



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

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA (DLLME) E GC-(TQ)MS/MS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Manoel Leonardo Martins**

**Santa Maria - RS, Brasil**

**2010**

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA (DLLME) E GC-(TQ)MS/MS**

**por**

**Manoel Leonardo Martins**

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 grau de

**DOUTOR EM QUÍMICA**

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

**Santa Maria - RS, Brasil**

**2010**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO  
DISPERSIVA (DLLME) E GC-(TQ)MS/MS**

elaborada por  
**Manoel Leonardo Martins**

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

**Comissão Examinadora**

---

**Prof. Dr. Renato Zanella** (Orientador, UFSM)

---

**Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha** (UFSC)

---

**Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** (FURG)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Palma Alves** (UNIFRA)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha Bohrer Adaime** (co-orientadora, UFSM)

Santa Maria, 29 de novembro de 2010.

À minha esposa Aline e à minha filha Julia, a Learci e ao Teraldo,  
e à minha mãe Edith (*em memória*)  
Agradeço o apoio incondicional, por abrir mão de minha companhia nas longas  
horas de estudos e pela incansável torcida.  
A vocês eu dedico essa conquista.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Renato Zanella**, pela orientação neste trabalho, pelo aprendizado, pela amizade e acolhida no grupo de pesquisas do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP).

À **Professora Dra. Martha Bohrer Adaime**, pela co-orientação neste trabalho, por seu carinho, incentivo, e pela precisa identificação do meu potencial e de onde posso melhorar.

Ao **Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel** pelas excelentes sugestões durante o exame de qualificação e como banca examinadora da defesa da tese.

Ao **Dr. Ubiratan Flores da Silva** por ter participado do exame de qualificação sugerindo novas idéias e questionamento que foram muito válidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Róger Wagner** por ter participado do exame de qualificação com toda disponibilidade possível, contribuindo para melhorias deste trabalho.

A **Prof. Dra. Marta Palma Alves** por ter aceitado participar da banca de defesa, contribuindo com sugestões importantes para aperfeiçoamento do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha** por ter aceitado participar da banca de defesa. Contribuindo com sugestões foram muito válidas e que expandiram as possibilidades do trabalho aqui desenvolvido.

Ao **Osmar Damian Prestes** e a **Sandra Cadore Peixoto**, pela inestimável ajuda, especialmente na etapa final da realização deste trabalho.

Aos **colegas do LARP**, pela ajuda prestada para desenvolver este e outros trabalhos no LARP.

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Química da UFSM pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos **funcionários do PPGQ**, pela gentileza, disposição e atenção para com os alunos.

A **UFSM** pela oportunidade de ensino gratuito e de qualidade.

A meu grande amigo **Adilson Bem da Costa**, que sempre me incentivou e ajudou, por estar sempre disponível para ajudar aos outros e pelo exemplo de dedicação aos seus objetivos.

À **MILENIA Agrociências** pela oportunidade de realização do Doutorado, disponibilizando tempo, instalações e equipamentos para realização deste trabalho.

**Aos colegas** da MILENIA, pelo respeito ao tempo em que estive dedicado ao trabalho, pela confiança e pelo incentivo.

À minha mãe **Edith**, que não está mais neste mundo, mas com certeza está em mim.

À minha esposa **Aline** que sempre me incentivou e me deu forças para vencer cada etapa, agradeço toda sua compreensão e amor.

À minha filha **Julia** pela companhia e paciência, sempre se mostrando muito compreensiva e sempre me trazendo bons momentos e seu imenso e inestimável amor.

Aos meus outros **familiares**, que sempre me apoiaram e me parabenizavam em cada conquista realizada.

À **Deus**, meu suporte, conforto, lucidez e equilíbrio, pela oportunidade de conviver com pessoas tão especiais!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EM ÁGUA POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) E GC-(TQ)MS/MS**

AUTOR: MANOEL LEONARDO MARTINS  
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 29 de novembro de 2010

A utilização de substâncias químicas, que por um lado gera benefícios, por outro é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos. A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico, em especial pela presença de pesticidas e outras substâncias químicas em mananciais de água. Dessa forma, métodos analíticos rápidos, sensíveis e eficientes têm de ser desenvolvidos para verificar se os níveis de concentração dos pesticidas e outras substâncias químicas em amostras de água estão de acordo com os estabelecidos pela legislação, a fim de resguardar a saúde humana e o meio ambiente. Este estudo teve como finalidade otimizar, validar e aplicar um método de extração e determinação de resíduos de mononitro, cetona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endossulfan,  $\beta$ -endossulfan e endossulfan sulfato em amostras de água de torneira, efluente industrial e água subterrânea, aplicando a técnica DLLME modificada e quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial tipo Triplo Quadrupolo (GC-(TQ)MS/MS). A técnica de extração DLLME está baseada na injeção rápida, com auxílio de uma seringa, de uma mistura dos solventes extrator (50  $\mu$ L de tetracloreto de carbono) e dispersor (2,0 mL de acetona) previamente resfriada em banho de gelo a uma temperatura entre 0 e 4 °C, em uma amostra aquosa (5,0 mL) contida em um tubo de vidro, com fundo cônico, graduados com volume de 10 mL, sem correção de pH e mantida resfriada em banho de gelo entre 0 e 4 °C. O procedimento não requer agitação da amostra. Retira-se a fase sedimentada separada por sedimentação simples após 10 min., do fundo do tubo cônico com auxílio de uma microseringa de 25  $\mu$ L e transfere-se para um frasco de 200  $\mu$ L, para determinação no sistema GC-(TQ)MS/MS. O fator de pré-concentração obtido é de 100 vezes. Na validação do método determinaram-se os limites de detecção e limites de quantificação (LOD e LOQ), linearidade, precisão e exatidão. As curvas analíticas apresentaram linearidade adequada entre 0,05 e 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup> com valores de coeficiente de determinação superior a 0,993. O método apresentou bons valores de recuperação, entre 70 e 115% e RSD(%) entre 10,9 e 17,2%, com LOQs entre 0,02 e 0,09  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. O método foi considerado adequado para a análise de resíduos dos pesticidas em estudo em amostras de água. Após a validação, o método foi aplicado em amostras de água de potável, efluente industrial e água subterrânea. Não foram encontrados resíduos dos pesticidas e outras substâncias químicas estudados nas amostras analisadas.

Palavras-chave: água, pesticidas, preparo de amostra, DLLME, GC-MS/MS.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Universidade Federal de Santa Maria

### **SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUND RESIDUES IN WATER SAMPLES BY DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION (DLLME) AND GC-(TQ)MS/MS**

AUTHOR: MANOEL LEONARDO MARTINS  
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Date and Place: November 29<sup>th</sup>, 2010, Santa Maria

The use of chemicals, which generates a lot off benefits, is responsible for the contamination of soil, water and foods. The concern about contamination of surface and ground water systems by pesticides has grown in scientific circles, especially by the presence of pesticides and other compounds in water sources. Thus, rapid analytical methods, sensitive and efficient must be developed in order to verify the concentration levels of pesticides and other organic compounds in water samples agree with those established by law to protect human health and the environment media. This study aimed to optimize, validate and implement an extraction method to determine residues of mononitro, ketones, trifluralin, oxirane, lindane, 2,4-D ester, chlorpyrifos, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan and endosulfan sulfate in samples of tap water, industrial wastewater and groundwater by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) modified and Gas Chromatography with Mass Spectrometry Tandem using Triple Quadrupole type (GC-(TQ)MS/MS). The method is based on the rapid injection, with a syringe, of a mixture of an extractor solvent (50  $\mu$ L of carbon tetrachloride) and an dispersor solvent (2.0 mL acetone) previously cooled (ice batch, 0 - 4  $^{\circ}$ C) in an aqueous sample (5.0 mL), contained in a 10 mL graduated glass tube with conical bottom, with no pH correction and cooled (ice batch, 0 - 4  $^{\circ}$ C). It is not necessary to stir the sample in this step. Remove 25  $\mu$ L of the sedimented phase separated by simple sedimentation for 10 min. from the bottom of conical tube with a microsyringe and transferred to a vial of 200  $\mu$ L for GC-(TQ)MS/MS determination. The preconcentration factor obtained was 100 times. The method was validated by determining the limits of detection and quantification limits (LOD and LOQ), linearity, precision and accuracy. The calibration curves showed adequate linearity between 0.05 e 10  $\mu$ g L<sup>-1</sup> with coefficients of determination higher than 0.993. The method showed good recovery values between 70 and 115%, RSD(%) ranged from 10.9 to 17.2%, LOQs between 0.02 and 0.09  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, and was considered adequate for the analysis of pesticide residues and other organic compounds evaluated in water samples. After validation, the method was applied to samples of drinking water, industrial wastewater and groundwater. No pesticide residues and other organic compounds evaluated were found in the water samples tested.

Keywords: water, pesticides, sample preparation, DLLME, GC-MS/MS.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Pesticidas e substâncias químicas relacionadas escolhidas para o estudo .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Técnicas de extração para determinação de substâncias químicas em águas .....</b>	<b>15</b>
2.3.1. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) .....	19
2.3.2. Princípios da DLLME .....	20
2.3.3. Descrição das etapas da DLLME .....	21
2.3.4. Solventes para extração DLLME .....	23
2.3.5. Aplicações da DLLME .....	25
<b>2.4. Espectrometria de massas para determinação de substâncias químicas orgânicas em água .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5. Validação do método cromatográfico .....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1. Reagentes, solvente e materiais .....</b>	<b>42</b>
3.1.1. Instrumentação .....	43
3.1.2. Gases utilizados .....	43

3.1.3. Padrões analíticos dos pesticidas e substâncias químicas estudados .....	44
3.1.4. Preparo das soluções analíticas .....	45
3.1.5. Escolha dos solventes .....	46
<b>3.2. Otimização do sistema cromatográfico GC-(TQ)MS/MS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.3. Matriz .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4. Otimização do procedimento de extração DLLME .....</b>	<b>49</b>
3.4.1. Seleção do solvente extrator .....	49
3.4.2. Seleção do solvente dispersor .....	49
3.4.3. Seleção do volume do solvente extrator .....	49
3.4.4. Seleção do volume do solvente dispersor .....	49
3.4.5. Comparação das melhores condições obtidas .....	50
3.4.6. Centrifugação e sedimentação .....	50
3.4.7. Resfriamento da mistura de solventes extrator e dispersor .....	51
3.4.8. Resfriamento da amostra .....	51
3.4.9. Procedimento otimizado .....	52
3.4.10. Comparação do procedimento otimizado com um procedimento alternativo .....	52
3.4.11. Comparação das recuperações em diferentes níveis de concentração .....	52
3.4.12. Comparação dos resultados de recuperação com parâmetros físico-químicos .....	53
3.4.13. Escolha dos pesticidas e substâncias químicas para validação do método analítico .....	53
3.4.14 Avaliação da DLLME como técnica extração de equilíbrio .....	53
<b>3.5. Validação do método .....</b>	<b>54</b>
3.5.1. Seletividade .....	54

3.5.2. Curva analítica e ajuste do modelo de calibração .....	54
3.5.3. Sensibilidade .....	55
3.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método .....	55
3.5.5. Exatidão .....	56
3.5.6. Precisão .....	58
<b>3.6. Aplicação do método .....</b>	<b>59</b>
3.6.1. Efluentes industriais e água subterrânea .....	59
3.6.2. Água de torneira .....	59
3.6.3. Comparação com outros métodos .....	60
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Análise dos solventes .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2. Condições cromatográficas utilizadas .....</b>	<b>63</b>
4.2.1. Avaliação da separação cromatográfica por GC-(TQ)MS/MS .....	64
<b>4.3. Condições do sistema GC-(TQ)MS/MS .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4. Estudo da DLLME .....</b>	<b>67</b>
4.4.1. Avaliação de diferentes solventes extratores utilizando acetonitrila como solvente dispersor .....	67
4.4.2. Avaliação de diferentes solventes dispersores utilizando tetracloreto de carbono como solvente extrator .....	70
4.4.3. Efeito da variação do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono .....	73
4.4.4. Volume do solvente dispersor acetonitrila .....	76
4.4.5. Melhores condições obtidas .....	79
4.4.6. Centrifugação e sedimentação .....	82
4.4.7. Resfriamento da mistura de solventes extrator e dispersor .....	85

4.4.8. Resfriamento da amostra .....	88
4.4.9. Procedimento otimizado .....	91
4.4.10. Comparação do procedimento otimizado com um procedimento alternativo .....	94
4.4.11. Comparação das recuperações em diferentes níveis de concentração .....	96
4.4.12. Comparação dos resultados de recuperação com parâmetros físico-químicos .....	100
4.4.13. Escolha dos pesticidas e substâncias químicas para validação do método analítico .....	103
4.4.14. Avaliação da DLLME como técnica extração de equilíbrio .....	105
<b>4.5. Validação do método analítico .....</b>	<b>109</b>
4.5.1. Seletividade .....	109
4.5.2. Curva analítica e ajuste do modelo de calibração .....	113
4.5.3. Sensibilidade .....	116
4.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método .....	116
4.5.5. Exatidão .....	119
4.5.6. Precisão .....	120
<b>4.6. Aplicação do método .....</b>	<b>123</b>
4.6.2. Água de torneira .....	124
4.6.3. Resultados da comparação com outros métodos .....	126
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>128</b>
<b>DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS .....</b>	<b>130</b>
<b>SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>132</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gráfico comparativo para o logaritmo do coeficiente de partição-octanol água ( $\text{Log } K_{ow}$ ) .....	12
Figura 2.	Gráfico comparativo das pressões de vapor (mm Hg) para os pesticidas e substâncias químicas em estudo .....	13
Figura 3.	Gráfico comparativo das solubilidades em água ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para os pesticidas e substâncias químicas em estudo .....	14
Figura 4.	Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME, adaptado de (BERIJANI <i>et al.</i> , 2006) .....	22
Figura 5.	Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo .....	32
Figura 6.	Figura 6: Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ instrumentais .....	56
Figura 7.	Diagrama demonstrando um gráfico Box and Whisker e sua comparação com a curva normal .....	58
Figura 8.	Cromatograma total obtido por GC-(TQ)MS/MS para a mistura branco dos solventes. a = solução analítica $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , b = branco dos solventes, c = tetracloreto de carbono e d = acetona, nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3 .....	61
Figura 9.	Cromatograma total obtido por GC-(TQ)MS/MS para a mistura branco dos solventes. a = solução analítica $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , b = branco dos solventes, c = clorofórmio e d = acetonitrila. Condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3. ....	62
Figura 10.	Cromatograma do nível de fortificação $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ em água de torneira, obtido nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3. ....	64
Figura 11.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com, a utilização de diferentes solventes extratores (diclorometano, tetracloreto de carbono e clorofórmio) .....	67
Figura 12.	Efeito de diferentes solventes extratores (diclorometano, tetracloreto de carbono e clorofórmio) na recuperação das substâncias químicas analisadas .....	69

Figura 13.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com, a utilização de diferentes solventes dispersores (acetona, metanol e acetonitrila) .....	70
Figura 14.	Efeito de diferentes solventes dispersores (acetona, metanol e acetonitrila) na recuperação das substâncias químicas analisadas.	72
Figura 15.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com, a Influência do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono .....	73
Figura 16.	Influência do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono na recuperação .....	75
Figura 17.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com o efeito do volume do solvente dispersor acetonitrila (0,5, 1,0 e 2,0 mL) .....	76
Figura 18.	Efeito do volume do solvente dispersor acetonitrila (0,5, 1,0 e 2,0 mL) na recuperação .....	78
Figura 19.	Gráfico Box and Whisker entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se dois procedimentos. a - 100 $\mu$ L de CCl <sub>4</sub> e 1 mL de acetonitrila e b – 50 $\mu$ L de CCl <sub>4</sub> e 2 mL de acetona .....	80
Figura 20.	Comparação entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se dois procedimentos.....	81
Figura 21.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito da utilização da centrifugação .....	82
Figura 22.	Efeito da utilização da centrifugação na recuperação das substâncias químicas analisados .....	84
Figura 23.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito do resfriamento da mistura de solventes.....	86
Figura 24.	Efeito do resfriamento da mistura de solventes na recuperação das substâncias químicas analisadas.....	87
Figura 25.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito utilização de resfriamento da amostra....	89
Figura 26.	Efeito da utilização de resfriamento da amostra na recuperação dos pesticidas e das substâncias químicas analisadas.....	90
Figura 27.	Desenho esquemático do procedimento DLLME.....	93
Figura 28.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste utilizando-se dois procedimentos recomendados.....	94

Figura 29.	Comparação entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se as misturas de solventes: a - 50 $\mu\text{L}$ de clorofórmio, 2 mL de acetona e b – 50 $\mu\text{L}$ de tetracloreto de carbono e 2 mL de acetona, ambos com resfriamento.....	95
Figura 30.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em todos os testes realizados para DLLME.....	97
Figura 31.	Gráfico das médias das recuperações (%) em três níveis de fortificação (0,1, 1,0 e 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ).....	99
Figura 32.	Gráfico do logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) versus as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação..	100
Figura 33.	Gráfico do logaritmo da solubilidade em água ( $\text{mg L}^{-1}$ ) versus as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação.....	101
Figura 34.	Gráfico do logaritmo da pressão de vapor (mm Hg) versus as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação.....	102
Figura 35.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com diferentes níveis de concentração.....	103
Figura 36.	Gráfico Box and Whisker para as recuperações obtidas em cada teste com diferentes níveis de concentração para mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal 1, $\alpha$ -endosulfan, $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.....	104
Figura 37.	Cromatograma do nível de fortificação 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em água de torneira com os segmentos e as transições utilizadas.....	112
Figura 38.	Valores percentuais de repetitividade para o instrumento (RSD) e de repetitividade ( $\text{RSD}_r$ ) e precisão intermediária ( $\text{RSD}_{pi}$ ) para o método validado.....	122
Figura 39.	Cromatograma obtido por GC-(TQ)MS/MS para o extrato branco de água de torneira, nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3.....	125
Figura 40.	Comparação entre as recuperações obtidas utilizando as técnicas de extração LLE, SPE e DLLME.....	127

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para o estudo.....	7
Tabela 2.	Identificação dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para este estudo.....	8
Tabela 3.	Propriedades físico-químicas dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para este estudo.....	11
Tabela 4.	Propriedades físico-químicas de alguns solventes passíveis de serem utilizados como solventes extratores e dispersores.....	24
Tabela 5.	Padrões analíticos dos pesticidas e substâncias químicas estudadas .....	44
Tabela 6.	Volumes utilizados no preparo das soluções analíticas .....	46
Tabela 7.	Dados da programação dos segmentos para cada um dos pesticidas e substâncias químicas em estudo .....	66
Tabela 8.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas e substância químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para amostras fortificadas. ....	105
Tabela 9.	Recuperações (R) e Desvio Padrão Relativo (RSD) em % obtidas para o nível de concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras fortificadas ( $n = 8$ ), considerando a DLLME como uma técnica de equilíbrio.....	107
Tabela 10.	Resultados obtidos para as curvas de calibração dos pesticidas e substâncias químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para a faixa de $50 \text{ a } 1000 \mu\text{g L}^{-1}$ .....	114
Tabela 11.	Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas e substância químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para a faixa de $5 \text{ a } 100 \mu\text{g L}^{-1}$ .....	115
Tabela 12.	Limites de detecção e de quantificação instrumental e do método.....	117



Tabela 13.	Recuperações (R) e Desvio Padrão Relativo (RSD) em % obtidas para os níveis de concentração 0,1, 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras fortificadas (n = 7).....	119
Tabela 14.	Precisão analítica em termos de repetitividade para o instrumento (RSD) e em termos de repetitividade ( $\text{RSD}_r$ ) e precisão intermediária ( $\text{RSD}_{pi}$ ) para o método validado.....	120
Tabela 15.	Resultados obtidos na aplicação do método em amostra de água subterrânea e amostra de efluente industrial.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3,4-DCA – 3,4-Di-Cloro-Anilina

3,4-DCBTF - 3,4-Di-Cloro-Benzeo-Tri-Fluoreto

ACN - Acetonitrila

ACT- Acetona

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAS - Serviço de resumo de química, do inglês *Chemical Abstract Service*

CPE Extração em ponto nuvem, do inglês *Cloud Point Extraction*

CV - Coeficiente de variação

DCM - Diclorometano

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*

DCPI – Di-Cloro-(Ph)enil-Isocianato

EI – Ionização por Impacto de Elétrons, do inglês *Electron Impact Ionization*

FISPQ - Ficha de Informações Sobre Produtos Químicos

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

GC-(IT)MS/MS - do inglês *Gas Chromatography with Ion Trap Detector with Mass Spectrometry with Mass Spectrometry (Tandem MS)*

GC(TQ)MS/MS - do inglês *Gas Chromatography with Triple Quadrupole Detector with Mass Spectrometry with Mass Spectrometry (Tandem MS)*

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*

GC-MS/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial, do inglês *Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons, do inglês, *Gas Chromatography with Electron Capture Detection*

FPD – Detector fotométrico de chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

- HF-LPME – “Hollow Fiber” Micro Extração Em Fase Líquida, do inglês *Hollow Fiber – Liquid Phase Micro Extraction*
- HLLE - Extração Líquido-Líquido Homogênea, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Extraction*
- HPFOA ácido perfluoro-octanóico
- HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection*
- HS – do inglês *Headspace*
- HS-SPME - Microextração Em Fase Sólida no modo "headspace", do inglês, *Head Space – Solid Phase Micro Extraction*
- IL-DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Com Líquido Iônico, do inglês *Ionic Liquid – Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia
- IUPAC – do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- $K_{oc}$  - coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo
- $K_{ow}$  - Coeficiente de partição octanol-água, do inglês *octanol-water partition coefficient*
- LC - Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*
- LC-DAD - Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Liquid Chromatography with Diode Array Detection*
- LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
- LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*
- LOD - Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ - Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- m/z – Razão massa/carga
- LPME - Microextração Em Fase Líquida, do inglês *Liquid Phase Micro Extraction*
- LPME-SFO – Microextração Em Fase Líquida Por Solidificação De Uma Gota Orgânica Flutuante, do inglês *Liquid-Phase Microextraction Method with Solidification Of Floating Organic drop*
- LT-DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva de Baixa Toxicidade, do inglês *Low Toxicity Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

MD-GC/MS – Multi-Dimensional

MeOH = Metanol

MRM – do inglês *Multiple Reactions Monitoring*.

