sítios ativos da superfície do recobrimento ou no interior dos seus poros, onde penetram por difusão (BORGES, 2015). Caso o mecanismo seja predominantemente partição, as moléculas devem cruzar a interface sorvente/matriz, se dissolvendo e se difundindo pelo filme de recobrimento. Em ambos os casos, o processo prossegue até que aconteça o equilíbrio entre o analito remanescente na amostra e o sorvido sobre ou pela fibra, o qual é dependente do tempo (MERIB &

CARASEK, 2013a). Atingindo o equilíbrio, a quantidade extraída é diretamente proporcional à sua concentração inicial na amostra, ou seja, em condições ideais e em equilíbrio, SPME é uma técnica de preparo de amostra quantitativa. Após a etapa de extração os analitos são dessorvidos da fibra. Segundo Beceiro-González e colaboradores (2007) o procedimento mais comum é a dessorção térmica no injetor do cromatógrafo a gás, o qual elimina completamente o uso de solventes orgânicos (BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; RAPOSO JÚNIOR *et al.*, 2007). No entanto, os analitos também podem ser dessorvidos usando um solvente orgânico como, por exemplo, acetonitrila (SÁNCHEZ-ORTEGA *et al.*, 2005), combinado com cromatografia líquida ou eletroforese capilar (PICÓ *et al.*, 2007). Neste procedimento, a dessorção pode acontecer pelos modos dinâmico ou estático. No primeiro, os compostos estão fracamente adsorvidos na fase da fibra e a dessorção ocorre pela passagem da fase móvel. No estático, quando os analitos estão fortemente adsorvidos, a fibra é mergulhada na fase móvel ou em outro solvente, por um período de tempo.

A composição da fibra é determinante no procedimento de SPME, fibras baseadas em solventes como, polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), Carboxeno/PDMS (CAR/PDMS), e Divinilbenzeno/Carboxeno/PDMS (DVB/CAR/PDMS), estão sendo utilizadas e avaliadas (CARASEK & MERIB, 2015).

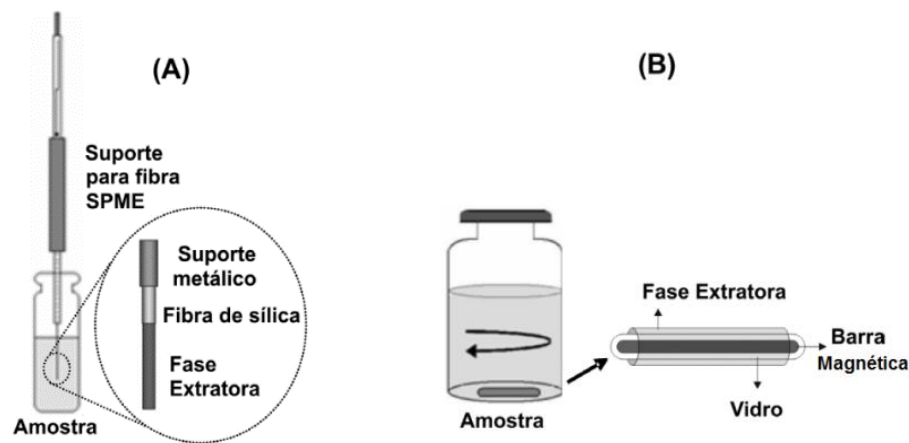
Algumas dessas fibras vêm sendo usadas para análises simultâneas de agrotóxicos, aumentando o espectro de aplicações da SPME. A SPME tem sido aplicada para extrair diferentes classes de agrotóxicos em matrizes aquosas. Em 2007, Beceiro-González e colaboradores utilizaram a SPME para extração simultânea de 46 agrotóxicos de diferentes classes em amostras de água de superfície e potável. Filho e colaboradores (2010) desenvolveram um método multirresíduo para a determinação de 16 agrotóxicos de diferentes classes em amostras de água superficial e subterrânea, utilizando a SPME como técnica de preparo de amostra. Tankiewicz e colaboradores (2013) empregaram a SPME para extração simultânea de 16 agrotóxicos de diversos grupos químicos (piretróides, organofosfatos, triazóis, triazolintiona, triaolinona, ariloxifenoxipropionato) em amostras de água. Ainda, em 2013b, Merib e colaboradores aplicaram a SPME para a extração simultânea de agrotóxicos organoclorados e trihalometanos em amostras aquosas.

Neste mesmo contexto, uma outra técnica de extração desenvolvida para o preparo de amostras foi a SBSE (BALTUSSEN, 1999). Esta técnica baseia-se nos princípios gerais da SPME, uma vez que, a extração ocorre como uma consequência da distribuição dos analitos entre a amostra em uma pequena quantidade de material de sorção imobilizada sobre um suporte inerte (BERLADI, 1989; ARTHUR, 1990).

Esquemáticamente, o dispositivo analítico de SBSE contém geometria com formato de barra de agitação, constituído por material magnético incorporado dentro de vidro inerte (10 a 20 mm de comprimento), revestido PDMS contendo um volume compreendido entre 24 e 126 μL (0,3 a 1,0 mm de espessura), conforme Figura 3b. Uma das vantagens da SBSE, quando comparada com a SPME, é que o volume empregado de PDMS é significativamente maior (na ordem de 100 μL para SBSE e aproximadamente 1 μL na SPME clássica). No entanto, perde a vantagem de automação completa, pois a barra de SBSE tem que ser retirada da amostra, seca, e deve ser introduzida manualmente em uma unidade especial de dessorção térmica (KREMSER *et al.*, 2016). Essa abordagem torna possível incrementar a detectabilidade em até 250 vezes quando comparada à SPME, conseguindo-se em geral diminuir os limites de detecção para níveis muito baixos (BORGES *et al.*, 2015).

A SBSE clássica está focada principalmente na extração de analitos não polares ou moderadamente polares a partir de amostras de natureza diferente. Este aspecto é uma consequência direta da baixa polaridade do polidimetilsiloxano (PDMS), o clássico revestimento da SBSE (LUCENA, 2012). Esta técnica tem sido aplicada no preparo de diferentes matrizes aquosas para extração de diferentes analitos. Seródio e Nogueira (2005), utilizaram a SBSE para a extração de 8 agrotóxicos em amostras de água. Neste mesmo sentido, Sanchez-Ortega e colaboradores (2009), empregaram a SBSE para a extração de resíduos de triazinas em amostra de água subterrânea. Em 2013, Camino-Sánchez e colaboradores desenvolveram um método multiclasse, onde a SBSE foi utilizada como a técnica de preparo de amostra para a extração de poluentes orgânicos em água potável. Em 2016, Xiao e colaboradores utilizaram a SBSE para a extrair resíduos de seis agrotóxicos organofosforados em amostras de água.

Figura 3 - Representação (A) da microextração em fase sólida (SPME) e (B) da extração sortiva em barra magnética (SBSE).

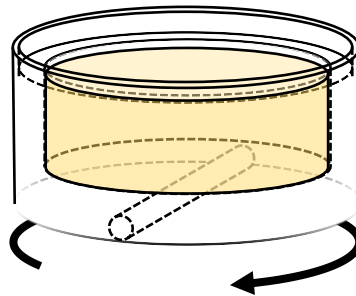


Fonte: (CALDAS *et al.*, 2011b)

2.6.1 Extração sortiva em disco rotatório (RDSE)

Em 2009, Richter e colaboradores apresentaram uma alternativa para a extração em fase sólida, a extração sortiva em disco rotatório (RDSE, do inglês *rotating disk sorptive extraction*) (RICHTER *et al.*, 2009). O dispositivo típico utilizado nesta técnica é um disco de politetrafluoretileno (PTFE), com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura, contendo uma fase extratora na sua superfície superior. Este dispositivo, possui uma barra magnética embutida em sua base, o qual permite a sua rotação, conforme Figura 4.

Figura 4 - Representação da base do dispositivo da RDSE.



Fonte: (Adaptado de RICHTER *et al.*, 2009)

A RDSE pode ser utilizada em duas configurações. Na versão clássica, a fase extratora é fixada na parte superior do dispositivo. Nesta configuração, PDMS ou silicone podem ser usados como material adsorvente para extração de analitos de baixa polaridade (Log Kow entre 3 e 7), conforme pode-se visualizar na Figura 5a (RICHTER *et al.*, 2009; CAÑAS *et al.*, 2012; JACHERO *et al.*, 2013). A segunda versão do disco utilizado na RDSE possui uma cavidade na parte superior onde, é carregada com um determinado sorvente de extração e, em seguida, é recoberta com um filtro de fibra de vidro ou por membrana semipermeável e por fim, é selado com um anel de PTFE, conforme Figura 5b (MANZO *et al.*, 2014a; CAÑAS *et al.*, 2014; BECERRA-HERRERA *et al.*, 2015).

O uso do disco com cavidade permite a incorporação de fases extratoras comerciais ou sintetizadas iguais as utilizadas em SPE, bem como maximiza a capacidade de sorção, uma vez que ocorre recirculação da amostra através da fase usando a tecnologia do disco rotatório. Esta configuração foi utilizada com sucesso para a extração de florfenicol em amostras plasma suíno (CAÑAS *et al.*, 2014), e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) em amostras de água utilizando como sorvente de extração Oasis[®] HLB (MANZO *et al.*, 2014a). Os polímeros de impressão molecular (MIPs), também podem ser empregados como uma alternativa de material de sorção, permitindo, assim, uma boa seletividade e eficiência de extração. A capacidade de reconhecimento molecular faz dos MIPs, excelentes candidatos para uso em microextração em fase sólida, denominada extração em fase sólida molecularmente impressa (MISPE, do inglês *molecularly imprinted solid-phase extraction*) (TAMAYO *et al.*, 2007).

Figura 5 - Representação dos dispositivos utilizados na RDSE em (a) a versão clássica da técnica com PDMS e em (b) a versão onde uma cavidade no disco é preenchida por um determinado sorvente.



Fonte: (Adaptado de CORROTEA *et al.*, 2014; CAÑAS *et al.*, 2014)

O dispositivo de extração utilizado na RDSE pode ser agitado em alta velocidade, sem danificar a fase, uma vez que a fase de extração só está em contato com a amostra líquida, o que não acontece com outras técnicas como, por exemplo, na SBSE. No dispositivo de extração usado na SBSE, o atrito da fase com o fundo do recipiente que contém a amostra reduz a sua durabilidade. O uso de elevadas velocidades de rotação do disco rotatório, reduz a camada de fronteira na interface da amostra e acelera a transferência de massa do analito para a fase sólida de extração (RICHTER *et al.*, 2009 & LUCENA, 2012). Além disso, na RDSE pode-se reduzir a utilização de solvente, além de que a configuração do disco é de fácil montagem no laboratório. Deste modo, esta técnica apresenta como vantagem o baixo custo quando comparado com outras técnicas como, por exemplo, a SPME e a SBSE e ainda, exige baixa supervisão do analista (CORROTEA *et al.*, 2016).

O princípio de operação da RDSE fundamenta-se nos princípios gerais da SPME e SBSE, ou seja, consiste em duas etapas fundamentais, nomeadamente, a extração ou o enriquecimento dos analitos da amostra para a fase extratora, seguida de retroextração ou dessorção dos solutos da fase extratora para um solvente adequado. Neste sentido, ensaios sistematizados costumam ser implementados usando estratégias de otimização univariante ou multivariante, no sentido de encontrar os parâmetros experimentais ideais para os sistemas analíticos em estudo. Na otimização univariada, por exemplo, os parâmetros operacionais são otimizados separadamente, em séries de extrações onde um deles é variado e os outros são mantidos fixos, utilizando amostras de teste o mais similar possível às que serão analisadas pelo método desenvolvido. A Tabela 2 apresenta diferentes aplicações da técnica RDSE no preparo de amostras aquosas usando ambas configurações dos discos rotatórios. Além destes trabalhos, a RDSE tem sido aplicada no preparo de amostras em diferentes matrizes como, por exemplo, em plasma suíno (CAÑAS *et al.*, 2014) e urina (MANZO *et al.*, 2014b).

No desenvolvimento de métodos para análises de contaminantes utilizando a técnica de RDSE alguns parâmetros devem ser avaliados. Dentre as variáveis que precisam ser estudadas destacam-se: o tempo de extração; velocidade de rotação do disco na etapa de extração; uso de modificadores de matriz; pH da amostra, bem como, diferentes tipos e quantidades de sorventes. Após a etapa de extração, os discos são levemente secos e os analitos são dessorvidos com uma pequena quantidade de solvente (PŁOTKA-WASYLKA, 2015). Na etapa de dessorção

algumas variáveis também precisam ser avaliadas como, por exemplo, tipo e quantidade de solvente, além do tempo e a velocidade de rotação do disco (RICHTER, 2009). Após estudar estas variáveis da etapa de preparo de amostra, faz-se necessário garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos através da validação de métodos analíticos.

Tabela 2 - Aplicações da RDSE no preparo de amostras aquosas e determinação por cromatografia.

continua

Compostos	Sorvente utilizado	Tipo de membrana	Condicionamento do disco	Volume e pH da amostra	Tempo de extração	Condições de dessorção	Técnica de determinação	Autor
Nonilfenol	Filme de PDMS fixado com silicone	-	-	250 mL	20 min (1600 rpm)	10 mL de metanol. Extraído por 20 min (1250 rpm) a 45 °C, após foi evaporado e redissolvido em 1 mL de MeOH	GC-MS	RICHTER <i>et al.</i> 2009
Clorpirifós; Diazinona; Fenvalerato; Cialotrina; Cipermetrina; Lindano; Malationa.	Filme de PDMS fixado com silicone	-	-	25 mL	3 h (1250 rpm)	2 mL de metanol. Extraído por 30 min (1250 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 1000 µL de acetato de etila	GC-MS	GIORDANO <i>et al.</i> 2011
HCH	C ₁₈	-	10 ml de DCM e metanol.	50 mL de amostra com 5% MeOH e 5 % NaCl	120 min (1250 rpm)	5 mL de metanol e with 5 mL de uma mistura de DCM:metanol 4:1 (v/v) por 45 min (1250 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 1 mL de MeOH	GC-ECD	CAÑAS <i>et al.</i> 2012

Compostos	Sorvente utilizado	Tipo de membrana	Condicionamento do disco	Volume e pH da amostra	Tempo de extração	Condições de dessorção	Técnica de determinação	Autor
Triclosan; Triclosan metílico.	Polidimetilsiloxano (PDMS)	-	-	25 mL acidificada pH 4,0 com 0,1 mol L ⁻¹ tampão citrato	80 min (1250 rpm)	5 mL de metanol. Extraído por 30 min (1250 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 1000 µL de acetato de etila	GC-MS	JACHERO <i>et al.</i> 2013
16 HPAs	Polidimetilsiloxano (PDMS)	-	-	20 mL de amostra com 20% de metanol	30 min (1250 rpm)	2 x 5 mL de metanol por 10 min (1250 rpm), após juntou-se os dois volumes e foi evaporado até 0,5 mL.	GC-MS	CORROTEA <i>et al.</i> 2014
Cetoprofeno; Ibuprofeno; Naproxeno; Diclofenaco; Ác. acetilsalicílico; Ác. mefenâmico	Oasis® HLB (60 mg)	Filtro de fibra de vidro	Acetato de etila, metanol e água ultrapura 5 min cada solvente	50 mL acidificada pH 2,0 com 0,1 M HCl	90 min (3000 rpm)	2 x 5 mL de metanol. Extraído por 10 min (2000 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 500 µL de acetato de etila	GC-MS	MANZO <i>et al.</i> 2014a
Hexaclorobenzeno; Diclofenaco; Ácido mefenâmico.	Polímero Impresso Molecularmente (MIP, 25 mg)	Filtro de fibra de vidro	Acetato de etila, metanol e água ultrapura 5 min cada solvente	50 mL acidificada pH 2,0 com 0,1 M HCl	60 min (3000 rpm)	10 mL de metanol. 5 min (2000 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 500 µL de acetato de etila	GC-MS	MANZO <i>et al.</i> 2015

Compostos	Sorvente utilizado	Tipo de membrana	Condicionamento do disco	Volume e pH da amostra	Tempo de extração	Condições de dessorção	Técnica de determinação	Autor
Cetoprofeno; Ibuprofeno; Naproxeno; Diclofenaco; Genfibrozila; Ác. clofíbrico	Oasis® HLB (50 mg)	Filtro de fibra de vidro	Acetato de etila, metanol e água ultrapura 5 min cada solvente	25 mL acidificada pH 2,0 com 0,1 M HCl	60 min (3000 rpm)	5 mL de metanol. Extraído por 10 min (2000 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 500 µL de metanol	UHPLC-ESI-TOF/MS	BECERRA-HERRERA <i>et al.</i> 2015
7β-estradiol; Estriol; 17α- etinilestradiol.	Oasis® HLB (50 mg)	Filtro de fibra de vidro	Acetato de etila, metanol e água ultrapura 5 min cada solvente	25 mL de amostra, sem acidificação se o pH da amostra for menor que 8,0	60 min (3000 rpm)	2 x de 4,5 mL de metanol por 15 min (1700 rpm), após foi evaporado e redissolvido em 0,5 mL de MeOH	GC-MS	CORROTEA <i>et al.</i> 2016
10 Bifenilas Policloradas	10 mg de montmorilonita (MMT) modificada com brometo de 1-hexadecil-3-metilimidazólio (HDMIM-Br)	Filtro de fibra de vidro	Acetato de etila, metanol e água ultrapura 5 min cada solvente	5 mL de amostra e 5% de NaCl e 2% de MeOH	30 min (2000 rpm)	5 mL de MeOH por 10 min (1000 rpm), após o extrato foi evaporado e redissolvido em 100 µL	GC-ECD	FISCAL-LADINO <i>et al.</i> 2017

DCM: diclorometano; NaCl: cloreto de sódio; rpm: rotação por minuto; MeOH: metanol;

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Para a comprovação de que um método analítico produza informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, o mesmo deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. A validação de um método é o processo que envolve uma série de experimentos planejados que irão caracterizar o método desenvolvido, fornecendo evidências da adequação da análise garantindo resultados confiáveis (ZANELLA *et al.*, 2015). Neste sentido, o objetivo da validação é demonstrar que determinado procedimento analítico é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que atende a parâmetros de desempenho e a critérios de aceitação preconizados. Deve ser um estudo experimental e integralmente documentado.

A validação consiste em confirmar que um método proposto possui confiabilidade, rastreabilidade, comparabilidade, interpretáveis e que esteja adequado para o uso pretendido e para tomada de decisões (INMETRO, 2011). Ainda, a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005 estabelece que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados; métodos não normalizados; e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Esta norma define também que os laboratórios devem confirmar que têm condições de operar adequadamente os métodos normalizados antes da implantação dos ensaios (ABNT, 2005).

No Brasil, há guias que auxiliam no processo de validação de um método analítico e podem ser seguidos, tais como, o guia publicado em 2003 pela ANVISA (“Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”). Além disso, em 2011 o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), publicou o documento “orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2011).

Além do Brasil, outros órgãos internacionais também dispõem de guias como, por exemplo, a Conferência Internacional em Harmonização (ICH do inglês, *International Conference on Harmonisation*) (ICH, 2005) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Ainda, em 2010 entrou em vigor o Guia de Controle de Qualidade Analítica (SANCO, 2010). Em 2015, este foi substituído pelo SANTE, cujo o objetivo foi publicar um guia direcionado para a

determinação de agrotóxicos em alimentos, tendo como objetivo harmonizar os sistemas de controle de qualidade; garantir a qualidade e comparabilidade de resultados; estabelecer uma exatidão aceitável; evitar resultados falso-positivo e falso-negativos; e servir de apoio à implementação do sistema ISO/IEC 17025:2005 (SANTE, 2015).

Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do mesmo. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparo da amostra, análise cromatográfica, detecção e avaliação estatística dos dados (DE SOUZA, 2007; SANTE, 2015).

Na validação de métodos cromatográficos para análise de resíduos de agrotóxicos alguns parâmetros devem ser avaliados como: seletividade, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, conforme demonstrado na Tabela 3 (INMETRO, 2011; SANTE, 2015).

Tabela 3 – Parâmetros avaliados durante a etapa de validação de métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos por cromatografia.

Parâmetros	Referência	Definição	Aplicação
Seletividade	INMETRO	Distinção de resposta entre analitos.	Extração de matriz "branco"
	SANTE	Distinção da resposta do analito na presença de interferentes.	
Linearidade	INMETRO SANTE	Correlação entre resposta analítica e concentração	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Faixa Linear de trabalho	INMETRO SANTE	Intervalo de concentrações em que y e x correlacionam-se linearmente	Curva Analítica ($y = ax + b$)
Efeito Matriz	Gosetti, 2010	Influência dos componentes da matriz na resposta (y)	Comparação entre curvas preparadas em solvente e em extrato branco

Parâmetros	Referência	Definição	conclusão Aplicação
Limite de detecção	INMETRO SANTE	Concentração limite de distinção entre analito e ruído	S/R = 3
Limite de quantificação			S/R = 10
Precisão	INMETRO SANTE	Proximidade de resultados obtidos por diferentes amostragens	Repetibilidade e Reprodutibilidade
Exatidão	INMETRO SANTE	Proximidade de resultado em relação à uma referência	Ensaio de fortificação

S/R: relação Sinal/Ruído

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu na avaliação e validação da técnica de extração sortiva em disco rotatório (RDSE) visando a extração e determinação multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes em amostras de água empregando UHPLC-MS/MS.

Na etapa de validação foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção e quantificação. Posteriormente, o método foi aplicado em amostras de água de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram:

- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3[®] (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- ✓ Agitador Vortex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ✓ Balança analítica modelo APX-200 (Denver Instruments, Brasil);
- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha);
- ✓ pHmetro modelo pH 500 series Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, EUA);
- ✓ Agitador magnético múltiplo - sem aquecimento (SP labor, Brasil);
- ✓ Sistema UHPLC-MS/MS: Cromatógrafo a Líquido Xevo TQ[™] (Waters, EUA) equipado com:
 - Detector triplo quadrupolo (TQ), utilizando o modo de ionização por eletronebulização, uma bomba binária e um controlador de temperatura da coluna (Waters, EUA);
 - Amostrador automático *Sample Manager Acquity*[™] (Waters, EUA);
 - Coluna analítica ACQUITY UPLC[™] BEH C₁₈, (50 x 2,1 mm d.i) e 1,7 µm de tamanho de partícula (Wexford, Irlanda);
 - Sistema de aquisição de dados através do *Software MassLynx Version 4.1* (Waters, EUA);

- Sistema gerador de nitrogênio, modelo NM30L-MS (Peak Scientific, Escócia) e gás argônio 6.0, usado como gás de colisão no sistema UHPLC-MS/MS (White Martins, Brasil).

3.2 REAGENTES, SOLVENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- ✓ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3[®] (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ✓ Metanol grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Acetonitrila grau LC-MS (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Cloreto de Sódio (J.T. Baker, EUA);
- ✓ Frascos de vidro (*via*), capacidade de 2 mL;
- ✓ Formiato de amônio (Sigma Aldrich, Estados Unidos);
- ✓ Extran[®] neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- ✓ Seringas de volume de 50, 100 e 1000 µL (Hamilton, Suíça);
- ✓ Ácido fosfórico P.A. 85% (Merck, Brasil);
- ✓ Sorvente Oasis[®] HLB 30 µm (Waters, EUA);
- ✓ Sorvente Strata[®] X (Phenomenex, EUA);
- ✓ Sorvente Strata[®] C₁₈ (Phenomenex, EUA);
- ✓ Sorvente Strata[®] SDB-L (Phenomenex, EUA);
- ✓ Sorvente Bond Elut Nexus (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Membrana de filtração com 0,45 µm porosidade (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Disco de teflon com 1,5 cm de diâmetro, com uma barra de agitação magnética embutida (Plastigen, Chile);
- ✓ Membrana polietersulfona (PES) 0,1 µm (GVS Life Sciences, Brasil);
- ✓ Vidraria comum de laboratório analítico.

3.3 AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Os agrotóxicos selecionados para este estudo são compostos comumente utilizados na agricultura. Os analitos selecionados para este estudo foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 4, juntamente com o grau de pureza, classe, grupo químico, fórmula molecular, pKa e log K_{ow}.

Tabela 4 - Informações dos compostos, contendo algumas características importantes de cada um deles.