MS/MS - do inglês *Mass Spectrometry with Mass Spectrometry (Tandem MS)*

MSn – do inglês *n steps of Mass Spectrometry*

PCBTF – Para-Cloro-Benzo-Tri-Fluoreto

PCT – Para-Cloro-Tolueno

PDLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Particionada, do inglês *Partitioned Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*

PE - ponto de ebulição

PF - ponto de fusão

PV - pressão de vapor

RP – Fase Reversa, do inglês *Reversed Phase*

R - Recuperação

$r^2$  - Coeficiente de Determinação

RSD - Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SDME - Microextração Em Gota Única Ou Micro Extração Em Gota Suspensa, do inglês *Single Drop Micro Extraction*

SIM – do inglês *Selective Ion Monitoring* ou *Single Ion Monitoring*.

SIS - do inglês, *Selected Ion Storage*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*

S/R - Relação Sinal Ruído

SRM – do inglês *Single Reaction Monitoring*.

$t_R$  - Tempo de Retenção

TCIL-DLLME - Microextração Em Fase Líquida Dispersiva Com Utilização De Líquido Iônico E Temperatura Controlada, do inglês *Temperature Controlled Ionic Liquid Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*

USAEME - Microextração Por Emulsificação Assistida Por Ultrassom, do inglês *Ultrasound-Assisted Emulsification–Microextraction*

US-DLLME - Microextração Líquido - Líquido Dispersiva Assistida Por Ultrassom, do inglês *Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction*

US-EPA – do inglês *United States - Environmental Protection Agency*

UV - Ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias químicas em geral e mais especificamente de pesticidas, em incontáveis aplicações relacionadas com a atividade humana, por um lado gera benefícios e por outro, é responsável pela contaminação do solo, água e alimentos.

A determinação de resíduos de pesticidas em alimentos e de outras substâncias químicas em amostras ambientais é importante devido ao risco que estas substâncias oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação (PRESTES, 2009).

Buscando atender a necessidade de desenvolvimento de novos métodos para quantificação de pesticidas e outras substâncias químicas em amostras de água, o meio científico tem se dedicado a pesquisar novas técnicas e a monitorar amostras ambientais, água potável, efluentes industriais, águas pluviais, água de degelo, entre outros.

Para o desenvolvimento das técnicas de preparação da amostra, notadamente na extração e pré-concentração dos analitos presentes na amostra, muito esforço tem se demandado na miniaturização dos procedimentos, reduzindo o impacto ambiental da própria determinação, devido ao consumo de grandes volumes de efluentes tóxicos e pela redução do tempo de processamento das amostras. Esta última característica é um limitante importante, visto que a validade de uma amostra de água, segundo as normas mais aceitas para análise de água é de 7 dias, descontando-se o tempo de transporte até o laboratório. Assim o tempo restante para processamento das amostras é bastante restrito (USEPA, 1996).

Uma técnica de extração e pré-concentração de amostras que atende os requisitos de miniaturização, baixo custo, rapidez e eficiência de extração e com alto potencial para aplicação direta em campo, é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), proposta por Razaee e colaboradores em 2006. Nesta técnica uma mistura de solventes é injetada na amostra aquosa e os analitos são transferidos desta para a fase orgânica por partição, de forma muito parecida com o que ocorre com a Extração Líquido-Líquido tradicional.

Na LLE a mistura do solvente orgânico com a fase/amostra aquosa é promovida por agitação, e a formação de bolhas ou gotas de solvente orgânico garante o aumento da superfície de troca para partição dos analitos entre as fases.

Na DLLME a mistura obtida pela injeção rápida de um jato de um mistura de solventes, onde um solvente miscível na fase aquosa e na fase orgânica promove a dispersão desta última na forma de migrogotas com grande área superficial onde ocorre a partição.

Outra diferença entre a LLE e a DLLME é que na LLE são realizadas, no mínimo, três etapas sucessivas de extração, para aumento da eficiência de extração, enquanto que na DLLME a extração ocorre em uma única etapa.

Se a eficiência de extração for próxima a 100%, a técnica pode ser considerada um técnica exaustiva, caso contrário é considerada uma técnica de equilíbrio (OLIVEIRA, 2008).

Dentre as técnicas instrumentais para separação, identificação e quantificação de resíduos de pesticidas e de outras substâncias químicas, a Cromatografia Acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*) permite a detecção e quantificação dos analitos simultaneamente com a identificação dos mesmos. A avaliação do espectro de massas e a comparação com bibliotecas padronizadas ou a utilização de mais etapas de fragmentação (MS/MS) permitem a obtenção de condições mais específicas de detectabilidade (PEDROSO *et al.*, 2009).

Este estudo teve como finalidade otimizar, validar e aplicar um método de extração para determinar resíduos de: PCBTF, xileno (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, 1,2-diclorobenzeno, nitrobenzeno, mononitro, DDVP + triclorfon, DCPI+diuron, dinitro, 3,4 dicloro-anilina, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, propanil, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal 1,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato em amostras água de torneira, efluente industrial e água subterrânea aplicando a técnica DLLME modificada e quantificação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas seqüencial tipo Triplo Quadrupolo (GC-(TQ)MS/MS, do inglês *Gas Chromatography with Triple Quadrupole Detector with Tandem MS*). As amostras de água potável utilizadas neste trabalho são provenientes da rede pública, coletadas no próprio laboratório, e as amostras de efluente industrial e de água subterrânea foram coletadas em uma indústria de produção de pesticidas.

Para a otimização do método foi levado em consideração que as substâncias químicas em estudo pertencem a diferentes classes químicas, e apresentam solubilidades e volatilidades bastante diferenciadas entre si. Em função dos testes iniciais de otimização, foi proposta uma modificação para o método, que consiste na eliminação da etapa de centrifugação, eliminação da agitação da amostra após a injeção dos solventes e utilização de resfriamento para minimizar perda do solvente extrator e dos analitos mais voláteis presentes na mistura.

Não foi utilizada a evaporação do extrato até a secura e/ou troca de solvente, pois os solventes utilizados já são adequados para a Cromatografia Gasosa.

De forma a tornar a técnica DLLME adequada para utilização direta do extrato obtido para determinação por GC-MS, é necessário evitar a retirada de fase aquosa junto com a fase orgânica sedimentada. No procedimento proposto é retirada somente parte da fase sedimentada, sendo utilizado um padrão interno para correção final da concentração das substâncias químicas avaliadas no extrato.

Para determinação das substâncias químicas em estudo foi realizada a otimização das condições de separação e detecção do sistema GC-(TQ)-MS/MS, que propicia alta seletividade e detectabilidade ao método proposto.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos

O crescimento da demanda por alimentos acompanhada com a explosão demográfica resultou, em um primeiro momento, na intensificação da cultura em terras mais férteis e, em um segundo momento, na expansão dessas fronteiras agrícolas para áreas menos produtivas. Com isso, a agricultura atual é caracterizada pelo uso de novas tecnologias e equipamentos, pela elevação do número de pesquisas agrônômicas e pelo uso de uma diversidade de insumos, como pesticidas e fertilizantes (PEIXOTO, 2010).

Pesticidas são considerados benéficos para produção de uma quantidade adequada de alimentos, através do controle de pragas na agricultura. Entretanto, o aumento da produção e da aplicação de pesticidas envolve sérios riscos para o meio ambiente bem como para a saúde humana (XIA *et al.*, 2008).

Os pesticidas são substâncias tóxicas e tem características de persistência no meio ambiente e no corpo humano. A poluição dos diferentes compartimentos ambientais envolve um risco sério para saúde humana, assim como a exposição direta aos resíduos de pesticidas em alimentos e em água potável (CALDAS *et al.*, 2010).

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico, em especial pela presença de pesticidas e outras substâncias químicas em mananciais de água.

O controle de pesticidas em água superficial, potável e subterrânea nos dias de hoje é uma necessidade real, o que tem causado um crescente interesse social em avaliar e monitorar os resíduos de pesticidas em diferentes matrizes ambientais. (PINTO *et al.*, 2010).

Considerando especificamente os pesticidas, estes podem atingir as águas de superfície e subterrâneas, em diferentes situações:



- Quando aplicados na lavoura eventualmente podem ser transportados para as águas de superfície através de vários mecanismos e seus resíduos podem permanecer no meio ambiente, causando riscos potenciais à saúde humana e ao meio ambiente (PRIMEL, 2003);
- Em caso de acidentes, especialmente no transporte destes produtos, por via terrestre ou por vias pluviais ou marítimas (ZANELLA *et al.*, 2003);
- Pelo destino inadequado das embalagens usadas pelos agricultores (BORTOLUZZI *et al.*, 2006);
- Pela emissão de efluentes líquidos oriundos da síntese ou preparo de formulações comerciais de pesticidas (MARTINS *et al.*, 2005).

Entre estas fontes, a emissão de efluentes líquidos gera preocupação pois consiste numa possível fonte contínua de emissão de poluentes requerendo rígido controle operacional e analítico, para minimizar os possíveis danos ao meio ambiente (MARTINS, 2004).

Muitas substâncias químicas utilizadas como matérias-primas e intermediários químicos na produção de pesticidas apresentam grande relevância ambiental, podendo ter efeitos mais nocivos que os próprios pesticidas ao homem e ao meio ambiente (EEC, 2000).

A preocupação com a poluição de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. A Comunidade Econômica Européia estabeleceu em  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas para consumo humano e em  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para o total de resíduos, sem deixar claro que se deve, ou não, considerar também produtos de transformação. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES, 2001).

Dessa forma, métodos analíticos rápidos, sensíveis e eficientes têm de ser desenvolvidos para verificar se os níveis de concentração dos pesticidas e outras substâncias químicas em amostras de água estão de acordo com os estabelecidos pela legislação, a fim de resguardar a saúde do consumidor.

## 2.2. Pesticidas e substâncias químicas relacionadas escolhidas para o estudo

A escolha dos pesticidas para o desenvolvimento do estudo baseou-se primeiramente na necessidade de monitorar a água potável, o efluente industrial e a água subterrânea de uma fábrica de pesticidas. A necessidade de monitoramento da água potável (água de torneira) está na possibilidade de contaminação cruzada com os produtos manipulados na fábrica. O efluente deve ser monitorado para atender padrões de emissão e, conseqüentemente, preservação do meio ambiente. A água subterrânea deve ser monitorada para prevenir ou avaliar possíveis contaminações advindas das emissões relacionadas com a operação da fábrica.

Foram selecionados matérias-primas e intermediários químicos da produção dos principais pesticidas produzidos na indústria, de forma a prover um controle efetivo do aporte destas substâncias químicas aos corpos receptores.

A Tabela 1 indica as classes e grupos químicos para os pesticidas em estudo e o tipo e aplicação para as outras substâncias químicas.

Os pesticidas trifluralina, propanil, 2,4-D éster e clorpirifós são herbicidas, os pesticidas DDVP + triclorfon, diuron,  $\alpha$ -endosulfan,  $\alpha$ -endosulfan são inseticidas.

As substâncias químicas PCBTF, PCT, 3,4-DCBTF, mononitro, dinitro, são intermediários químicos para produção do herbicida trifluralina.

Para o Diuron as substâncias químicas relacionadas são o DCPI, que é determinado simultaneamente e a 3,4-dicloro-anilina.

Oxirano e cetona são utilizados na produção do tebuconazole que é determinado por outro procedimento, não fazendo parte deste estudo. Da mesma maneira o bromoketal é utilizado na produção de propiconazol que é igualmente determinado por outro procedimento para as mesmas amostras.

A substância química relacionada com o propanil é a 3,4-dicloro-anilina, matéria-prima na produção de propanil.

O xileno (o+m+p) é usado como solvente na formulação comercial da trifluralina.

O DDVP, triclorfon, lindano, 2,4-D éster, e  $\alpha$ -endosulfan e  $\alpha$ -endosulfan não são mais sintetizados ou manipulados na fábrica desde 1995, mas o monitoramento destes é necessário para verificar contaminações remanescentes.

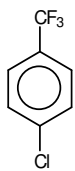
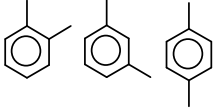
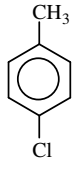
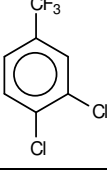
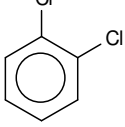
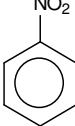
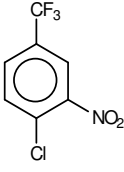
O endosulfan sulfato é produto de degradação do inseticida endosulfan.

**Tabela 1:** Classificação dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para o estudo.

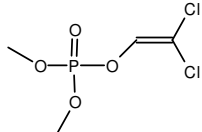
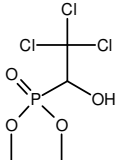
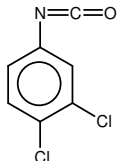
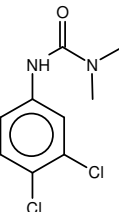
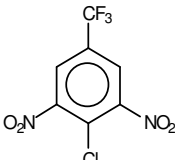
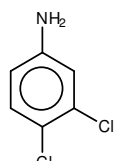
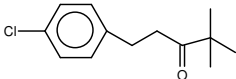
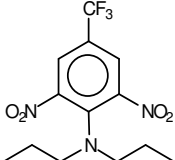
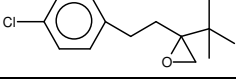
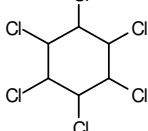
<b>Nome comum</b>	<b>Classe ou Tipo</b>	<b>Grupo Químico/Aplicação</b>
PCBTF	Solvente e Intermediário-químico	Tinta automotiva, Produção de herbicidas
Xileno (o+m+p)	Solvente	Solvente aromático
PCT	Intermediário-químico	Produção de herbicidas
3,4-DCBTF	Intermediário-químico	Produção de herbicidas
1,2-dicloro-benzeno	Padrão de controle	Solventes clorados
Nitrobenzeno	Padrão de controle	Nitro-aromático
Mononitro	Intermediário de reação	Nitro-aromático halogenado
DDVP	Inseticida	Organofosforado
Triclorfon	Inseticida	Organofosforado
DCPI	Intermediário-químico síntese diuron	Produção de herbicidas
Diuron	Herbicidas	Fenil uréias
Dinitro	Intermediário de reação	Nitro-aromático halogenado
3,4-DCA	Intermediário-químico e produto de degradação	Dicloroanilina
Ketone	Intermediário-químico	Produção de fungicidas
Trifluralina	Herbicida	Dinitroanilinas
Oxirane	Intermediário-químico	Produção de fungicidas
Lindane	Inseticida	Organoclorado
Propanil	Herbicida	Cloroanilida
2,4-D Éster	Herbicida	Fenoxiácido
Clorpirifós	Inseticida	Organofosforado
Bromoketal	Intermediário-químico	Produção de fungicidas
$\alpha$ -Endosulfan	Inseticida	Organoclorado
$\beta$ - Endosulfan	Inseticida	Organoclorado
Endosulfan sulfato	Metabólito do endosulfan	Organoclorado

A Tabela 2 apresenta os dados de identificação dos pesticidas e substâncias químicas selecionadas para o estudo, onde consta o nome comum, o nome oficial de acordo com as regras da IUPAC, o número de registro no CAS, a massa molecular e a fórmula estrutural.

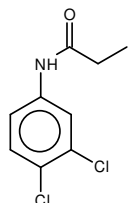
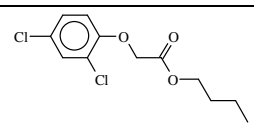
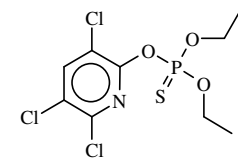
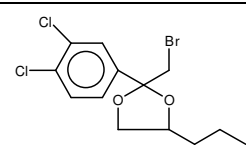
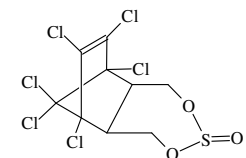
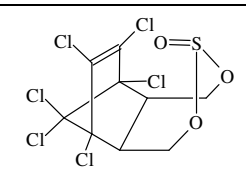
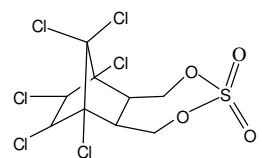
**Tabela 2:** Identificação dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para este estudo

Nome comum	Nome IUPAC	Número CAS	Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Fórmula Estrutural
PCBTF	4-cloro- $\alpha, \alpha, \alpha$ - trifluoro-tolueno	95-56-6	180,55	
Xileno (o+m+p)	o-xileno, m-xileno e p-xileno	95-47-6 108-38-3 e 106-42-3	106,16	
PCT	4-cloro-tolueno	106-43-1	126,58	
3,4-DCBTF	3,4-dicloro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-tolueno	328-84-7	215,00	
1,2-diclorobenzeno (padrão de controle)	1,2-dicloro-benzeno	95-50-1	147,01	
Nitrobenzeno (padrão de controle)	nitrobenzeno	98-95-3	123,11	
Mononitro	4-cloro-3-nitro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-tolueno	121-17-5	225,55	

## Continuação da Tabela 2

DDVP	2,2-dicloroetenol dimetil fosfato	62-73-7	220,97	
Triclorfon	dimetil 2,2,2-tricloro-1-hidroxi-etil-fosfonato	52-68-6	257,43	
DCPI	3,4-dicloro-fenil isocianato	102-36-3	188,10	
Diuron	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil-urea	330-54-1	233,09	
Dinitro	4-cloro-3,5-dinitro- $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-tolueno	393-75-9	270,55	
3,4-DCA	3,4-dicloro-anilina	95-76-1	162,01	
Ketona	1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-3-pentanona	66346-01-8	224,73	
Trifluralina	$\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina	1582-09-8	335,28	
Oxirano	2-[2-(4-Clorofenil)etil]-2-(1,1-dimetil-etil)-oxirano	80443-63-6	238,75	
Lindano	1,2,3,4,5,6-hexacloro-ciclohexano	58-89-9	290,83	

Continuação da Tabela 2

Propanil	3',4'-dicloro-propionanilida	709-98-08	218,08	
2,4-D Éster	butil, 2,4-diclorofenoxi-acetato	533-23-3	277,14	
Clorpirifós	o,o-dietil o-3,5,6-tricloro-2-piridi -fosforotioato	2921-88-2	350,58	
Bromoketal	2-bromometil-2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolano,	60207-89-8	354,07	
$\alpha$ -Endosulfan	1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo-(2,2,1)-hepteno-2,5,6,-bis(metileno) sulfito	959-98-8	406,92	
$\beta$ -Endosulfan	1,2,3,4,7,7a-hexacloro-biciclo-(2,2,1)-hepteno-2,5,6,-bis(metileno) sulfito	33213-65-9	406,92	
Endosulfan Sulfato	6,9-Methano-2,4,3-benzodioxathiepin, 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-, 3,3-dioxide	1031-07-8	422,9	

Na Tabela 3 estão relacionados dos dados físico-químicos obtidos de várias fontes bibliográficas e de fichas de informação de segurança de produtos químicos (FISPQ), incluindo o ponto de fusão (PF), o ponto de ebulição (PE) a solubilidade em água, o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), o coeficiente de adsorção em solo ( $K_{oc}$ ), a pressão de vapor (PV), o tempo de meia vida na água e no solo.

**Tabela 3:** Propriedades físico-químicas dos pesticidas e substâncias químicas escolhidas para este estudo

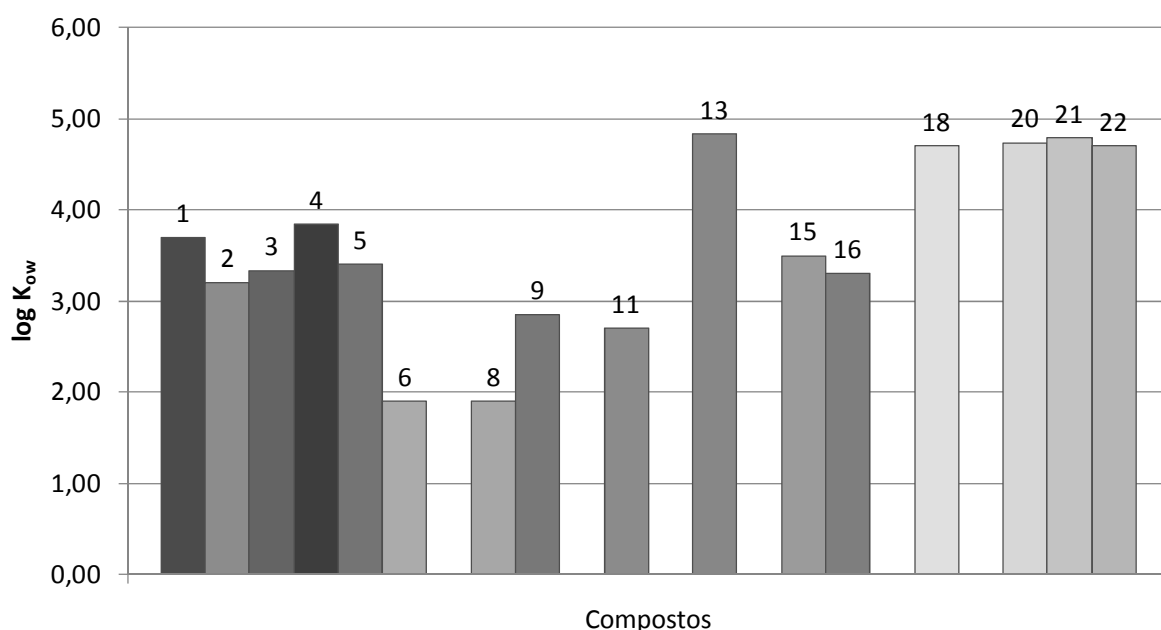
Nome comum	PF (°C)	PE (°C)	Solubilidade em H <sub>2</sub> O (mg L <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>	K <sub>oc</sub>	PV (mm Hg)	t <sub>1/2</sub> água (d)	t <sub>1/2</sub> solo (d)
PCBTf	-36	136-138	23 (23 °C)	3,7		7,98		
o- Xileno	-25	143-145	200	3,2		7 (20 °C)		
m-xileno		139	200	3,2		9 (20 °C)		
p-xileno	12-13	138	200	3,2		9 (20 °C)		
PCT	6-8	161,9	100 (20 °C)	3,33		2,79 (20 °C)		
3,4-DCBTf	(-13)- (-12)	173-174	11,6 (25 °C)	3,84		1,6		
1,2-dicloro-benzeno	-17,6	180,5	150 (25 °C)	3,4		1 (20 °C)		
Nitrobenzeno	5,7	210,9	1900 (20 °C)	1,9 (20 °C)		1 (44,4 °C)		
Mononitro		222,6	-	-		0,01 (20 °C)		
DDVP		245	18.000 (25 °C)	1,9 (20 °C)		2,1.10 <sup>-3</sup> (25 °C)	<1	<1
Triclorfon	76-77		120.000 (20 °C)	0,43 (20 °C)	20 ±10	7,8.10 <sup>-6</sup> (20 °C)	46 h (pH 7)	
DCPI		118-120	-	-				
Diuron	158-159		36,4 (25 °C)	2,85 (25 °C)	400	8,25.10 <sup>-9</sup> (25 °C)		92-180
Dinitro	56-58							
3,4-DCA	70-72,5	272	580	2,7		0,01		
Ketone		245						
Trifluralina	46,5- 48,5	139	0,2221 (20 °C)	4,83 (20 °C)	4400- 40000	0,000458	32,0	168,7
Oxirane		180						
Lindane	112,5	323,4	46,8 (20 °C)	3,5	22,1	0,00001 (20 °C)	172,8	980,0
Propanil	91,5		130 (25 °C)	3,3	518,0	0,026	2	1-2
2,4-D éster		250	9	-		-		
Clorpirifós	42-43,5		1,4 (25 °C)	4,7	1250- 12600	2,02.10 <sup>-5</sup> (25 °C)	1,5 (pH 8,0 e 25 °C)	33-56
Bromoketal			1,39 (20 °C)		125,2		58,1	113,3
α-Endosulfan	109,2		0,32 (22 °C)	4,74 (pH 5)	3.000- 20.000	6,22.10 <sup>-6</sup> (20 °C)	93,8	31,5
β- Endosulfan	213,3		0,33 (22 °C)	4,79 (pH 5)	3.000- 20.000	6,22.10 <sup>-6</sup> (20 °C)	93,8	31,5
Endosulfan sulfato	480,7		0,22	4,70 (pH 5)	8.500	6,22.10 <sup>-6</sup> (20 °C)	-	77

Onde: PF = Ponto de Fusão; PE = Ponto de Ebulição; K<sub>ow</sub> = coeficiente partição octanol-água; K<sub>oc</sub> = coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo; PV = pressão de vapor; t<sub>1/2</sub> água = tempo de meia-vida na água; t<sub>1/2</sub> solo = tempo de meia-vida no solo; d= dias;

Fonte: *Chemservice*, 2004; MILENIA, 2004; PAN, 2004; PRIMEL, 2003; *Pesticide Manual*, 2000-2001.

Para o procedimento de extração por DLLME, foco deste trabalho, entre as propriedades listadas na Tabela 3, as mais relevantes são o coeficiente de partição-octanol água, a pressão de vapor e a solubilidade em água.

O gráfico da Figura 1 apresenta uma comparação do  $\log K_{ow}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, sendo que para mononitro, dinitro, ketona, oxirano, 2,4-D éster e bromoketal 1 não foram encontrados valores de  $K_{ow}$  na literatura pesquisada.



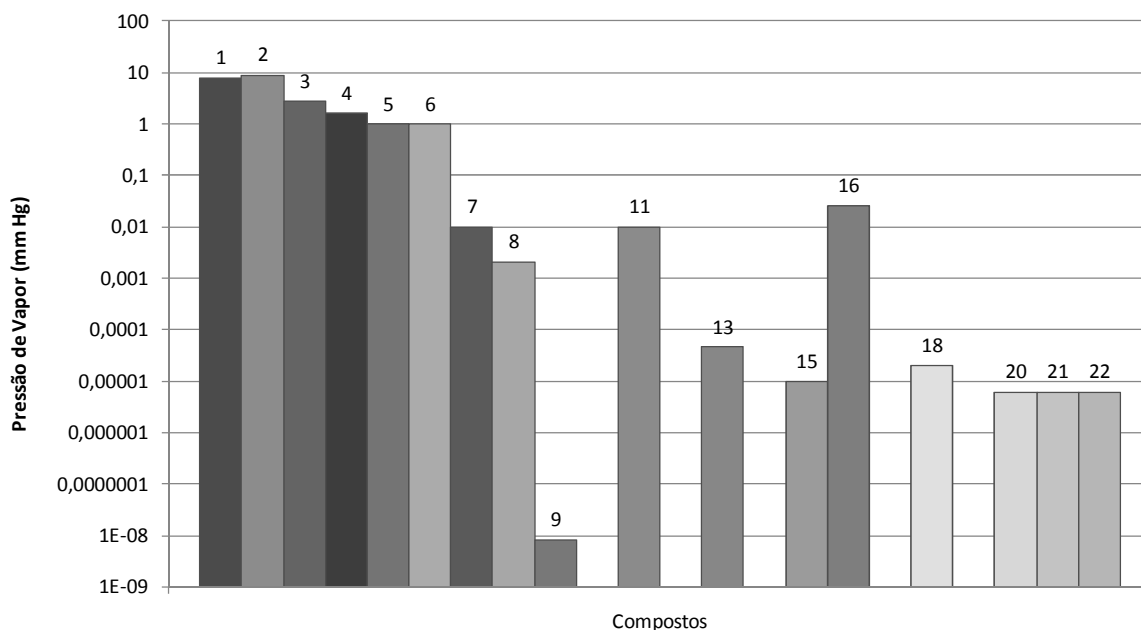
**Figura 1:** Gráfico comparativo para o logaritmo do coeficiente de partição-octanol água (Log  $K_{ow}$ )

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

A faixa de variação do  $\log K_{ow}$  é bastante ampla, entre 1,9 e 4,74, com substâncias químicas apresentando alta hidrofobicidade, com valores de  $\log K_{ow} > 2,5$  até substâncias químicas pouco hidrofóbicas com  $\log K_{ow}$  de 1,9, indicando que pode ser esperado um comportamento bem variado para a Extração Líquido-Líquido que é baseada no equilíbrio de partição entre fase orgânica e fase aquosa (CALDAS, 2009).



A Figura 2 apresenta uma comparação das pressões de vapor dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, sendo que para dinitro, ketona, oxirano, 2,4-D éster e bromoketal 1 não foram encontrados valores de pressão de vapor na literatura pesquisada.

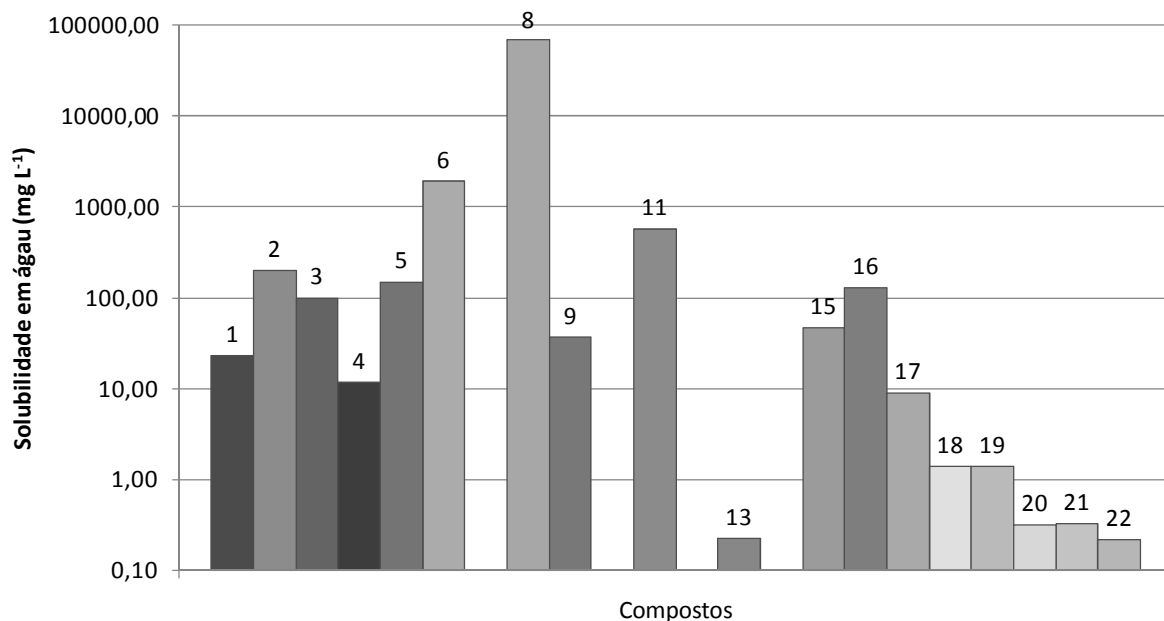


**Figura 2:** Gráfico comparativo das pressões de vapor (mm Hg) para os pesticidas e substâncias químicas em estudo

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloroanilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

Novamente se observa uma faixa de pressão de vapor bastante ampla, indicando uma alta volatilidade para PCBTF, xileno (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, 1,2-diclorobenzeno e nitrobenzeno. Além destes, a 3,4-dicloroanilina e o propanil apresentam pressões de vapor relativamente altas.

A Figura 3 apresenta a comparação da solubilidade em água para os pesticidas e substâncias químicas em estudo, sendo que para mononitro, dinitro, ketona e oxirano não foram encontrados valores de solubilidade em água na literatura pesquisada.



**Figura 3:** Gráfico comparativo das solubilidades em água ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para os pesticidas e substâncias químicas em estudo

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) cetona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

Da mesma maneira que observado para  $K_{ow}$  e para pressão de vapor, na Figura 3 também se observa uma grande variação das solubilidades em água. Destacam-se o DDVP e o triclorfon com solubilidade de 18.000 e 120.000  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivamente.

Na técnica DLLME a solubilidade em água pode interferir significativamente nas recuperações dependendo do solvente dispersor utilizado no procedimento.

### 2.3. Técnicas de extração para determinação de substâncias químicas em águas

Para determinação de resíduos de pesticidas a nível de traços, uma etapa de extração e pré-concentração é necessária. (XIA *et al.*, 2008).

A Extração Líquido-Líquido (**LLE**, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) é baseada na transferência do analito de uma amostra aquosa para um solvente imiscível em água. É uma técnica largamente utilizada para preparação de amostras. Entretanto alguns inconvenientes, tais como a formação de emulsão, utilização de grandes volumes de solventes tóxicos e a geração de grande quantidade de resíduos, tornam a LLE uma técnica muito trabalhosa, de alto custo, demorada e ambientalmente indesejada (PICHON, 2000).

Uma técnica de extração bastante utilizada atualmente é a Extração em Fase Sólida (**SPE**, do inglês *Solid Phase Extraction*) que utiliza uma quantidade menor de solvente em relação a LLE, mas esta quantidade de solvente ainda pode ser considerada significativa. Além disso, a SPE normalmente requer um etapa extra de concentração do extrato à um volume menor de solvente, o que não é aplicável para substâncias químicas com volatilidades alta (RAZAEI *et al.*, 2010).

A introdução da Microextração em Fase Sólida (**SPME**, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*) em 1990 despertou o interesse por técnicas de microextração na química analítica. Com a utilização da SPME, analitos de baixa e média polaridade podem ser extraídos de amostras aquosas ou gasosas em uma fibra polimérica sólida. A extração ocorre por difusão passiva e a recuperação é determinada pelo coeficiente de partição do analito entre a fibra de a amostra. É uma técnica portátil, de fácil utilização, relativamente rápida e pode ser automatizada e acoplada a instrumentação analítica. Entretanto, as fibras recobertas são de alto custo e para algumas aplicações tem vida útil muito curta (RAZAEI *et al.*, 2010).

Um método para determinação de 15 hidrocarbonetos aromáticos em amostras de resíduos sólidos produzidos durante a co-pirólise de plásticos e biomassa foi desenvolvido por BERNARDO *et al.* (2009). Comparativamente às técnicas Microextração em Fase Sólida por “Headspace” (HS-SPME) e amostragem estática por “Headspace” (HS). A DLLME teve uma eficiência de extração ligeiramente menor, mas se mostrou a única técnica capaz de extrair todas as substâncias químicas voláteis em estudo simultaneamente e com fator de pré-

concentração (fator de enriquecimento) adequado. As recuperações médias variaram de 60,6 a 113,9%, com repetitividade (RSD) entre 4,8 e 13,2%. Os LODs variaram de 0,66 a 37,85 ng L<sup>-1</sup>. Na aplicação deste método foram detectados bezeno, xileno, tolueno, etilbenzeno em altas concentrações, assim como foi detectada a presença de alquil-fenóis e outros compostos aromáticos em amostras de água.

A Microextração em Fase Líquida (**LPME**, do inglês *Liquid Phase Micro Extraction*) é uma alternativa para miniaturização do procedimento de extração. Esta técnica surgiu nos meados dos anos 90, e requer somente 1 microlitro para extração dos analitos de amostras aquosas (KHALILI-ZANJANI *et al.*, 2008). KHALILLI-ZANJANI *et al.* (2007) descreveram um método utilizando Microextração Em Fase Líquida, utilizando um pequeno volume (8 µL) de 1-undecanol adicionado na superfície de uma solução aquosa contendo os analitos e submetido a agitação e posteriormente a resfriamento até solidificação do 1-undecanol, que foi transferido para 1 frasco e fundido com posterior injeção no sistema cromatográfico. Após a validação onde foram obtidos LODs entre 0,07 e 1,67 µg L<sup>-1</sup> e a faixa de calibração linear de 0,25 a 300 µg L<sup>-1</sup>, com recuperações de 24 e 78% e RSD <7%. Este procedimento foi utilizado para análise de fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benz[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenz[ah]antraceno, indeno[123-cd]pireno e (12) benzo[ghi]perileno em amostras de água

A Microextração Em Gota Única Ou Micro Extração Em Gota Suspensa (**SDME**, do inglês *Single Drop Micro Extraction*) foi desenvolvida como um procedimento miniaturizado de pré-tratamento de amostra utilizando solvente. É um procedimento de baixo custo e com mínima exposição a solventes tóxicos, pois somente um volume muito pequeno de solvente é utilizado. No entanto apresenta algumas desvantagens, tais como: a agitação rápida de amostra tende a soltar a gota de solvente orgânico, prejudicando a robustez da técnica, a agitação também pode causar bolhas de ar, o tempo de extração é longo (PINTO *et al.*, 2010).

KHALILLI-ZANJANIA *et al.* (2008) desenvolveram um método utilizando Microextração em Fase Líquida, pela exposição de um gota suspensa de solvente orgânico na superfície de uma solução aquosa em um frasco selado, para determinação de concentrações traços de compostos organofosforados em amostras de água. Para determinação utilizaram Cromatografia Gasosa com

detecção por fotometria de Chama (GC-FPD, do inglês *Gas Chromatography with Flame Photometric Detection*). As recuperações obtidas variaram de 96 a 104%, os RSDs entre 3,5 e 8,9% e os LODs foram de 0,01 a 0,04  $\mu\text{g L}^{-1}$ , sendo o método proposto aplicado com êxito para determinação de pesticidas organofosforados em amostras de água.

Em 1999 a “Hollow Fiber” Microextração em Fase Líquida (**HF-LPME**, do inglês *Hollow Fiber – Liquid Phase Micro Extraction*) foi proposta como solução para aumentar a robustez da LPME. A HF-LPME utiliza a fase extratora (solvente orgânico) suportada no interior de uma fibra tubular que é colocada em contato com a amostra e agitada por um período determinado até o equilíbrio das fases. Esta técnica permite a extração e pré-concentração de analitos de amostras muito complexas de uma forma simples e barata.

A técnica de extração HF=LPME pode ser conduzida ainda utilizando dois solvente orgânicos imiscíveis, formando assim um sistema ternário com a fase aquosa (amostra). O analito é extraído da amostra aquosa para uma camada de solvente orgânico suportado na superfície da fibra e então transferido para um solvente aceptor localizado no interior a mesma. Desta forma a HF-LPME serve para extração, pré-concentração e purificação (*clean up*) do extrato obtido (GHAMBARIAN *et al.*, 2010).

Em geral a eficiência de extração obtida por HF-LPME é maior que obtida por SDME, pois a utilização de “hollow fibers” hidrofóbicas permite uma taxa de agitação alta, acelerando a cinética de extração. Além disso, o uso de “hollow fibers” protege a fase orgânica permitindo a análise de amostras mais “suja” e o pequeno tamanho dos poros propicia uma microfiltração das amostras, permitindo a obtenção de extratos muito “limpos” (PINTO *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2008).