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	pKa	log K_{ow}
Atrazina	99,5	H	Triazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	1,7	2,7
Azinfós metílico	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	5	2,96
Azoxistrobina	99,5	F	Estrobilurina	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	-	2,5
Bispiribaque sódico	97,5	H	Ácido pirimidiniloxibenzóico	C ₁₉ H ₁₇ N ₄ O ₈ Na	3,05	1,0
Boscalida	99,5	F	Anilida	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	-	2,96
Buprofezina	99,0	I/Ac	Tiadiazinona	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	-	4,93
Carbaril	98,5	I	Carbamato de naftila	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	10,4	2,36
Carbofurano	98,5	Ac/I/N	Carbamato	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃	-	1,8
Carboxim	99,9	F	Carboxanilida	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂ S	0,5	2,3
Cianizina	99,0	H	Triazina	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	12,9	2,1
Clorpirifós etílico	98,5	I	Organofosforado	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	-	4,7
Clorpirifós metílico	97,0	I	Organofosforado	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	-	4,0
Clomazona	99,5	Ac/H	Isoxazolidinona	C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂	-	2,5
Clorimuron etílico	97,0	H	Sulfoniluréia	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₄ O ₆ S	4,2	0,11
Deltametrina	97,5	I	Piretróide	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	-	4,6
Diazinona	99,0	Ac/I	Organofosforado	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	2,6	3,69
Difenoconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	1,07	4,36
Epoxiconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₇ H ₁₃ ClFN ₃ O	-	3,3
Fenpropatrina	99,0	Ac/I	Piretróide	C ₂₂ H ₂₃ NO ₃	-	6,04
Fenpropimorfe	94,5	F	Morfolina	C ₂₀ H ₃₃ NO	6,98	4,5
Fenarimol	97,5	F	Pirimidina	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	-	3,69
Fentiona	97,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	-	4,84
Fipronil	97,5	I	Pirazol	C ₁₂ H ₄ Cl ₂ F ₆ N ₄ OS	-	3,75
Fluquiconazol	98,5	F	Triazol	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ FN ₅ O	0,9	3,24
Flutolanil	99,0	F	Carboxamida	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂	-	3,17
Iprovalicarbe	97,5	F	Carbamato	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	-	3,2
Linurom	99,4	H	Uréia	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	-	3,0

continua

continuação

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	pKa	log K_{ow}
Malationa	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	-	2,75
Mecarbam	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	-	2,75
Mepronil	99,0	F	Benzanilida	C ₁₇ H ₁₉ NO ₂	-	3,66
Metalaxil	99,5	F	Acilalaninato	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	-	1,65
Metconazol	99,0	F	Triazol	C ₁₇ H ₂₂ ClN ₃ O	11,3/1,0	3,85
Metiocarbe sulfona	99,0	I	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ S	-	1,60
Monolinurom	99,0	H	Feniluréia	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	-	2,20
Miclobutanil	99,0	I	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	2,3	2,89
Paraoxon etílico	99,0	I	Organofosforado	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	-	-
Piraclostrobina	97,5	F	Metoxicarbamato	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	-	3,99
Pirazofós	97,0	I	Organofosforado	C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₅ PS	-	3,80
Piridabem	99,0	I, Ac	Piridazinona	C ₁₉ H ₂₅ ClN ₂ OS	-	6,37
Piridafentiona	97,5	I	Organofosforado	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₄ PS	-	3,20
Piridato	96,5	I	Piridazina	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂ O ₂ S	-	4,01
Pirimetanil	98,3	I	Anilino pirimidina	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	3,52	2,84
Pirimicarbe	98,5	F	Carbamato	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃	4,4	1,70
Pirimifós metílico	99,0	Ac/I	Organofosforado	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	4,3	3,90
Profenofós	98,0	Ac	Organofosforado	C ₁₁ H ₁₅ BrClO ₃ PS	-	1,70
Profoxidim	98,5	H	Cicloexadiona oxima	C ₂₄ H ₃₂ ClNO ₄ S	5,91	3,90
Propargito	91,5	H	Éster sulfito	C ₁₉ H ₂₆ O ₄ S	-	5,70
Propiconazol	98,1	F	Triazol	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	1,09	3,72
Propizamida	99,5	H	Benzamida	C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO	-	3,30
Propoxur	99,0	F	Carbamato	C ₁₁ H ₁₅ NO ₃	-	0,14
Quinoxifeno	99,0	F	Quinolina	C ₁₅ H ₈ Cl ₂ FNO	-	4,66
Simazina	98,0	H	Triazina	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	1,62	2,30
Tebuconazol	98,0	F	Triazol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	-	3,70
Terbutilazina	99,0	H	Triazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	1,9	3,4
Tetraconazol	98,5	F	Triazol	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	0,65	3,56
Tiacloprido	98,0	I	Neonicotinoide	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	-	1,26

Analitos	Pureza (%)	Classe	Grupo Químico	Fórmula Molecular	conclusão	
					pKa	log K _{ow}
Tolclofós metílico	98,5	F	Hidrocarboneto aromático	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ O ₃ PS	-	4,56
Triadimefon	99,0	F	Triazol	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	-	3,18
Triazofós	78,0	F	Organofosforado	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	-	3,55
Triclorfom	97,0	F	Organofosforado	C ₄ H ₈ Cl ₃ O ₄ P	-	0,43
Trifloxistrobina	99,0	F	Estrobilurina	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	-	4,5
Triflumizol	98,0	F	Imidazol	C ₁₅ H ₁₅ ClF ₃ N ₃ O	3,7	4,77

Onde: I = Inseticida; F = Fungicida; H = Herbicida; Ac = Acaricida; N: Nematicida. Fonte: <http://sitem.herts.ac.uk/aeu/iupac/>.

3.4 ESCOLHA DO PADRÃO DE CONTROLE E DO PADRÃO INTERNO

O emprego do padrão de controle e do padrão interno tem como finalidade avaliar o procedimento de extração e de análise no sistema cromatográfico, respectivamente. Além disso, melhorar a robustez de métodos e verificar fontes de erros que podem impactar sobre os resultados da análise. Estes compostos são adicionados em diferentes estágios do procedimento analítico como, por exemplo, anterior a extração (padrão de controle, PC) ou no extrato final anterior a injeção (padrão interno, PI) (SANTE, 2015).

Neste trabalho, utilizou-se como padrão de controle o composto atrazina deuterada (atrazina d-5), para a avaliação da etapa de extração. O composto trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenyl phosphate*) foi empregado como padrão interno, para o monitoramento das análises por UHPLC-MS/MS. A utilização de isótopos modificados como padrões de controle ocorre devido à semelhança e comportamento físico-químico com os analitos. No entanto possuem massas suficientemente diferentes para serem determinados por cromatografia acoplada à espectrometria de massas (JEMAL *et al.*, 2003). Os resultados da atrazina d-5 não foram utilizados para “correção da recuperação” de nenhum analito, apenas para a avaliação do procedimento de extração.

3.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS

As soluções analíticas foram preparadas individualmente na concentração estoque 1000 mg L⁻¹ de cada composto, considerando a pureza dos padrões sólidos.

A massa do padrão sólido pesado foi dissolvida em acetonitrila e/ou metanol, grau HPLC. A partir das soluções de concentração 1000 mg L^{-1} , preparou-se 50 mL de uma solução de trabalho contendo todos analitos na concentração 5 mg L^{-1} .

Para o estudo de linearidade do método e confecção das curvas analíticas extraídas (de cada composto) preparou-se uma mistura dos analitos em estudo nas concentrações de 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ em acetonitrila, partindo da solução 5 mg L^{-1} . A partir dessas soluções foram preparadas as curvas analíticas extraídas de acordo com o processo de extração das amostras. As curvas foram preparadas adicionando diferentes quantidades da mistura dos analitos, antes da extração, para a obtenção das concentrações 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Este modo de padronização permite uma quantificação mais correta da amostra uma vez que os efeitos causados pela matriz e as perdas na extração são considerados na construção da curva analítica (SANTE, 2015).

As soluções de padrão interno e padrão de controle utilizadas foram preparadas individualmente na concentração 1000 mg L^{-1} . Em seguida foram preparados 10 mL de soluções na concentração de 10 mg L^{-1} para cada composto (TPP e atrazina d-5). O composto atrazina d-5 foi adicionado na amostra ($10 \mu\text{L}$) juntamente com a etapa de fortificação, na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. Para o composto TPP, a partir da solução de 10 mg L^{-1} preparou-se uma solução na concentração $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, a qual foi adicionada $16 \mu\text{L}$ ao extrato final para injeção, obtendo uma concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que $-18 \text{ }^\circ\text{C}$, antes da utilização todas as soluções foram retiradas do freezer e esperou-se até a temperatura ambiente para utilização.

3.6 CONDIÇÕES OTIMIZADAS NO SISTEMA UHPLC-MS/MS

Neste estudo, as análises foram realizadas através da utilização do sistema UHPLC-MS/MS, empregando o modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*) e ionização por eletronebulização nos modos positivo e negativo.

3.6.1 Escolha da fase móvel e gradiente

A escolha da fase móvel baseou-se nas condições utilizadas frequentemente na rotina do LARP-UFSM, local onde foi desenvolvido este trabalho, bem como através de trabalhos descritos na literatura (ORSO *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2016). A fase móvel empregada neste trabalho consistiu em água contendo 2% (v/v) de metanol e 0,1% (v/v) de ácido fórmico com formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (solvente A) e metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹ (solvente B), conforme gradiente descrito na Tabela 5. A vazão foi mantida constante em 0,225 mL min⁻¹, resultando em um tempo total de análise de 10 min. O volume de injeção utilizado foi de 10 µL.

Tabela 5 - Gradiente da fase móvel empregado para a eluição dos compostos determinados por UHPLC-MS/MS.

	Tempo (min)	% A	% B
Gradiente	0,0	95	5
	7,75	0	100
	8,51	95	5
	10,0	95	5

% A: Água contendo 2% (v/v) de metanol 0,1% (v/v) de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹

% B: Metanol contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L⁻¹.

3.6.2 Otimização da fonte de ionização por eletronebulização

Os parâmetros relacionados às condições de ionização de cada analito foram obtidas segundo Kemmerich *et al.* (2015a) e Martins *et al.* (2016). A seguir estão descritas as condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos em amostra de água.

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Voltagem do capilar: 2,0 kV;
- Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- Vazão do gás de dessolvatação (N₂): 600 L h⁻¹;
- Vazão do *spray*: 80 L h⁻¹;
- Vazão do gás de colisão: 0,15 mL min⁻¹;

- Temperatura da fonte: 150 °C.

Com a finalidade de otimizar as condições de análises de cada um dos agrotóxicos em estudo, inicialmente utilizou-se o banco de dados “*Quanpedia*”, disponível junto ao *software* do UHPLC, onde constam informações de alguns analitos, tais como: íons precursores e íons produtos, energias de colisão e energias do cone. No entanto, para os compostos inexistentes neste banco de dados, foram realizadas infusões, ou seja, injeções diretas no MS com soluções analíticas individuais dos compostos na concentração 100 µg L⁻¹. A partir das infusões foi selecionado o modo de ionização (eletronebulização positiva ou eletronebulização negativa), voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos, temperatura e pressão do gás de dessolvatação para secagem do solvente. Após a escolha destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para identificação e quantificação dos agrotóxicos estudados.

3.7 OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE EXTRAÇÃO POR RDSE PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA

Durante a etapa de extração, os discos rotatórios são colocados em contato direto com amostra, ou seja, ocorre a imersão do dispositivo diretamente na amostra aquosa. A etapa de extração por RDSE é geralmente finalizada sob condições de equilíbrio no sentido de se obter máxima eficiência, sendo sempre obrigatório o controle de diversos parâmetros experimentais (RICHTER, 2009).

Neste trabalho, a otimização do método de extração foi realizada utilizando uma avaliação univariada, ou seja, alterando uma variável e mantendo-se constante as demais variáveis. Por outro lado, a otimização da etapa de dessorção foi realizada de maneira multivariada para os parâmetros de velocidade e tempo de extração. Portanto, foram otimizadas diferentes variáveis hidrodinâmicas e químicas, que influenciam diretamente no processo de extração e dessorção dos analitos. Ainda, cada teste foi realizado em triplicata (n= 3).

3.7.1 Preparação do disco rotatório

O dispositivo de extração utilizado neste estudo foi um disco de PTFE com 1,5 cm de diâmetro, contendo uma barra de agitação magnética embutida em sua base. O disco possui em uma das suas faces, uma cavidade com um volume de aproximadamente $0,44 \text{ cm}^3$, onde o adsorvente escolhido é colocado. A cavidade foi coberta com uma membrana de polietersulfona com diâmetro de 1,5 cm e tamanho médio dos poros de $0,1 \text{ }\mu\text{m}$. E finalmente, selado com um anel de teflon.

Os testes iniciais foram baseados nos estudos realizados por Manzo e colaboradores (2014a). As condições iniciais de extração e dessorção foram: volume de amostra de 50 mL (acidificada pH 3,0 com H_3PO_4 (1:1; v/v)), utilizando como sorvente de extração Oasis[®] HLB (20 mg) e velocidade de rotação do disco de 1600 rpm para a etapa de extração, em temperatura ambiente. Depois da extração, o disco foi colocado em um frasco de vidro com capacidade de aproximadamente 6,5 mL e adicionou-se 5 mL de metanol (solvente de dessorção). O tempo de dessorção utilizado foi de 80 min à uma velocidade de rotação de 900 rpm. A concentração utilizada para realização dos testes foi de $2 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

3.7.2 Variáveis hidrodinâmicas otimizadas na etapa de extração

a) Tempo e velocidade de rotação na etapa de extração: Assim como as demais variáveis, a determinação do tempo de extração possui carácter decisivo na otimização do método RDSE como técnica de preparo de amostra, uma vez que é necessário saber o tempo de equilíbrio do analito entre a fase aquosa (amostra) e o sorvente. Para determinar o tempo ideal de extração para os compostos em estudo, foram testados diferentes tempos de extração 10; 30; 60; 80; 100 e 120 min. Para estabelecer a velocidade de rotação adequada nos processos de extração, foram testadas diferentes rotações 300; 700; 1300 e 1600 rpm. As melhores condições são avaliadas em termos de área de pico.

b) Solventes de dessorção: Os analitos depois de transferidos para a fase extratora necessitam ser dessorvidos para sua posterior determinação por UHPLC-MS/MS. Para isso, o dispositivo de extração foi colocado em um frasco contendo um determinado solvente orgânico, adequado para a dessorção dos

analitos. Assim, testou-se dois diferentes solventes orgânicos (metanol e acetonitrila).

c) Velocidade de rotação do disco e tempo na etapa de dessorção:

Para otimizar esta etapa, aplicou-se um planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken, o qual é utilizado na otimização de técnicas de microextração (GHASEMI & SILLANPÄÄ., 2014; MOHAMED *et al.*, 2014; ROOSTA *et al.*, 2014; TSAI *et al.*, 2014). Para avaliar as condições de tempo e velocidade de rotação na dessorção, utilizou-se os níveis -1, 0 e +1 que correspondem, os tempos 10, 30 e 60 minutos e as rotações 300, 800 e 1600 rpm. O número de experimentos necessários foi obtido através de um planejamento 3^2 , como pode ser observado na Tabela 6. Realizou-se um total de 9 experimentos sendo que cada um foi realizado em triplicata, resultando um total de 27 experimentos. Para avaliar os parâmetros de dessorção utilizou-se a área obtida de cada analito como resposta. Ainda, foi avaliada a significância para cada parâmetro através da análise da variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*) a 95% de confiança, bem como diagramas de Pareto. As melhores condições de dessorção foram verificadas através de diagramas de médias marginais.

Tabela 6 - Experimentos realizados através do planejamento 3^2 , para a otimização da etapa dessorção dos analitos.

	Tempo (min)	Velocidade de Rotação (rpm)
Experimento 1	10	300
Experimento 2	10	800
Experimento 3	10	1600
Experimento 4	30	300
Experimento 5	30	800
Experimento 6	30	1600
Experimento 7	60	300
Experimento 8	60	800
Experimento 9	60	1600

d) Tipo e quantidade de sorvente: Para a extração dos agrotóxicos em estudo foram testados diferentes tipos de sorventes, como: Oasis[®] HLB; Strata[®] X; Strata[®] SDB-L; Bond Elut Nexus e Strata[®] C₁₈. Após selecionado o sorvente adequado, avaliou-se o efeito da quantidade utilizada na cavidade do disco na etapa de extração, para isso, testaram-se quantidades de 10; 20; 30 e 40 mg.

3.7.3 Variáveis químicas na extração

a) pH: O pH da amostra pode ser crítico para obtenção de uma extração adequada dos agrotóxicos no sorvente. Por isso, em alguns casos, o ajuste do pH da amostra é necessário para estabilizar os agrotóxicos e aumentar sua retenção na fase sólida (VEGA *et al.*, 2005; BORTOLUZZI *et al.*, 2007). A fim de estudar esta variável as amostras foram avaliadas após ajuste de pH em 2; 3; 4 e sem ajuste de pH da amostra (pH natural da água, aproximadamente 6,5). As modificações do pH foram realizadas com ácido fosfórico (H₃PO₄; 1:1 (v/v)).

b) Força iônica: O uso de modificadores de matriz em técnicas de microextração pode melhorar a eficiência de extração de alguns analitos (dependendo de sua polaridade). Esta vantagem está associada ao efeito *salting out* e alteração da força iônica do meio aquoso (JACHERO *et al.*, 2013). Neste trabalho o efeito da força iônica foi avaliado utilizando cloreto de sódio (NaCl). Para isso, foram adicionadas nas amostras aquosas com diferentes quantidades de NaCl (0; 5; 10% m/v).

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO RDSE E UHPLC-MS/MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRA DE ÁGUA

Estabelecidas as melhores condições para o procedimento de extração e separação cromatográfica, a etapa seguinte foi validar o método analítico para determinação de agrotóxicos em amostras de água.

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram: seletividade, linearidade e curva analítica, limites de detecção e quantificação, exatidão através do ensaio de recuperação, precisão (repetibilidade) e precisão intermediária (SANTE, 2015; INMETRO, 2011).

3.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos picos cromatográficos e os respectivos espectros de massas dos cromatogramas obtidos pelas injeções no sistema UHPLC-MS/MS de extratos de amostras de água ultrapura fortificadas. As amostras “branco” (água ultrapura) foram fortificadas na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ com os agrotóxicos em estudo e posteriormente foram extraídas por RDSE. A ausência de picos cromatográficos nas amostras “branco” evidencia a seletividade do método (SANTE, 2015).

3.8.2 Linearidade e Curvas Analíticas

A linearidade das curvas analíticas extraídas foi avaliada através da extração de 6 níveis de concentração 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, preparadas conforme item 3.5. As curvas analíticas foram extraídas e injetadas no sistema UHPLC-MS/MS, para posteriormente realizar os cálculos das médias das áreas e do RSD. Os dados de regressão linear foram obtidos com auxílio do sistema de aquisição de dados *MassLynx V4.1*.

3.8.3 Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOQ)

Os valores do LOD e LOQ foram estabelecidos experimentalmente com base na razão sinal/ruído sendo determinado para cada composto. A determinação dos valores de LOQ foi estabelecida de acordo com o menor nível fortificado que obteve relação sinal/ruído > 10 , com resultados de exatidão entre 70 e 120% e precisão $\leq 20\%$ (SANTE, 2015). Por outro lado, os valores de LOD foram obtidos a partir do LOQ dividido por 3,33 vezes.

3.8.4 Ensaios de recuperação relativa para avaliar a exatidão

A exatidão do método analítico proposto foi avaliada através da recuperação relativa. As amostras “branco” foram fortificadas em quatro níveis de concentração: 0,05; 0,1; 0,5 e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, empregando o método de extração RDSE otimizado.

Foram realizadas 6 réplicas de extração para cada nível de concentração. Para determinar as concentrações, substituiu-se os valores de área encontrados em cada nível na equação da curva extraída. Os valores de recuperação foram calculados substituindo os valores de concentração equação 4 (INMETRO, 2011).

$$\text{recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

3.8.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para avaliar a precisão do método, em termos de repetibilidade (RSDr), foram realizadas seis extrações de cada nível de fortificação (0,05; 0,1; 0,5 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) e cada extrato foi injetado uma vez ($n = 6$).

O estudo da precisão do método, em termos de precisão intermediária (RSDpi) foi efetuado através da extração e análise de amostras fortificadas, em dias diferentes, sendo cada nível de fortificação extraído seis vezes e cada extrato injetado 1 vez no sistema UHPLC-MS/MS.

A precisão, em termos de desvio padrão relativo (RSD%), foi calculada através da equação (5):

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

Onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto ($s = \{\sum(x_i - \bar{x})^2/n-1\}^{1/2}$);

x_i = valores individuais;

n = número de medidas;

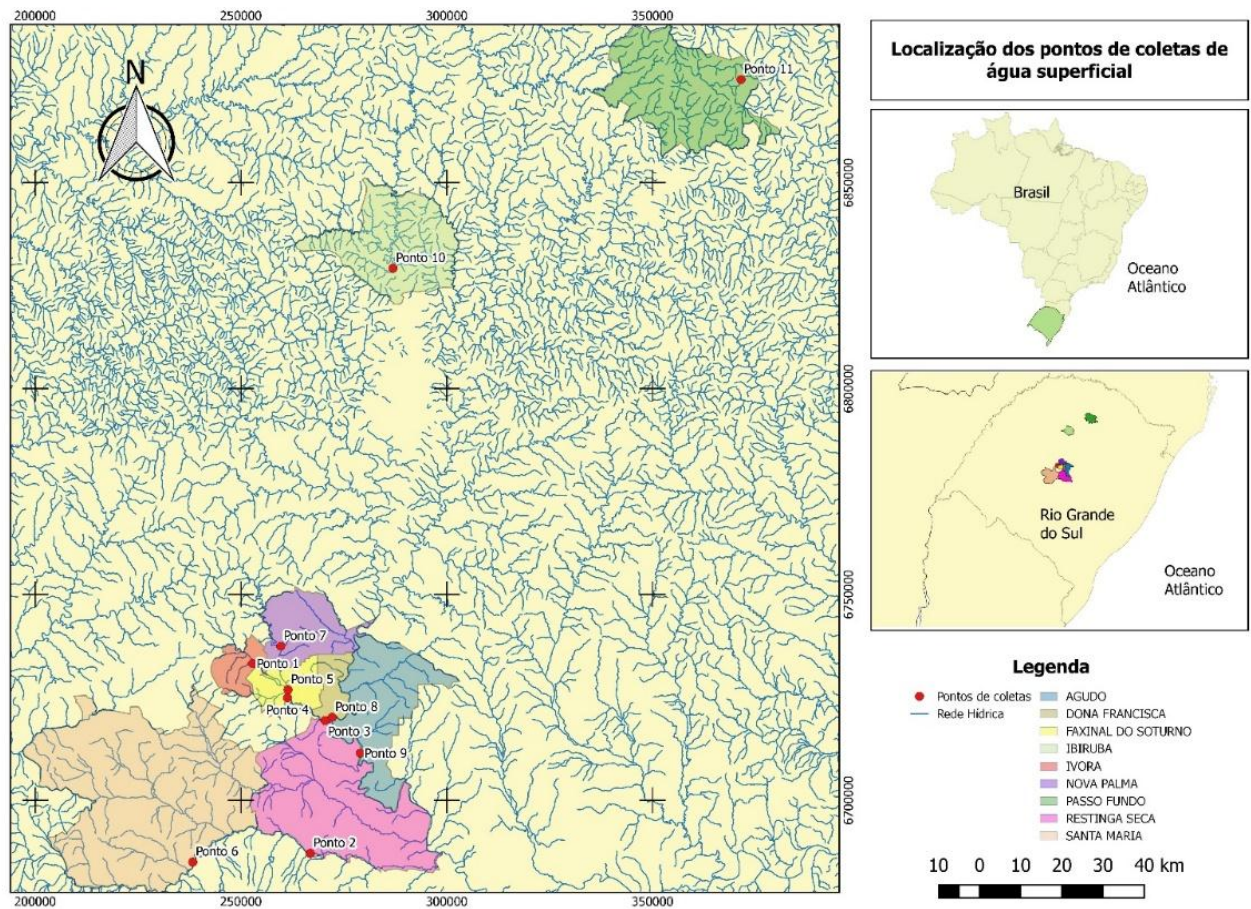
\bar{X} = média das medidas em replicatas.

3.9 APLICAÇÃO DO MÉTODO

Após a avaliação e validação do método empregando RSDE e determinação por UHPLC-MS/MS, o mesmo foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos em estudos em amostras de água. A amostragem teve por objetivo abranger amostras de águas superficiais de diferentes bacias hidrográficas da região central e norte no Rio Grande do Sul, localizadas nas cidades de Restinga Seca, Agudo, Dona Francisca, Faxinal do Soturno, Nova Palma, Ivorá, Santa Maria, Ibirubá e Passo Fundo. Desse modo, visando avaliar o desempenho do método desenvolvido foram coletadas 11 amostras de água superficial de diferentes bacias hidrográficas pontos 8 e 9 (rio Jacuí), pontos 3, 4, 5 e 7 (rio Soturno), ponto 1 (rio Melo), ponto 10 (rio Jacuí Mirim), ponto 11 (rio Passo Fundo) e pontos 2 e 6 (rio Vacacaí), conforme pode ser visto na Figura 7.

As amostras foram coletadas em frascos âmbar (1 litro), armazenadas em local protegido da luz e em temperaturas entre 4 e 10 °C, evitando assim o congelamento da amostra e possível degradação dos compostos a serem analisados. Antes do processo de extração as amostras foram filtradas utilizando uma membrana de PTFE com diâmetro de 47 mm e 0,45 µm de porosidade. As concentrações dos analitos presentes nas amostras foram realizadas através da equação da reta da curva analítica extraída ($y = ax + b$). Valor de y foi substituído pelo valor de área obtido relativo a cada composto obtendo-se o valor de concentração.

Figura 6 - Representação dos pontos de coletas de água nas diferentes bacias hidrográficas.



Fonte: QGis version 2.18

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CONDIÇÕES OTIMIZADAS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO UHPLC-MS/MS PARA A DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM ÁGUA.

Os analitos foram determinados por UHPLC-MS/MS, utilizando as condições otimizadas conforme descrito no item 3.6. O modo de ionização empregado foi do tipo eletronebulização (ESI), operando no modo positivo ou negativo dependendo do composto. Ademais, foram escolhidas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa (mais estável) utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a identificação dos mesmos, através do modo SRM. Os parâmetros tempo de retenção, modo de ionização (+/-), energia do cone e de colisão, bem como as transições relativas ao SRM para cada agrotóxico, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Compostos em estudo com os respectivos tempos de retenção, íon precursor, íons de quantificação e confirmação, energia do cone e de colisão para cada transição SRM.

continua						
Compostos	t _R (min)	Modo de ionização (ESI)	Íon precursor, m/z	Energia do cone (V)	Íon produto (Identificação) m/z (EC, eV)	Íon produto (Quantificação) m/z (EC, eV)
Atrazina	5,55	+	216	30	96 (23)	174 (18)
Atrazina d5 (PC)	5,53	+	221	26	101 (23)	179 (18)
Azinfós metílico	5,84	+	318	12	160 (8)	261 (8)
Azoxistrobina	6,01	+	404	17	329 (30)	372 (15)
Bispiribaque-sódico	6,18	+	431,3	23	196,1 (20)	275,2 (14)
Boscalida	6,20	+	343	32	140 (20)	307 (20)
Buprofezina	7,52	+	306	22	57 (20)	201 (12)
Carbaril	5,17	+	202	19	117 (28)	145 (22)
Carbofurano	4,96	+	222	25	123 (16)	165 (16)
Carboxim	5,11	+	236	25	87 (22)	143 (16)
Cianazina	4,67	+	241	28	96 (25)	214 (17)
Clorpirifós etílico	7,70	+	350	27	97 (32)	198 (20)
Clorpirifós metílico	7,23	+	321,8	23	125 (20)	289,9 (16)

continuação

Compostos	t _R (min)	Modo de ionização (ESI)	Íon precursor, m/z	Energia do cone (V)	Íon produto (Identificação) m/z (EC, eV)	Íon produto (Quantificação) m/z (EC, eV)
Clomazona	5,93	+	240	23	89 (46)	125 (18)
Clorimuró etílico	6,24	+	415,1	25	83 (40)	186 (15)
Deltametrina	7,99	+	523	16	506 (11)	281 (18)
Diazinona	6,97	+	305	20	97 (35)	169 (22)
Difenoconazol	7,21	+	406	37	111 (60)	251 (25)
Epoxiconazol	6,59	+	330	25	101 (50)	121 (22)
Fenpropatrina	7,70	+	350,1	15	125 (14)	97 (34)
Fenpropimorfe	6,08	+	304	41	147 (28)	57 (30)
Fenarimol	6,56	+	331	37	81 (34)	268 (22)
Fentiona	6,90	+	279	25	169 (16)	247 (13)
Fipronil	6,77	-	435,3	25	250,1 (26)	330 (16)
Fluquiconazol	6,48	+	376	37	307 (30)	349 (18)
Flutolanil	6,28	+	324	23	65 (40)	262 (18)
Iprovalicarbe	6,48	+	321	19	119 (16)	203 (10)
Linurom	6,08	+	249	25	160 (18)	181 (16)
Malationa	6,30	+	331	12	99 (24)	127 (12)
Mecarbam	6,54	+	330	12	97 (30)	227 (8)
Mepronil	6,30	+	270	27	91 (44)	119 (28)
Metalaxil	5,67	+	280	15	192 (17)	220 (13)
Metconazol	7,07	+	320,1	29	125 (36)	70 (22)
Metiocarbe sulfona	3,83	+	258	22	107 (38)	122 (19)
Miclobutanil	6,41	+	289,1	25	70,2 (18)	125 (32)
Monolinurom	5,25	+	215	23	126 (22)	99 (34)
Paraoxon etílico	5,50	+	276	28	220 (17)	248 (16)
Piraclostrobina	7,01	+	388	20	163 (25)	194 (12)
Pirazofós	7,06	+	374	33	194 (32)	222 (22)
Piridabem	8,05	+	365	19	147 (24)	309 (12)
Piridafentiona	6,40	+	341	31	92 (34)	189 (22)
Piridato	8,23	+	379	19	207 (18)	351 (10)
Pirimetanil	5,84	+	200	42	82 (24)	107 (24)

conclusão

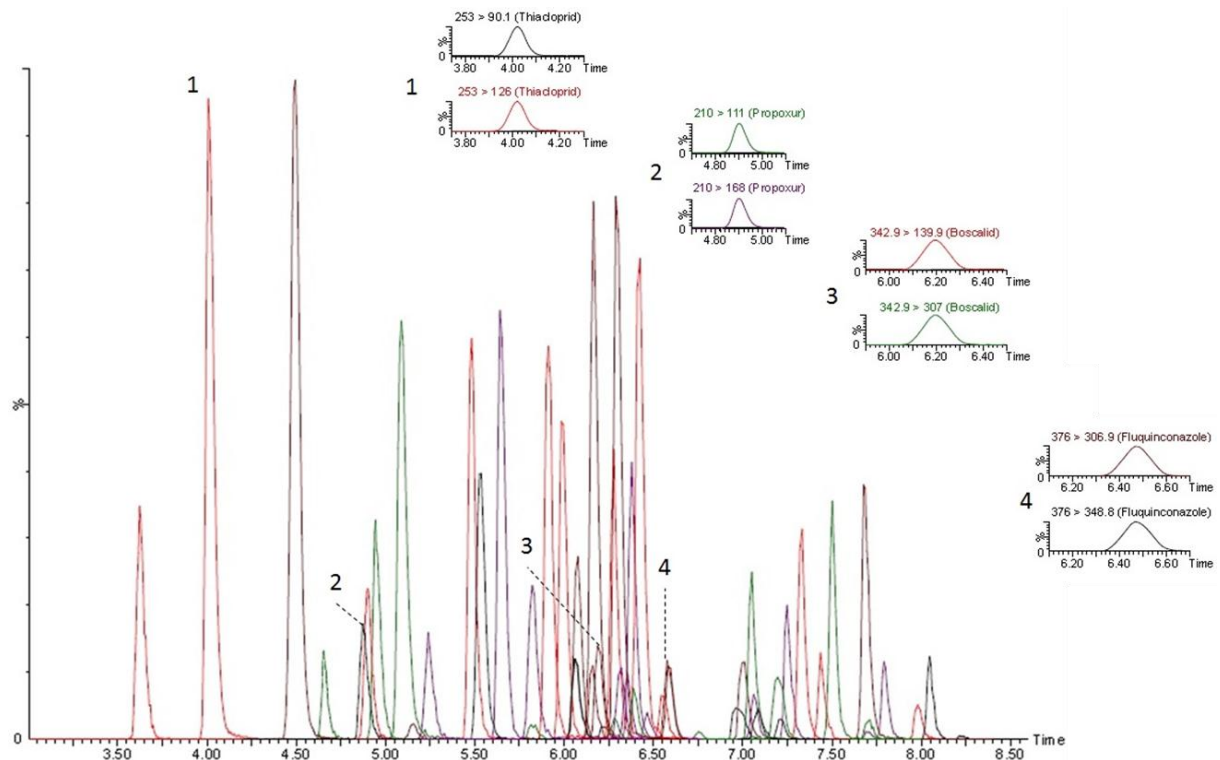
Compostos	t _R (min)	Modo de ionização (ESI)	Íon precursor, m/z	Energia do cone (V)	Íon produto (Identificação) m/z (EC, eV)	Íon produto (Quantificação) m/z (EC, eV)
Pirimicarbe	4,51	+	239	25	72 (18)	182 (15)
Pirimifós metílico	7,06	+	306	25	108 (32)	164 (22)
Profenofós	7,45	+	373	25	128 (40)	302 (20)
Profoxidim	7,98	+	466	28	238 (19)	280 (16)
Propargito	7,80	+	368	15	175 (15)	231 (15)
Propiconazol	6,99	+	342	37	69 (22)	159 (34)
Propizamida	6,32	+	256	27	156 (15)	190 (15)
Propoxur	4,92	+	210	12	111 (16)	168 (10)
Quinoxifeno	7,69	+	308	52	162 (44)	197 (32)
Simazina	4,89	+	202	34	96 (22)	124 (16)
Tebuconazol	6,92	+	308	31	70 (22)	125 (40)
Terbutilazina	6,18	+	230	28	96 (28)	174 (16)
Tetraconazol	6,60	+	372	32	70,1 (20)	159 (30)
Tiacloprido	4,03	+	253	32	90 (40)	126 (20)
Tolcofós metílico	7,10	+	301	30	125 (17)	175 (29)
Triadimefon	6,37	+	294	22	69 (20)	197 (15)
Triazofós	6,43	+	314	22	119 (35)	162 (18)
Triclorfom	3,63	+	257	19	79 (30)	109 (18)
Trifenilfosfato (PI)	6,97	+	327,2	40	152,1 (28)	215 (37)
Trifloxistrobina	7,26	+	409	25	145 (40)	186 (16)
Triflumizol	7,33	+	346	13	60 (10)	278 (10)

t_R: tempo de retenção; PI: Padrão interno; PC: Padrão de controle e EC: Energia de colisão.

Na Figura 8 pode-se verificar os cromatogramas de íons totais, bem como as transições SRM de alguns compostos obtidos por UHPLC-MS/MS para a solução analítica preparada no solvente (acetonitrila) contendo os agrotóxicos em estudo na concentração de 20 µg L⁻¹. Ainda, observa-se que o emprego do modo de aquisição SRM com as transições apresentadas na Tabela 7 permite a quantificação dos analitos, mesmo quando os picos cromatográficos estão sobrepostos. Outros trabalhos também apresentaram separações cromatográficas adequadas, no desenvolvimento de métodos multirresíduo, utilizando os mesmos aditivos na fase

móvel (RIZZETTI *et al.*, 2016; ORSO *et al.*, 2015). Modificadores de fase móvel são utilizados para melhorar o sinal analítico e para obter melhor reprodutibilidade da resposta cromatográfica. Com a utilização de formiato de amônio, a presença de íons amônio suprimiu a formação de adutos de sódio, que são mais comuns sob condições ácidas (ácido fórmico), e, portanto, as moléculas protonadas foram predominantemente $[M+H]^+$, mostrando alta detectabilidade e respostas mais consistentes para certos agrotóxicos (HIEMSTRA & KOK, 2007).

Figura 7 - Cromatograma de íon total, juntamente com as transições SRM de alguns compostos avaliados neste trabalho, obtidos por UHPLC-MS/MS.



4.2 SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA A RDSE

O processo de avaliação das variáveis presentes no preparo de amostra é muito importante para alcançar uma maior eficiência na extração dos agrotóxicos em água e conseqüentemente uma adequada exatidão e precisão do método.

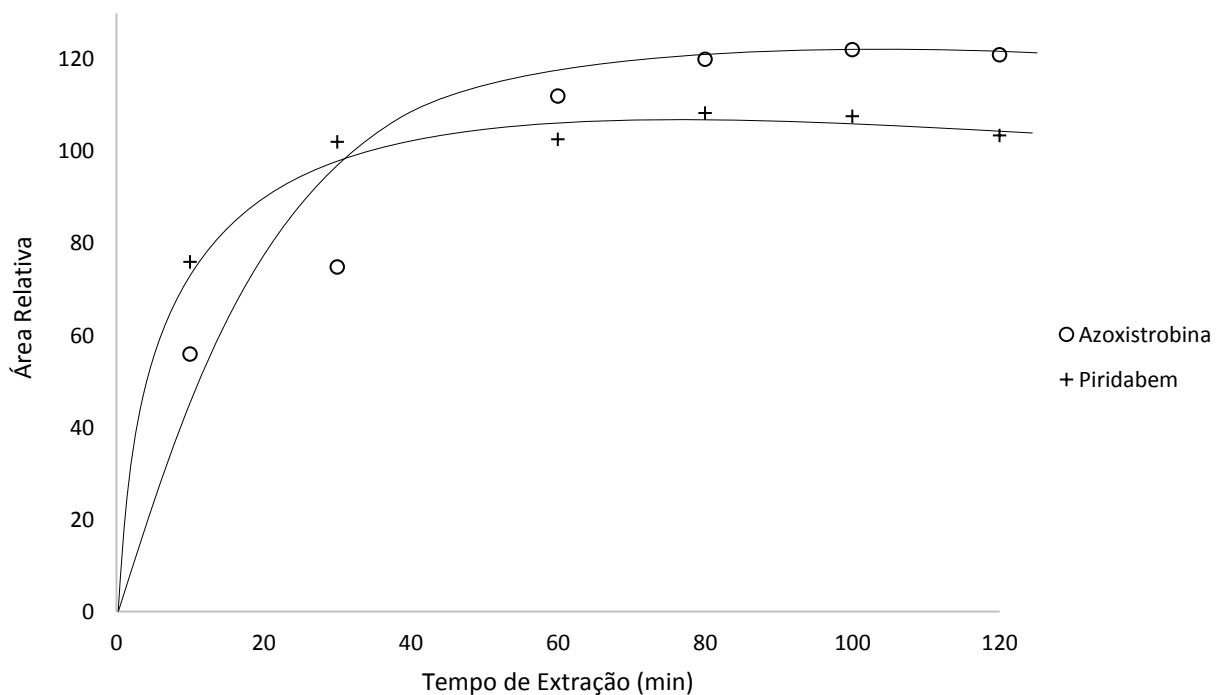
Para a escolha das melhores condições para RDSE, foram otimizadas as seguintes variáveis: tempo de extração; velocidade de rotação do disco na etapa de extração; pH da amostra; força iônica da amostra; tipo e quantidade de sorvente e

condições de dessorção, tais como: velocidade de rotação do disco; tipos de solvente e tempo de dessorção. As condições utilizadas na avaliação dos primeiros testes estão descritas no item 3.7.1. Para avaliar os procedimentos de extração realizados neste estudo, utilizaram-se amostras “branco” (água ultrapura) fortificadas na concentração $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. As extrações foram realizadas em triplicata ($n= 3$) e os resultados avaliados em termos de área relativa uma vez que, quanto maior a área, maior a quantidade de analito extraído.

4.2.1 Efeito do tempo de extração

O tempo de extração dos agrotóxicos foi otimizado considerando o equilíbrio de distribuição do analito entre a amostra e a fase extratora (CORROTEA *et al.*, 2014). O efeito do tempo na eficiência da extração empregando RDSE foi avaliado no intervalo de 10 a 120 min a temperatura ambiente, utilizando um volume de amostra de 50 mL. Na Figura 9 observa-se o efeito do tempo de extração sobre a resposta analítica de dois agrotóxicos (azoxistrobina e piridabem), utilizando a RDSE.

Figura 8 - Efeito do tempo na etapa de extração de dois agrotóxicos avaliados neste estudo.



Conforme pode-se observar na Figura 9, o rendimento da extração aumenta com o tempo de extração até que o equilíbrio seja atingido. Para a maioria dos agrotóxicos em estudo, o tempo de equilíbrio foi alcançado aproximadamente entre 60 e 80 min. Alguns analitos, como por exemplo, o inseticida piridabem, apresentaram um tempo de equilíbrio menor de aproximadamente 30 min. Isto pode ser explicado devido à polaridade de alguns compostos avaliados. Os compostos menos polares ($\text{Log Kow} > 4,0$), apresentam mais afinidade pela fase extratora, quando comparados com os analitos mais polares e assim atingem mais rapidamente o equilíbrio (GIORDANO *et al.*, 2011). No entanto, para assegurar que todos os analitos estivessem em estado de equilíbrio o tempo de extração escolhido foi de 80 min.

4.2.2 Velocidade de rotação do disco na etapa de extração

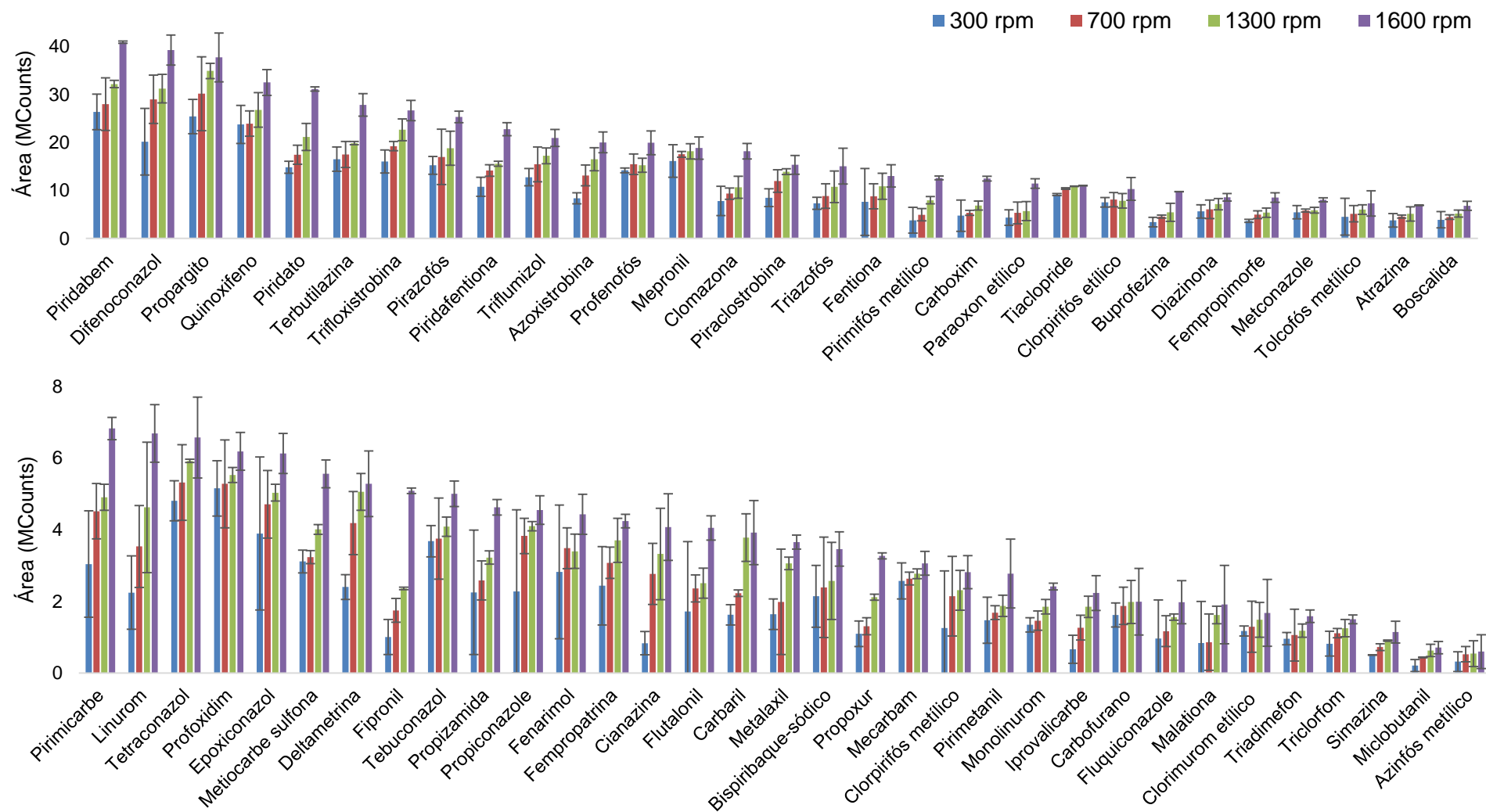
Neste trabalho, foram avaliadas diferentes velocidades de rotação dos discos, variando entre 300 e 1600 rpm. Na Figura 10, pode-se observar o efeito da velocidade de rotação do disco na extração por RDSE dos agrotóxicos em amostras de água.

Observa-se na Figura 10, que quanto maior a velocidade de rotação do disco rotatório, maior é a área dos analitos, o que significa um aumento na quantidade de agrotóxicos extraídos. O aumento da velocidade no processo de extração, faz com que a transferência de analito para a fase extratora seja aumentada e, conseqüentemente, o equilíbrio seja atingido mais rapidamente (GIORDANO *et al.*, 2011). O aumento da velocidade de agitação do dispositivo produz um fluxo mais turbulento no meio, diminuindo a espessura da camada aquosa e, conseqüentemente aumentando a mobilidade dos analitos em solução para o sorvente de extração. Estes efeitos permitem uma taxa de transferência de massa mais elevada para a fase extratora (MANZO *et al.*, 2014a; MANZO *et al.*, 2015). Além disso, outros trabalhos que utilizaram a técnica RDSE para o preparo de amostra, também reportaram a alta velocidade de rotação do disco como sendo a mais adequada para a extração (CAÑAS *et al.*, 2012; CORROTEA *et al.*, 2014; CORROTEA *et al.*, 2016; FISCAL-LADINO *et al.*, 2017). Neste sentido, a velocidade de rotação escolhida neste estudo foi de 1600 rpm, que corresponde à velocidade

máxima fornecida pelo agitador magnético utilizado e um tempo de extração de 80 min.

O efeito da velocidade de rotação do disco RDSE é uma variável hidrodinâmica de grande importância no processo de extração. Sem a ajuda de um dispositivo que produza agitação, o processo somente dependeria da velocidade de difusão do analito em fase aquosa para a fase sólida, produzindo tempos de extração muito longos. Isto seria pouco eficiente quando comparado às técnicas atualmente desenvolvidas. Portanto, ao aplicar agitação, se produz uma maior transferência do analito para a fase extratora, melhorando a velocidade de extração (MANZO *et al.*, 2015). Ainda, rotações elevadas na etapa de extração além de melhorar o processo de microextração, não causam danos físicos à fase polimérica, pois a fase não está em contato direto com o fundo do frasco de amostragem, diferentemente do que ocorre com a técnica SBSE.

Figura 9 - Efeito da velocidade de rotação do disco na extração dos compostos em amostras de água.



4.2.3 Tempo e velocidade de rotação do disco rotatório na etapa de dessorção

Dentre os parâmetros que necessitam otimização na etapa de dessorção dos analitos, encontra-se o tempo (t) e a velocidade de rotação do disco (R). Estas duas variáveis foram otimizadas quando submetidas a um modelo de interação linear e quadrática, utilizando ANOVA e o erro puro obtido através das réplicas de cada experimento, para avaliação da significância de cada parâmetro. Os efeitos significativos padronizados para cada um dos compostos podem ser observados na Tabela 8. No Apêndice A, pode-se observar, por exemplo, a ANOVA, diagrama de Pareto e os gráficos de médias marginais dos agrotóxicos cianazina, iprovalicarbe, monolinurom, tebuconazol, tiacloprido e triclorfom.

Nenhum dos parâmetros avaliados teve significância para os compostos clorpirifós etílico, clorpirifós metílico, diazinona, epoxiconazole, fenpropatrina, fenpropimorfe, fentiona, flutolanil, malationa, mecarbam, mepronil, metalaxil, metconazol, miclobutanil, pirimifós metílico, profenofós, propiconazol, piraclostrobina, pirazofós, quinoxifeno, tetraconazol, triazofós e trifloxistrobina. O termo (Rt) não foi significativo para nenhum dos analitos em estudo.

Tabela 8 - Estimativas do efeito padronizado (SEE, do inglês *Standardized Effect Estimate*) para os compostos em estudo, para a otimização da etapa de dessorção.

Compostos	continua						
	R	R ²	t	t ²	R t ²	R ² t	R ² t ²
Atrazina			4,7				
Azinfós metílico						-2,7	
Azoxistrobina			5,5			-2,3	
Bispiribaque sódico			4,3				-2,9
Boscalida			6,2			-2,5	-2,2
Buprofezina			4,2				-2,5
Carbaril			3,5			-2,2	
Carbofurano		2,8					-2,7
Carboxim						2,1	
Clomazona						2,2	
Clorimurom etílico			3,4				
Cianazina			3,4				
Deltametrina			2,8				

Compostos	conclusão						
	R	R ²	t	t ²	R t ²	R ² t	R ² t ²
Difenoconazol			3,2				
Fenarimol						2,3	
Fipronil			2,1				
Fluquiconazol			3,0				
Iprovalicarbe		4,2		2,4		3,3	-3,8
Linurom			2,6			-2,6	
Metiocarbe sulfona			3,2				-2,3
Monolinurom							-2,2
Pirimicarbe			2,9				-2,2
Profoxidim			-3,1	-3,1			
Propargito			-3,2	-3,3			
Propizamida			3,1			-3,5	
Propoxur			4,4				
Piridabem			-2,6	-3,4			
Piridafentiona			2,2				
Piridato				-3,3			
Pirimetanil			4,8				
Simazina			3,3				
Tebuconazol			5,2		-2,2		-2,6
Terbutilazina			2,8				-2,1
Tiacloprido	3,5		8,0	2,2			-2,7
Tolcofós metílico			4,0				
Triadimefon			2,9				-2,4
Triclorfom	2,2		4,4				
Triflumizol			3,4				

Pode-se observar na Tabela 8, que 13 compostos foram positivamente afetados apenas pelo fator (t), o que já era esperado, uma vez que o processo de dessorção também depende do equilíbrio. Ainda, outros 14 analitos também foram afetados positivamente pelo termo (t), porém, tiveram outros efeitos significativos. Os agrotóxicos iprovalicarbe e tiacloprido foram afetados positivamente pelo termo (t²), sendo que o analito tiacloprido foi o mais afetado pelo termo (t).

O aumento do termo (R) também aumentou a eficiência de extração para os compostos triclorfom e tiacloprido, assim como o termo (R²) teve o mesmo comportamento para carbofurano e iprovalicarbe.

Para os compostos carboxim, clomazona, fenarimol e iprovalicarbe o termo (R^2t) foi positivo. As interações que apresentaram estimativa do efeito negativo foram: (Rt^2) para tebuconazol, (R^2t) para propizamida, azinfós metílico, boscalida, azoxistrobina, linuron e carbaril, (R^2t^2) para iprovalicarbe, bispiribaque sódico, carbofurano, tiacloprido, tebuconazol, buprofezina, triadimefom, metiocarbe sulfona, boscalida, monolinurom, pirimicarbe e terbutilazina. Os compostos profoxidim, piridabem, propargito e piridato obtiveram influência negativa pelas variáveis (t) e (t^2).

Após analisados os efeitos e os diagramas de medidas marginais para todos os analitos que apresentaram efeitos significativos, pode-se concluir que as melhores condições de extração para a maioria dos agrotóxicos na etapa de dessorção foi utilizando o maior tempo (60 min) e a maior velocidade de rotação do disco (1600 rpm). Estes resultados demonstram a necessidade do estabelecimento do equilíbrio do analito durante a etapa de dessorção. Ainda, condizem com os efeitos já publicados a respeito do aumento da rotação, que também favorece a transferência do analito da fase extratora para a fase de dessorção (solvente orgânico) (JACHERO *et al.*, 2013; MANZO *et al.*, 2015).

Como já observado, a etapa de dessorção também depende do equilíbrio. Portanto, mais alguns testes para avaliar o efeito do tempo na etapa de dessorção e encontrar o tempo ótimo nesta etapa foram realizados. Para isso comparou-se os tempos de dessorção de 60; 90 e 120 minutos. O tempo de 60 min foi escolhido, uma vez que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as áreas relativas para a maioria dos agrotóxicos estudados nos diferentes tempos testados. Já para a velocidade de rotação do disco, não foram testadas rotações maiores, pois o equipamento utilizado não fornece possibilidades acima de 1600 rpm.