Um método baseado na HF-LPME foi proposto por SANAGI *et al.* (2010) para determinação dos piretróides fenpropatrin, cialotrin, permetrin e tau-fluvalinato em amostras de água), obtendo LODs entre 3 e 7  $\text{ng L}^{-1}$ , recuperações de 96 e 102% e RSDs entre 4,6 a 7,9% e faixa linear de calibração entre 0,01 e 60  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Extração Em Ponto Nuvem (**CPE**, do inglês *Cloud Point Extraction*) é baseada na separação de fases que ocorre em soluções aquosas de surfactantes não iônicos aquecidas até a temperatura chamada “temperatura do ponto de nuvem”. Apesar dos benefícios da CPE, a escolha dos surfactantes pode ser um problema para os instrumentos analíticos como GC e HPLC. O uso de surfactantes aniônicos como

extratantes efetivos para CPE requer algumas vezes a utilização de sais e o ajuste do pH da solução (SILVA *et al.*, 2006). ZHOU *et al.* (2009) apresentaram um método para determinação de lisoniazida, substância utilizada no tratamento da tuberculose, em amostras de urina utilizando CPE com o surfactante o polietileno glicol e determinação por HPLC-UV. A faixa de calibração linear obtida foi de 0,002 a 20 mg L<sup>-1</sup>, as recuperações para três níveis de fortificação (0,05, 0,3 e 3,0 mg L<sup>-1</sup>) foram de 88,7, 90,3 e 94,1%, respectivamente. O LOD obtido foi 0,0005 mg L<sup>-1</sup>.

A Extração Líquido-Líquido Homogênea (**HLLE**, do inglês *Homogeneous Liquid-Liquid Extraction*) utiliza a separação de fases de uma solução homogênea, e os analitos são extraídos na fase sedimentada. As técnicas mais usuais utilizam um sistema ternário de solventes ou um surfactante perfluorado (RAZAEI *et al.*, 2010).

IGARASHI *et al.* (2000) utilizaram Extração Líquido-Líquido Homogênea em presença do íon perfluoro-octanato para pré-concentração de certos tipos de quelatos de metais como o di-etil-di-tio-carbamato, 1,10-fenantrolina e desferrioxamine B. Os valores de recuperação e RSD foram satisfatórios, ou seja, entre 83 e 100% e <5%, respectivamente.

OSHITE *et al.* (2001) determinaram 21 amino ácidos utilizando derivatização com fluorescência em condições básicas (pH 9) e Extração Líquido Líquido Homogênea com ácido perfluoro-octanóico (HPFOA) baseada em uma separação de fases em condições extremamente ácida. A faixa de calibração linear obtida foi de  $1,0 \cdot 10^{-8}$  a  $1,5 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, o RSD <4,5% e o LOD foi de  $8,9 \cdot 10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup>.

Recentemente foi proposta uma nova aplicação da LPME baseada na solidificação de uma gota orgânica flutuante (**LPME-SFO** *Liquid Phase Microextraction Method with Solidification of Floating Organic*). Nesta técnica suportes específicos não são necessários, devido ao uso de solventes orgânicos de densidade menor que a água e ponto de fusão adequado (PINTO *et al.*, 2010; RAZAEI *et al.*, 2010)

LIU *et al.* (2010) propuseram um método para determinação dos piretróides fenpropatrina, cialotrina, permetrina e tar-fluvalinato em amostras de água, empregando DLLME baseada na solidificação de gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) e determinação por GC-ECD. Este método foi considerado adequado pela avaliação dos parâmetros de validação do procedimento proposto, que foram: LODs entre 1,4 e 2,9 ng L<sup>-1</sup>, recuperações entre 73,9 e 114,5%, RSDs entre 2,6 e 5,1% e faixa de calibração linear de 2 a 1000 ng L<sup>-1</sup>.

A combinação de sistemas de microextração e ultrassom permite o desenvolvimento de técnicas eficientes de extração e pré-concentração, como a Microextração Por Emulsificação Assistida Por Ultrassom (**USAEME**, do inglês *Ultrasound-Assisted Emulsification–Microextraction*). Recentemente o uso para fins analíticos de emulsões geradas por ultra-som tem despertado um crescente interesse para aumentar a eficiência da LLE, uma vez que o ultrassom aumenta a velocidade de transferência de massas entre a fase aquosa e a fase orgânica, pois as gotas dispersas podem atuar como um processo de Microextração Líquido-Líquido Eficiente em Fase Contínua, sendo a fase orgânica separada posteriormente por centrifugação (REGUEIRO *et al.*, 2008). Estes autores desenvolveram um método baseado na USAEME e GC-MS para análises de fragrâncias de almíscar sintéticas, ésteres de ftalatos e lindano em amostras de água. Os LODs obtidos variaram entre 6,0 a 133 ng L<sup>-1</sup>, as recuperações variaram de 78 a 114% e os RSDs obtidos foram <14%. O método foi aplicado satisfatoriamente para extração e determinação das substâncias químicas avaliadas em amostras de água de várias origens.

### **2.3.1. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)**

Um desenvolvimento da Microextração em Gota Suspensa (SDME) proposto por REZAEE *et al.* (2006) é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*), proposta pela primeira vez em 2006 por BERIJANI *et al.*. Este método utiliza um solvente dispersivo, miscível no solvente extrator (fase orgânica) e na amostra (fase aquosa), sendo baseada em um sistema ternário de solventes como a HLLE a CPE (RAZAEE *et al.*, 2010).

Na DLLME o tempo de extração é definido como o intervalo entre a injeção da mistura do solvente dispersor e do solvente extrator antes da centrifugação. A área superficial entre o solvente de extração e a fase aquosa é infinitamente grande. Assim, a transferência dos analitos da fase aquosa para a fase extratora é rápida e, portanto, o estado de equilíbrio é atingido rapidamente (RAZAEE *et al.*, 2010)

O solvente é introduzido na amostra em um tubo apropriado, onde ocorre a extração dos analitos e após a mistura é centrifugada. O solvente extrator sedimentado no fundo do tubo é recolhido e injetado no sistema cromatográfico.

O método dispensa a agitação, como forma de mistura dos solventes com a amostra, podendo ser necessária agitação para decantar gotas de solvente aderidas as paredes do tubo de extração.

### 2.3.2. Princípios da DLLME

A DLLME baseia-se no processo de partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma delas a fase aquosa (a amostra) e a outra um fase orgânica (solvente orgânico) (HARRIS, 2001).

A solubilização do soluto em qualquer uma das fases é governada pela polaridade relativa do sistema, sendo que o soluto ou analito é geralmente apolar apresentando maior afinidade pela fase orgânica, que é um solvente orgânico apolar em comparação com a fase aquosa, que é por sua vez, altamente polar.

A polaridade de uma molécula refere-se às concentrações de cargas da nuvem eletrônica em volta da molécula. Moléculas polares possuem maior concentração de carga negativa numa parte da nuvem e maior concentração positiva em outro extremo. Nas moléculas apolares, a carga eletrônica está uniformemente distribuída.

As diferenças de cargas elétricas entre as moléculas do(s) analito(s), da fase aquosa ou polar e da fase orgânica ou apolar, é que determinam o equilíbrio resultante (HARRIS, 2001), que pode ser representado por:

$$A_{eq} \rightleftharpoons A_{org} \quad (1)$$

No caso ideal, a razão das atividades de A nas duas fases é uma constante e independe da quantidade de A, sendo que para uma temperatura dada, a constante de equilíbrio,  $K_D$ , é o coeficiente de partição ou distribuição (HARRIS, 2001), sendo representada como:

$$K_D = \frac{[A_{org}]}{[A_{aq}]} \quad (2)$$

Onde:

A: soluto A

Aq: fase aquosa



Org: fase orgânica

$K_D$ : coeficiente de distribuição ou partição

[ ]: atividade ou concentração relativa do soluto A

Alguns fatores afetam a polaridade relativa do sistema, tais como presença ou adição de sais, alterações no pH da fase aquosa, modificadores químicos ou misturas de solventes solúveis ou parcialmente solúveis na fase aquosa.

Após o tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio da partição do soluto ou analito, as fases são separadas, ficando a fase aquosa com uma quantidade remanescente do soluto.

A fase orgânica ou extrato conterá o restante do soluto ou analito, se esta quantidade for próxima a 100% pode ser considerada uma técnica de extração exaustiva, caso contrário, será considerada uma técnica de equilíbrio (OLIVEIRA, 2008).

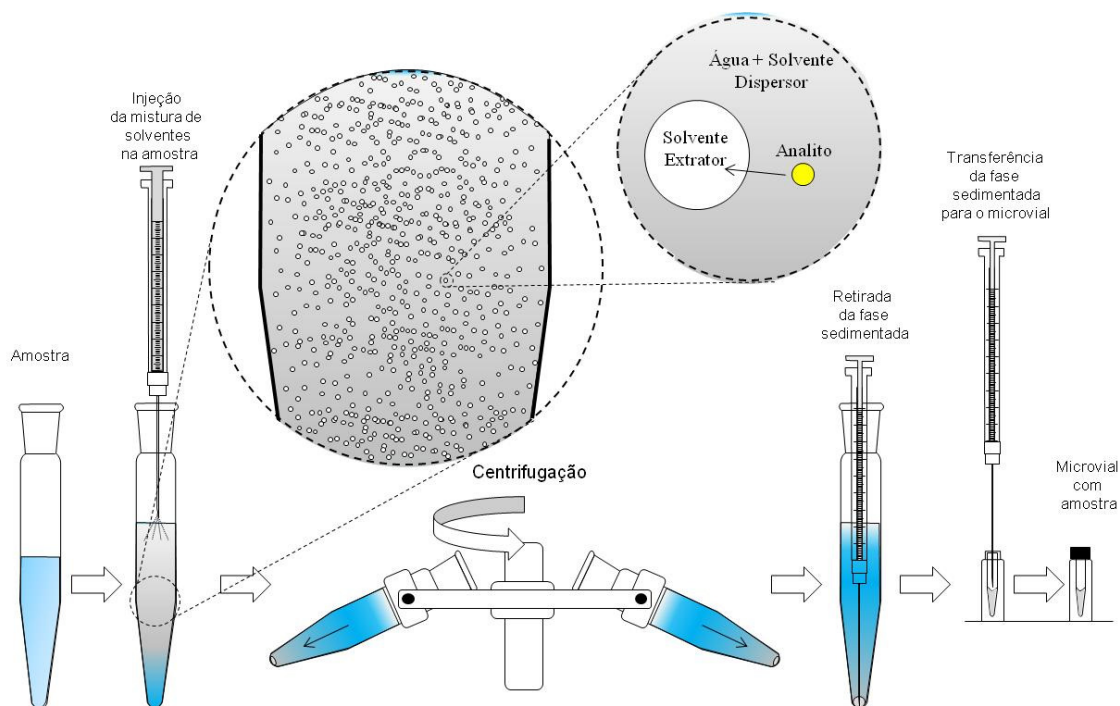
### **2.3.3. Descrição das etapas da DLLME**

A técnica DLLME é realizada em duas etapas:

Primeira: Injeção de uma mistura adequada dos solventes extrator e dispersor na amostra aquosa contendo os analitos. Nesta etapa o solvente extrator é disperso na fase aquosa em gotas muito finas extraindo os analitos. Devido a grande área superficial entre o solvente extrator e a amostra aquosa, o equilíbrio é atingido rapidamente e a extração é independente do tempo, sendo esta a principal vantagem deste método (RAZAEI, *et al.*, 2010).

Segunda: Centrifugação da solução turva. Após a centrifugação, os analitos na fase sedimentada podem ser determinados por instrumentos analíticos.

A Figura 4 apresenta as etapas normalmente utilizadas na técnica DLLME.



**Figura 4:** Diagrama simplificado demonstrando as etapas da DLLME, adaptado de (BERIJANI *et al.*, 2006)

Os fatores que afetam a eficiência da extração por DLLME, são: (1) tipo de solvente extrator, (2) tipo de solvente dispensor, (3) volume do solvente extrator e (4) volume do solvente dispensor.

O principal parâmetro a ser definido para a otimização de um procedimento de extração por DLLME é o **tipo de solvente extrator**, que deve ser escolhido com base na sua densidade, capacidade de extração dos analitos de interesse e adequação a técnica cromatográfica escolhida.

O **volume do solvente extrator** é o que determina o fator de pré-concentração. Aumentando o volume do solvente extrator, o volume da fase sedimentada obtido com a centrifugação aumenta, resultando em um menor fator de pré-concentração. Portanto, o volume ótimo de solvente extrator deve garantir tanto um alto fator de pré-concentração quanto permitir a obtenção de um volume de fase sedimentada suficiente para as análises subseqüentes.

O parâmetro fundamental para escolha do **tipo de solvente dispensor** é sua solubilidade tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa.

Já o **volume de solvente dispensor** afeta diretamente a formação da solução turva com micro-gotas água/solvente dispensor/solvente extrator, o grau de

dispersão do solvente na fase aquosa e, conseqüentemente, da eficiência da extração.

Variações no volume do solvente dispersor causam variações no volume da fase sedimentada, tornando necessário, modificar simultaneamente o volume do solvente extrator e o volume do solvente dispersor para manter constante o volume da fase sedimentada. O volume adequado de solvente dispersor para uma boa formação da solução turva com micro-gotas depende tanto do volume da fase aquosa quanto do volume do solvente extrator.

Em DLLME os fatores mais importantes que afetam o volume da fase sedimentada são: (1) solubilidade do solvente extrator em água, (2) volume e características da amostra, (3) volume do solvente dispersor e (4) volume do solvente extrator.

Do ponto de vista experimental, para obter o volume desejado de fase sedimentada, alguns testes iniciais devem ser efetuados antes do início da otimização (KOZANI *et al.*, 2007).

#### **2.3.4. Solventes para extração DLLME**

Os requisitos para o solvente extrator a ser utilizado são:

- densidade maior que a água, de forma a permitir a formação da fase sedimentada (entretanto algumas aplicações tem utilizado solventes extratores com densidade menor que a da água (LEONG *et al.*, 2008).
- pressão de vapor relativamente baixa e temperatura de ebulição relativamente alta, para evitar perdas significativas de solvente durante o processo de extração.
- baixa solubilidade em água, permitindo a separação do extrato orgânico.

Na Tabela 4 estão listadas as propriedades dos principais solventes de uso comum em laboratórios de análises.

**Tabela 4:** Propriedades físico-químicas de alguns solventes passíveis de serem utilizados como solventes extratores e dispersores.

Solvente	Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em água (g L <sup>-1</sup> a 20 °C)	Ponto de fusão (° C)	Densidade (g cm <sup>3</sup> a 20 °C)	Ponto de Ebulição (°C a 1013 hPa)	Pressão de Vapor (mm Hg a 20 °C)
<b>Extratores</b>						
Tetracloroeto de Carbono	153,8	0,8	-23	1,59	76,7	90
Clorofórmio	119,4	8	-63	1,47	61	158
Diclorometano	84,9	20	-95	1,33	40	356
1,2-Dicloroetano	99,0	8,7	-35,5	1,25	83,5 - 84,1	65
Acetato de etila	88,1	85,3	-83	0,90	77	73
1-Clorobutano	92,6	0,5	-123	0,886	79	83
Benzeno	78,1	1,8	5,5	0,88	80,1	76
Tolueno	92,1	0,52	-95	0,87	110,6	22
1-Butanol	74,1	77	-89	0,81	116 - 118	5
Éter tert-butil-metilco	88,2	42	-108,6	0,74	55,3	201
Ciclohexano	84,2	0,055	6	0,78	81	77
Isooctano	114,2	0,00056	-107	0,69	99	38
n-Heptano	100,2	0,05	-90,5	0,68	97 - 98	36
n-Hexano	86,2	0,0095	-94,3	0,66	69	120
<b>Dispersores</b>						
Tetrahidrofurano	72,1	solúvel	-108,5	0,89	65 - 66	-
1,4-Dioxano	88,1	solúvel	12	1,03	101,5	31
1-Propanol	60,1	solúvel	-127	0,80	96,5 - 98	14
Metanol	32,0	solúvel	-98	0,792	64,5	96
Etanol	46,1	solúvel	-114,5	0,79	78,3	44
Acetona	58,1	solúvel	-95,4	0,79	56,2	175
Acetonitrila	41,5	solúvel	-45,7	0,786	81,6	73
2-Propanol	60,1	solúvel	-89,5	0,786	82,4	32

Fonte: Merck, 2010 (<http://www.merck-chemicals.com.br/solventes-para-cromatografia-analitica-lichrosolv->).

Dentre eles, o tetracloroeto de carbono, o clorofórmio, o diclorometano e 1,2-dicloroetano atendem os requisitos listados, sendo que diclorometano apresenta

ponto de ebulição relativamente baixo podendo causar perdas significativas por volatilização. O 1,2-dicloroetano é um contaminante de interesse na avaliação de efluentes e áreas contaminadas, não sendo recomendado seu uso em análises de rotina.

### 2.3.5. Aplicações da DLLME

Os últimos desenvolvimentos da DLLME incluem aplicações para variados grupos de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas em vários tipos de matriz.

FATTAHI *et al.* (2007) desenvolveram uma técnica de pré-concentração combinando a SPE com DLLME para determinação de clorofenóis em amostras de água. O clorofenóis foram extraídos de 100 mL de amostra aquosa em 100 mg de fase polimérica de estireno divinil-benzeno funcionalizado (PPL). Após a eluição utilizando acetona foi utilizada DLLME na solução obtida, empregando clorobezeno (solvente extrator) e acetona (solvente dispersor). Para a determinação empregaram GC-ECD. A faixa de calibração linear obtida foi 0,001 - 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , as recuperações foram de 71 e 121%, e os LODs ficaram entre 0,0005 e 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Em um estudo publicado em 2007 por KOZANI, *et al.* foi desenvolvido um método simples, rápido e eficiente utilizando DLLME e GC-ECD para extração e determinação de clorobenzenos (1,2-diclorobenzeno, 1,3-diclorobenzeno, 1,4-diclorobenzeno, 1,2,3-triclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno, 1,3,5-triclorobenzeno, 1,2,3,4-tetraclorobenzeno, 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, pentaclorobenzeno e hexaclorobenzeno) em amostras de água. Foi utilizado clorobenzeno como solvente extrator e acetona solvente dispersor. O método foi adequado para a extração e análise dos pesticidas em estudo.

Um método simples e rápido utilizando DLLME e determinação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas com detector do tipo Ion Trap (GC-(IT)MS, do inglês *Gas Chromatography with Mass Spectrometry with Ion Trap Detector*) foi utilizada por NAGARAJU *et al.* (2007) para determinação dos herbicidas atrazina, desmetrina, simazia, prometrina, propazina, sebutilazina, sebumeton e simetrina do grupo das triazinas em amostras de água. Os solventes extrator e dispersor utilizados foram clorobezeno e acetona, respectivamente. Os

valores de recuperação e RSD foram satisfatórios, ou seja, entre 85,2 e 119,4% e entre 1,4 e 8,7%, respectivamente.

Em 2007 FARAHANI *et al.* desenvolveram um método simples, rápido e eficiente para determinação de ésteres de ftalatos (dimetil-ftalato, di-alil-ftalato, di-n-butil-ftalato, benzil-butil-ftalato, di-ciclo-hexil-ftalato e di-2-etil-hexil-ftalato) em amostras de água utilizando extração por DLLME e determinação por GC-MS. A DLLME foi executada empregando clorobenzeno (solvente extrator) e acetona (solvente dispersor). A faixa de calibração linear obtida foi de 0,01 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , as recuperações foram de 68,1 e 88,9%, e os LODs foram de 0,002 e 0,008  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

XIA *et al.* (2008) desenvolveram um método para determinação de metacrate (metolcarb, pesticida do grupo dos carbamatos), otimizando as variáveis relevantes, como o volume do solvente extrator (116  $\mu\text{L}$  de diclorometano) e dispersor (565  $\mu\text{L}$  de metanol), efeito da adição de sal, volume de amostra e tempo de extração utilizando um método de planejamento de experimentos e ajuda de gráficos de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) para otimização da DLLME com determinação cromatográfica. Na validação do método a recuperações obtidas com amostras reais variaram de 96,7 e 101,8%, com RSDs menores que 5,7%, o LOD obtido foi de 1  $\text{ng mL}^{-1}$  e faixa linear de 0,01 a 10,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , demonstrando que o método proposto é adequado para análise de metacrate em amostras de água.

MELWANKI *et al.* (2008) demonstraram que a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva Particionada (PDLLME, do inglês *Partitioned Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*) foi eficiente para extração de substâncias químicas orgânicas polares (ácidos cloro-fenóxi-acéticos) previamente a determinação por HPLC. O método proposto foi baseado na formação de gotas muito finas de um solvente extrator orgânico na amostra de água (água de rio) pela injeção de uma mistura de um solvente insolúvel em água (tetracloroetileno) dissolvido em um solvente solúvel em água (tetrahydrofurano). O método foi adequado para a extração e análise de ácido-cloro-fenóxi-acéticos em amostras de água superficial.