4.2.4 Efeito do pH

Segundo Caldas *et al.* (2011b), 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 estabilizar os agrotóxicos e aumentar sua retenção na fase sólida. O pH da amostra determina a forma como os analitos estarão

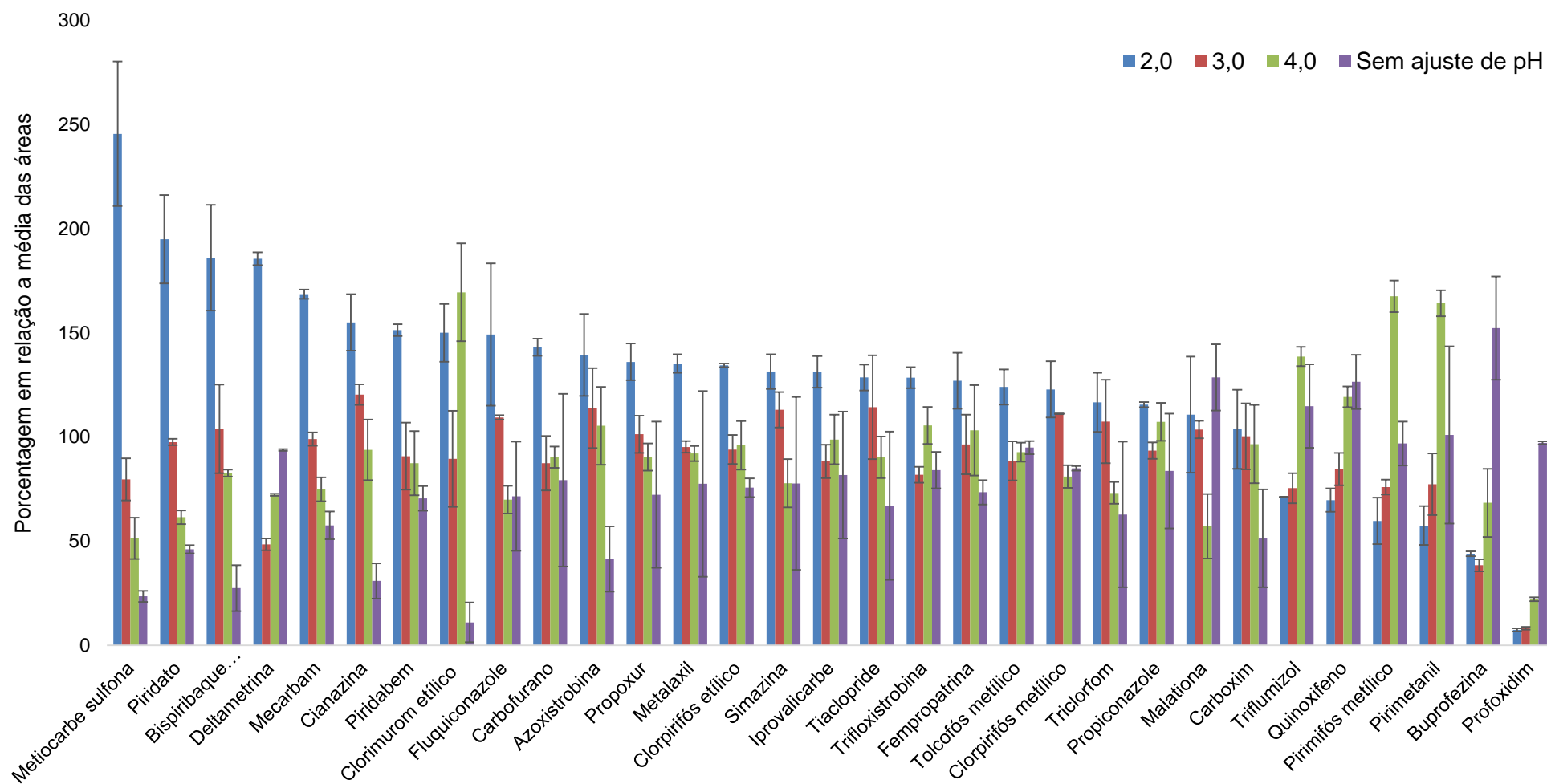
presentes na amostra (como íons ou forma neutra), que, posteriormente, pode afetar a recuperação dos analitos (ZHANG *et al.*, 2010).

Para otimizar o efeito do pH da amostra sobre o sinal analítico dos agrotóxicos, foram avaliados quatro diferentes valores de pH, ou seja, corrigindo o pH das amostras para 2,0; 3,0; 4,0 e sem correção do pH da amostra (pH entre 5,5 e 6,5).

Para determinados analitos em estudo não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH testados, conforme pode-se observar no Apêndice B. Já para a maioria dos compostos que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$), a eficiência de extração foi maior quando a amostra foi acidificada em pH 2,0, de acordo com a Figura 11. Portanto, o pH escolhido para a extração dos analitos foi pH 2,0.

A necessidade de correção do pH da amostra é atribuída aos valores de constante de dissociação ácida (pKa) dos agrotóxicos selecionados neste estudo (Tabela 4). Quando os agrotóxicos estão na forma neutra as interações com o sorvente de extração é favorecida (MANZO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2010). Pode-se também observar que alguns compostos como, clorimurómetil, malationa, triflumizol, quinoxifeno, pirimifós metílico, pirimetanil, buprofezina e profoxidim apresentaram maior eficiência de extração em pH mais alto. Este efeito, pode ser explicado devido a dissociação dos compostos básicos em valores de pH ácido (SILVA FILHO *et al.*, 2011). No entanto, em valores de pH mais elevados, os agrotóxicos orgânicos como, por exemplo, o analito pirimifós metílico, podem sofrer degradação, e conseqüentemente diminuem o sinal analítico (CHIRON *et al.*, 1998; NAVALÓN *et al.*, 2002).

Figura 10 - Efeito do pH da amostra em relação a média das áreas obtidas na extração dos agrotóxicos por RDSE e determinação por UHPLC-MS/MS.



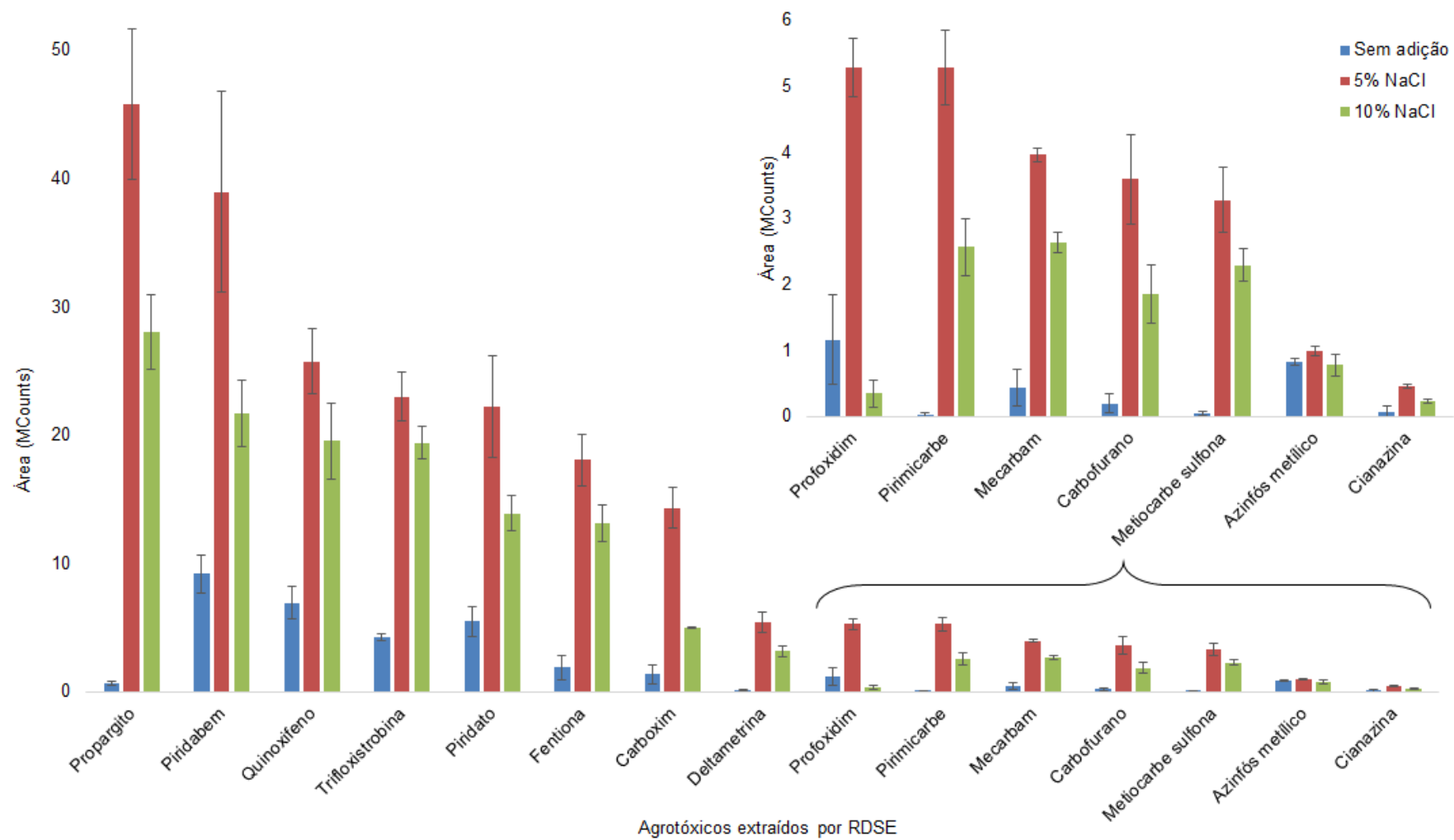
4.2.5 Efeito da força iônica na extração dos agrotóxicos em amostra de água

A influência da força iônica é geralmente testada em técnicas de microextração uma vez que, pode aumentar a eficiência de extração de determinado analito, dependendo da polaridade. Para compostos semi-polares e polares, a presença de sal, por meio do efeito *salting out*, aumenta eficiência de extração, tornando os analitos menos solúveis em água e aumentando sua afinidade para a fase extratora (GIORDANO *et al.*, 2011; CAÑAS *et al.*, 2012; MANZO *et al.*, 2014a; CORROTEA *et al.*, 2014; CAÑAS *et al.*, 2014; MANZO *et al.*, 2015; CORROTEA *et al.*, 2016).

Neste trabalho foi avaliada a adição de diferentes quantidades de cloreto de sódio (NaCl) nas amostras, em uma faixa que variou de 0 a 10% (m/v). Para a maioria dos analitos em estudo obteve-se maior eficiência de extração quando adicionou-se NaCl na amostra. A adição de um eletrólito (por exemplo, NaCl) favorece a migração dos solutos para a fase polimérica e, conseqüentemente, melhora o rendimento de extração (BORGES *et al.*, 2015; MANZO *et al.*, 2014a). Quando o sal é adicionado à solução, as moléculas de água formam esferas de hidratação em torno dos íons (Na^+ e Cl^-) em solução. Estas esferas de hidratação reduzem a quantidade de água disponível para dissolver moléculas de analito, direcionando-os para a fase extratora (CALDAS *et al.*, 2016).

Ainda, para a verificação da significância, o teste t de *Student* foi aplicado à 95% de confiança aos resultados em área relativa obtidos pela adição de 2,5 e 5,0 g de sal na amostra para a etapa de extração. Conforme pode ser visto na Figura 12, os agrotóxicos que apresentaram diferença significativa entre os resultados, demonstraram que a adição de 5% de NaCl na amostra apresentou melhor eficiência de extração. Desta forma, a quantidade de NaCl escolhida para ser adicionada à amostra foi de 5% (m/v). Cañas e colaboradores (2012) também obtiveram resultados satisfatórios utilizando 5% de NaCl para a extração de agrotóxicos em água por RDSE.

Figura 11 - Resultados dos analitos que apresentaram diferença significativa em relação à adição de diferentes quantidades de NaCl.

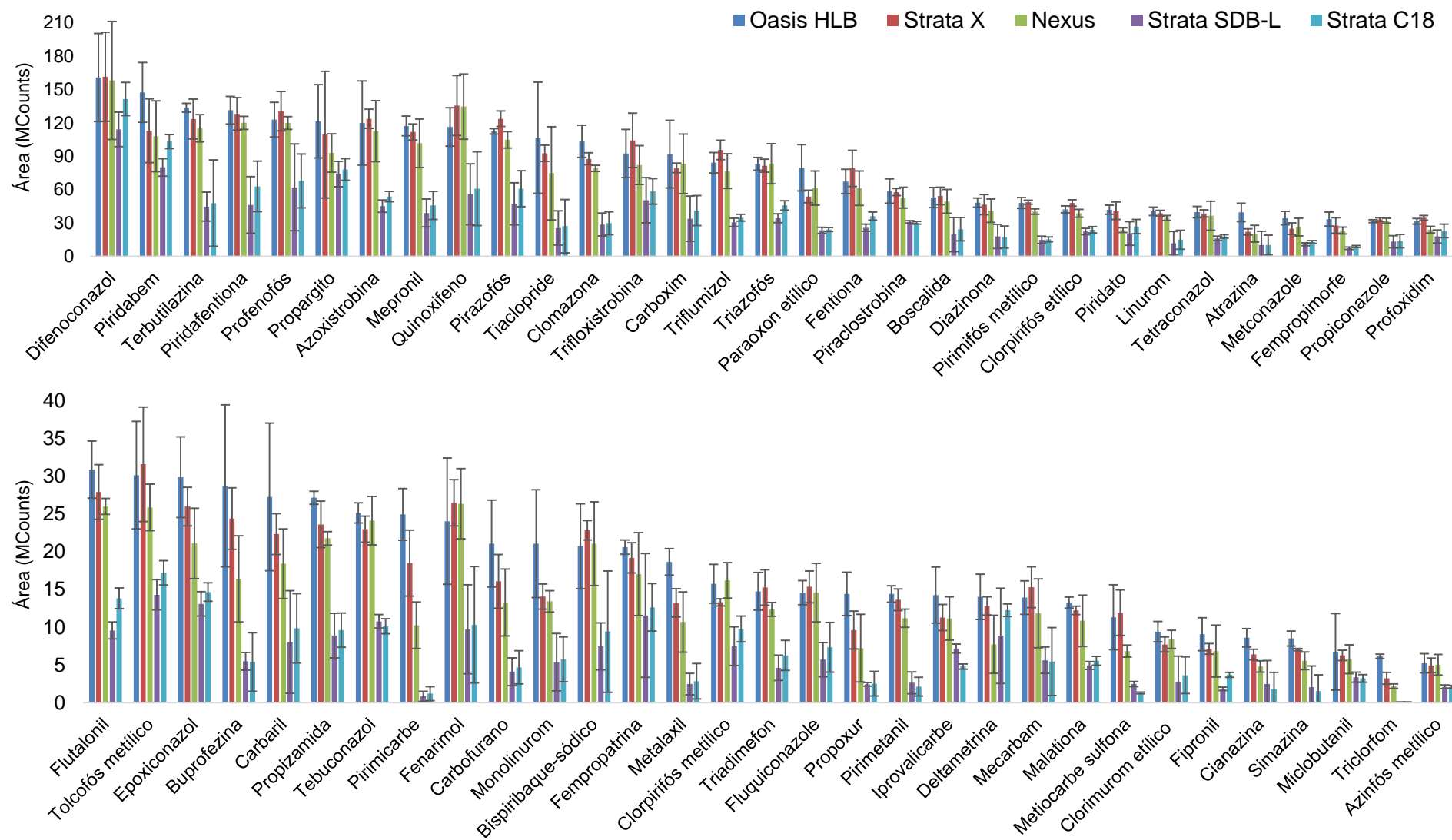


4.2.6 Avaliação de diferentes tipos de sorventes

A fim de avaliar o melhor sorvente de extração para este estudo, foram testados diferentes tipos como: Oasis[®] HLB, Strata[®] X, Strata[®] C₁₈, Strata[®] SDB-L e Bond Elut Nexus. As estruturas dos sorventes testados, encontra-se no Apêndice C. Para isso, utilizou-se as condições previamente otimizadas. Pode-se observar na Figura 13 que a maioria dos compostos estudados apresentaram melhores resultados para os sorventes poliméricos Oasis[®] HLB, Bond Elut Nexus e Strata[®] X. Estes sorventes poliméricos apresentam características lipofílicas e hidrofílicas, com grande área de superfície e com capacidade para extração de compostos ácidos, neutros e básicos, favorecendo a extração dos analitos (BROUSMICHE *et al.*, 2008; CAÑAS *et al.*, 2014). Donato e colaboradores (2015), também constataram em seu trabalho melhor eficiência dos sorventes poliméricos quando comparados, por exemplo, com C₁₈ para a extração simultânea de agrotóxicos de diferentes classes em amostras de água.

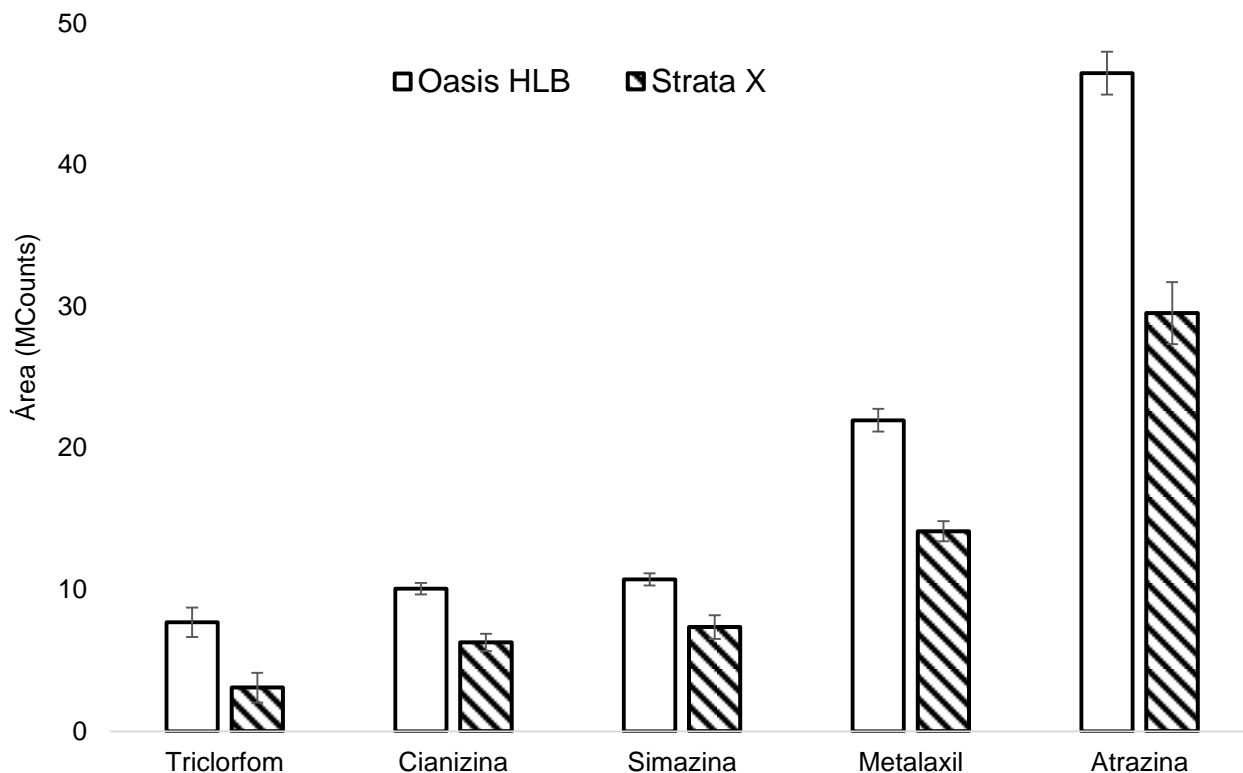
No entanto, percebe-se na Figura 13 que os sorventes Oasis[®] HLB e Strata[®] X apresentaram melhores resultados, em termos de área relativa em comparação ao sorvente Nexus para a maioria dos compostos em estudo. Os sorventes Strata[®] X e Oasis[®] HLB possuem uma superfície modificada com divinilbenzeno (não polar) e um grupo N-vinilpirrolidona (polar), o que facilita a extração de agrotóxicos de diferentes polaridades em uma única etapa de extração (BUSZEWSKI & SZULTKA, 2012).

Figura 12 - Agrotóxicos extraídos por RDSE utilizando diferentes tipos de sorventes.



Além disso, comparando os sorventes poliméricos Oasis[®] HLB e Strata[®] X, através do teste de significância (teste t), constatou-se que para a maioria dos analitos estudados, não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre as eficiências de extração, medidas através da área relativa de cada analito. Entretanto, para os compostos triclorfom, cianizina, simazina, metalaxil e atrazina diferenças significativas foram observadas entre os dois sorventes avaliados (Figura 14). Segundo a Figura 14, o sorvente Oasis[®] HLB demonstrou ser mais eficiente para os analitos que obtiveram diferenças significativas entre os resultados. Portanto, para o desenvolvimento deste trabalho foi escolhido o sorvente Oasis[®] HLB, o qual permitiu extrair simultaneamente analitos de diferentes características físico-químicas por adsorção. Manzo *et al* (2014a) também utilizaram este sorvente na extração RDSE de antiinflamatórios não esteroidais em amostras aquosas. Corrotea e colaboradores (2016), obtiveram resultados satisfatórios, na extração de fármacos em água, empregando o sorvente Oasis[®] HLB na técnica RDSE.

Figura 13 - Resultado dos analitos que apresentaram diferença significativa ($\rho \leq 0,05$) entre os sorventes poliméricos testados na etapa de extração por RDSE.

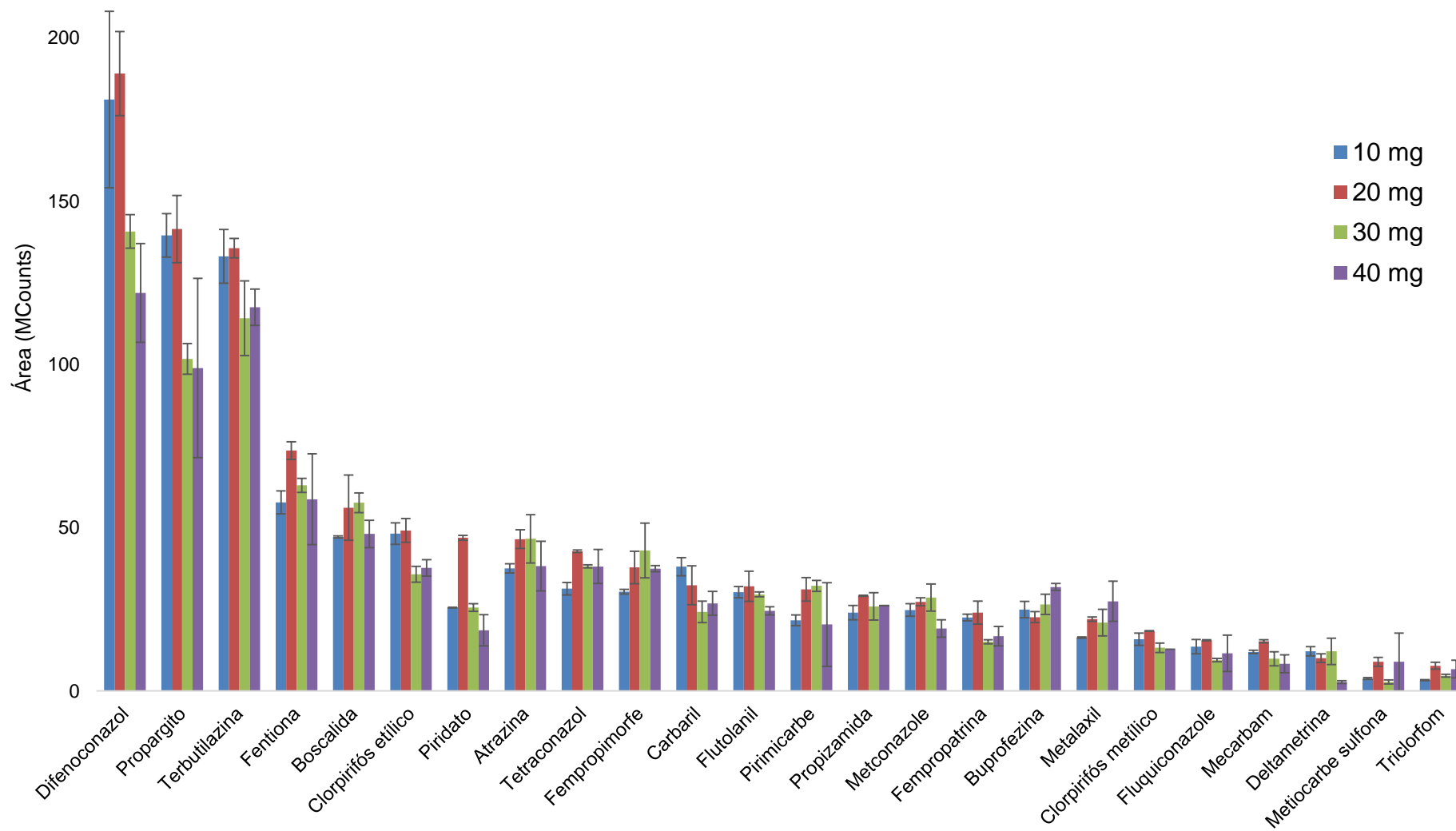


4.2.7 Estudo da quantidade de sorvente utilizada para a etapa de extração

A fim de otimizar a quantidade de sorvente utilizada na cavidade do disco rotatório, foram testadas diferentes proporções de 10; 20; 30 e 40 mg de Oasis[®] HLB. Conforme pode-se observar no Apêndice D, para 39% dos compostos avaliados a diferença na quantidade utilizada foi significativa, no entanto, 61% dos analitos apresentaram resultados semelhantes nas proporções avaliadas. Na Figura 15 observa-se que a maioria dos compostos que apresentaram diferenças significativas, demonstraram resultados satisfatórios quando utilizou-se 20 mg de Oasis[®] HLB. Manzo e colaboradores (2014), relataram em seu trabalho que quantidades de fases de extração de 50 e 65 mg de sorvente utilizadas, diminuíram a eficiência de extração por RDSE. Este efeito pode ser explicado, uma vez que a fase tende a ser comprimida, e assim, a sua interação com os analitos diminui (MANZO *et al.*, 2014a; FISCAL-LADINO

et al., 2017). Também, segundo os autores, quantidades menores possibilitam livre circulação da fase na cavidade do disco permitindo maior circulação da amostra e melhor interação com os analitos.

Figura 14 - Compostos que apresentaram diferença significativa em área nos resultados com diferentes quantidades de sorventes para a extração por RDSE.