MELWANKI *et al.* (2008) desenvolveram uma técnica semi-automática de extração por DLLME seguida de extração reversa por DLLME no interior de uma seringa, para determinação por Cromatografia Líquida. Após o extrato obtido inicialmente por DLLME, ser separado por centrifugação, a fase sedimentada foi transferida para uma seringa, para extração reversa para fase aquosa acidificada

por 1% de ácido fórmico. A válvula da seringa foi fechada e o plunger movimentado rapidamente para trás, formando um filme orgânico fino, de forma a aumentar a superfície de contato entre as duas fases, com o analito protonado sendo extraído para a fase aquosa. Este método foi utilizado para extração e determinação de clenbuterol em amostras de água, sendo que a recuperação obtida foi de 97%, o LOD de  $4,9 \text{ ng mL}^{-1}$  e a faixa linear foi de 10 a  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ .

Recentemente um método foi desenvolvido e otimizado para análise rápida de resíduos de 24 pesticidas em suco de maçã empregando DLLME e Cromatografia Gasosa Multidimensional Acoplada à Espectrometria de Massas (MD-GC/MS, do inglês *Gas Chromatography Multi-Dimensional with Mass Spectrometry*) (CUNHA *et al.*, 2009). As recuperações médias obtidas em três níveis de concentração variaram de 60 a 105%, com repetitividade (RSD) entre 1 e 21%. Os LODs variaram de 0,06 a  $2,20 \mu\text{g L}^{-1}$ . Na aplicação deste método em suco foi detectado o resíduo de captan em duas de um total de 28 amostras.

LEONG & HUANG (2008) desenvolveram um método utilizando DLLME baseada na solidificação de uma gota de solvente orgânico flutuante (DLLME-SFO) combinada com GC-ECD ou GC-MS para determinação de solvente orgânicos halogenados em amostras de água. Na DLLME utilizaram os solventes o dodecanol (solvente extrator) e a acetona (solvente dispersor). A faixa de calibração linear obtida foi de 0,01 a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , as recuperações foram de 83 e 102%, e os LODs foram de 0,005 e  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ .

ZHOU *et al.* (2008) apresentaram uma nova abordagem para determinação de pesticidas organofosforados baseada na Microextração em Fase Líquido Dispersiva com Utilização de Líquido Iônico e Temperatura Controlada (TCIL-DLLME) com detecção por Cromatografia Líquida Com Detecção Espectrofotométrica No Ultravioleta (HPLC-UV, do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection*), obtendo LODs entre 0,17 e  $0,29 \text{ ng mL}^{-1}$  e a faixa de calibração linear de 1 a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ , com recuperações de 88,2 e 103,6% e RSD de 2,5 a 2,7%.

LIU *et al.* (2009) desenvolveram um método analítico combinando a SPE com a DLLME para determinar difenil éteres poli-bromados em amostras de água e de plantas. As curvas de calibração obtidas apresentaram faixa linear entre 0,1 e  $100 \text{ ng L}^{-1}$  para os congêneres 28 e 47 e de 0,5 a  $500 \text{ ng L}^{-1}$  para os congêneres 100, 99, 85, 154 e 153. Os RSDs e os LODs ficaram na faixa entre 5,9 e 11,3% e 0,03 a  $0,15$

ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. As recuperações obtidas para amostras de água de poço, de rio, do mar, lixiviado e em amostras de trevo fortificadas com difenil éteres polibromados ficaram entre 62,1 a 110,4%, demonstrando que o método desenvolvido foi adequado para determinações em amostras de água e de plantas (trevos).

Um procedimento de microextração chamado Microextração Líquido-Líquido Dispersiva com Líquido Iônico (IL-DLLME, do inglês *Ionic Liquid – Dispersive Liquid-Liquid Micro Extraction*) combinando Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD) foi desenvolvida para determinação dos inseticidas fipronil, clorfenapir, buprofezin e hexitiazox em amostras de água (LIU *et al.*, 2009). Este método foi considerado adequado aos objetivos propostos, uma vez que foram obtidos LODs de 0,53 e 1,28 µg L<sup>-1</sup>, faixa de calibração linear de 2 a 100 µg L<sup>-1</sup>, recuperações entre 79 e 110% e RSDs entre 4,5 a 10,7%.

XIONG *et al.* (2009) desenvolveram um método utilizando DLLME e HPLC-UV para determinação das drogas psicotrópicas amitriptilina, clomipramine e tioridazine em amostras de urina. As recuperações obtidas para amitriptilina, clomipramine e tioridazine foram de 96, 97 e 101%, respectivamente, com repetitividade (RSD) de, no máximo, 4,8%. Para a amitriptilina o LOD obtido foi de 3 ng mL<sup>-1</sup> e o LOQ obtido de 10 µg L<sup>-1</sup>, para clomipramine, foram de 7 e 21 µg L<sup>-1</sup> e para tioridazine de 8 e 25 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

CHEN *et al.* (2009) desenvolveram um procedimento para extração e determinação de cloranfenicol e thianfenicol em amostras de mel utilizando DLLME e HPLC-UV, obtendo LODs de 0,6 e 0,1 µg kg<sup>-1</sup> e uma faixa de calibração linear de 2 a 2000 µg kg<sup>-1</sup>, com recuperações de 68,2 e 87,9% e RSD de 4,3 a 6,2%, para cloramfenicol e thianfenicol, respectivamente.

FU *et al.* (2009) desenvolveram uma técnica rápida e sensível para a pré-concentração de amostras utilizando DLLME e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Fluorescência (HPLC-FLD, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescent Detection*) para determinação de resíduos dos pesticidas carbaril e triazofós em amostras de água e suco de frutas. Esta técnica foi considerada adequada pela avaliação dos parâmetros de validação do procedimento proposto, que foram: LODs entre 12,3 a 16,0 pg mL<sup>-1</sup>, recuperações entre 80,4 e 117,9%, RSDs entre 1,38 e 2,74% e faixa de calibração linear de 0,1 a 1000 µg L<sup>-1</sup>.



SERESHTI *et al.* (2009) utilizaram DLLME e GC-MS para investigação da composição da água de rosas. A seleção dos parâmetros do procedimento, tais como volume do solvente extrator e dispersor, temperatura e efeito da adição de sal foram otimizados utilização planejamento fatorial para identificação dos parâmetros de suas interações. O método foi adequado para a extração e análise dos pesticidas em estudo.

LIU *et al.* (2009) desenvolveram um método para determinação de cinco pesticidas do grupo dos carbamatos (metolcarb, carbofuran, carbaril, isoprocarb e diethofencarb) em amostras de água utilizando DLLME e HPLC-DAD. Os LODs obtidos foram de 0,1 a 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , as recuperações variaram de 86 a 97,2%, com RSDs de 3,5 a 8,7% e faixa de calibração linear de 5 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Com isso método foi aplicado satisfatoriamente para determinação de amostras de água.

DANESHFAR *et al.* (2009) propuseram um método baseado na extração por DLLME e determinação por HPLC-UV para determinação de colesterol em amostras de alimentos, obtendo o LOD de 0,01  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o LOQ de 0,03  $\mu\text{g L}^{-1}$ , faixa linear de 0,03 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  e recuperações amostras de leite, ovos e azeite de olivas fortificadas, variando entre 95 e 105%, respectivamente. Estes resultados demonstraram que o método proposto é adequado para aplicação pretendida.

Um procedimento com baixa exposição a solventes tóxicos utilizando Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (LT-DLLME, do inglês *Low Toxicity Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) combinado com GC-MS foi desenvolvido para extração e quantificação de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) em amostras de água. Nos procedimentos típicos com DLLME, solventes clorados têm sido largamente utilizados. Devido aos riscos ambientais e para saúde humana na utilização deste tipo de solvente, LEONG *et al.* (2010) propuseram a utilização de 1-bromo-3-metil-butano como solvente extrator. Na validação do método foram obtidas recuperações em 87 e 105%, com RSDs entre 5,1 e 10,0%, LODs entre 0,0003 e 0,0078  $\mu\text{g L}^{-1}$ , faixa linear de 0,01 a 10,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

YAN *et al.* (2010), desenvolveram um método utilizando US-DLLME e HPLC para análise de seis piretróides em amostras de água superficial. Este procedimento foi baseado na utilização de um sistema ternário de solvente e de ultrassom para auxiliar a formação de microgotas do solvente extrator da amostra de água. Com recuperações de 86,2 a 109,3% obtidas para amostras fortificadas, o método se

mostrou adequado para a extração e determinação dos seis piretróides avaliados em amostras de água superficial.

KAMAREI *et al.* (2010) pesquisaram Microextração em Fase Líquida Dispersiva por Líquido Iônico com Temperatura Controlada (TCIL-DLPME) e detecção com HPLC-DAD para extração, pré-concentração e determinação de clorobenzenos (1,2-Diclorobenzeno, 1,3-diclorobenzeno, 1,4-diclorobenzeno, 1,2,3-triclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno) em amostras de água de poço. Na validação do método os LODs obtidos ficaram entre 0,05 e 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A faixa linear determinada foi de 0,5 a 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As recuperações obtidas ficaram entre 91 e 110% com RSD <9,2%, demonstrando que o método é adequado para o objetivo proposto.

CALDAS *et al.* (2010) desenvolveram e validaram um método analítico para extração e pré-concentração de três pesticidas de diferentes classes: carbofuran (inseticida), clomazone (herbicida) e tebuconazol (fungicida), em amostras aquosas utilizando DLLME e determinação por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*). O LOQ obtido para o método, considerando um fator de pré-concentração de 50 vezes foi de 0,02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , as recuperações variaram de 62,7 a 120,0%, com RSDs de 1,9 a 9,1% e faixa de calibração linear de 1 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Este método foi aplicado para extração, pré-concentração e determinação de pesticidas em amostras de água, obtendo resultados satisfatórios.

YAN *et al.* (2011) utilizaram DLLME assistida por ultrassom e HPLC-UV, para determinação de fluoro-quinolinas (ofloxacina, norfloxacina, enroflaxacina e lomefloxacina) em efluente de indústria farmacêutica. Na validação do método foram obtidas recuperações em 82,7 e 110,9%, com RSDs menores que 5,2%, LODs entre 0,14 e 0,81  $\mu\text{g L}^{-1}$ , faixa linear de 0,01 a 2,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## 2.4. Espectrometria de massas para determinação de substâncias químicas orgânicas em água

A Espectrometria de Massas é uma técnica de detecção amplamente utilizada em Cromatografia Gasosa permitindo a obtenção de informação qualitativa e quantitativa a respeito dos componentes de uma mistura (HARRIS, 2001).

Segundo SKOOG & LEARY (1992), a Espectrometria de Massas é uma das técnicas analíticas mais importantes, uma vez que é capaz de prover informação sobre:

- a) composição qualitativa e quantitativa de analitos orgânicos e inorgânicos em misturas complexas;
- b) as estruturas de uma grande variedade de espécies moleculares complexas;
- c) razão isotópica de átomos em amostras;
- d) a estrutura e composição de superfícies sólidas.

Quando combinada à Cromatografia, a Espectrometria de Massas apresenta as seguintes características:

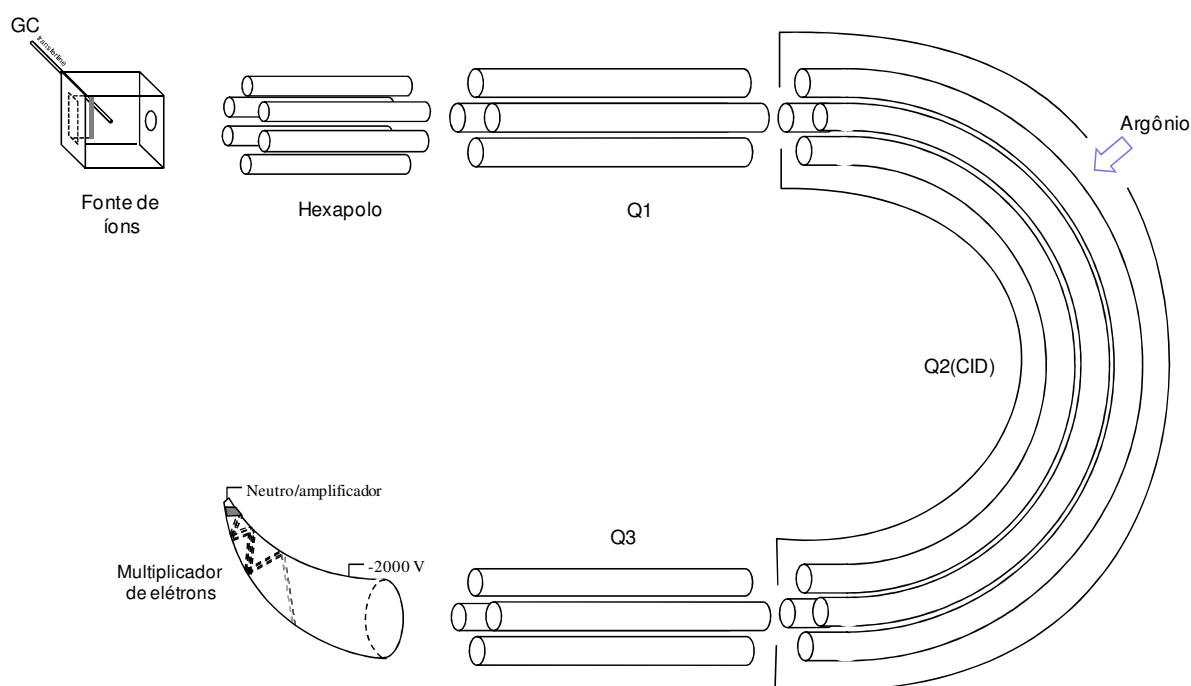
- O espectrômetro pode ser altamente seletivo para o constituinte de interesse;
- Requer procedimentos mais simples para preparação da amostra;
- A separação cromatográfica não precisa ser completa, pois é possível a separação do sinal de cada substâncias químicas pelos seus íons característicos;
- Maior razão sinal/ruído e conseqüentemente detectabilidade mais alta.

Quando o espectrômetro de massas é utilizado sozinho como técnica qualitativa ou quando acoplado a um cromatógrafo a gás, as moléculas do analito no estado gasoso são ionizadas (geralmente para formarem cátions), aceleradas por um campo elétrico, e então separadas de acordo com sua massa (HARRIS, 2001).

Resolução é a capacidade de um espectrômetro de massas diferenciar entre massas, considerando dois picos adjacentes e cuja altura do vale entre eles não é maior que 10% de suas alturas. São ditos de baixa resolução os espectrômetros de massas capazes de diferenciar unidades de massas. Já os equipamentos de alta resolução conseguem diferenciar até quatro casas decimais (SKOOG & LEARY, 1992).

Atualmente, a configuração bastante utilizada em GC-MS, é a que resulta do acoplamento do sistema de Cromatografia Gasosa com Analisador do Tipo Triplo Quadrupolo (TQ). Nos instrumentos do tipo TQ, o íon de interesse é pré-selecionado no primeiro quadrupolo (Q1), após, o íon é ativado com energias de até 300 eV na câmara de colisão (Q2), previamente pressurizada com argônio. Os fragmentos desta colisão, são analisados no terceiro quadrupolo (Q3). Este processo, caracterizado pela baixa energia, é conhecido como dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation, CID*), tem como vantagem a certeza sobre a origem dos fragmentos, uma vez que o íon precursor é selecionado antes da colisão (KUSTER *et al.*, 2006; PÍCO *et al.*, 2004).

Um desenho esquemático simples de um espectrômetro do tipo triplo quadrupolo pode se visto na Figura 5.



**Figura 5:** Espectrômetro de Massa Triplo Quadrupolo

A seguir, serão descritos os modos de operação, ou seja, de que maneiras o espectrômetro de massas pode ser programado para aquisição dos dados:

**a) Scan:** Neste modo de operação o espectrômetro de massas é programado de forma a analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma faixa determinada de  $m/z$ . Por exemplo, de 50 a 650  $m/z$  (VÉKEY, 2001).

**b) SIS ou SIM:** No modo SIS (do inglês *Selected Ion Storage*) ou SIM (do inglês, *Single Ion Monitoring*) após a ionização o espectrômetro faz a separação de somente um íon específico, o que aumenta a sensibilidade uma vez que os íons correspondentes ao ruído são ejetados sem chegar ao detector. Em alguns equipamentos podem ser selecionados até três íons simultaneamente (VÉKEY, 2001).

**c) MS-MS, Tandem MS, MS<sup>n</sup>:** Dependendo do tipo de espectrômetro de massas esta técnica pode ser considerada como um modo de operação, como no caso do Ion Trap ou requer uma instrumentação diferente que é o caso do Triplo Quadrupolo.

Uma mistura de íons entra no primeiro quadrupolo (Q1), que deixa passar somente uma determinada massa para o segundo estágio, Q2. O segundo estágio é chamado célula de colisão induzida (CID, do inglês: *Collision Induced Cell*) preenchido com N<sub>2</sub> ou Ar a uma pressão de 0,1 Pa. O íon precursor selecionado em Q1 colide com o N<sub>2</sub> ou Ar com energia suficiente para se quebrar em fragmentos chamados resultantes. O quadrupolo Q3 seleciona apenas um tipo de íon resultante para passar para o detector (HARRIS, 2001).

Nos espectrômetros tipo Ion Trap o composto é fragmentado, o íon é selecionado dentro da câmara, as massas não desejadas são ejetadas, o íon selecionado sofre nova fragmentação, e os íons resultantes são ejetados para o detector. Como os íons ficam confinados em órbitas estáveis, este processo pode ser repetido mais vezes (MS<sup>n</sup>) (VÉKEY, 2001).

**d) MRM:** No modo de operação de monitoração de reações múltiplas (MRM – Multiple Reactions Monitoring) o espectrômetro é programado de forma que dois ou mais íons são separados (SIM) e estes íons são fragmentados novamente (MS/MS). É extremamente útil quando a separação cromatográfica não é completa (VÉKEY, 2001).

Os íons formados e separados no espectrômetro de massas são detectados pelo multiplicador de elétrons, que é muito semelhante aos fotomultiplicadores

utilizados para detecção de radiação ultravioleta ou visível. O tipo mais comum é o eletromultiplicador de dínodo contínuo, que tem a forma de uma trombeta de vidro revestida de chumbo. Um potencial de 1,9 a 3 kV é aplicado ao longo do detector. Os íons, ao colidir com as paredes da entrada ejetam elétrons que novamente colidem com as paredes curvas do detector ejetando mais elétrons a cada impacto. Um ganho de corrente entre  $10^5$  e  $10^8$  pode ser atingido (SKOOG E LEARY, 1992).

## 2.5. Validação do método cromatográfico

RIBANI *et al.* (2004) estudaram a validação de métodos cromatográficos, com o objetivo de comentar os principais aspectos de validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, mostrando as diferenças e similaridades entre as diretrizes estabelecidas pelas diferentes agências reguladoras internacionais e do Brasil. Os parâmetros analíticos necessários para a validação de métodos são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2003; SANCO, 2007).

Existe vasta literatura na área de medições químicas e recomendações publicadas por organizações nacionais e internacionais. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são órgãos credenciados para avaliar a competência destes ensaios. Os parâmetros preconizados pelo ICH (*International Conference on Harmonization*) e o INMETRO são: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2007).

### 2.5.1. Seletividade

A seletividade em um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, como por exemplo: outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outras substâncias químicas de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo SHABIR (2003) e RIBANI *et al.* (2004), a seletividade em matrizes complexas por ser avaliada por alguns testes como:

- a) Comparar a matriz isenta de substância de interesse e esta adicionada de padrão. O analito deve se apresentar isolado de qualquer possível interferente;
- b) Caso a matriz isenta de substância não seja possível, pode-se confrontar uma curva analítica do padrão e outra do padrão adicionado à amostra. Curvas paralelas indicam que a matriz não interfere na determinação de substância de interesse;
- c) Analisar se as respostas (picos) do analito na amostra e de uma substância de referência pura são equivalentes.
- d) Avaliar a semelhança do resultado do método com relação à outra técnica mais específica como espectrometria de massas.

### **2.5.2. Curva analítica e ajuste do modelo de calibração**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004). Esse parâmetro pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação da curva analítica (BRITO, 2003; SANCO, 2007).

### **2.5.3. Sensibilidade**

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequeno incremento na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção (LOD) (AMARANTE, 2001).