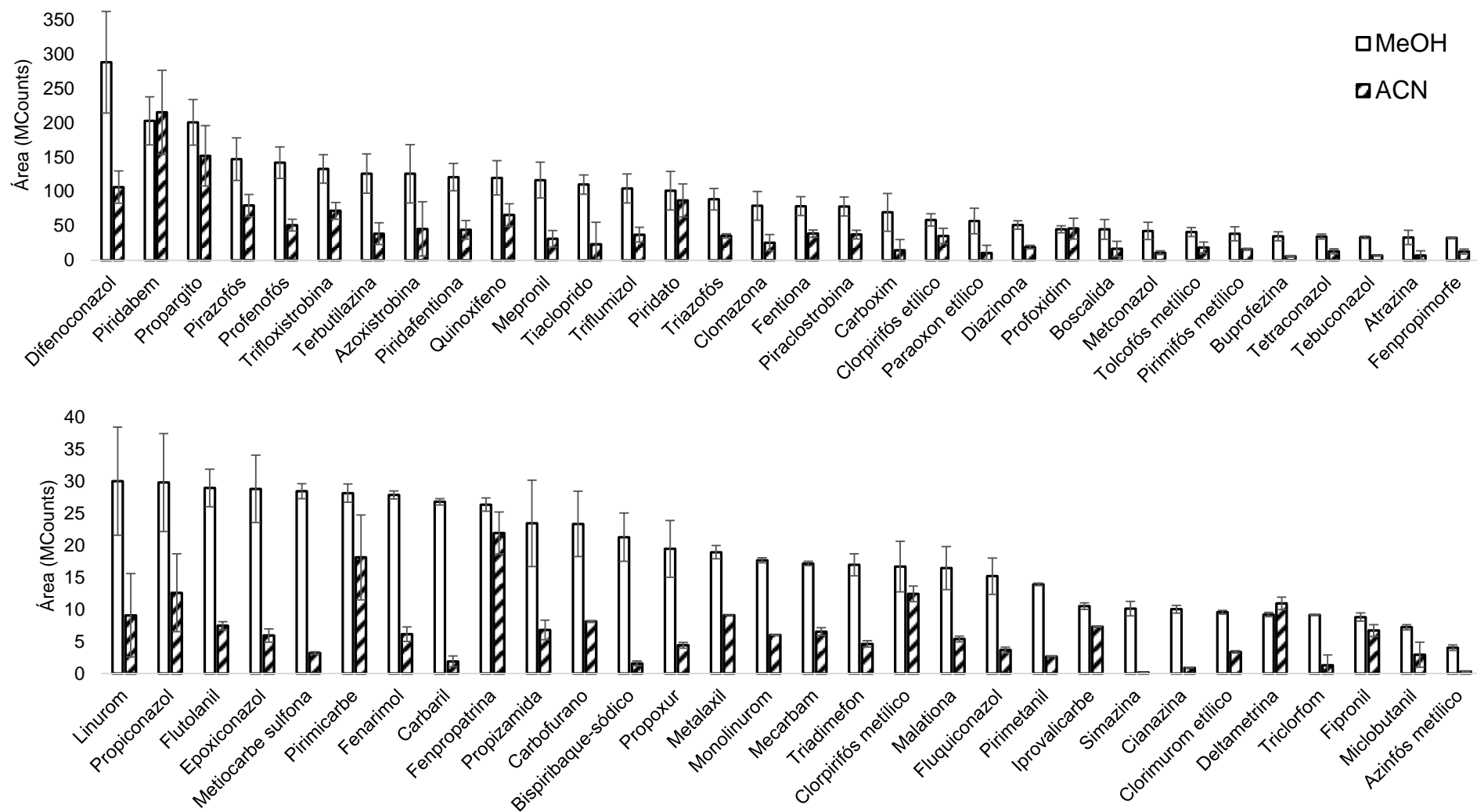


4.2.8 Solvente de dessorção

Uma vez extraídos os agrotóxicos no sorvente polimérico Oasis[®] HLB, é necessário escolher um solvente que permita a dessorção adequada dos analitos. A escolha do solvente de dessorção é um parâmetro importante e está relacionada com a polaridade dos compostos (JARDIM, 2010). O ideal é que o solvente selecionado permita dessorver os analitos de forma rápida e quantitativa com pequenos volumes, ser compatível com o equipamento que será utilizado para a determinação dos compostos e ainda, apresente baixa toxicidade e nocividade ao meio ambiente. Neste sentido, foram testados dois tipos de solvente orgânicos para a dessorção dos agrotóxicos em estudo, metanol e acetonitrila. Ainda, nos testes para avaliação de diferentes solventes de dessorção foram utilizados volumes de 3 e 5 mL.

De acordo com a Figura 16, o solvente de dessorção metanol apresentou dessorção mais efetiva quando comparado com a acetonitrila, para a maioria dos agrotóxicos. Embora a acetonitrila tenha uma polaridade semelhante a do metanol, para este estudo o solvente metanol mostrou-se ser mais apropriado. Além disso, o volume de 3 mL utilizado para a dessorção dos analitos também demonstrou bons resultados. Assim, a dessorção dos compostos extraídos pela técnica RDSE foi realizada pela adição de 3 mL de metanol.

Figura 15 - Comparação da área dos solventes metanol e acetonitrila utilizados na etapa de desorção dos agrotóxicos extraídos por RDSE.

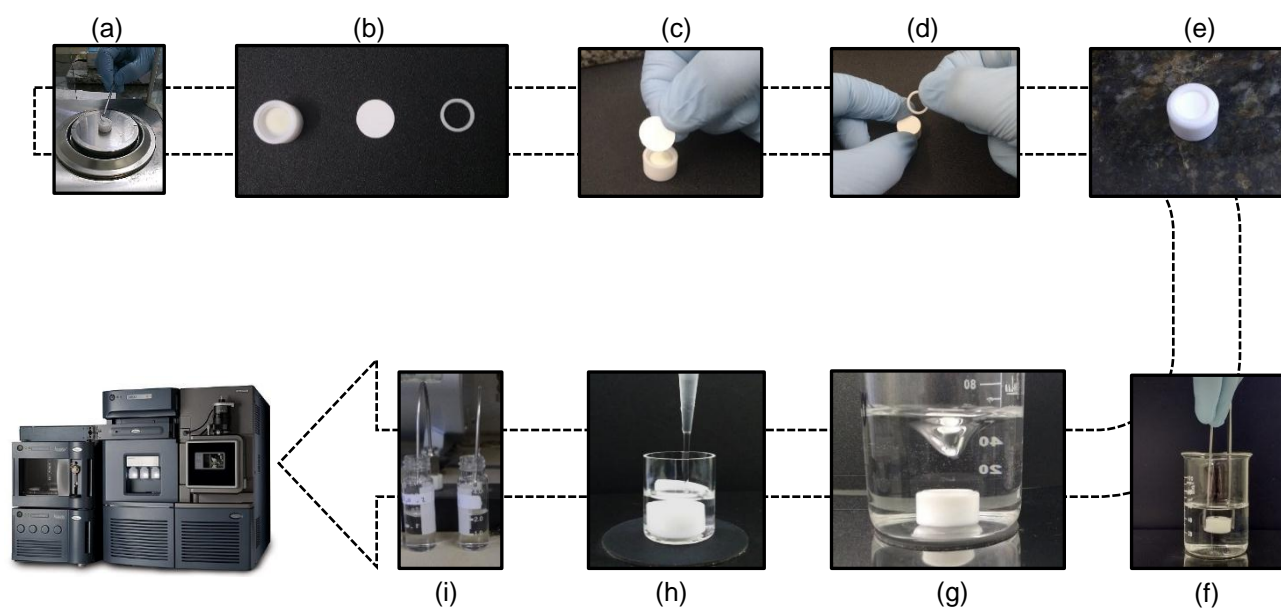


4.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO OTIMIZADO

A partir dos resultados obtidos, na etapa de avaliação dos parâmetros envolvidos no procedimento de extração e dessorção dos analitos em amostras de água, obteve-se o procedimento de extração otimizado para os agrotóxicos estudados neste trabalho.

O volume de amostra utilizado foi de 50 mL e o pH foi ajustado em 2,0 com ácido fosfórico (1:1; v/v) ainda, adicionou-se a amostra 2,5 g de NaCl. O disco rotatório foi preparado utilizando sorvente Oasis[®] HLB (20 mg), coberto com uma membrana de difusão semipermeável de polietersulfona (PES) e selado com um anel de teflon, como pode ser visto na Figura 17a a 17e. Após isto, o dispositivo (disco rotatório) foi imerso na amostra que está sobre uma mesa agitadora (Figura 17f). O disco foi submetido a uma rotação de 1600 rpm por um tempo de extração de 80 min (Figura 17g). Depois do tempo de extração, o disco foi retirado da amostra e levemente seco. Após foi colocado em um recipiente de vidro com capacidade de aproximadamente 6,5 mL, e então 3 mL de MeOH foram adicionados para dessorver os analitos da fase extratora (Figura 17h). Além disso, na etapa de dessorção o disco foi submetido a uma velocidade de rotação de 1600 rpm por um tempo de 60 min. Posteriormente, retirou-se 2,5 mL do extrato, adicionou-se 200 µL de água ultrapura e evaporou-se com fluxo suave de N₂ até 400 µL (Figura 17i), obtendo-se um volume de extrato final 125 vezes menor do que o volume de amostra inicial. A adição de água no extrato a ser evaporado proporcionou uma melhora no formato dos picos cromatográficos. Ainda, a etapa de evaporação foi necessária para alcançar níveis de concentração mais baixos. Após, os extratos foram injetados no sistema UHPLC-MS/MS. Cabe destacar que para o preparo de amostra foi utilizado um agitador magnético de múltiplas posições, o qual possibilita a extração de 15 amostras simultaneamente.

Figura 16 - Principais etapas envolvidas na extração RDSE de agrotóxicos em amostras de água.

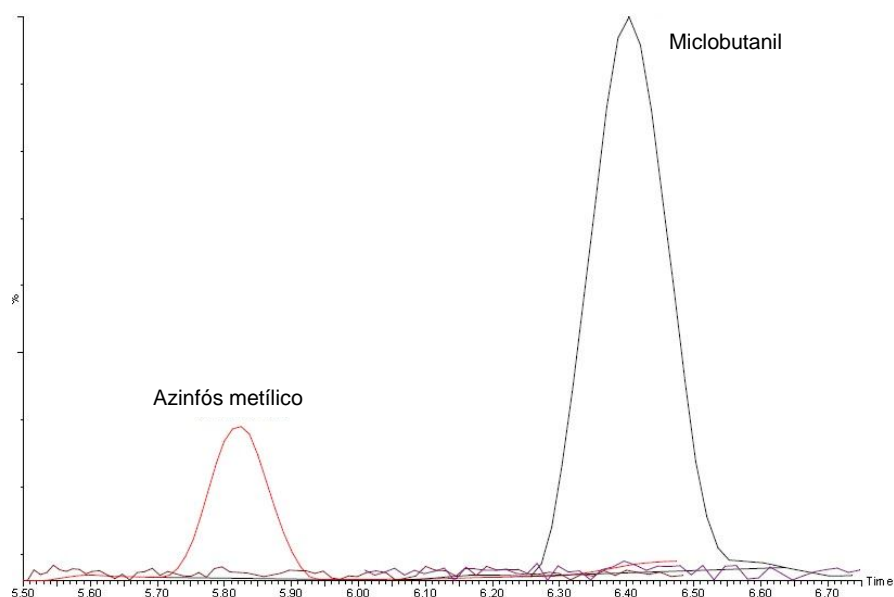


4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZANDO RDSE PARA A EXTRAÇÃO DOS AGROTÓXICOS E DETERMINAÇÃO POR UHPLC-MS/MS

4.4.1 Seletividade

A seletividade de um método é obtida quando um sinal analítico está livre de qualquer outra espécie presente em uma determinada amostra, ou seja, assegurar que o sinal analítico obtido no equipamento possa ser atribuído aos analitos de interesse discriminando substâncias semelhantes (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, componentes que possam gerar interferências, entre outros) (BRASIL, 2011b; SPÍNOLA *et al.*, 2014). No desenvolvimento deste método, este parâmetro foi considerado satisfatório, uma vez que não houve interferentes com os mesmos íons de quantificação e identificação, bem como pela ausência dos agrotóxicos no “branco”, sendo que neste estudo utilizou-se água ultrapura. Neste sentido, a amostra “branco” foi utilizada para o preparo das curvas analíticas e ensaios de fortificação. Observa-se na Figura 18 o pico cromatográfico dos agrotóxicos azinós metílico e miclobutanil fortificados no nível $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e sobreposta ao “branco” (água ultrapura).

Figura 17 - Cromatograma de íon total de uma fortificação na concentração $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ dos agrotóxicos azinfós metílico e miclobutanil sobreposta ao “branco” da matriz.



4.4.2 Curva analítica e faixa de trabalho

A faixa de trabalho de cada agrotóxico estudado foi determinada extraindo-se em triplicata amostras de água fortificada nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, referente aos pontos da curva. De acordo com o INMETRO (2011), a curva analítica deve possuir no mínimo cinco pontos (não incluindo o ponto zero).

Conforme pode ser visto na Tabela 9, as faixas de trabalho variaram de 0,05 e 0,1 a $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo do composto estudado. A curva analítica extraída, devido ao fato de passar por todo processo de extração, teve como primeiro ponto a concentração equivalente ao LOQ do método de cada analito até $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Todos os analitos demonstraram linearidade satisfatória, uma vez que todos compostos obtiveram coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, estando de acordo com as orientações da ANVISA e INMETRO.

4.4.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção do método

Os valores de LOQ_m do método foram obtidos através da relação sinal/ruído, levando em consideração a extração da menor concentração do analito que pode ser validado com adequada exatidão (70-120%) e precisão ($\text{RSD} \leq 20\%$). Para 19

agrotóxicos estudados os limites de quantificação e detecção do método foram de 0,05 e 0,015 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que para 43 compostos os LOQs e LODs, conforme Tabela 9, foram de 0,1 e 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Estes valores são considerados satisfatórios, uma vez que com os LOQs obtidos, consegue-se atingir determinados valores máximos permitidos dos agrotóxicos que possuem legislação vigente no Brasil como, por exemplo, a Portaria 2914 de 2011, do Ministério da Saúde (variam entre 2 a 180 $\mu\text{g L}^{-1}$), ou mesmo valores estipulados pela União Europeia que é de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para agrotóxicos individuais e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a soma das concentrações dos agrotóxicos presentes na água destinada ao consumo humano. No Estado do Rio Grande do Sul, a Portaria Estadual 320/2014 contempla o monitoramento de resíduos de 46 agrotóxicos, além das substâncias que são monitoradas na Portaria MS nº 2914. Nesta portaria os valores máximos permitidos (VMPs), para os agrotóxicos registrados variam entre 1,2 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sendo assim, os valores de LOQs do método atingem aos VMP da portaria estadual, uma vez que são inferiores.

Giordano e colaboradores (2011), desenvolveram um método utilizando RDSE para a extração de resíduos de sete agrotóxicos. Dentre eles, encontram-se os compostos malationa, diazinona e clorpirifós, com LOQs de 0,32; 1,30 e 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Neste trabalho, estes agrotóxicos também foram avaliados e, quando compara-se os valores de LOQs obtidos, observa-se que foi possível atingir níveis ainda menores, 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (para clorpirifós e diazinona) e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para malationa.

Neste mesmo sentido, Donato e colaboradores (2015), desenvolveram um método multirresíduo para determinação de agrotóxicos em água utilizando SPE, no preparo de amostra e determinação por LC-MS/MS e GC-MS/MS e obteve-se valores de LOQs de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos compostos avaliados. Embora a SPE seja uma técnica exaustiva quando comparada com os resultados obtidos neste estudo apresentou valores de LOQs que variaram de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Ademais, em 2009, Giordano e colaboradores utilizaram a técnica de microextração SBSE para a extração de 16 resíduos agrotóxicos em amostras de água, e obtiveram resultados de LOQs semelhantes a este trabalho, demonstrando assim equivalência entre as técnicas de microextração.

Em relação ao número de compostos avaliados, a quantidade máxima de analitos até então reportada na literatura utilizando a técnica RDSE, para o preparo

de amostra foi de 16 HPAs (CORROTEA *et al.*, 2014) e neste trabalho foi possível a determinação simultânea de 62 agrotóxicos de diferentes propriedades físico-químicas. Neste sentido, a técnica RDSE avaliada neste estudo demonstra ser adequada para o monitoramento de resíduos de agrotóxicos em amostras de água, pois os níveis de quantificação obtidos estão de acordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira e a legislação europeia.

Tabela 9 - Faixa linear, coeficiente de determinação (r^2), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e razão de íons do método para cada agrotóxico avaliado neste trabalho.

Compostos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	continua
					Razão de íons
Atrazina	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,2
Azinfós metílico	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,7
Azoxistrobina	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,4
Bispiribaque-sódico	0,1 - 2,0	0,994	0,030	0,1	0,3
Boscalida	0,05 - 2,0	1,000	0,015	0,05	0,2
Buprofezina	0,1 - 2,0	0,999	0,030	0,1	0,1
Carbaril	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,3
Carbofurano	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,6
Carboxim	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,8
Cianazina	0,1 - 2,0	0,995	0,030	0,1	0,1
Clomazona	0,1 - 2,0	0,992	0,030	0,1	0,8
Clorimurom etílico	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,3
Clorpirifós etílico	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,4
Clorpirifós metílico	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,9
Deltametrina	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,4
Diazinona	0,05 - 2,0	0,999	0,015	0,05	0,7
Difenoconazol	0,05 - 2,0	0,994	0,015	0,05	0,6
Epoxiconazol	0,1 - 2,0	0,999	0,030	0,1	0,3
Fenpropatrina	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,2
Fenpropimorfe	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,4

continuação

Compostos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD_m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ_m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Razão de íons
Fenarimol	0,1 - 2,0	0,999	0,030	0,1	0,5
Fentiona	0,05 - 2,0	0,997	0,015	0,05	0,2
Fipronil	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,5
Fluquiconazol	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,6
Flutolanil	0,05 - 2,0	0,999	0,015	0,05	0,2
Iprovalicarbe	0,1 - 2,0	0,993	0,030	0,1	0,7
Linurom	0,05 - 2,0	0,994	0,015	0,05	0,8
Malationa	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,8
Mecarbam	0,1 - 2,0	0,992	0,030	0,1	0,1
Mepronil	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,5
Metalaxil	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,3
Metconazol	0,05 - 2,0	0,999	0,015	0,05	0,6
Metiocarbe sulfona	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,8
Miclobutanil	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,5
Monolinurom	0,05 - 2,0	0,997	0,015	0,05	0,4
Paraoxon etílico	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,8
Piraclostrobina	0,05 - 2,0	0,999	0,015	0,05	0,8
Pirazofós	0,1 - 2,0	0,992	0,030	0,1	0,9
Piridabem	0,05 - 2,0	0,999	0,015	0,05	0,6
Piridafentiona	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,2
Piridato	0,1 - 2,0	0,998	0,030	0,1	0,2
Pirimetanil	0,1 - 2,0	0,994	0,030	0,1	0,5
Pirimicarbe	0,1 - 2,0	0,995	0,030	0,1	0,8
Pirimifós metílico	0,1 - 2,0	0,990	0,030	0,1	0,5
Profenofós	0,05 - 2,0	0,996	0,015	0,05	0,1
Profoxidim	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,2
Propargito	0,1 - 2,0	0,999	0,030	0,1	0,2
Propiconazol	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,2
Propizamida	0,1 - 2,0	0,994	0,030	0,1	0,1

Compostos	Faixa Linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	LOD _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ _m ($\mu\text{g L}^{-1}$)	conclusão
					Razão de íons
Propoxur	0,1 - 2,0	0,999	0,030	0,1	0,8
Quinoxifeno	0,1 - 2,0	0,996	0,030	0,1	0,6
Simazina	0,1 - 2,0	0,993	0,030	0,1	0,7
Tebuconazol	0,1 - 2,0	0,994	0,030	0,1	0,1
Terbutilazina	0,05 - 2,0	0,993	0,015	0,05	0,1
Tetraconazol	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,2
Tiacloprido	0,1 - 2,0	0,993	0,030	0,1	0,1
Tolcofós metílico	0,1 - 2,0	0,992	0,030	0,1	0,6
Triadimefon	0,1 - 2,0	0,997	0,030	0,1	0,5
Triazofós	0,1 - 2,0	0,991	0,030	0,1	0,2
Triclorfom	0,1 - 2,0	0,990	0,030	0,1	0,1
Trifloxistrobina	0,05 - 2,0	0,998	0,015	0,05	0,7
Triflumizol	0,05 - 2,0	0,997	0,015	0,05	0,4

4.4.4 Exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para avaliar a exatidão e a precisão do método, foram realizados ensaios de fortificação em diferentes níveis de concentração. Os níveis avaliados foram 0,05; 0,1; 0,5 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, extraídos pelo método RDSE, com seis repetições ($n = 6$). Os valores de recuperação foram calculados utilizando-se a curva analítica na matriz. Além disso, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%, com $\text{RSD} \leq 20\%$ (SANTE, 2015). Na Tabela 9 estão os resultados de recuperação média ($n = 6$) em percentuais e o desvio padrão relativo (RSD%) para os 62 agrotóxicos determinados por UHPLC-MS/MS. Também, segundo a Tabela 9, pode-se visualizar os resultados obtidos para a precisão intermediária (*interday*) avaliada em dias de análises diferentes nos mesmos níveis de concentração da precisão *intraday*.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que os resultados foram satisfatórios para todos os agrotóxicos em estudos, tendo em vista que as recuperações variaram de 70,1 a 119,9% com $\text{RSD} \leq 20\%$.

Ainda, durante a etapa de extração e determinação por UHPLC-MS/MS utilizaram-se os padrões de controle (atrazina d-5) e interno (TPP), respectivamente, conforme descrito no item 3.4. Ao longo das extrações não foi observada variação maior do que 20% da área do padrão de controle e do padrão interno, demonstrando assim, que a etapa de preparo de amostra foi adequada e o instrumento apresentou estabilidade na resposta obtida. A utilização da atrazina d-5 e do TPP, tem sido abordada em diferentes estudos, apresentando resultados satisfatórios na análise de resíduos de agrotóxicos por sistemas cromatográficos (KEMMERICH *et al.*, 2015b; DONATO *et al.*, 2015).

Tabela 10 - Resultados de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária em diferentes níveis de fortificação.

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	0,05	0,1	0,5	2,0	0,05	0,1	0,5	2,0
	Recuperação \pm RSD (%), Repetibilidade				Recuperação \pm RSD _{pi} (%), Precisão Intermediária			
Atrazina	-	106 \pm 3	90 \pm 7	98 \pm 6	-	79 \pm 12	107 \pm 13	100 \pm 12
Azinfós metílico	-	118 \pm 6	101 \pm 9	99 \pm 10	-	91 \pm 15	110 \pm 4	98 \pm 11
Azoxistrobina	78 \pm 12	119 \pm 8	91 \pm 4	99 \pm 10	80 \pm 8	82 \pm 12	118 \pm 6	99 \pm 10
Bispiribaque-sódico	-	117 \pm 6	78 \pm 9	101 \pm 7	-	108 \pm 8	103 \pm 8	100 \pm 6
Boscalida	100 \pm 5	83 \pm 5	100 \pm 8	100 \pm 9	109 \pm 6	82 \pm 11	109 \pm 8	100 \pm 12
Buprofezina	-	116 \pm 10	96 \pm 17	100 \pm 7	-	74 \pm 7	93 \pm 10	98 \pm 16
Carbaril	-	95 \pm 8	98 \pm 3	98 \pm 11	-	84 \pm 12	113 \pm 7	98 \pm 8
Carbofurano	-	90 \pm 8	95 \pm 17	98 \pm 15	-	72 \pm 6	110 \pm 5	98 \pm 17
Carboxim	-	117 \pm 11	95 \pm 18	100 \pm 17	-	74 \pm 9	105 \pm 7	98 \pm 7
Cianazina	-	71 \pm 2	83 \pm 12	100 \pm 16	-	117 \pm 5	99 \pm 9	101 \pm 15
Clomazona	-	105 \pm 15	99 \pm 15	97 \pm 14	-	83 \pm 15	115 \pm 9	100 \pm 11
Clorimurom etílico	-	111 \pm 6	101 \pm 6	99 \pm 6	-	80 \pm 7	95 \pm 9	98 \pm 8
Clorpirifós etílico	98 \pm 5	110 \pm 9	99 \pm 13	99 \pm 5	82 \pm 5	89 \pm 8	114 \pm 16	97 \pm 18
Clorpirifós metílico	-	94 \pm 2	95 \pm 11	98 \pm 10	-	76 \pm 3	108 \pm 7	97 \pm 17
Deltametrina	-	74 \pm 7	116,3 \pm 6	98 \pm 11	-	93 \pm 20	101 \pm 6	98 \pm 18

continua

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	0,05	0,1	0,5	2,0	0,05	0,1	0,5	2,0
	Recuperação \pm RSD (%), Repetibilidade				Recuperação \pm RSD _{pi} (%), Precisão Intermediária			
Diazinona	113 \pm 3	110 \pm 13	93 \pm 12	100 \pm 4	79 \pm 8	81 \pm 9	101 \pm 9	99 \pm 15
Difenoconazol	83 \pm 11	93 \pm 6	94 \pm 6	97 \pm 6	81 \pm 8	71 \pm 3	111 \pm 7	98 \pm 8
Epoxiconazol	-	119 \pm 3	104 \pm 15	99 \pm 2	-	81 \pm 8	105 \pm 12	98 \pm 10
Fenproprina	72 \pm 2	89 \pm 8	106 \pm 6	98 \pm 10	88 \pm 18	96 \pm 5	87 \pm 4	101 \pm 17
Fenpropimorfe	71 \pm 7	106 \pm 6	106 \pm 9	100 \pm 1	116 \pm 13	106 \pm 4	93 \pm 9	101 \pm 6
Fenarimol	-	106 \pm 9	95 \pm 14	100 \pm 1	-	93 \pm 1	103 \pm 7	99 \pm 3
Fentiona	72 \pm 8	93 \pm 13	96 \pm 9	98 \pm 3	73 \pm 3	70 \pm 10	102 \pm 5	98 \pm 4
Fipronil	-	99 \pm 10	100 \pm 7	98 \pm 9	-	81 \pm 2	105 \pm 3	97 \pm 4
Fluquiconazol	-	96 \pm 7	112 \pm 16	99 \pm 7	-	92 \pm 2	104 \pm 6	100 \pm 3
Flutolanil	103 \pm 9	103 \pm 5	97 \pm 17	100 \pm 7	95 \pm 4	81 \pm 1	98 \pm 3	99 \pm 6
Iprovalicarbe	-	70 \pm 15	110 \pm 4	97 \pm 15	-	111 \pm 1	97 \pm 3	99 \pm 6
Linurom	75 \pm 7	105 \pm 9	98 \pm 16	97 \pm 5	72 \pm 12	83 \pm 1	108 \pm 3	99 \pm 2
Malationa	-	96 \pm 8	103 \pm 6	98 \pm 5	-	78 \pm 2	105 \pm 10	98 \pm 14
Mecarbam	-	76 \pm 11	118 \pm 14	98 \pm 11	-	99 \pm 2	100 \pm 5	99 \pm 14
Mepronil	-	71 \pm 4	111 \pm 13	98 \pm 9	-	84 \pm 7	95 \pm 4	99 \pm 8
Metalaxil	-	111 \pm 7	87 \pm 15	99,4 \pm 6	-	85 \pm 3	108 \pm 6	100 \pm 4
Metconazol	106 \pm 6	101 \pm 15	97 \pm 15	99 \pm 6	102 \pm 5	74 \pm 7	107 \pm 10	98 \pm 13