A sensibilidade por ser determinada por intermédio da inclinação do gráfico de calibração. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível será o método. Para comparação da sensibilidade de dois métodos analíticos utilizam-se as equações das duas retas. A que apresentar maior coeficiente angular representará o método mais sensível (LANÇAS, 2004).

Detectabilidade é a capacidade de um instrumento de mensurar uma espécie química. Um equipamento possui alta detectabilidade, quando consegue mensurar uma quantidade mínima da função ou espécie em questão. É o termo mais adequado no caso de utilização de técnicas de separação, como a Cromatografia Gasosa, acopladas à Espectrometria de Massas, onde o detector aumenta a capacidade aparente de separação, devido a sua alta seletividade e detectabilidade (PEDROSO *et al.*, 2009).

#### **2.5.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação**

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. O LOD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009).

No **método visual**, realiza-se a análise de amostras contendo baixas concentrações conhecidas da espécie de interesse. Considera-se o LOD como sendo a menor concentração que pode ser detectada e que seja distinta do sinal analítico do ruído (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O método da **relação sinal-ruído** pode ser aplicado em procedimentos analíticos que apresentam ruído da linha de base. O LOD é estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra branco ou com o ruído medido na região do cromatograma próximo ao do pico de interesse (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O método de estimativa do LOD baseado em **parâmetros da curva analítica** de calibração apresenta maior confiabilidade estatística, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão. O LOD é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida em informada com 99 ou 95% de confiança (RIBEIRO *et al.*, 2008).

O LOQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida com precisão e exatidão adequadas, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

Da mesma forma que o LOD, o LOQ pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009).

#### **2.5.5. Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para a validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, entre outros (THOMSON *et al.*, 2002).

### 2.5.5.1. Recuperação

O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. A quantidade de analito recuperada é dada pela fórmula descrita na Equação 1:

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde:

$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada obtida na análise;

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_3$  = concentração do analito adicionada a amostra fortificada.

Deve-se ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Isso nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não-presentes na matriz.

### 2.5.6. Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (s), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20 (HUBER, 2001; RIBANI *et al.*, 2004).

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.* 2009), conforme a Equação 2:

$$RSD (\%) = \frac{s}{X_m} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

$X_m$  = média de uma série de medidas (replicatas).

### 2.5.6.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.* 2009)).

### 2.5.6.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou ainda uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009).

### 2.5.6.3. Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX. É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos colaborativos. Frequentemente, altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método. Estudos colaborativos não são somente indispensáveis para avaliação da reprodutibilidade, eles também podem ser de grande ajuda para testar a exatidão do método (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação da técnica DLLME modificada em relação à técnica originalmente proposta por REZAEI e colaboradores em 2006. As modificações incluem a eliminação da etapa de centrifugação e a utilização de resfriamento da mistura de solventes extrator, dispersor e da amostra durante processo de extração e pré-concentração.

A quantificação foi realizada por GC-(TQ)-MS/MS, onde foram avaliados os íons mais representativos para os pesticidas e substâncias químicas em estudo, as transições a serem monitoradas e as voltagens aplicadas.

Os parâmetros analíticos avaliados na etapa de validação foram: linearidade, precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão (recuperação), limite de detecção e quantificação.

#### 3.1. Reagentes, solvente e materiais

##### **Solventes e Reagentes:**

- Acetona, p.a. (Merck, Alemanha);
- Acetonitrila, grau HPLC (J.T. Baker, México);
- Clorofórmio, p.a. (Merck, Alemanha);
- Diclorometano, p.a. (Merck, Alemanha);
- Extran Neutro e Alcalino (Merck, Alemanha);
- Metanol, p.a. (Merck, Alemanha);
- Tetracloreto de carbono, extra puro (Merck, Alemanha).

##### **Materiais:**

- Microseringas, SGE ou Hamilton, de 10, 25, 100, 250, 500 e 1000 µL.
- Frascos volumétricos, classe A, de 10, 25, 50 e 100 mL, com tampas de vidro.
- Béqueres
- Pipetas Volumétricas

- Pipeta Graduada
- Pipeta de Pasteur
- Tubos vidro fundo cônico, graduados 10 mL.
- Frascos de 2 mL (*vials*)

### 3.1.1. Instrumentação

- Sistema GC-(TQ)-MS/MS equipado com:
  - Cromatógrafo a gás CP 3800 (Varian, EUA)
  - Amostrador automático CP 8400 (Varian, EUA);
  - Injetor 1079, com insersor de vidro silanizado, d.i. de 3,4 mm, contendo cerca de 0,5 cm de carbofrita;
  - Coluna capilar CP VF-5-MS (5% fenil 95% metilpolisiloxano), de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i. e 0,25 µm de espessura de filme (Varian, EUA);
  - Detector MS Triplo Quadrupolo 1200, atuando no modo SIM (Varian, EUA);
  - Sistema de aquisição de dados através do *software MS Workstation 6.4* (Varian, EUA);
- Balança Analítica
- Ultra-Som
- Termômetro
- Estufa
- Destilador e Deionizador e/ou ultrapurificador de água

### 3.1.2. Gases utilizados

Hélio 99,9997% de pureza (Air Products, Brasil)

Argônio 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil)

### 3.1.3. Padrões analíticos dos pesticidas e substâncias químicas estudados

A Tabela 5 apresenta as informações dos padrões sólidos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, destacando o fornecedor e pureza deles.

**Tabela 5:** Padrões analíticos dos pesticidas e substâncias químicas estudadas

Nome comum	Fornecedor	Pureza (%)
PCBTF	Chem Service (West Chester, USA)	97,8
Xileno (o+m+p)	Chem Service (West Chester, USA)	99,2
PCT	Chem Service (West Chester, USA)	98,4
3,4-DCBTF	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	98,1
1,2-diclorobenzeno	Chem Service (West Chester, USA)	98
Nitrobenzeno	Chem Service (West Chester, USA)	99
Mononitro	Chem Service (West Chester, USA)	98,1
DDVP	Chem Service (West Chester, USA)	99,0
Triclorfon	Chem Service (West Chester, USA)	98,0
DCPI	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	92,8
Diuron	Chem Service (West Chester, USA)	99
Dinitro	Chem Service (West Chester, USA)	96,2
3,4-DCA	Chem Service (West Chester, USA)	99,5
Ketona	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	98,8
Trifluralina	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	99,3
Oxirano	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	98,6
Lindano	Chem Service (West Chester, USA)	98,9
Propanil	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	99,4
2,4-D Éster	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	99,1
Clorpirifós	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	99,4
Bromoketal	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	97,3
$\alpha$ -Endosulfan	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	97,5
$\beta$ -Endosulfan	Milenia Agro Ciencias S.A. (Londrina, Brasil)	97,5
Endosulfan sulfato	Chem Service (West Chester, USA)	98,0
1,3-di-fenoxi-benzeno	Chem Service (West Chester, USA)	99,0



### 3.1.4. Preparo das soluções analíticas

Para o preparo da solução padrão estoque com a mistura das substâncias químicas em estudo foram pesados 0,0100 g ( $\pm 0,0002$  g) de cada um das substâncias químicas indicados na Tabela 5 (item 3.1.4) para um mesmo balão volumétrico de 50 mL. A seguir foi adicionado acetona para dissolução dos mesmos e para completar o volume a 50 mL. A concentração teórica desta solução é de 200 mg L<sup>-1</sup>.

A partir da solução estoque foi preparada uma solução estoque intermediária 1, diluindo-se 2,5 mL da solução padrão estoque a 50 mL em balão volumétrico utilizando como solvente acetona. A concentração teórica desta solução é de 10 mg L<sup>-1</sup>.

A partir da solução estoque intermediária 1 foi preparada uma solução estoque intermediária 2, diluindo-se 5 mL da solução estoque intermediária 1 a 50 mL em balão volumétrico utilizando como solvente acetona. A concentração teórica desta solução é de 1 mg L<sup>-1</sup>.

As soluções estoque intermediárias foram utilizadas para os ensaios de fortificação e também para preparar as soluções analíticas, através de sua diluição, nas concentrações de 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 200,0; 500,0 e 1000,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para o estudo de linearidade e confecção das curvas analíticas para cada analito. Os volumes utilizados estão descritos na Tabela 6.

Para o preparo da solução estoque de padrão interno, foi pesado 0,0100 g ( $\pm 0,0002$  g) de 1,3-di-fenoxi-benzeno para um balão volumétrico de 50 mL e dissolvido com acetona, a seguir o volume foi completado para 50 mL. A concentração teórica desta solução é de 200 mg L<sup>-1</sup>.

A solução de padrão interno foi preparada pela diluição de 5 mL da solução estoque de padrão interno a 100 mL em balão volumétrico utilizando como solvente o acetona. A concentração teórica desta solução é de 10 mg L<sup>-1</sup>.

A solução analítica de padrão interno foi preparada pela diluição de 10 mL da solução de padrão interno em balão volumétrico de 100 mL utilizando-se como solvente o tetracloreto de carbono, que é o mesmo solvente a ser utilizado na extração. A concentração teórica desta solução é de 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 6:** Volumes utilizados no preparo das soluções analíticas

Concentração da solução analítica ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Volume da solução estoque intermediária ( $\mu\text{L}$ )	Solução estoque intermediária utilizada	Volume da solução de padrão interno ( $\mu\text{L}$ )	Volume de solvente ( $\mu\text{L}$ )	Volume total ( $\mu\text{L}$ )
5	5	2	10	985	1000
10	10	2	10	980	1000
20	20	2	10	940	1000
50	50	2	10	940	1000
100	100	2	10	890	1000
200	20	1	10	940	1000
500	50	1	10	940	1000
1000	100	1	10	890	1000

Para o preparo da solução estoque do padrão de controle, utilizados para rastrear a eficiência de recuperação dos analitos, foram pesados 0,0100 g ( $\pm 0,0002$  g) de 1,2-diclorobenzeno e de nitrobenzeno em balão volumétrico. O volume foi completado à 50 mL utilizando-se acetona como solvente. A concentração desta solução é de 200  $\text{mg L}^{-1}$ .

A solução analítica do padrão de controle foi preparada pela diluição de 5 mL da solução estoque do padrão de controle a 100 mL em balão volumétrico, utilizando-se acetona como solvente. A concentração desta solução é de 10  $\text{mg L}^{-1}$ .

### 3.1.5. Escolha dos solventes

Os solventes utilizados na análise foram previamente analisados pela injeção direta no sistema GC-(TQ)-MS/MS, com os mesmos volumes utilizados na extração das amostras, para verificar se os mesmos estavam isentos dos analitos ou de outros solventes ou contaminantes que pudessem interferir na análise.

### 3.2. Otimização do sistema cromatográfico GC-(TQ)MS/MS

A otimização das condições de detecção e da separação cromatográfica, foi feita de forma a avaliar qual modo de operação do sistema cromatográfico acoplado ao espectrômetro de massas apresentaria a máxima sensibilidade e seletividade, ou seja, melhor detectabilidade para cada composto em estudo.

Inicialmente foram preparadas soluções individuais para os pesticidas e substâncias químicas em estudo, com concentração de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  e injetadas no GC-(TQ)MS/MS, utilizando a detecção no modo *full scan*, ou seja, varredura de 50 a 500 m/z e o modo de impacto de elétrons com polaridade positiva.

Para cada uma dos pesticidas e das substâncias químicas foram identificados e selecionados os íons característicos formados na fragmentação por impacto de elétrons e detecção no modo *full scan*.

A seguir foi injetada uma solução padrão contendo todos os pesticidas e substâncias químicas em estudo na concentração de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Neste estudo foi utilizado o modo de impacto de elétrons com polaridade positiva e a detecção no modo *full scan* simultaneamente à detecção no modo SIM, monitorando cada um dos íons selecionados na etapa anterior, em segmentos programados de acordo com os tempos de retenção dos picos cromatográficos.

Nesta etapa foi verificado se as temperaturas do sistema cromatográfico, conforme descritas no item 4.2, produzem uma separação adequada dos picos cromatográficos em um tempo razoável. Também foi verificado se existem íons comuns para os pesticidas e substâncias químicas em estudo e se os tempos de retenção neste caso são próximos.

Foram injetados os extratos de brancos e das matrizes de interesse e os solventes a serem utilizados no procedimento analítico, para verificar as possíveis contaminações com outros solventes, com os analitos de interesse e com os interferentes da matriz.

A seguir foram programados segmentos MRM para cada um dos pesticidas e substâncias químicas, utilizando variações na energia colisional dentro de uma faixa de 5 a 30 V. No Q3 foram monitorados os íons na faixa entre 50 m/z até 10 a 20% acima da m/z do íon molecular obtido na fragmentação inicial.

Foram repetidas as injeções até obter a maior intensidade de sinal para os íons produtos de interesse e até obter a completa fragmentação do íon precursor.

Então foram programadas as massas dos íons produtos no Q3 para cada transição a ser monitorada.

Novamente foram injetados os extratos de brancos e das matrizes de interesse e os solventes a serem utilizados no procedimento analítico.

Na seqüência foram injetadas as soluções analíticas para construção da curva de calibração. Nesta etapa, a integridade dos espectros foi verificada para confirmar se as energias selecionadas produzem espectros de massas consistentes, ou seja, na mesma proporção ao longo da faixa de concentrações de interesse.

O sistema GC-(TQ)MS/MS utilizado tem um recurso denominado “*override*” que permite o aumento da voltagem da eletromultiplicadora para um ou mais segmentos durante a corrida cromatográfica. Este recurso foi utilizado para aumentar o sinal de alguns pesticidas e substâncias químicas, de forma a obter razões sinal/ruído adequadas para o desenvolvimento do método.

### **3.3. Matriz**

Amostras de água de torneira foram coletadas no próprio laboratório para otimização e validação do método. Não foi utilizada filtração ou qualquer outro pré-tratamento nas amostras coletadas. Para cada batelada de análises, correspondente a um dia de trabalho, foi analisado um branco da amostra.

### **3.4. Otimização do procedimento de extração DLLME**

#### **3.4.1. Seleção do solvente extrator**

Para escolha do solvente extrator foram realizados ensaios utilizando diclorometano, tetracloreto de carbono e clorofórmio, utilizando 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator e 2 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

#### **3.4.2. Seleção do solvente dispersor**

Para seleção do solvente dispersor foram testados os solventes acetona, metanol e acetonitrila, utilizando 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL do solvente dispersor.

#### **3.4.3. Seleção do volume do solvente extrator**

Para seleção do volume do solvente extrator foram realizadas extrações de amostras fortificadas utilizando-se 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$  de solvente extrator, utilizando 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foi utilizado o tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

#### **3.4.4. Seleção do volume do solvente dispersor**

Depois de selecionados o solvente dispersor (acetonitrila) e o solvente extrator (tetracloreto de carbono), bem como o volume deste a ser utilizado no procedimento (50  $\mu\text{L}$ ), foram realizados testes comparativos para os volumes de 0,5,

1,0, 2,0 e 4,0 mL de solvente dispersor, utilizando 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloreto de carbono) e acetonitrila como solvente dispersor.

#### **3.4.5. Comparação das melhores condições obtidas**

Considerando os fatores avaliados na otimização do procedimento, foi realizado um teste comparativo com dois procedimentos de extração utilizando:

(a) 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de solvente extrator tetracloreto de carbono e 1 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

(b) 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator tetracloreto de carbono e 2 mL de acetona como solvente dispersor.

#### **3.4.6. Centrifugação e sedimentação**

Para verificar a perda de solvente extrator durante o procedimento de extração, foi realizado um teste comparando o uso de centrifugação (2000 rpm durante 5 min) para separação da fase sedimentada (gota) e a separação por sedimentação simples durante 10 min. Foi utilizado 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de acetona como solvente dispersor.

### 3.4.7. Resfriamento da mistura de solventes extrator e dispersor

A perda por volatilização do solvente extrator pode ocorrer durante o preparo da mistura do solvente dispersor com o solvente extrator. Para verificar influência desta perda foi realizado um teste comparativo utilizando-se dois procedimentos de preparo da mistura de solventes descritos a seguir:

- “Solvente resfriado”: foi utilizado um banho de gelo com temperatura entre 0 e 4 °C onde foi colocado um tubo de vidro no qual foram adicionados 2 mL do solvente dispersor acetona, com auxílio de uma seringa. Em seguida foram adicionados 50 µL do solvente extrator tetracloreto de carbono, tomando o cuidado de mergulhar a ponta da agulha no solvente dispersor contido no tubo resfriado.
- “Temperatura ambiente”: o tubo de vidro onde foi feita a mistura de 2 mL de solvente dispersor acetona e 50 µL de solvente extrator (tetracloreto de carbono) foi mantido a temperatura ambiente de 20 °C durante a adição dos solventes com auxílio de seringa. Foi tomado o cuidado de mergulhar a ponta da agulha quando da adição do solvente extrator no solvente dispersor.

Em ambos os procedimentos utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com 10 µg L<sup>-1</sup> dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50 µL de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de acetona como solvente dispersor.

### 3.4.8. Resfriamento da amostra

A perda do solvente extrator por volatilização pode ocorrer durante a injeção da mistura dos solventes. Foi realizado um teste comparativo com e sem resfriamento da amostra, durante a extração para verificar a extensão deste efeito.

Para este teste foi mantida a condição de resfriamento das misturas dos solventes, nas mesmas condições descritas anteriormente.

No teste com resfriamento da amostra esta foi mantida em banho de gelo (0 a 4 °C) durante a extração. No teste sem resfriamento a amostra foi mantida a temperatura ambiente durante o procedimento de extração. Em ambos os casos, utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com 10 µg L<sup>-1</sup> dos

pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50 µL de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de acetona como solvente dispersor.

#### **3.4.9. Procedimento otimizado**

Considerando os resultados dos testes de otimização foi proposto um procedimento modificado em relação a técnica DLLME tradicional, a ser submetido à validação, através da determinação das figuras de mérito descrita no item 3.5

#### **3.4.10. Comparação do procedimento otimizado com um procedimento alternativo**

O procedimento otimizado foi aplicado para amostras fortificadas utilizando dois tipos de solventes extratores e dispersores: tetracloreto de carbono e acetona ou clorofórmio e acetonitrila, para comparação das recuperações obtidas.

Em ambos os procedimentos utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com 10 µg L<sup>-1</sup> dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50 µL de solvente extrator e 2 mL de solvente dispersor.

#### **3.4.11. Comparação das recuperações em diferentes níveis de concentração**

Para verificar a influência da concentração dos analitos nas recuperações obtidas, foi realizado um teste com amostras fortificadas na concentração de 0,1, 1,0 e 10 µg L<sup>-1</sup>.

Para este procedimento utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com 10 µg L<sup>-1</sup> dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50 µL de solvente extrator e 2 mL de solvente dispersor.



### **3.4.12. Comparação dos resultados de recuperação com parâmetros físico-químicos**

A partir dos resultados dos ensaios, em três níveis de concentração, descritos no item 3.4.11 e das propriedades físico-química dos pesticidas e outras substâncias químicas em estudo apresentados no item 2.2, foram construídos gráficos de distribuição x-y para verificar a extensão do efeito da solubilidade em água, do coeficiente de partição octanol:água e da pressão de vapor sobre os resultados de recuperação obtidos.

### **3.4.13. Escolha dos pesticidas e substâncias químicas para validação do método analítico**

Nesta etapa foi feita a comparação dos resultados de recuperação obtidos com a faixa de aceitação proposta na literatura (RIBANI *et al.*, 2004), que é de 70 a 120%.

A partir desta avaliação foram selecionados os pesticidas e outras substâncias químicas que obtiveram recuperações dentro desta faixa para validação do método analítico proposto.

### **3.4.14 Avaliação da DLLME como técnica extração de equilíbrio**

Para avaliação da DLLME como uma técnica de equilíbrio, foram construídas curvas de calibração a partir dos resultados obtidos na determinação das concentrações de amostras fortificadas com os pesticidas e outras substâncias químicas em estudo.

### 3.5. Validação do método

Definidas as melhores condições de extração e separação dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, a etapa seguinte foi validar o método para determinação destes analitos em amostras de água. Considerando a etapa de validação do método analítico, os parâmetros utilizados neste trabalho estão descritos a seguir:

#### 3.5.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada por comparação dos picos cromatográficos e dos respectivos espectros de massas dos cromatogramas obtidos por injeções no sistema GC-(TQ)MS/MS de extratos de amostras de água de torneira fortificadas.

As amostras foram fortificadas com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo em amostras “branco” de água de torneira coletadas no próprio laboratório, que posteriormente foi extraída por DLLME.