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	0,05	0,1	0,5	2,0	0,05	0,1	0,5	2,0
	Recuperação \pm RSD (%), Repetibilidade				Recuperação \pm RSD _{pi} (%), Precisão Intermediária			
Metiocarbe sulfona	-	103 \pm 10	84 \pm 10	99 \pm 10	-	73 \pm 9	103 \pm 7	97 \pm 10
Miclobutanil	-	113 \pm 10	96 \pm 10	99 \pm 12	-	96 \pm 16	99 \pm 15	97 \pm 16
Monolinurom	102 \pm 11	105 \pm 7	89 \pm 6	98 \pm 12	79 \pm 5	86 \pm 6	108 \pm 6	99 \pm 5
Paraoxon etílico	-	94 \pm 9	103 \pm 7	98,5 \pm 15	-	72 \pm 8	102 \pm 7	98 \pm 5
Piraclostrobina	99 \pm 7	107 \pm 8	97 \pm 8	100 \pm 7	93 \pm 7	90 \pm 4	113 \pm 5	99 \pm 16
Pirazofós	-	80 \pm 9	95 \pm 15	97,3 \pm 7	-	71 \pm 6	111 \pm 6	98 \pm 6
Piridabem	77 \pm 7	100 \pm 4	102 \pm 9	99 \pm 10	71 \pm 10	76 \pm 8	103 \pm 7	98 \pm 13
Piridafentiona	-	88 \pm 11	106 \pm 13	98,7 \pm	-	71 \pm 20	106 \pm 4	97 \pm 4
Piridato	-	96 \pm 9	105 \pm 17	99 \pm 7	-	95 \pm 4	99 \pm 10	99 \pm 16
Pirimetaniil	-	101 \pm 5	89 \pm 13	98 \pm 12	-	84 \pm 6	101 \pm 10	98 \pm 8
Pirimicarbe	-	116 \pm 9	108 \pm 16	80 \pm 4	-	100 \pm 6	102 \pm 8	100 \pm 6
Pirimifós metílico	-	72 \pm 5	105 \pm 16	96,5 \pm 6	-	83 \pm 1	113 \pm 6	100 \pm 2
Profenofós	85 \pm 3	100 \pm 8	92 \pm 10	98 \pm 8	103 \pm 20	70 \pm 2	113 \pm 8	98 \pm 12
Profoxidim	-	73 \pm 16	98 \pm 19	98 \pm 20	-	95 \pm 7	102 \pm 9	99 \pm 3
Propargito	-	115 \pm 6	99 \pm 13	99 \pm 8	-	75 \pm 4	92 \pm 6	99 \pm 5
Propiconazol	-	103 \pm 4	95 \pm 15	98 \pm 9	-	94 \pm 7	107 \pm 10	97 \pm 4

Compostos	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	0,05	0,1	0,5	2,0	0,05	0,1	0,5	2,0
	Recuperação \pm RSD (%), Repetibilidade				Recuperação \pm RSD _{pi} (%), Precisão Intermediária			
Propizamida	-	73 \pm 12	117 \pm 14	98 \pm 16	-	78 \pm 11	118 \pm 7	99 \pm 3
Propoxur	-	101 \pm 8	105 \pm 11	99 \pm 9	-	90 \pm 17	98 \pm 4	99 \pm 8
Quinoxifeno	-	108 \pm 14	92 \pm 14	98 \pm 6	-	72 \pm 9	111 \pm 18	98 \pm 17
Simazina	79 \pm 15	90 \pm 13	85 \pm 6	98 \pm 8	119 \pm 15	103 \pm 2	100 \pm 8	100 \pm 4
Tebuconazol	-	93 \pm 9	97 \pm 16	97 \pm 7	-	99 \pm 17	91 \pm 7	99 \pm 3
Terbutilazina	70 \pm 5	92 \pm 5	91 \pm 7	97 \pm 6	80 \pm 7	71 \pm 7	106 \pm 5	97 \pm 3
Tetraconazol	72 \pm 5	90 \pm 12	111 \pm 16	99 \pm 9	98 \pm 4	101 \pm 5	109 \pm 6	101 \pm 13
Tiacloprido	-	81 \pm 12	93 \pm 19	97 \pm 13	-	76 \pm 7	99 \pm 7	98 \pm 5
Tolcofós metílico	-	99 \pm 6	97 \pm 18	97 \pm 8	-	82 \pm 3	101 \pm 5	98 \pm 5
Triadimefon	-	87 \pm 11	112 \pm 7	99 \pm 10	-	88 \pm 0	106 \pm 5	97 \pm 6
Triazofós	-	76 \pm 3	96,7 \pm 15	96 \pm 9	-	74 \pm 1	102 \pm 3	97 \pm 4
Triclorfom	-	72 \pm 18	105 \pm 16	98 \pm 18	-	101 \pm 9	94 \pm 8	100 \pm 10
Trifloxistrobina	77 \pm 9	95 \pm 12	99 \pm 15	98 \pm 3	70 \pm 18	78 \pm 8	109 \pm 14	99 \pm 11
Triflumizol	10 \pm 11	94 \pm 6	91 \pm 8	99 \pm 7	114 \pm 18	103 \pm 4	105 \pm 5	101 \pm 11

4.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS REAIS

Depois de otimizado e validado o método RDSE e UHPLC-MS/MS desenvolvido neste trabalho foi aplicado em 11 amostras de água superficial, coletadas em seis diferentes bacias hidrográficas da região central e norte do estado do Rio Grande do Sul em janeiro de 2017. A escolha destes rios para realizar as amostragens e testar a aplicabilidade do método, foi devido aos seus principais usos, que são: a dessedentação animal, abastecimento público, industrial, bem como para a irrigação na agricultura.

A Tabela 11 apresenta os resultados das determinações de resíduos de agrotóxicos em água superficial, extraída por RDSE. Conforme Tabela 11, pode-se observar que apenas em um dos pontos de coletas não foi observada a presença de resíduos de agrotóxicos. No entanto, nos demais pontos, foram encontrados resíduos dos fungicidas azoxistrobina, difenoconazol, propoxur, simazina e tebuconazol, bem como dos herbicidas epoxiconazol, clomazona e atrazina. As concentrações encontradas variaram entre 0,06 e 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando a técnica RDSE para o preparo de amostra. A ocorrência de resíduos de agrotóxicos nas bacias hidrográficas avaliadas pode ser explicada pelo fato da região possuir intensa atividade agrícola, principalmente arroz irrigado, milho e soja, ao entorno desses rios. Após a aplicação, os resíduos de agrotóxicos podem permanecer no ar, no solo ou na água, sendo que o escoamento superficial e/ou a lixiviação aparecem como o principal caminho de transporte do solo para os corpos hídricos (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Para todas as amostras em que resíduos de agrotóxicos foram encontrados, a razão entre os íons (*ion ratio*) de quantificação e identificação foi verificada para a prevenção de resultados falso-positivos. Em todas as amostras que apresentaram resíduos de agrotóxicos em concentrações acima do LOD, esta razão foi menor do que 30%, estando de acordo com o guia de validação de métodos analíticos (SANTE, 2015).

O fato do rio Jacuí (ponto 9) ter apresentado diferentes resíduos de agrotóxicos, pode ter relação direta com a drenagem dos demais rios como, por exemplo, o rio Soturno, o rio Jacuí-Mirim e o rio Vacacaí, que desaguam suas águas para o rio Jacuí, carreando resíduos de agrotóxicos. Outros trabalhos também relataram a presença de agrotóxicos nas mesmas bacias avaliadas neste estudo.

Em 2010, Marchesan e colaboradores, determinaram resíduos dos herbicidas clomazona, quincloraque, propanil, bentazona, 2,4-D e imazetapir e dos inseticidas carbofurano e fipronil nos rios Vacacaí e Vacacaí-Mirim, situados na região Central do Rio Grande do Sul nas safras de 2003/04 a 2007/08 (cultivo de arroz). Nos três primeiros anos de monitoramento os autores relataram a presença dos agrotóxicos clomazona, 2,4-D e propanil com mais frequência nas amostras coletadas, com uma concentração média de 1,0; 0,7 e 0,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Donato e colaboradores (2012b) analisaram duas amostras do rio Jacuí coletadas na cidade de Ernestina-RS, monitorando 81 agrotóxicos e 6 antibióticos. Em ambas as amostras foram detectados os agrotóxicos propoxur (27,2 e 51,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), clomazona (59,7 e 23,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e, buprofezina (17,1 e 104,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), e em uma das amostras foi detectado resíduo de simazina (77,2 $\mu\text{g L}^{-1}$). Cabe destacar que a extração em fase sólida (SPE) foi utilizada no preparo das amostras nos dois trabalhos citados anteriormente. Milhome e colaboradores (2015) também detectaram e quantificaram resíduos de agrotóxicos (atrazina, azoxistrobina, clorpirifós, difenoconazol, parationa metílica, triazofós e propiconazol) em água superficial no estado do Ceará. As concentrações encontradas foram entre 0,39 e 10,14 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Após observar que a amostra do ponto 4, não apresentou nenhum dos resíduos de agrotóxicos em estudo, realizou-se um ensaio de fortificação na mesma, bem como em uma amostra branco (água ultrapura), na concentração de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados de recuperação e RSD pode ser visto na Tabela 12. Conforme pode-se observar na Tabela 12, os ensaios de exatidão e precisão para a amostra de água superficial e “branco” (água ultrapura) apresentaram valores adequados.

Ainda, para comparação do método proposto, as amostras de água superficial foram extraídas por SPE (usando Oasis[®] HLB), conforme método proposto por Donato e colaboradores (2015), e a determinação da concentração foi efetuada utilizando o sistema UHPLC-MS/MS. Através dos resultados obtidos observa-se que ambas as técnicas de extração (RDSE e SPE) apresentaram semelhanças na identificação e quantificação dos analitos encontrados nas amostras reais (Tabela 11). O que demonstra que a técnica RDSE é uma alternativa confiável como método de preparo de amostra. Manzo e colaboradores (2014a) também obtiveram resultados semelhantes quando compararam as duas técnicas de extração.

Tabela 11 - Resultados obtidos em amostras reais de águas superficiais na aplicação do método (RDSE e UHPLC-MS/MS) em comparação com os resultados obtidos pela técnica (SPE e UHPLC-MS/MS).

Compostos		Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)										
		Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11
Atrazina	RDSE	< 0,1 ^a	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,22	n.d	0,35	n.d	< 0,1 ^a
	SPE	< 0,02 ^a	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< 0,02 ^a	0,3	0,3	n.d	n.d
Azoxistrobina	RDSE	< 0,05 ^a	< 0,05 ^a	< 0,05 ^a	n.d	< 0,05 ^a	0,07	0,06	n.d	0,1	n.d	< 0,05 ^a
	SPE	< 0,02 ^a	< 0,02 ^a	0,04	n.d	0,04	0,08	0,04	< 0,02 ^a	< 0,02 ^a	n.d	n.d
Clomazona	RDSE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,25	n.d	n.d
	SPE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,3	n.d	n.d
Difenoconazol	RDSE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< 0,05 ^a	< 0,05 ^a	n.d	n.d
	SPE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< 0,02 ^a	n.d	n.d	n.d
Epoiconazol	RDSE	n.d	0,06	n.d	n.d	n.d	0,1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	SPE	n.d	0,08	n.d	n.d	n.d	0,08	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Propoxur	RDSE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,26	< 0,1 ^a	n.d
	SPE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,40	0,06	n.d
Simazina	RDSE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	< 0,1 ^a	< 0,1 ^a	n.d	n.d
	SPE	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,09	0,1	n.d	n.d
Tebuconazol	RDSE	n.d	0,15	n.d	n.d	n.d	0,33	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
	SPE	n.d	0,16	n.d	n.d	n.d	0,28	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

^a Corresponde ao LOQ do método; n.d: não detectado;

Tabela 12 - Resultados de exatidão (recuperação) e precisão (RSD) utilizando uma amostra real de água superficial e uma amostra branco (água ultrapura), fortificada na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

continua

Compostos	Recuperação±RSD (%)	
	Amostra	Branco fortificado
Atrazina	97±15	99±11
Azinfós metílico	95±2	98±2
Azoxistrobina	116±9	108±2
Bispiribaque-sódico	97±8	87±8
Boscalida	102±4	104±14
Buprofezina	97±10	107±4
Carbaril	107±11	107±8
Carbofurano	96±3	94±2
Carboxim	87±4	88±6
Cianazina	77±11	83±3
Clomazona	85±11	86±17
Clorimurom etílico	115±6	87±8
Clorpirifós etílico	86±12	116±12
Clorpirifós metílico	87±7	74±5
Deltametrina	80±3	104±3
Diazinona	94±19	76±20
Difenoconazol	98±11	75±18
Epoconazol	83±9	81±2
Fenpropatrina	91±14	86±8
Fenpropimorfe	70±14	98±6
Fenarimol	72±8	111±6
Fentiona	72±12	82±8
Fipronil	79±11	81±3
Fluquiconazol	79±15	85±9
Flutolanil	72±16	112±10
Iprovalicarbe	80±5	79±12
Linurom	112±17	99±12
Malationa	84±6	99±6
Mecarbam	111±10	116±7
Mepronil	86±10	92±19
Metalaxil	76±15	73±13
Metconazol	114±14	103±1

Compostos	conclusão	
	Recuperação±RSD (%)	
	Amostra	Branco fortificado
Metiocarbe sulfona	90±3	85±5
Miclobutanil	75±11	80±10
Monolinurom	73±15	107±11
Paraoxon etílico	92±5	94±13
Piraclostrobina	82±14	97±6
Pirazofós	107±10	104±6
Piridabem	73±9	91±7
Piridafentiona	75±8	83±10
Piridato	74±5	103±3
Pirimetanil	76±8	88±11
Pirimicarbe	75±4	112±8
Pirimifós metílico	101±2	104±1
Profenofós	99±4	86±4
Profoxidim	113±14	100±12
Propargito	94±17	76±18
Propiconazol	84±14	95±18
Propizamida	82±14	74±14
Propoxur	116±8	77±1
Quinoxifeno	76±12	81±5
Simazina	73±17	85±11
Tebuconazol	78±13	80±7
Terbutilazina	110±9	102±12
Tetraconazol	70±12	88±8
Tiacloprido	81±12	96±16
Tolcofós metílico	84±6	83±14
Triadimefon	82±18	76±0
Triazofós	90±17	81±6
Triclorfom	96±5	71±11
Trifloxistrobina	90±11	103±9
Triflumizol	74±9	90±1

5 CONCLUSÕES

O método de extração empregando RDSE em amostras de água tem como vantagens a utilização de pouca quantidade de solvente orgânico, requer baixa supervisão do analista, versatilidade para usar diferentes sorventes de extração, resiste a altas velocidades de rotação, apresenta baixo custo e alta razão superfície/volume de sorvente.

Os valores de limite de quantificação do método ficaram entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, destacando-se aqui a alta seletividade e detectabilidade do método, quando realizadas as determinações por UHPLC-MS/MS. As curvas analíticas extraídas apresentaram linearidade entre 0,05 a 2 e 0,1 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, com valores de r^2 maiores que 0,99 para todos os compostos. O método apresentou exatidão e precisão adequada, com recuperações entre 70,1 e 119,9% e com valores de RSD inferiores a 20%, bem como boa robustez quando aplicado, na extração e determinação de resíduos de agrotóxicos em amostras reais de águas superficiais. Foi possível a identificação e quantificação de fungicidas e herbicidas em concentrações que variaram entre 0,06 e 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A técnica RDSE permite o preparo de várias amostras simultaneamente com baixo consumo de sorvente polimérico e de solvente. Além disso, quando comparada com outra técnica (SPE), apresentou resultados semelhantes, demonstrando aplicabilidade equivalente.

Sendo assim, o método proposto mostrou-se adequado para a determinação multirresíduo de agrotóxicos de diferentes classes em amostras de água, uma vez que os objetivos traçados foram alcançados. Ainda, podendo ser usado na rotina de laboratórios de análises de amostras ambientais, visto que todos os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos.

DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

No desenvolvimento das atividades laboratoriais é inevitável a geração de resíduos líquidos e sólidos, os quais precisam ser armazenados, descartados e tratados de forma adequada, para resguardar a integridade do meio ambiente bem como, da saúde da população.

Neste sentido, os resíduos líquidos e sólidos gerados no desenvolvimento deste trabalho foram devidamente separados, identificados e encaminhados para o almoxarifado do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, para posterior tratamento adequado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a aplicação do método desenvolvido no monitoramento da qualidade das águas superficiais, de todo o estado do RS.
- Avaliar a aplicação do método em outras matrizes ou outros tipos de águas como, por exemplo, efluentes, água tratada destinada ao consumo humano, bem como águas subterrâneas.
- Avaliar na etapa de extração o efeito de velocidades de rotação acima de 1600 rpm.
- Incluir diferentes compostos orgânicos no escopo como, por exemplo, fármacos, medicamentos veterinários, etc.
- Aplicar o método para compostos determinados por cromatografia gasosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ABNT NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro, 43 p, 2005.

AHUJA, S. **Comprehensive Water Quality and Purification.** EUA, Ed. Elsevier, 2014.

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC–MS or LC–MS/MS? **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, p. 838– 865, 2006.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil:** controle social e interesses corporativos, São Paulo, 1ª ed, Ed. Annablume, 2002.

ANA (AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS). **Caderno de Recursos Hídricos; 6.** Parte I - Implementação do Enquadramento em Bacias Hidrográficas no Brasil. Brasília, DF, Brasil: ANA, 2009. Disponível em: <http://portalpnqa.ana.gov.br/Publicacao/implementacao_do_enquadramento.pdf> Acesso em 14 jul. 2016.

ANIRUDDHA, B. P.; KUMAR, J. K. Clean Water for Developing Countries. **Annu. Rer. Chem. Biomol. Eng.**, v. 6, p. 217-246, 2015.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução – RE 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 de junho de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 23 mai. 2016.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Classificação e Rotulagem de agrotóxicos, 2005a. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/ghs/curso>>. Acesso em 22 jun 2016.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Guia para Qualidade em Química Analítica.** Brasília, p. 76. 2005.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA), 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monografias>>. Acesso em 15 jun. 2016.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Considerações sobre os estudos de Toxicidade Inalatória (CL₅₀ inalatória) para fins de classificação toxicológica de produtos agrotóxicos.** Nota Técnica nº 02, Brasília, 11 de maio de 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117833/NOTA+T%C3%89CNICA+02-2016+11-05-2016/fa523f6f-9c68-4126-b49f-08d2f5bb382d>>. Acesso em: 22 jun 2016.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**, Brasília, 29 de outubro de 2016. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%252BPARA%252B2011-12%252B-%252B30_10_13_1.pdf/d5e91ef0-4235-4872-b180-99610507d8d5>. Acesso em: 24 jul 2016.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

BERLADIARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Anal. Chem**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. **J. Microcolumn Separations**, v. 11, p. 737-747, 1999.

BAPAYEVA, G.; ISSAYEVA, R.; ZHUMADILOVAC, A.; NURKASIMOVAC, R.; KULBAYEVA S.; TLEUZHAN, R. Organochlorine pesticides and female puberty in South Kazakhstan. **Reproductive Toxicology**, v. 65, p. 67-75, 2016.

BARIZON, R. R. M.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; PRATA, F.; TORNISIELO, V. L. Simulação do transporte e da sorção de imazaquin em colunas de solo. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 30, p. 615-623, 2006.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Inseticidas registrados para a cultura do arroz e análise de parâmetros indicadores de seu comportamento no ambiente. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão (Circular Técnica, 74)**, p. 4, 2005.

BEDOS, C.; CELLIER, P.; CALVET, R.; BARRIUSO, E.; GABRIELLE, B. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: overview. **Agronomie**. v. 22, p. 21-33, 2002.

BECEIRO-GONZÁLEZ, E.; CONCHA-GRAÑA, E.; GUIMARAES, A.; GONÇALVES, C.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; ALPENDURADAA, M. F. Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 165-173, 2007.

BECERRA-HERRERA, M.; HONDA, L.; RICHTER, P. Ultra-high-performance liquid chromatography—Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1423, p. 96-103, 2015.

BERLADI, R. P.; PAWLISZYN, J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. **Water Pollution Research Journal of Canada**, v. 24, p. 179–191, 1989.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, p. 1860–1869, 2013.

BORGES, K. B.; DE FIGUEIREDO, E. C.; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

BORTOLOZO, F. *et al.* Peatland as a natural sink for pesticides from no-till systems in subtropical climate. **Agricultural Water Management**, v. 163, p. 19-27, 2016.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; MARONEZE, A. M.; KURZ, M. H. S.; BACAR, N. M.; ZANELLA, R. Investigation of the occurrence of pesticides residues in rural Wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, v. 30, p. 1872-1876, 2007.

BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em 6 abr. 2016.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Portaria Normativa IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996. Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins, Brasília, Ministério da Agricultura, Departamento de Defesa e Inspeção Vegetal, 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 out. 1996. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/servicosonline/phocadownload/legislacao/portaria_84.pdf>. Acesso em 17 jun 2016.

BRASIL. Lei nº. 9.433 de 8 de janeiro de 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/l9433.htm>. Acesso em 6 mai. 2016.

BRASIL. Decreto nº. 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 jan. 1997. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm#art98>. Acesso em 10 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de dezembro de 2011. 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, 14 de dezembro de 2011a. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em 15 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: MAPA/ACS, 2011b.

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 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 14 mai. 2016.

BRITTO, F. B. *et al.* Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 390-398, 2012.

BROUSMICHE, D. W. *et al.* Functionalization of divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer particles: Ion exchangers for solid phase extraction. **Journal of Chromatography**, v. 1191, p. 108-117, 2008.

BUSZEWSKI, B.; SZULTKA, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Crit. Rev. Anal. Chem**, v. 42, p. 198-213, 2012.

CABRERA, L.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. **Química Nova**, v. 31, p. 1982-1986, 2008.

CAHILL, J. D.; FURLONG, E. T.; BURKHARDT, M. R.; KOLPIN, D.; ANDERSON, L. G. J. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 171-180, 2004.

CALDAS, S, S.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E, G. Herbicides and Environment. In:_____. **Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticides in the South of Brazil**. Rijeka: InTech, Cap. 23, p. 471-492, 2011a.

CALDAS, S. S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**. V. 34, p. 1604-1617, 2011b.

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; ARIAS, J. L. de O.; MARUBE, L. C.; PRIMEL, E. G. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676-688, 2016.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; RUIZ-GARCÍA, J.; VÍLCHEZ, J. L. Screening and Quantification of 65 Organic Pollutants in Drinking Water by Stir Bar Sorptive Extraction-Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 6, p. 854-867, 2013.

CAÑAS, A.; RICHTER, P. Solid-Phase Microextraction Using Octadecyl-Bonded Silica Immobilized on the Surface of a Rotating Disk: Determination of Hexachlorobenzene in Water. **Anal. Chim. Acta**, v. 743, p. 75-79, 2012.

CAÑAS, A.; VALDEBENITO, S.; RICHTER, P. A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma. **Anal Bioanal Chem**, v. 406, p. 2205-2210, 2014.

CARASEK, E.; MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, p. 8-25, 2015.

CEPEA (CENTROS DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA), 2016. Disponível em: < <http://cepea.esalq.usp.br/pib/>>. Acesso em: jun. de 2016.

CERNY, H.S.; AFFOLTER, M.; CERNY, C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 2349-2361, 2003.

CCANCCAPA, A.; MASIÁ, A.; ANDREU, V.; PICÓ, Y. Spatio-temporal patterns of pesticide residues in the Turia and Júcar Rivers (Spain). **Science of the Total Environment**, v. 540, p. 200-210, 2016.

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**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília. v. 4, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2a ed, Campinas, SP: Ed. UNICAMP, 2009.

CORRÊA JUNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Boas Práticas Agrícolas (BPA) de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER. 2013. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/28/bpa-plantas-medicinais-aromaticas-condimentares.pdf>>. Acesso em: jun de 2016.

CORREIA, F.; MERCANTE, F.; FABRÍCIO, A.; CAMPOS, T.; VARGAS J. R. E.; LANGENBACH, T. Adsorção de atrazina em solo tropical sob plantio direto e convencional. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v.17, p. 37-46, 2007.

CORROTEA, Y.; SÁNCHEZ, K.; RUBIO, M. A.; RICHTER, P. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples into A rotating-disk microextractor and the subsequent determination by gas Chromatography-mass spectrometry. *J. Chil. Chem. Soc*, v. 59, p. 2477-2480, 2014.

CORROTEA, Y.; AGUILERA, N.; HONDA, L.; RICHTER, P. Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Letters*, v 49, p. 1344-1358, 2016.

COSTA, E.L.N. *et al.* Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biologica Leopoldensia*, v. 26, p.173-85, 2004.

COSTA, L. L. F.; SANT’ANA, E. S.; SUCHARA, E. A.; BENATO, V. S.; CARASEK, E. Determinação de herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado na região sul do Estado de Santa Catarina através da SPME-GC-ECD. *Química Nova*, v. 31, p. 79-83, 2008.

CROTTI, A. E. M; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*, v. 29, p. 287-292, 2006.

CRUZ-VERA, M.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Liquid phase microextraction in bioanalytical sample preparation. *Bioanalysis*, v. 1, p. 135–149, 2009.

CRUZEIRO, C.; ROCHA, E.; PARDAL, M. Â.; ROCHA, M. J. Environmental assessment of pesticides in the Mondego River Estuary (Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, v. 103, p. 240–246, 2016.

DANIEL, J. M.; FRIESS, D.; RAJAGOPALAN, S.; WENDT, S.; ZENOBI, R. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using soft ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 216, p. 1–27, 2002.

De HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3^a ed. West Sussex. Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2007.

De MELO, R. F.; BRITO, L. T. De LIMA.; PETRERE, V. G.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A. A. Seminário Brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação, editado por Iêdo Bezerra Sá e Pedro Carlos Gama da Silva. Embrapa Semiárido, 2010. **Capítulo 4 – Pesticidas e seus impactos no meio ambiente**, p. 101-136, 2010.

De SOUZA, S. V. C. **Procedimento para Validação Intralaboratorial de Métodos de Ensaio: Delineamento e Aplicabilidade em Análises de Alimentos**. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DEMAJOROVIC, J.; CARUSO, C.; JACOBI, P. R. Cobrança do uso da água e comportamento dos usuários industriais na bacia hidrográfica do Piracicaba, Capivari e Jundiá. **Revista de Administração Pública**, v. 49, p. 1193-1214, 2015.