#### 3.5.2. Curva analítica e ajuste do modelo de calibração

As curvas analíticas foram construídas com 5 níveis de concentração e para duas faixas de concentração: 5, 10, 20, 50 e  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  e 50, 100, 250, 500 e  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , conforme as condições otimizadas de detecção, descritas no item 4.3.

Foram utilizadas duas faixas de concentração para minimizar o erro introduzido pelo modelo de regressão no cálculo da concentração, o que ocorre principalmente nas menores concentrações da faixa linear.

Cada solução foi injetada três vezes no equipamento. Os gráficos da área do pico cromatográfico do íon(s) selecionado(s) *versus* concentração foi obtido com auxílio do *software* do equipamento (*Saturn Workstation 6.9.2.*). A partir das curvas analíticas foi avaliado o ajuste do modelo de calibração utilizado (linear ou quadrático), avaliando o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

### 3.5.3. Sensibilidade

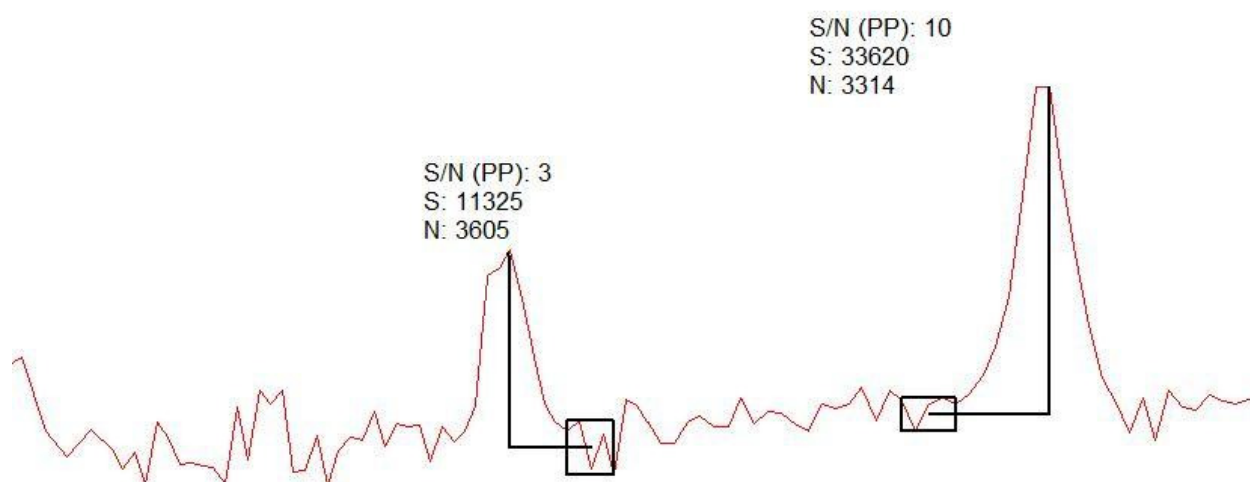
A sensibilidade do método foi determinada a partir da equação do modelo de calibração e demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e é expressa pelo coeficiente angular da curva analítica (PASCHOAL *et al.*, 2008).

### 3.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método

A determinação do limite de detecção foi feita a partir de 7 injeções no sistema GC-(TQ)MS/MS de uma solução analítica com concentração de  $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ . A voltagem da eletromultiplicadora foi ajustada de forma que, nesta concentração, a razão sinal ruído (S/N) obtida para cada analito fosse no mínimo igual a 3, conforme descrito no item 3.2.2.

A determinação do limite de quantificação foi feita a partir de 7 injeções no sistema GC-(TQ)MS/MS de uma solução analítica com concentração de  $2,50 \mu\text{g L}^{-1}$ . A voltagem da eletromultiplicadora foi ajustada de forma que, nesta concentração, a razão sinal-ruído (S/N) obtida para cada analito fosse no mínimo igual a 10, conforme descrito no item 3.2.2.

A razão sinal ruído foi calculada pelo *software* do equipamento (*Saturn Workstation 6.9.2*), conforme demonstrado na Figura 6, sendo que para a medida do sinal foi utilizado a altura do pico cromatográfico, sendo medida a partir da média da oscilação do ruído.



**Figura 6:** Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ instrumentais.

Após a determinação do LOD e LOQ instrumental, foram determinados os LOD e LOQ do método a partir de 7 injeções extratos de brancos fortificados no sistema GC-(TQ)MS/MS.

### 3.5.5. Exatidão

A recuperação foi determinada em três níveis de concentração em amostras fortificadas pela adição de volumes conhecidos do padrão analítico da mistura dos pesticidas e substâncias químicas em estudo.

Para os ensaios de recuperação os níveis de fortificação foram 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As recuperações expressas em porcentagem de recuperação foram calculadas de acordo com a equação (5):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \cdot 100 \quad (5)$$

Onde:

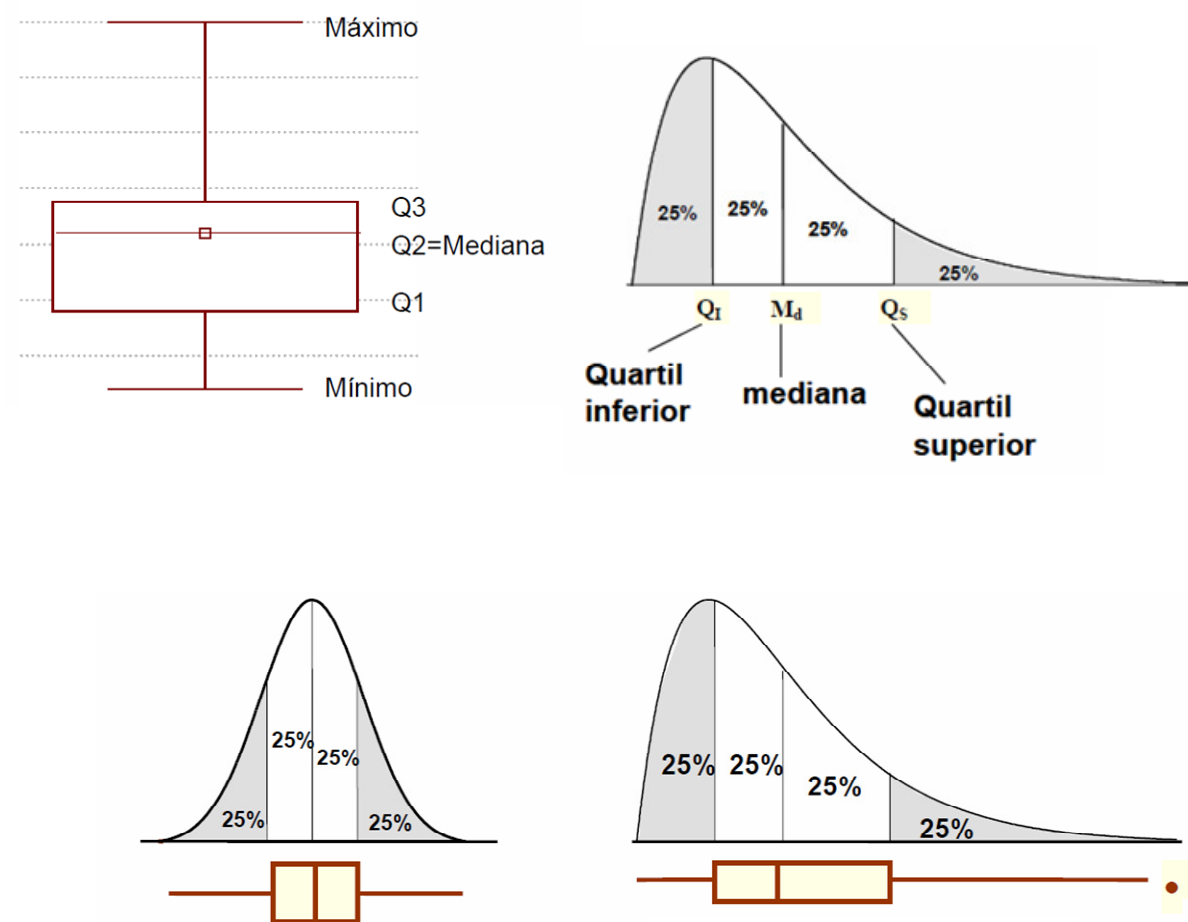
$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada obtida na análise;

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_3$  = concentração do analito adicionada a amostra fortificada.

Para avaliação dos resultados obtidos foram utilizados dois tipos de gráficos *Box and Whisker* e colunas simples. No primeiro obtemos um sumário completo dos dados de forma simples. Podemos ver a mediana, a dispersão, a assimetria, demonstrando assim a distribuição por freqüências dos resultados, o que permite a comparação com uma curva normal, conforme pode ser visto na Figura 7. Este tipo de gráfico tem sido utilizado para avaliação de testes de otimização métodos para determinação simultânea de várias substâncias químicas em uma mesma corrida cromatográfica (ZENKER *et al.*, 2008 e RODIL *et al.*, 2009).

O gráfico tipo *Box and Whisker* foi utilizado para as recuperações obtidas para os pesticidas e substâncias químicas um mesmo teste, com o objetivo e observar o comportamento geral no teste.



Adaptado de [http://www.pro.poli.usp.br/graduacao/backup/disciplinas-em-andamento/pro2271\\_1/PRO2271-aula1-3.pdf](http://www.pro.poli.usp.br/graduacao/backup/disciplinas-em-andamento/pro2271_1/PRO2271-aula1-3.pdf), acessado em 19/11/2010.

**Figura 7:** Diagrama demonstrando um gráfico *Box and Whisker* e sua comparação com a curva normal.

O gráfico de colunas simples foi utilizado para avaliar o comportamento individual de cada composto nas condições de cada teste realizado.

### 3.5.6. Precisão

O estudo da precisão do equipamento, em termos de repetitividade ( $RSD_i$ ), foi realizado efetuando-se seis injeções no sistema cromatográfico para cada concentração das soluções analíticas.

O estudo da precisão do método, em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) foi efetuado através da extração e análise de amostras fortificadas em 3 níveis de

concentração, sendo cada nível de fortificação extraído sete vezes e cada extrato obtido injetado 1 vez no sistema cromatográfico.

O estudo da precisão do método, em termos de precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) foi efetuado através da extração e análise de amostras fortificadas, em dias diferentes, sendo cada nível de fortificação extraído sete vezes e cada extrato obtido injetado 1 vez no sistema cromatográfico.

A precisão, em termos de desvio padrão relativo (RSD%), foi calculada através da equação (6):

$$RSD (\%) = \frac{s}{X_m} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

$X_m$  = média de uma série de medidas (replicatas).

### **3.6. Aplicação do método**

#### **3.6.1. Efluentes industriais e água subterrânea**

Uma vez otimizado e validado o método de análise por DLLME, o mesmo foi aplicado para determinação dos pesticidas e substâncias químicas em estudo em amostras de efluente industrial e em amostras de água subterrânea, para comparação com os métodos de Extração Líquido-Líquido (LLE) e Extração em Fase Sólida (SPE).

#### **3.6.2. Água de torneira**

Uma vez otimizado e validado o método de análise por DLLME, o mesmo foi aplicado para determinação dos pesticidas e substâncias químicas em estudo em amostras de água de torneira, conforme descrito no item 3.3.

### 3.6.3. Comparação com outros métodos

Amostras de água de torneira foram fortificadas com os pesticidas e substâncias químicas em estudo: mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal 1,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato, pela adição de volumes conhecidos das soluções analíticas intermediárias descritas no item 3.1.5, na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e extraídas por DLLME e quantificadas por GC-(TQ)MS/MS.

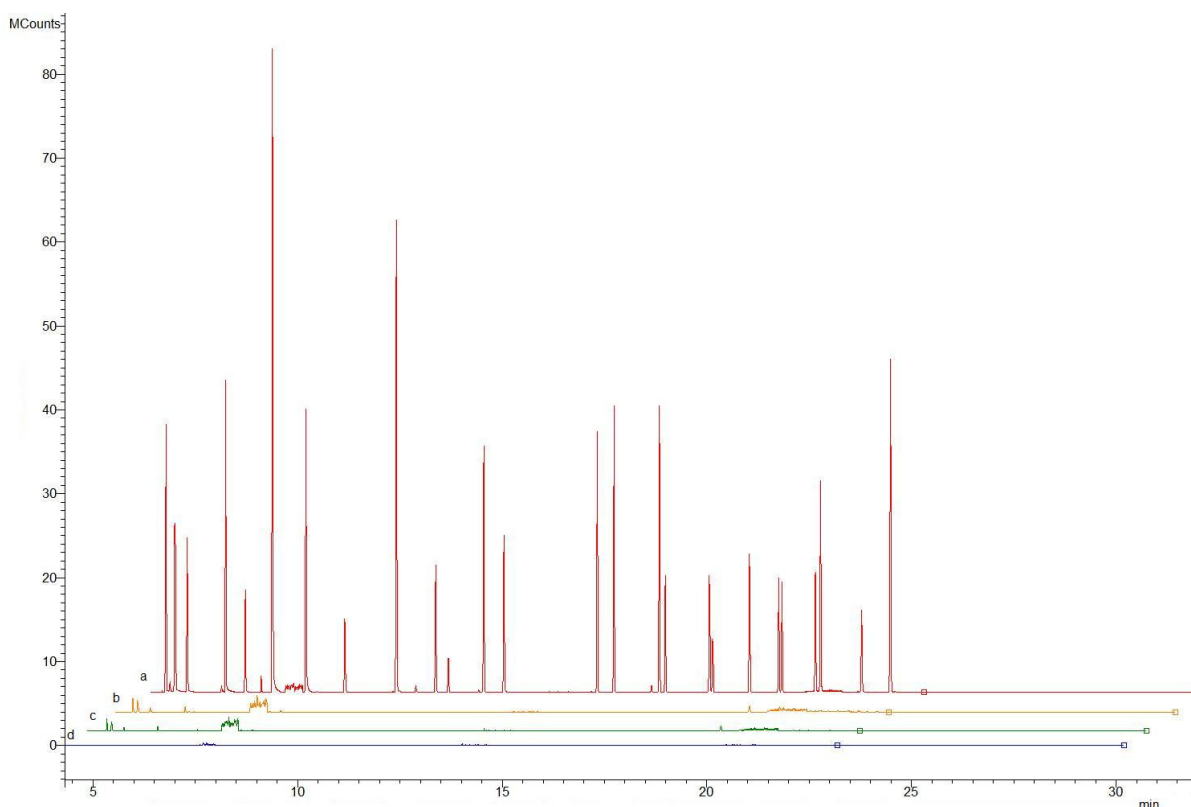
Os resultados foram comparados com os resultados obtidos no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Tratamento de Efluentes e Meio Ambiente da MILENIA Agrociências S.A. para amostras fortificadas na mesma concentração e extraídas por LLE e determinação por GC-(IT)MS/MS e extraídas por SPE e determinação por GC-(IT)MS/MS.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

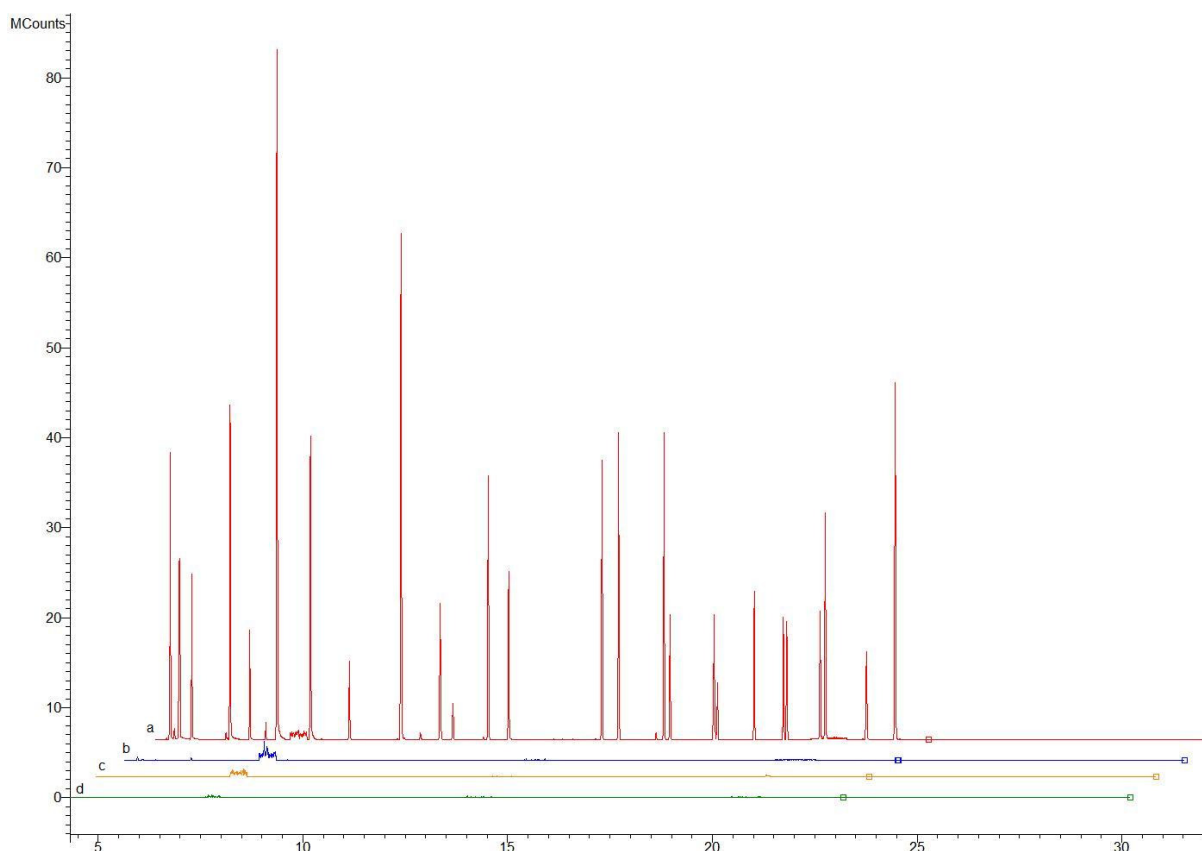
### 4.1. Análise dos solventes

O cromatograma obtido pela injeção direta no sistema GC-(TQ)-MS/MS, da mistura dos solventes tetracloreto de carbono e acetona utilizados na extração das amostras, é apresentado na Figura 8.



**Figura 8:** Cromatograma total obtido por GC-(TQ)MS/MS para a mistura branco dos solventes. a = solução analítica  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , b = branco dos solventes, c = tetracloreto de carbono e d = acetona, nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3.

O cromatograma obtido pela injeção direta no sistema GC-(TQ)-MS/MS, da mistura dos solventes clorofórmio e acetonitrila utilizados na extração das amostras, é apresentado na Figura 9.



**Figura 9:** Cromatograma total obtido por GC-(TQ)MS/MS para a mistura branco dos solventes. a = solução analítica  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , b = branco dos solventes, c = clorofórmio e d = acetonitrila. Condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3.

A análise dos brancos dos reagentes durante o processo de otimização de validação do método indicou a presença do composto xileno no solvente tetracloreto de carbono, que veio a interferir na validação do método.

Mesmo assim o xileno foi mantido no estudo para verificar o comportamento durante os testes realizados, visto que objetivo deste trabalho é aplicar a DLLME a pesticidas e substâncias químicas com ampla faixa de valores de volatilidade.