DICK, D. P.; MARTINAZZO, R.; KNICKER, H.; ALMEIDA, P. S. G. Matéria orgânica em quatro tipos de solos brasileiros: composição química e sorção de atrazina. **Química Nova**, v. 33, p. 14-19, 2010.

DOBSON, R.; SCHEYER, A.; RIZET, A. L.; MIRABEL, O.; MILLET, M. Comparison of the efficiencies of different types of adsorbents at trapping currently used pesticides in the gaseous phase using the technique of high-volume sampling. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 386, p. 1781-1789, 2006.

DONATO, F. F. **Resíduos de Agrotóxicos em Água Potável Usando SPE e Determinação Rápida por LC-MS/MS e GC-MS/MS**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012a.

DONATO, F. F.; KEMMERICH, M.; FACCO, J. F.; FRIGGI, C. A.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of pesticide and antibiotic residues at trace levels in water samples by SPE and LC-MS/MS. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 331-340, 2012b.

DONATO, F. F.; MARTINS, M. L.; MUNARETTO, J. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 26, p. 2077-2087, 2015.

DUJACOVIĆ, N., *et al.* Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 678, p. 63-72, 2010.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. **Mass Spectrometry: Instrumentation, interpretation and applications**. 3 ed. Ed. Jhon Wiley & Sons, 2009.

FARAJZADEH, M. A. *et al.* Dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of three organophosphorus pesticides in real samples by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection and its optimization by experimental design. **Microchimica Acta**, v. 172, p. 465-470, 2011.

FERMAM, R. K. S; ANTUNES, A. M. S. Uso de defensivos agrícolas, limites máximos de resíduos e impacto no comércio internacional: estudo de caso. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 7, p. 197-214, 2009.

FILHO, A. M.; DOS SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of diferente chemical group in surface and groundwater samples. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 139-145, 2010.

FISCAL-LADINO, J. A.; OBANDO-CEBALLOS, M.; ROSERO-MOREANO, M.; MONTAÑO, D. F.; CARDONA, W.; GIRALDO, L. F.; RICHTER, P. Ionic liquids intercalated in montmorillonite as the sorptive phase for the extraction of low-polarity organic compounds from water by rotating-disk sorptive extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 953, p. 23-31, 2017.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 497-526, 2005.

GHASEMI, E.; SILLANPÄÄ, M. Optimization of headspace solid phase microextraction based on nano-structured ZnO combined with gas chromatography–mass spectrometry for preconcentration and determination of ultra-traces of chlorobenzenes in environmental samples. **Talanta**, v. 130, p. 322–327, 2014.

GIORDANO, A.; FÉRNANDEZ-FRANZÓN, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G.; PICÓ, Y. Pesticide residue determination in surface Waters by stir bar sorptive extration and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 393, p. 1733-1743, 2009.

GIORDANO, A.; RICHTER, P.; AHUMADA, I. Determination of Pesticides in River Water Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Talanta**, v. 85, p. 2425-2429, 2011.

GIORI, F. G., *et al.* Sugarcane straw management and soil attributes on alachlor and diuron sorption in highly weathered tropical soils, part B. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 49, p. 352-360, 2014.

GLIESSMAN, S. R; ROSEMEYER, M. **The conversion to sustainable agriculture: principles, processes and practices**. Boca Raton, Ed. CRC Press, 2010.

GOMES, M. A. F.; CERDEIRA, A. L.; SPADOTTO, C. A. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. 2013. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/html. Acesso em: jun de 2016.

GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; ZAMPIERI, D.; GENNARO, M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3929-3937, 2010.

GRAY, L. E.; OSTBY, J.; FURR, J.; WOLF, C. J.; LAMBRIGHT, C.; PARKS, L.; *et al.* Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Hum. Reprod.**, v. 7, p. 248–264, 2016.

GRIZA, F. T.; ORTIZ, K. S.; GEREMIAS, D.; THIESEN, F. V.; Avaliação da contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rodinha – Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 31, p. 1631-1635, 2008.

HIEMSTRA, M.; KOK, A. Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 3-25, 2007.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER), 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. Disponível em: < [http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(15\)70134-8.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(15)70134-8.pdf)>. Acesso em: jun de 2016.

ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE). Disponível em: <<http://www.ich.org/>>. Acesso em: jun de 2016.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: DOQ-CGCRE-008 rev 04**. Rio de Janeiro. 20 p. 2011.

IUPAC (INTERNETIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY). Compendium of Chemical Terminology. 2012. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acesso em: jul de 2016.

JACHERO, L.; SEPÚLVEDA, B.; AHUMADA, I.; FUENTES, E.; RICHTER, P. Rotating Disk Sorptive Extraction of Triclosan and Methyl-Triclosan from Water Samples. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, p. 7711–7716, 2013.

JEMAL, M.; SCHUSTER, A.; WHIGAN, D. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.17, p.1723–1734, 2003.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fase sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.

KAH, M.; BROWN, C. D. Changes in pesticide adsorption with time at high soil to solution ratios. **Chemosphere**, v. 68, p. 1335-1343, 2007.

KEMMERICH, M.; RIZZETTI, T. M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization by central composite design of a modified QuEChERS method for extraction of pesticide Multiresidue in sweet pepper and analysis by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, p. 728-739, 2015a.

KEMMERICH, M.; BERNARDI, G.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; PRESTES, O. A simple and efficient method for imidazolinone herbicides determination in soil by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1412, p. 82-89, 2015b.

KIM, S.I. *et al.* Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p. 293-303, 2003.

KÖHNE, J. M.; KÖHNE, S.; ŠIMUNEK, J. A review of model applications for structured soils: b) Pesticides transport. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 104, p. 36-60, 2009.

KOSIKOWSKA, M.; BIZIUK, M. Review of the determination of pesticides residues in ambient air. **Trend in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 1064-1072, 2010.

KREMSER, A.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. PAL SPME Arrow-evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 408, p. 943-952, 2016.

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

LAAKS, J.; JOCHMANN, M. A.; SCHMIDT, T. C. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 565–571, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos, Ed. RiMa, 4^a Ed, 2004.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 35-61, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 27-46, 2013.

LIMA, R. N. DE SOUZA.; RIBEIRO, C. B. DE MELO.; BARBOSA C. C. F.; FILHO O. C. R. Estudo da poluição pontual e difusa na bacia de contribuição do reservatório da usina hidrelétrica de funil utilizando modelagem espacialmente distribuída em sistema de informação geográfica. **Eng. Sanit. Ambiental**, v. 21, p. 139-150, 2016.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1° ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190 p, 2011.

LUCENA, R. Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. **Anal Bioanal Chem**, v. 403, p. 2213–2223, 2012.

LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7, p. 157-182, 2015.

MACKAY, D.; SHIU, W. Y.; MA, K. C.; LEE, S. C. **Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals**. Boca Raton, Ed. CRC Press. 2^a Ed, 2006.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 197-207, 2012.

MANZO, V.; HONDA, L.; NAVARRO, O.; ASCAR, L.; RICHTER, P. Microextraction of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs from Waste Water Samples by Rotating-Disk Sorptive Extraction. **Talanta**, v. 128, p. 486–492, 2014a.

MANZO, V.; MIRÓ, M.; RICHTER, P. Programmable Flow-Based Dynamic Sorptive Microextraction Exploiting an Octadecyl Chemically Modified Rotating Disk Extraction System for the Determination of Acidic Drugs in Urine. **J. Chromatogr. A**, v. 1368, p. 64–69, 2014b.

MANZO, V.; ULISSE, K.; RODRÍGUEZ, I.; PEREIRA, E.; RICHTER, PABLO. A molecularly imprinted polymer as the sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device for the determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater. **Analytica Chimica Acta**, v. 889, p. 130-137, 2015.

MARCHESAN, E. *et al.*, Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central de Estado do Rio grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1053-1059, 2010.

MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. Introduction. **Toxicology**, v. 143, p. 5-118, 2000.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, p. 1248-1255, 2013.

MARTINS, M. L.; RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; SAIBT, N.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Dilution standard addition calibration: a practical calibration Strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84-91, 2016.

MASIÁ, A.; CAMPO, J.; VÁZQUEZ-ROIG, P.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 263, p. 95–104, 2013.

MASIÁ, A. et al. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. **Journal of Chromatography A**, v. 1378, p. 19-31, 2015.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica, Rio de Janeiro: **Embrapa Agrobiologia**, 58p, 2005.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase sólida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 249-262, 2013a.

MERIB, J.; SIMÃO, V.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. Simultaneous determination of trihalomethanes and organochlorine pesticides in water samples by direct immersion-headspace-solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1321, p. 30-37, 2013b.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, P. L. R.; LIMA, F. A. F.; NACIMENTO, R. F. Influence The USE of Pesticides in The Quality of Surface and Groundwater Located IN Irrigated Areas of Jaguaribe, Ceara, Brazil. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, p. 255-262, 2015

MINGUELA, J. V.; CUNHA, J. P. A. R. **Manual de aplicação de produtos fitossanitários**. Viçosa, Ed. Aprenda Fácil, 2011.

MOHAMED, A.-M. I.; ABDEL-WADOOD, H. M.; MOUSA, H. S. Simultaneous determination of dorzolomide and timolol in aqueous humor: A novel salting out liquid–liquid microextraction combined with HPLC. **Talanta**, v. 130, p. 495–505, 2014.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D.; JARDIM, W. F.; JARDIM, I. C. S. F.; UMBUZEIRO, G. A. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). **Analytical Methods**, v. 6, p. 6668–6677, 2014.

MULTIGNER, J. L. Effets retardés des pesticides sur la santé humaine. **Environnement, Risques & Santé**, v. 4, p. 187–194, 2005.

NAKAMURA, E. **Avaliação das Concentrações de Pesticidas Organoclorados em Águas Superficiais pela Otimização da Técnica USAEME**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2015.

NETO, M. L. F.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 69-78, 2009.

NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4^a ed., Bookman, cap. 26, 2010.

NEY, R. E. **Fate and Transport of Organic Chemicals in the Environment: A Practical Guide**. Rockville, Ed. Government Institutes, 2^a ed, 1995.

NAVALÓN, A.; PRIETRO, A.; ARAUJO, L.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, **J. Chromatogr. A**. v. 975, p. 355-360, 2002.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente In: OLIVEIRA J. R.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Curitiba-PR: Omnipax, p. 263-304, 2011.

ORSO, D.; FLORIANO, L.; RIBEIRO, L. C.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, p. 1638-1653, 2015.

OSHITA, D.; JARDIM, I. C. S. F. Comparação de métodos por cromatografia líquida na determinação de multirresíduos de agrotóxicos em morangos. **Química Nova**, v. 38, p. 1273-1281, 2015.

OUYANG, F.; PERRY, M. J.; VENNERS, S. A.; CHEN, C.; WANG, B.; YANG, F. *et al.* Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. **Occup. Environ. Med**, v. 62, p. 878-884, 2005.

OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. DE F.; VICENTE, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 9-18, 2003.

PAÍGA, P.; LOLIĆ, A.; HELLEBUYCK, F.; SANTOSA, L. H. M. L. M.; CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C. Development of a SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 97, p. 61-70, 2015.

PATHAK, R.; SUKE, S. G.; AHMED, T.; AHMED, R. S.; TRIPATHI, A. K.; GULERIA, K.; *et al.* Organochlorine pesticide residue levels and oxidative stress in preterm delivery cases. **Hum. Exp. Toxicol**, v. 29, p. 351-358, 2010.

PEREIRA, V. J. *et al.* Physical-Chemical Properties of Pesticides: Concepts, Applications, and Interactions with the Environment. **Bioscience Journal**, v 32, p. 627-641, 2016.

PEREIRA-JUNIOR, E. V., *et al.* Effects of soil attributes and straw accumulation on the sorption of hexazinone e tebuthiuron in tropical soils cultivated with sugarcane, part b. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 50, p. 238-246, 2015.

PICÓ, Y.; FERNÁNDEZ, M.; RUIZ, M. J.; FONT, G. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, p. 117-131, 2007.

PINHEIRO, A.; MORAES, J. C. S.; SILVA, M. R. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantação de cebolas em Ituporanga, SC. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 533-538, 2011.

PLIMMER, J. R. **Handbook of Pesticide Toxicology**. New York, vol. 1, Ed. JRP Consultants, p. 95-107, 2001.

PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 19-38, 2015.

PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; POPPI, N.; Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por *headspace* com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, p. 1260-1264, 2011.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Validação de método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando QuEChERS e UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v.35, p. 185-192, 2012.

RAPOSO JÚNIOR, J. L.; RÉ-POPPI, N. Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, v. 72, p. 1833-1841, 2007.

RAYNIE, D. E. Modern Extraction Techniques. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4911-4916, 2010.

REICHENBERGER, S.; BACH, M.; SKITSCHAK, A.; FREDE, H. G. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; a review. **Science of the Total Environment**, v. 384, p. 1–35, 2007.

REN, A.; QIU, X.; JIN, L.; MA, J.; LI, Z.; ZHANG, L. Association of selected persistent organic pollutants in the placenta with the risk of neural tube defects. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v. 108, p. 12770-12775, 2011.

RICHTER, P.; LEIVA, C.; CHOQUE, C.; GIORDANO, A.; SEPÚLVEDA, B. Rotating disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 8598–8602, 2009.

RIZZETTI, T. M.; KEMMERICH, M.; MARTINS, M. L.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticides multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25-33, 2016.

ROCHA, P. R. R.; FARIA, A. T.; SILVA, G. S.; QUEIROZ, M. A. L. R.; GUIMARÃES, F. F. N.; TIRONI, S. P.; GALON, L.; SILVA, A. A. Meia vida do diuron em solos com diferentes atributos físicos e químicos. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1961-1966, 2013.

RODRIGUES, E. T.; LOPES, I.; PARDAL, M. Â. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. **Environment International**, v. 53, p. 18-28, 2013.

CHIRON, S.; RODRIGUEZ, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. Application of gas and liquid chromatography-mass spectrometry to the evaluation of pirimiphos-methyl degradation products in industrial water under ozone treatment. **J. Chromatogr. A**, v. 823, p. 97-107, 1998.

ROOSTA, M.; GHAEDI, M.; DANESHFAR, A. Optimisation of ultrasound-assisted reverse micelles dispersive liquid-liquid micro-extraction by Box-Behnken design for determination of acetoin in butter followed by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 161, p. 120-126, 2014.

ROZET, E. *et al.* Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, vol. 1158, p. 111-125, 2007.

SANCHES, S. M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados a contaminação da água. **Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.53-58, 2003.

SANCHEZ-ORTEGA, A.; SAMPEDRO, M. C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using online diode array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. **Journal of Chromatography**, v. 1094, p. 70-76, 2005.

SANCHEZ-ORTEGA, A.; UNCETA, N.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; SAMPEDRO, M. C.; AKESOLO, U.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 641, p. 110-116, 2009.

SANTE, EUROPEAN COMMISSION. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. **Document n° SANTE/11945/2015**, 30 de novembro 2015.

SCHUMMER, C.; MOTHIRON, E.; APPENZELLER, B. M. R.; RIZET, A.; WENNIG, R.; MILLET, M. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 576-584, 2010.

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE - RS. Portaria SES RS nº 320, de 28 de abril de 2014. Estabelece parâmetros adicionais de agrotóxicos ao padrão de potabilidade para substâncias químicas, no controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano no RS. **Diário Oficial [do] Estado do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 24 abr. 2014. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1429882586_Portaria%20320-2014.pdf>. Acesso em 27 mai. 2016.

SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. Development of a stir-bar-sorptive extraction–liquid desorption–large-volume injection capillary gas chromatographic–mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 382, p. 1141-1151, 2005.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; Agrotóxicos Aspectos Gerais: Agrotóxicos e Ambiente, **Embrapa**: Brasília, 2004.

SILVA, E.; DAAM, M. A.; CEREJEIRA, M. J. Aquatic risk assessment of priority and other river basin specific pesticides in surface waters of Mediterranean river basins. **Chemosphere**, v. 135, p. 394–402, 2015.

SILVA FILHO, C. F.; EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Solid-phase microextraction for determination of anilino-pyrimidine, dimethylcarbamate and thiadiazine pesticides in irrigation project surface water. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, p. 1371-1378, 2011.

SINDIVEG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola), 2015. **Balanco 2015 – Setor de Agroquímicos**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/balanco-2015-setor-de-agroquimicos-confirma-queda-de-vendas/>>. Acesso em 10 jul 2016.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICA), 2016. Disponível em: <http://sinitox.iciet.fiocruz.br/sites/sinitox.iciet.fiocruz.br/files//Tabela10_2013.pdf>. Acesso em 10 abr. 2016.

SOUSA, A. S.; DUAVÍ, W. C.; CAVALCANTE, R. M.; MILHOME, M. A. L.; DO NASCIMENTO, R. F. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.96, p. 90–95, 2016.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de agrotóxicos, **Embrapa Meio Ambiente**, 2014. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html>. Acesso em 10 jul 2016.

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHOS, P. C. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 2-17, 2014.

TAMAYO, F.; TURIÉL, E.; MARTÍN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. **J. Chromatogr. A**, v. 1152, p. 32-40, 2007.

TANKIEWICZ, M. *et al.* Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. **Trends in Analytical Chemistry**, V, 29, p. 1050-63, 2010.

TANKIEWICZ, M.; MORRISON, C.; BIZIUK, M. Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI-SPME coupled with GC-MS. **Talanta**, v. 107, p. 1-10, 2013.

TETTE, P. A. S., et al. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**. v. 149, p. 124-141, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.** v. 74, p. 835-843, 2002.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, p. 829-833, 2006.

TSAI, D.-Y.; CHEN, C.-L.; DING, W.-H. Optimization of matrix solid-phase dispersion for the rapid determination of salicylate and benzophenone-type UV absorbing substances in marketed fish. **Food Chemistry**, v. 154, p. 211–216, 2014.

VEGA, A. B.; GARRIDO, F. A.; MARTINEZ, V. J. L.; Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, v. 538, p. 117-127, 2005.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227–236, 2001.

WHO – **World Health Organization**. Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/pesticides/en/>>. Acesso em 10 mai. 2016.

XIAO, Z.; HE, M.; CHEN, B.; HU, BIN. Polydimethylsiloxane/metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-flame photometric detection for the determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. **Talanta**, v. 156, p. 126-133, 2016.

YANG, C.; WANG, J.; LI, D. Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 799, p. 8-22, 2013.

YU, Y.; LI, Y.; SHEN, Z.; YANG, Z.; MOB, L.; KONG, Y.; LOU, I. Occurrence and possible sources of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) along the Chao River, China. **Chemosphere**, v. 114, p. 136–143, 2014.

ZANELLA, R. *et al.* Herbicides Persistence in Rice Paddy Water in Southern Brazil, editado por Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen. InTech Desing Team 2011. **Chapter 10 – Herbicides Persistence in Rice Paddy Water in Southern Brazil**, p. 183-204, 2011.

ZANELLA, R. *et al.* High Performance Liquid Chromatography in Pesticide Residue Analysis, editado por Tomasz Tuzimski e Joseph Sherma. CRC Press Taylor & Francis Group 2015. **Chapter 13 – Quantitative Analysis and Method Validation**, p. 303-324, 2015.

ZHANG, H. -F.; SHI, Y. -P. Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei samples. **Talanta**, v. 82, p. 1010-1016, 2010.

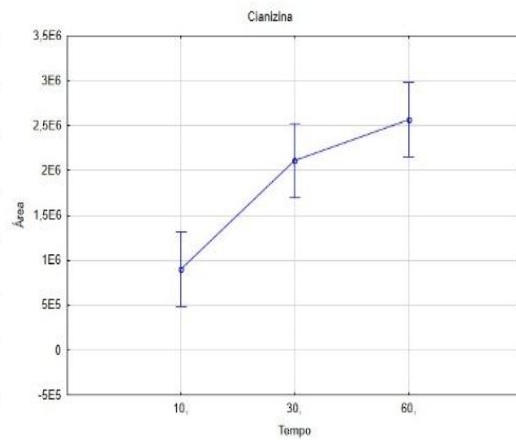
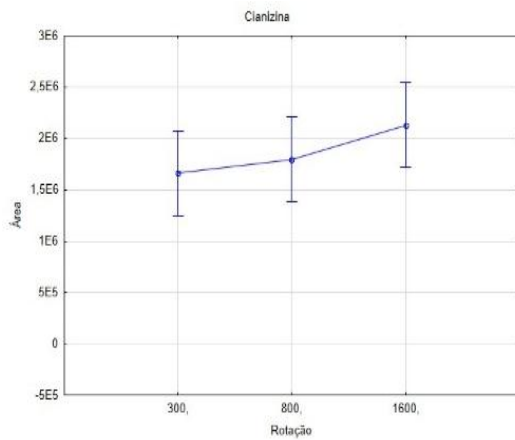
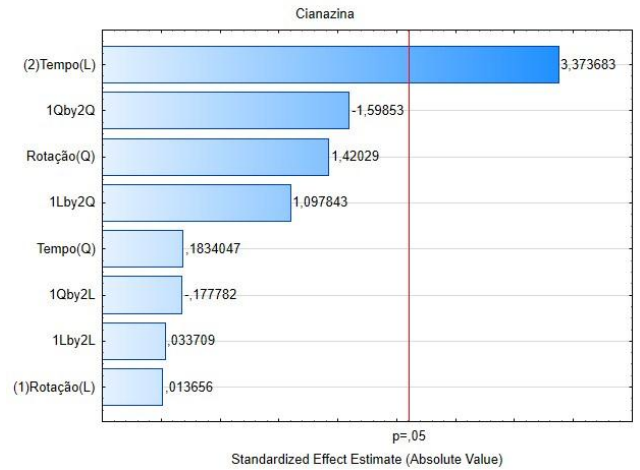
ZHI, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, L. The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in water from Poyang Lake, the largest freshwater lake in China. **Chemosphere**, v. 119, p. 1134–1140, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A - Resultados de ANOVA, diagrama de pareto e médias marginais dos agrotóxicos cianizina, iprovalicarbe, monolinurom, tebuconazol, tiacloprido e triclorfom na otimização da etapa de dessorção.

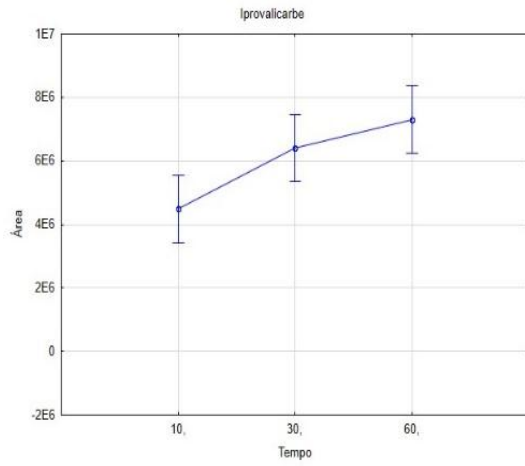
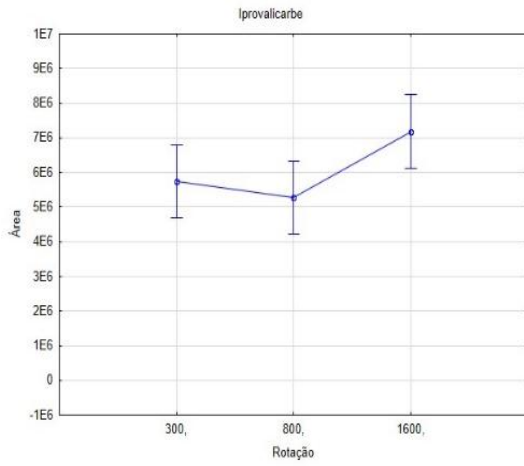
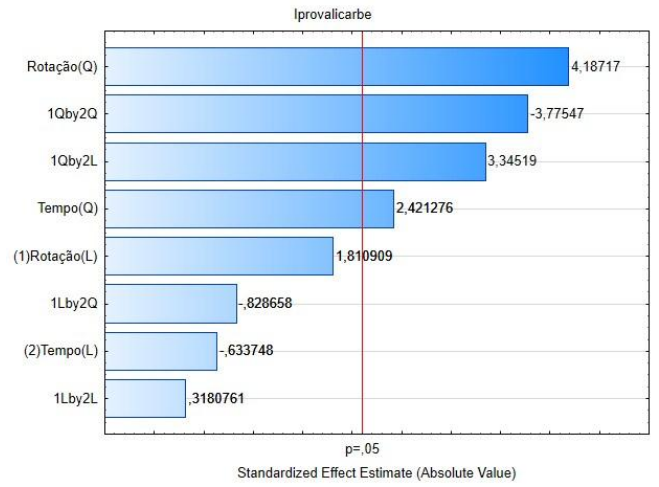
Cianazina

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	6.5E+07	1	6.5E+07	0.000	0.989
Rotação (Q)	7.1E+11	1	7.1E+11	2.017	0.173
(2) Tempo (L)	4.0E+12	1	4.0E+12	11.382	0.003
Tempo (Q)	1.2E+10	1	1.2E+10	0.034	0.857
1L by 2L	4.0E+08	1	4.0E+08	0.001	0.973
1L by 2Q	4.2E+11	1	4.2E+11	1.205	0.287
1Q by 2L	1.1E+10	1	1.1E+10	0.032	0.861
1Q by 2Q	9.0E+11	1	9.0E+11	2.555	0.127
Pure Error	6.3E+12	18	3.5E+11		
Total SS	2.2E+13	26			



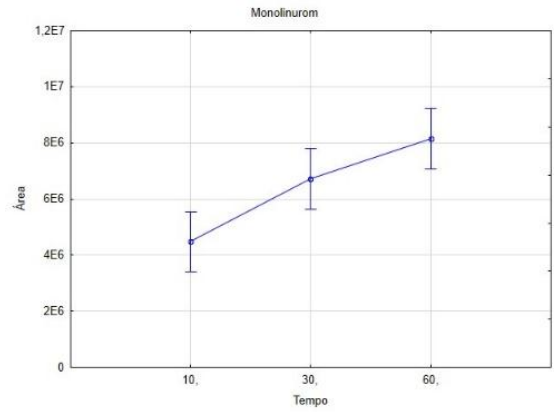
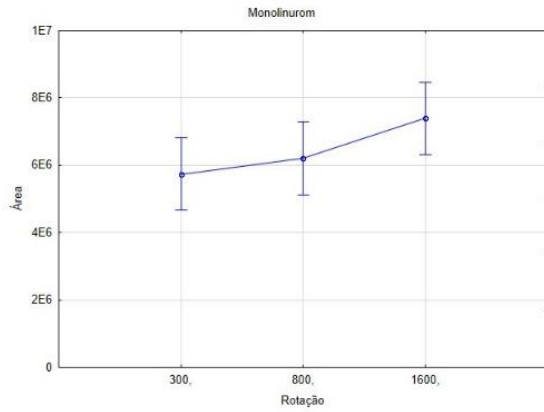
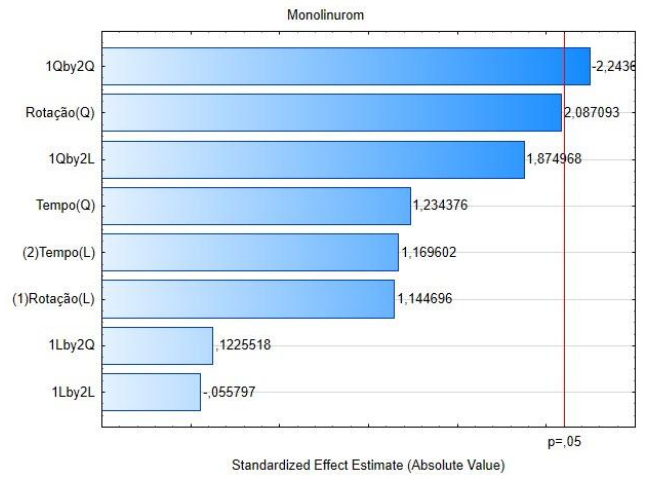
Iprovalicarbe

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	7.5E+12	1	7.5E+12	3.279	0.087
Rotação (Q)	4.0E+13	1	4.0E+13	17.532	0.001
(2) Tempo (L)	9.2E+11	1	9.2E+11	0.402	0.534
Tempo (Q)	1.3E+13	1	1.3E+13	5.863	0.026
1L by 2L	2.3E+11	1	2.3E+11	0.101	0.754
1L by 2Q	1.6E+12	1	1.6E+12	0.687	0.418
1Q by 2L	2.6E+13	1	2.6E+13	11.190	0.004
1Q by 2Q	3.3E+13	1	3.3E+13	14.254	0.001
Pure Error	4.1E+13	18	2.3E+12		
Total SS	1.5E+14	26			



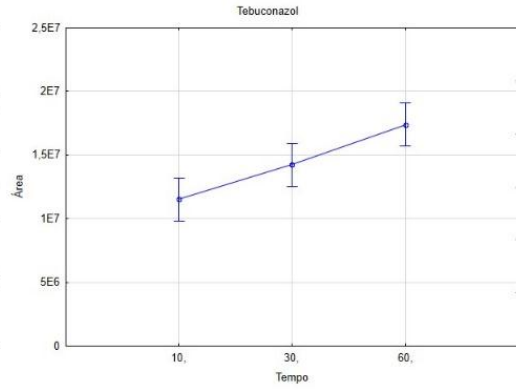
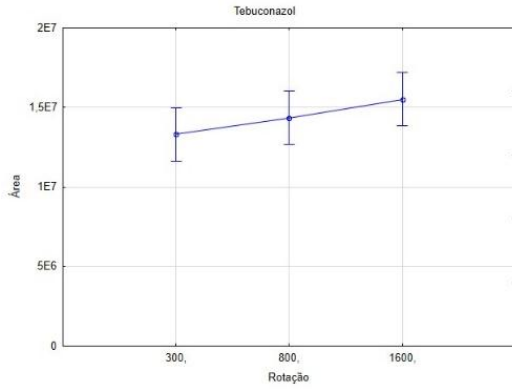
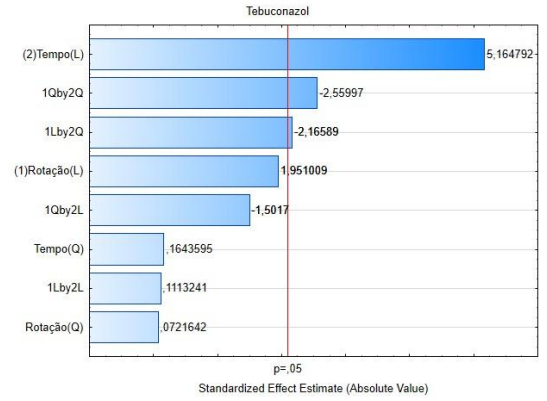
Monolinurom

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	3.1E+12	1	3.1E+12	1.310	0.267
Rotação (Q)	1.0E+13	1	1.0E+13	4.356	0.051
(2) Tempo (L)	3.2E+12	1	3.2E+12	1.368	0.257
Tempo (Q)	3.6E+12	1	3.6E+12	1.524	0.233
1L by 2L	7.4E+09	1	7.4E+09	0.003	0.956
1L by 2Q	3.6E+10	1	3.6E+10	0.015	0.904
1Q by 2L	8.3E+12	1	8.3E+12	3.516	0.077
1Q by 2Q	1.2E+13	1	1.2E+13	5.034	0.038
Pure Error	4.3E+13	18	2.4E+12		
Total SS	1.4E+14	26			



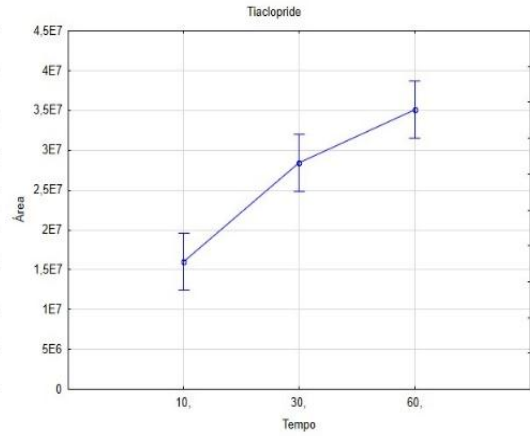
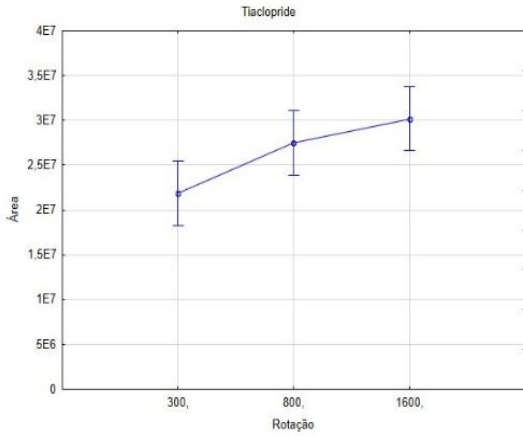
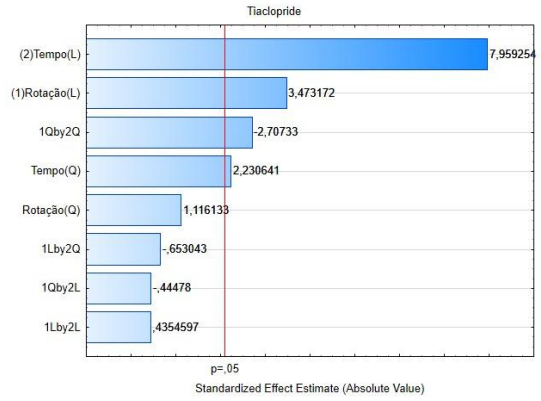
Tebuconazol

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	2.2E+13	1	2.2E+13	3.806	0.067
Rotação (Q)	3.0E+10	1	3.0E+10	0.005	0.943
(2) Tempo (L)	1.5E+14	1	1.5E+14	26.675	0.000
Tempo (Q)	1.6E+11	1	1.6E+11	0.027	0.871
1L by 2L	7.2E+10	1	7.2E+10	0.012	0.913
1L by 2Q	2.7E+13	1	2.7E+13	4.691	0.044
1Q by 2L	1.3E+13	1	1.3E+13	2.255	0.151
1Q by 2Q	3.8E+13	1	3.8E+13	6.553	0.020
Pure Error	1.0E+14	18	5.8E+12		
Total SS	3.5E+14	26			



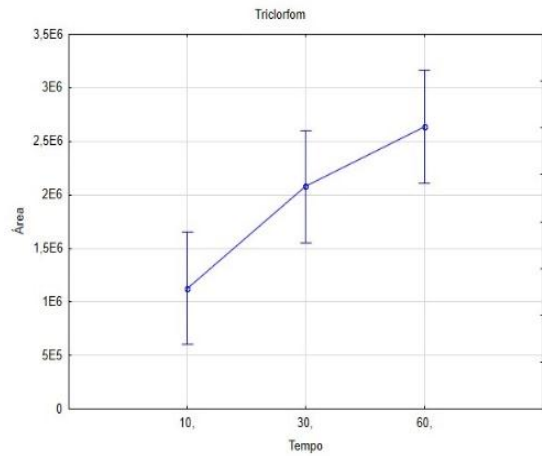
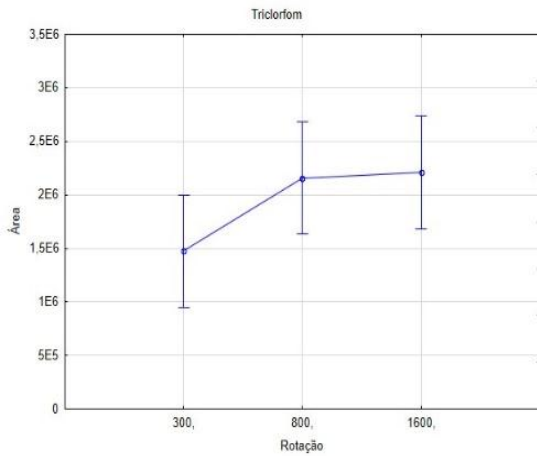
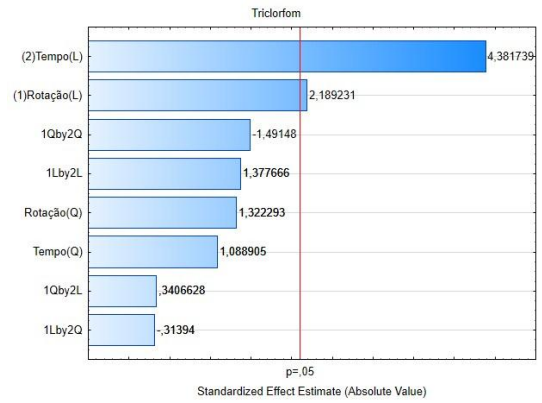
Ticloprido

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	3.1E+14	1	3.1E+14	12.063	0.003
Rotação (Q)	3.3E+13	1	3.3E+13	1.246	0.279
(2) Tempo (L)	1.7E+15	1	1.7E+15	63.350	0.000
Tempo (Q)	1.3E+14	1	1.3E+14	4.976	0.039
1L by 2L	5.0E+12	1	5.0E+12	0.190	0.668
1L by 2Q	1.1E+13	1	1.1E+13	0.426	0.522
1Q by 2L	5.2E+12	1	5.2E+12	0.198	0.662
1Q by 2Q	1.9E+14	1	1.9E+14	7.330	0.014
Pure Error	4.7E+14	18	2.6E+13		
Total SS	2.7E+15	26			



Triclorfom

	SS	df	MS	F	p
(1) Rotação (L)	2.7E+12	1	2.7E+12	4.793	0.042
Rotação (Q)	9.9E+11	1	9.9E+11	1.748	0.203
(2) Tempo (L)	1.1E+13	1	1.1E+13	19.200	0.000
Tempo (Q)	6.7E+11	1	6.7E+11	1.186	0.291
1L by 2L	1.1E+12	1	1.1E+12	1.898	0.185
1L by 2Q	5.6E+10	1	5.6E+10	0.099	0.757
1Q by 2L	6.5E+10	1	6.5E+10	0.116	0.737
1Q by 2Q	1.3E+12	1	1.3E+12	2.225	0.153
Pure Error	1.0E+13	18	5.6E+11		
Total SS	2.6E+13	26			



Apêndice B – Resultados do teste t de *student* para as condições experimentais de diferentes pHs das amostras (2,0; 3,0; 4,0 e sem ajuste de pH), utilizado na etapa de extração.

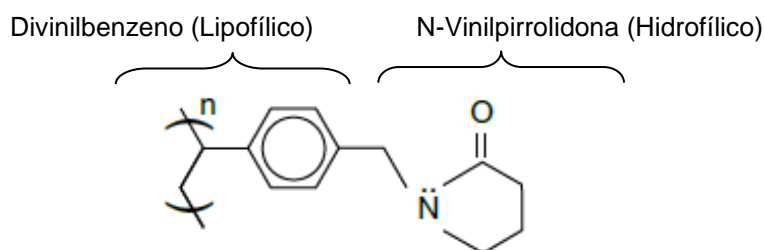
Compostos	continua					
	pH 2,0 x pH 3,0	pH 2,0 x pH 4,0	pH 2,0 x sem ajuste	pH 3,0 x pH 4,0	pH 3,0 x sem ajuste	pH 4,0 x sem ajuste
Atrazina	0,6363	0,1644	0,1485	0,0825	0,1398	0,4072
Azinfós metílico	0,4144	0,8108	0,0615	0,4919	0,1829	0,0616
Azoxistrobina	0,3198	0,2185	0,0315	0,6987	0,0539	0,0655
Bispiribaque sódico	0,0726	0,0290	0,0149	0,2960	0,0458	0,0196
Boscalida	0,8319	0,5207	0,0650	0,6944	0,0733	0,0537
Buprofezina	0,1270	0,1688	0,0072	0,1246	0,0069	0,0132
Carbaril	0,6001	0,2772	0,3475	0,8399	0,4770	0,4900
Carbofurano	0,0291	0,0077	0,1625	0,7996	0,8167	0,7456
Carboxim	0,1250	0,7421	0,1337	0,0966	0,0401	0,1674
Cianazina	0,0766	0,0490	0,0081	0,1347	0,0059	0,0340
Clorpirifós etílico	0,0148	0,0432	0,0030	0,8533	0,0886	0,1474
Clorpirifós metílico	0,3443	0,0554	0,0583	0,0158	0,0009	0,4179
Clomazona	0,3946	0,0723	0,2006	0,3584	0,4956	0,9940
Clorimurom etílico	0,6996	0,0881	0,0029	0,1237	0,0159	0,0483
Deltametrina	0,0025	0,0020	0,0030	0,0374	0,0107	0,0024
Diazinona	0,8700	0,2700	0,1734	0,1544	0,1222	0,2769
Difenoconazol	0,1423	0,7784	0,1405	0,4136	0,2425	0,1860
Epoxiconazol	0,1443	0,1293	0,1825	0,8620	0,7657	0,6629
Fenpropatrina	0,1582	0,3170	0,0355	0,7492	0,1696	0,2022
Fenpropimorfe	0,1908	0,0975	0,1310	0,9530	0,0910	0,0813
Fenarimol	0,0168	0,0715	0,1905	0,1057	0,9229	0,5227
Fentiona	0,3600	0,1605	0,2544	0,1133	0,3883	0,3067
Fipronil	0,0514	0,3477	0,1695	0,2607	0,7657	0,3693
Fluquiconazol	0,3555	0,0904	0,1517	0,0143	0,1780	0,9377
Flutolanil	0,5406	0,3494	0,2144	0,7050	0,3134	0,3935
Iprovalicarbe	0,0312	0,0827	0,1555	0,4078	0,7973	0,5379
Linurom	0,3308	0,2682	0,1421	0,5763	0,2827	0,5632
Malationa	0,7522	0,5110	0,1419	0,1571	0,0576	0,0449
Mecarbam	0,0015	0,0022	0,0020	0,0353	0,0154	0,1079
Mepronil	0,0848	0,1138	0,1365	0,2040	0,5668	0,3672
Metalaxil	0,0086	0,0087	0,2100	0,4289	0,6309	0,6905
Metconazol	0,1281	0,2019	0,1129	0,8192	0,2609	0,3784
Metiocarbe sulfona	0,0352	0,0260	0,0187	0,1521	0,0259	0,0919
Miclobutanil	0,0717	0,0226	0,5966	0,0508	0,8395	0,5262
Monolinurom	0,3408	0,1238	0,1363	0,2061	0,2071	0,3607
Paraoxon etílico	0,2891	0,1676	0,2792	0,1897	0,3584	0,4293
Piraclostrobina	0,0716	0,1213	0,0854	0,1397	0,9431	0,1998
Pirazofós	0,0676	0,1033	0,0637	0,3027	0,2523	0,1310
Piridabem	0,0346	0,0289	0,0032	0,8506	0,2366	0,2853

conclusão

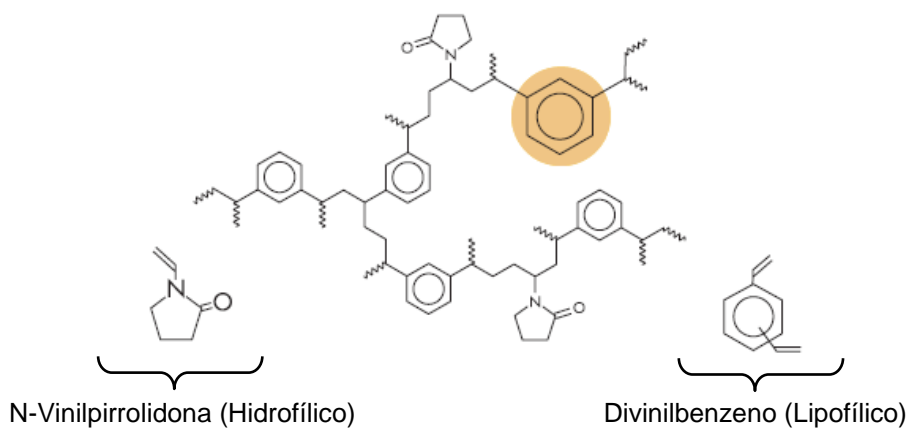
Compostos	pH 2,0 x pH 3,0	pH 2,0 x pH 4,0	pH 2,0 x sem ajuste	pH 3,0 x pH 4,0	pH 3,0 x sem ajuste	pH 4,0 x sem ajuste
Piridafentona	0,1509	0,2088	0,2882	0,5626	0,7118	0,6040
Piridato	0,0230	0,0126	0,0101	0,0049	0,0012	0,0289
Pirimetanil	0,2498	0,0317	0,0741	0,1726	0,1122	0,1731
Pirimicarbe	0,4343	0,3586	0,7619	0,6287	0,4343	0,3904
Pirimifós metílico	0,1884	0,0600	0,0100	0,0718	0,0073	0,0166
Profenofós	0,7273	0,1985	0,1058	0,3478	0,1487	0,2472
Profoxidim	0,0875	0,3587	0,4489	0,0256	0,0276	0,1869
Propargito	0,4419	0,6789	0,2950	0,5425	0,5873	0,2345
Propiconazol	0,0170	0,3345	0,2441	0,1875	0,6683	0,3687
Propizamida	0,2619	0,2351	0,1476	0,1835	0,1662	0,2088
Propoxur	0,0597	0,0278	0,1305	0,2987	0,3749	0,5474
Quinoxifeno	0,1586	0,0114	0,0298	0,0338	0,0597	0,5403
Simazina	0,1619	0,0336	0,2144	0,0735	0,3584	0,9974
Tebuconazol	0,1725	0,5937	0,5813	0,7096	0,9266	0,8851
Terbutilazina	0,1952	0,2182	0,1770	0,7291	0,3908	0,3630
Tetraconazol	0,2884	0,1417	0,0618	0,1455	0,0543	0,1374
Tiacloprido	0,5139	0,0443	0,1378	0,3332	0,2640	0,4679
Tolcofós metílico	0,0579	0,0442	0,0451	0,6272	0,4574	0,6323
Triadimefon	0,9130	0,6727	0,9520	0,6222	0,8068	0,5144
Triazofós	0,0815	0,1415	0,0773	0,1319	0,7403	0,1283
Triclorfom	0,2186	0,0555	0,1809	0,0368	0,0971	0,7180
Trifloxistrobina	0,0092	0,0865	0,0251	0,0741	0,7786	0,1352
Triflumizol	0,4964	0,0056	0,0414	0,0227	0,0522	0,2430

Apêndice C – Estruturas dos sorventes avaliados neste trabalho

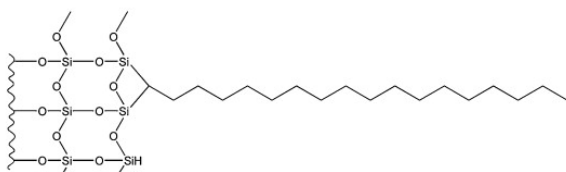
A) Estrutura do sorvente **Strata[®] X**



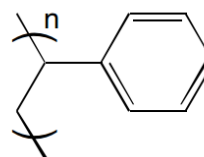
B) Estrutura do sorvente **Oasis[®] HLB**



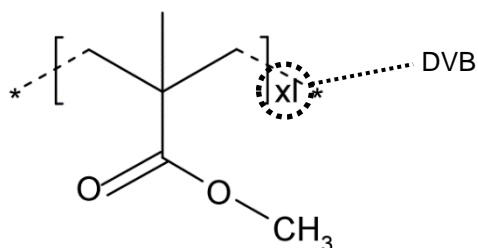
C) Estrutura do sorvente **Strata[®] C₁₈L**



D) Estrutura do sorvente **Strata[®] SDB-L**



E) Estrutura do sorvente **Bond Elut Nexus** (Metacrilato-divinilbenzeno, MA-DVB)



Apêndice D – Resultados do teste t de *student* para as condições experimentais de diferentes quantidade de sorvente (10; 20; 30 e 40 mg), utilizado na etapa de extração.

Compostos	continua					
	10 x 20	10 x 30	10 x 40	20 x 30	20 x 40	30 x 40
Atrazina	0,05	0,23	0,92	0,99	0,29	0,38
Azinfós metílico	0,11	0,12	0,19	0,91	0,74	0,81
Azoxistrobina	0,66	0,47	0,06	0,94	0,29	0,18
Bispiribaque sódico	0,95	0,61	0,45	0,60	0,52	0,29
Boscalida	0,33	0,04	0,79	0,86	0,40	0,12
Buprofezina	0,39	0,63	0,07	0,26	0,02	0,15
Carbaril	0,35	0,05	0,07	0,23	0,38	0,53
Carbofurano	0,81	0,82	0,51	0,70	0,47	0,62
Carboxim	0,87	0,97	0,08	0,96	0,08	0,24
Cianazina	0,13	0,14	0,76	0,85	0,57	0,61
Clorpirifós etílico	0,80	0,05	0,07	0,05	0,07	0,51
Clorpirifós metílico	0,20	0,26	0,15	0,04	0,00	0,71
Clomazona	0,66	0,51	0,89	0,77	0,75	0,57
Clorimurom etílico	0,10	0,12	0,66	0,23	0,36	0,74
Deltametrina	0,26	0,99	0,01	0,56	0,02	0,09
Diazinona	0,83	0,95	0,59	0,76	0,63	0,48
Difenoconazol	0,74	0,17	0,11	0,04	0,04	0,24
Epoxiconazol	0,58	0,36	0,30	0,99	0,95	0,89
Fenpropatrina	0,62	0,01	0,13	0,07	0,16	0,50
Fenpropimorfe	0,17	0,17	0,01	0,53	0,93	0,45
Fenarimol	0,18	0,65	0,21	0,70	0,50	0,50
Fentiona	0,04	0,22	0,93	0,05	0,28	0,71
Fipronil	0,57	0,17	0,83	0,09	0,43	0,09
Fluquiconazol	0,34	0,12	0,68	0,00	0,42	0,65
Flutolanil	0,66	0,66	0,06	0,53	0,16	0,04
Iprovalicarbe	0,71	0,24	0,42	0,14	0,31	0,93
Linurom	0,24	0,12	0,80	0,46	0,34	0,16
Malationa	0,18	0,09	0,34	0,15	0,70	0,99
Mecarbam	0,02	0,31	0,21	0,07	0,07	0,60
Mepronil	0,43	0,79	0,24	0,38	0,18	0,13
Metalaxil	0,01	0,25	0,13	0,75	0,34	0,34
Metconazol	0,26	0,36	0,13	0,71	0,05	0,11
Metiocarbe sulfona	0,04	0,17	0,50	0,03	1,00	0,43
Miclobutanil	0,13	0,45	0,84	0,12	0,63	0,68
Monolinurom	0,85	0,24	0,32	0,16	0,23	0,87
Paraoxon etílico	0,22	0,67	0,46	0,27	0,72	0,38
Piraclostrobina	0,54	0,32	0,25	0,57	0,43	0,91
Pirazofós	0,63	0,60	0,40	0,93	0,33	0,23
Piridabem	0,57	0,06	0,08	0,24	0,20	0,59
Piridafentiona	0,41	0,54	0,31	0,44	0,48	0,17
Piridato	0,00	1,00	0,18	0,00	0,01	0,19

Compostos	conclusão					
	10 x 20	10 x 30	10 x 40	20 x 30	20 x 40	30 x 40
Pirimetanil	0,26	0,13	0,09	0,59	0,92	0,45
Pirimicarbe	0,08	0,02	0,90	0,74	0,37	0,32
Pirimifós metílico	0,91	0,17	0,31	0,10	0,09	0,25
Profenofós	0,50	0,20	0,41	0,09	0,20	0,57
Profoxidim	0,98	0,11	0,15	0,14	0,19	0,73
Propargito	0,94	0,02	0,18	0,21	0,28	0,90
Propiconazol	0,70	0,62	0,79	0,20	0,54	0,91
Propizamida	0,08	0,63	0,29	0,39	0,00	0,93
Propoxur	0,48	0,29	0,62	0,46	0,78	0,87
Quinoxifeno	0,64	0,36	0,41	0,48	0,53	0,86
Simazina	0,08	0,38	0,74	0,97	0,37	0,54
Tebuconazol	0,79	0,56	0,21	0,31	0,15	0,08
Terbutilazina	0,73	0,20	0,16	0,12	0,05	0,74
Tetraconazol	0,01	0,04	0,22	0,01	0,33	0,99
Tiacloprido	0,66	0,69	0,41	0,51	0,35	0,48
Tolcofós metílico	0,96	0,44	0,31	0,29	0,23	0,46
Triadimefon	0,48	0,39	0,77	0,24	0,35	0,41
Triazofós	0,37	0,52	0,32	0,65	0,88	0,51
Triclorfom	0,03	0,04	0,21	0,06	0,67	0,40
Trifloxistrobina	0,72	0,80	0,58	0,50	0,19	0,79
Triflumizol	0,55	0,80	0,83	0,76	0,44	0,65