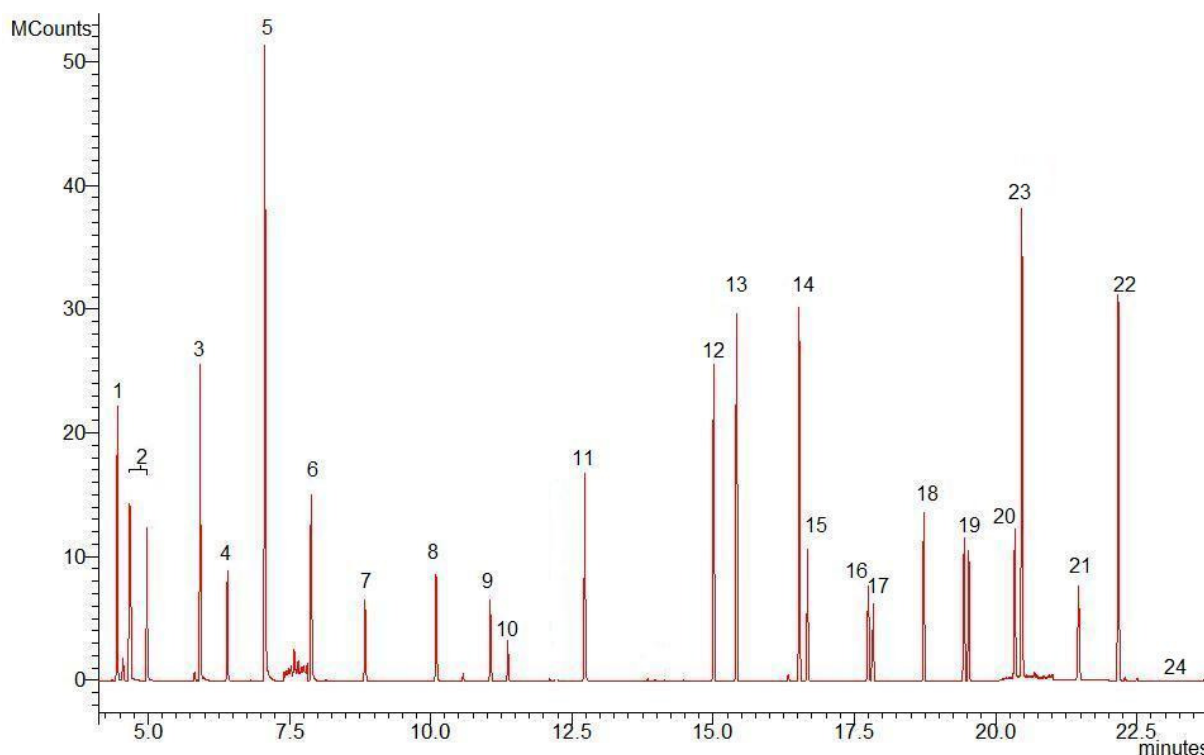
## 4.2. Condições cromatográficas utilizadas

Abaixo estão apresentadas as condições utilizadas para o sistema GC-(TQ)MS/MS:

- Programação de temperatura do injetor: temperatura constante de 250 °C;
- Programação da válvula do *split* do injetor: inicialmente válvula do *split* aberta na razão 1/50, após 0,01 min válvula do *split* fechada e após 2,0 min válvula do *split* aberta na razão 1/20.
- Volume de injeção de 2 µL;
- Injeção efetuada com o auxílio de amostrador automático, a qual consistiu na aspiração de 2,0 µL de solução a analisar e 1,0 µL de ar, com velocidade de injeção de 5 µL s<sup>-1</sup> ;
- Programação de temperatura do forno da coluna: temperatura inicial de 45 °C durante 1,0 min, e a seguir aquecimento com incremento de temperatura de 10 °C min<sup>-1</sup> até 260 °C, e posteriormente mantendo a temperatura de 260 °C por mais 7,5 min.
- Vazão do gás de arraste (hélio) constante em 1,0 mL min<sup>-1</sup> na coluna;
- Tempo total de corrida de 30 min.

#### 4.2.1. Avaliação da separação cromatográfica por GC-(TQ)MS/MS

Na Figura 10 é apresentado o cromatograma obtido pela injeção no sistema GC-(TQ)MS/MS do extrato de uma amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos analitos e extraída por DLLME, nas condições descritas no item 3.4.9.



**Figura 10:** Cromatograma do nível de fortificação  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  em água de torneira, obtido nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3..

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) cetona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan, (22) endossulfan sulfato, (23) 1,3-difenoxibenzeno e (24) segmento monitorado para ésteres de ftalatos.

### 4.3. Condições do sistema GC-(TQ)MS/MS

Para o espectrômetro de massas as condições utilizadas foram:

- Temperatura do *transfer line*: 250 °C;
- Temperatura da fonte de ionização: 230 °C;
- Temperatura do *manifold*: 40 °C;
- Modo de aquisição MS/MS;
- Modo de ionização por impacto de elétrons (EI, do inglês *Electron Impact Ionization*), com polaridade positiva e energia de 70 eV;

No segmento inicial os dados não são coletados pelo espectrômetro de massas (*Collect delay*) e que corresponde ao tempo necessário para eluição do solvente, que é <4 min.

De acordo com a Tabela 7, o tempo de corrida de entre 4 e 23 min foi dividido em 22 segmentos programados de acordo com o tempo de retenção de cada analito. A partir dos 23 até os 30 min foi programado um segmento para detecção de ésteres de ftalatos.

Os ésteres de ftalatos têm uma grande variedade de aplicações industriais, agrícolas e domésticas, mas o seu uso mais importante é como agente plastificante, para aumentar a flexibilidade de materiais poliméricos. Devido a estas propriedades a produção e uso dos ésteres de ftalatos têm aumentado bastante (FARAHANI, *et al.*, 2007). A presença de ésteres de ftalatos nos extratos analisado por GC-MS, em concentração elevada pode alterar os espectros de massas obtidos, saturar a coluna cromatográfica causando desvios nos tempos de retenção e contaminam o injetor e/ou outras partes aquecidas do sistema.

**Tabela 7:** Dados da programação dos segmentos para cada um dos pesticidas e substâncias químicas em estudo

Composto	Segmento (min.)	Scan time (s)	Q1 (m/z)	Energia de colisão (V)	Q3 (m/z)	Dwell Time (s)
PCBTF (1)	4,00 – 5,50	0,5	91,0	20,0	130,0; <b>145,0*</b> ; 161,0	0,100
Xileno (o+m+p) (2)	4,00 – 5,50	0,5	180,0	22,0	<b>65,0</b> ; 91,0	0,100
PCT (3)	5,50 – 6,20	0,2	91,0	22,0	<b>65,0</b> ; 91,0	0,100
3,4-DCBTF (4)	6,20 – 6,80	0,3	179	20,0	143; <b>144</b> ; 179	0,100
1,2-diclorobenzeno (5)	6,80 – 7,40	0,2	146	20,0	<b>75</b> ; 111	0,100
Nitrobenzeno (6)	7,40 – 8,50	0,2	77,0	18,0	<b>51</b> ; 77	0,100
Mononitro (7)	8,50 – 9,80	0,3	179,0	18,0	143,0; <b>144,0</b> ; 179,0	0,100
DDVP +Triclorfon (8)	9,80 – 10,80	0,4	109,0; 185,0	5,0; 14,0	79,0; <b>109,0</b> ; 93,0; <b>109,0</b>	0,100
DCPI+Diuron (9)	10,80 – 11,90	0,6	143,0	20,0	93,0; <b>123,0</b> ; 143,0	0,100
Dinitro (10)	10,80 – 11,90	0,6	159,0	8,0	73,0; <b>124,0</b> ; 159,0	0,100
3,4-dicloro-anilina (11)	11,90 – 13,80	0,4	161,0	16,0	90,0; 99,0; <b>126,0</b> ; 161,0	0,100
Ketona (12)	13,80 – 15,20	0,3	139	15,0	77,0; <b>103,0</b> ; 139,0	0,100
Trifluralina (13)	15,20 – 16,00	0,5	264,0; 306,0	12,0; 6,0	160,0; <b>206,0</b> ; 264,0 <b>264,0</b> ; 306	0,100
Oxirano (14)	16,00 – 16,55	0,3	138,0	12,0	77,0; <b>103,0</b> ; 138,0	0,100
Lindano (15)	16,55 – 17,00	0,3	219,0	5,0	181,0; <b>183,0</b> ; 219,0	0,100
Propanil (16)	17,00 – 18,40	0,8	161,0	20,0	90,0; 99,0; <b>126,0</b> ; 161,0	0,100
2,4-D Éster (17)	17,00 – 18,40	0,8	185,0	18,0	115,0; <b>143,0</b> ; 155,0; 185,0	0,100
Clorpirifós (18)	18,40 – 19,00	0,4	197,0; 316,0	15,0	<b>169,0</b> ; 197,0; <b>260,0</b> ; 316,0	0,100
Bromoketal (19)	19,00 – 20,00	0,4	259,0	8,0	69,0; <b>173,0</b> ; 259,0	0,100
$\alpha$ -Endosulfan (20)	20,00 -21,00	0,45	195,0; 241,0	22,0; 25,0	125,0; <b>159,0</b> ; 136,0; 170,0; <b>206,0</b>	0,100
1,3-difenoxibenzeno (23)	20,00 – 21,00	0,45	141,0; 262,0	15,0	89,0; <b>115,0</b> ; 141,0; <b>168,0</b>	0,050
$\beta$ -Endosulfan (21)	21,00 – 22,00	0,5	195,0; 241,0	22,0; 25,0	125,0; <b>159,0</b> ; 136,0; <b>170,0</b> ; 206,0	0,100
Endosulfan Sulfato (22)	22,00 – 23,00	0,4	241,0; 272,0; 387,0	25,0; 20,0; 20,0	136,0; <b>170,0</b> ; 206,0; <b>235,0</b> ; 237,0; 204,0; <b>219,0</b> ; 253,0	0,050
Ésteres de ftalatos (24)	23,00 – 30,00	0,1	149,0	30,0	121,0	0,100

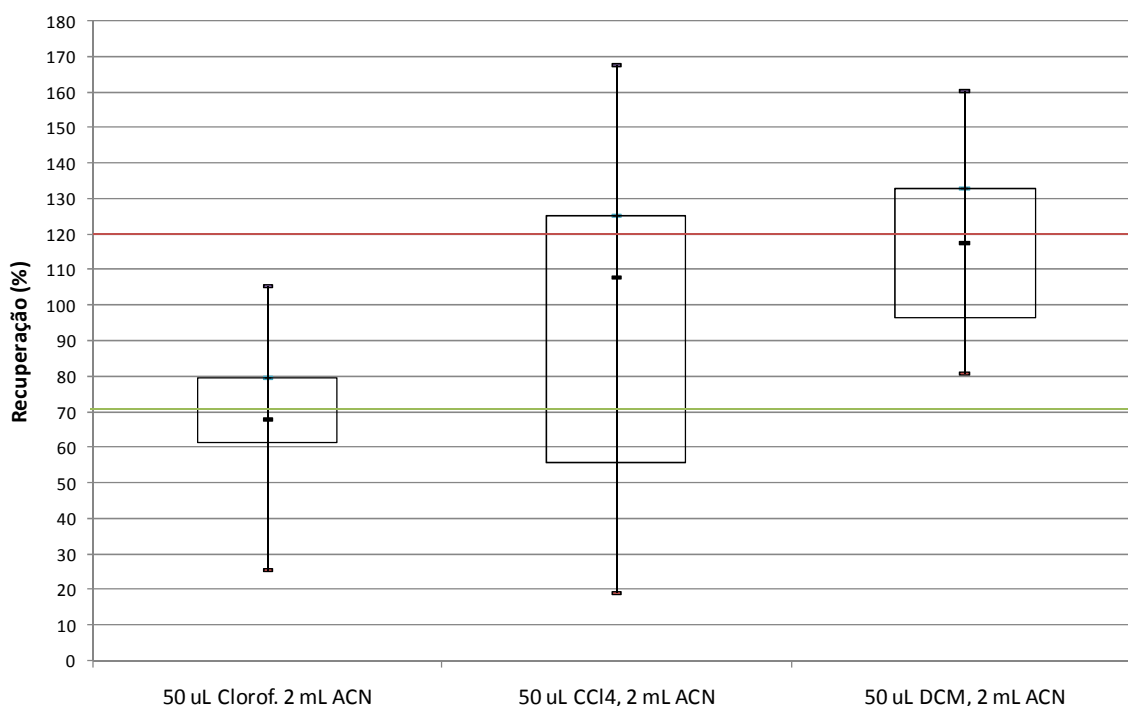
Segmento: tempo inicial e tempo final do segmento; *Scan time*: tempo de varredura; Q1: fragmentos selecionados no primeiro quadrupolo; Energia de Colisão: Energia para fragmentação no segundo Quadrupolo (câmara colisional); Q3: fragmento(s) selecionado(s) no terceiro quadrupolo e *dwell time*: tempo no qual o sistema permanece monitorando os íons especificados. Em negrito íons utilizados para quantificação, os demais são para confirmação e monitoramento da integridade do espectro.

#### 4.4. Estudo da DLLME

##### 4.4.1. Avaliação de diferentes solventes extratores utilizando acetonitrila como solvente dispersor

Este teste foi realizado utilizando-se 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, extraída com 50  $\mu\text{L}$  de diclorometano ou tetracloreto de carbono ou clorofórmio como solvente extrator e 2 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

A Figura 11 apresenta o gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas no teste, assim como as linhas indicando a recuperação de 70% como a mínima aceitável e a recuperação de 120%, que é máxima aceitável, segundo MAMUN *et al.* (2009).



**Figura 11:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com, a utilização de diferentes solventes extratores (diclorometano, tetracloreto de carbono e clorofórmio).

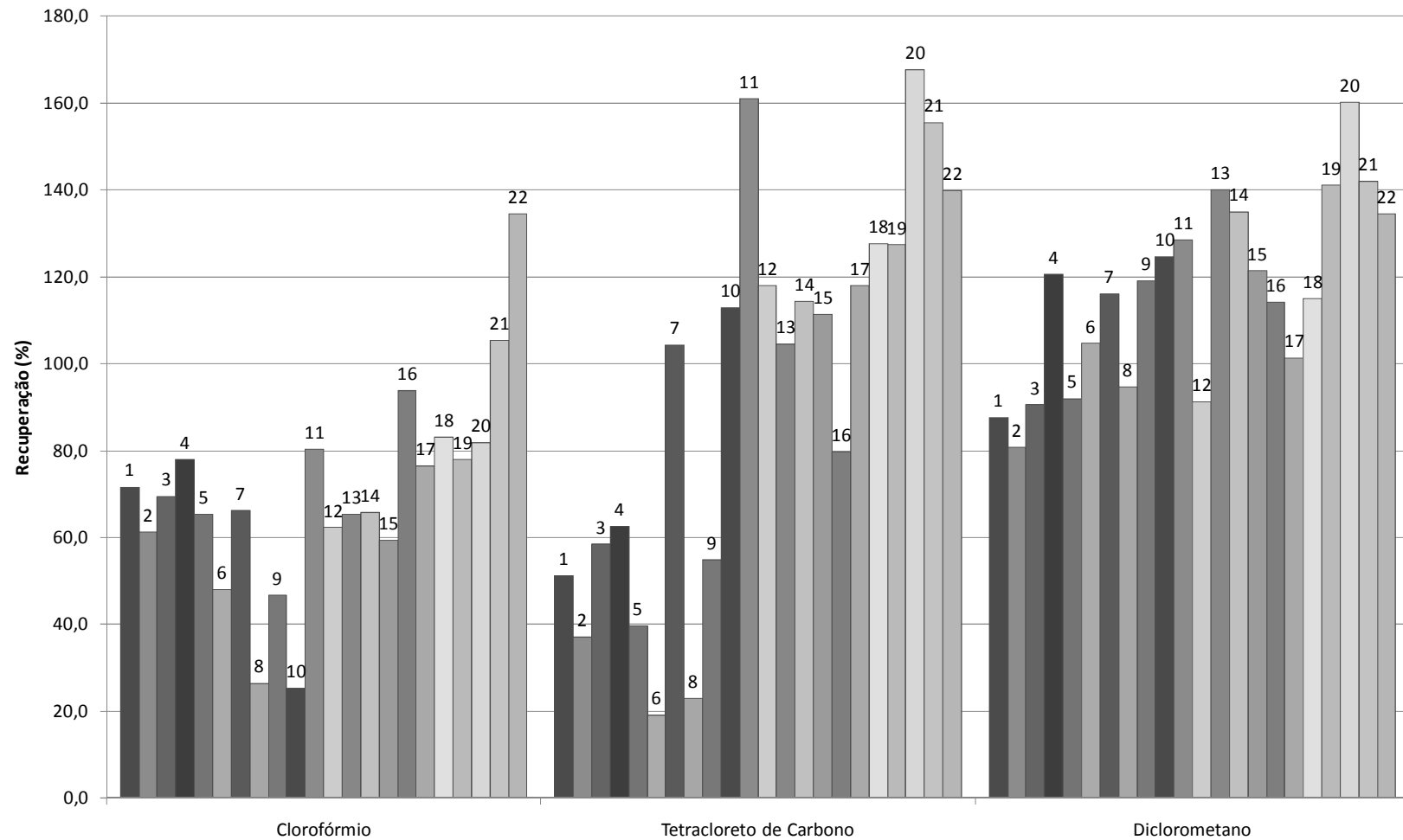
Clorof.= clorofórmio, CCl<sub>4</sub> = tetracloreto de carbono, DCM= diclorometano, ACN = acetonitrila.

A Figura 12 apresenta as recuperações obtidas para cada um dos pesticidas e substâncias químicas avaliadas. Os resultados das recuperações obtidas apresentados nas Figuras 11 e 12 e demonstraram uma melhor eficiência de extração empregando clorofórmio (variação entre 25 e 105%) e tetracloreto de carbono (variação entre 16 e 85%) em relação ao diclorometano (81 e 160%). Para os demais testes o tetracloreto de carbono foi selecionado como solvente extrator devido a sua menor solubilidade em água em relação a clorofórmio.

Conforme apresentado no item 2.2. a faixa de variação do  $K_{ow}$  é bastante ampla, entre 1,9 e 4,74, com substâncias químicas apresentando alta hidrofobicidade, com valores de  $\log K_{ow} > 2,5$  até substâncias químicas pouco hidrofóbicas com  $\log K_{ow}$  de 1,9, o que explica o comportamento bem variado nos resultados de recuperação obtidos.

As recuperações maiores que 120% obtidas com o solvente diclorometano, indicam perda por volatilização deste solvente, reduzindo o volume do extrato final e consequentemente aumento da concentração relativa do extrato.





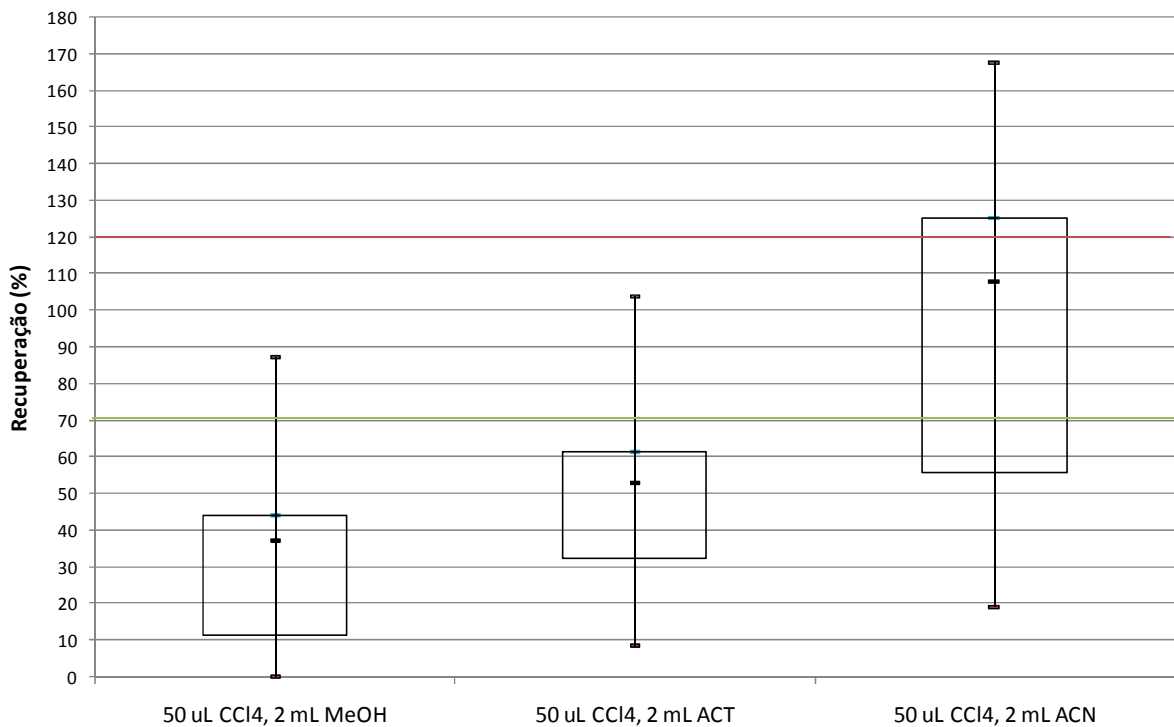
**Figura 12:** Efeito de diferentes solventes extratores (diclorometano, tetracloroeto de carbono e clorofórmio) na recuperação das substâncias químicas analisadas.

Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto, 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator, 2 mL solvente dispersor (acetonitrila). Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

#### 4.4.2. Avaliação de diferentes solventes dispersores utilizando tetracloreto de carbono como solvente extrator

Este teste foi realizado utilizando-se 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto em estudo, extraída com 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de metanol ou acetona ou acetonitrila como solvente dispersor.

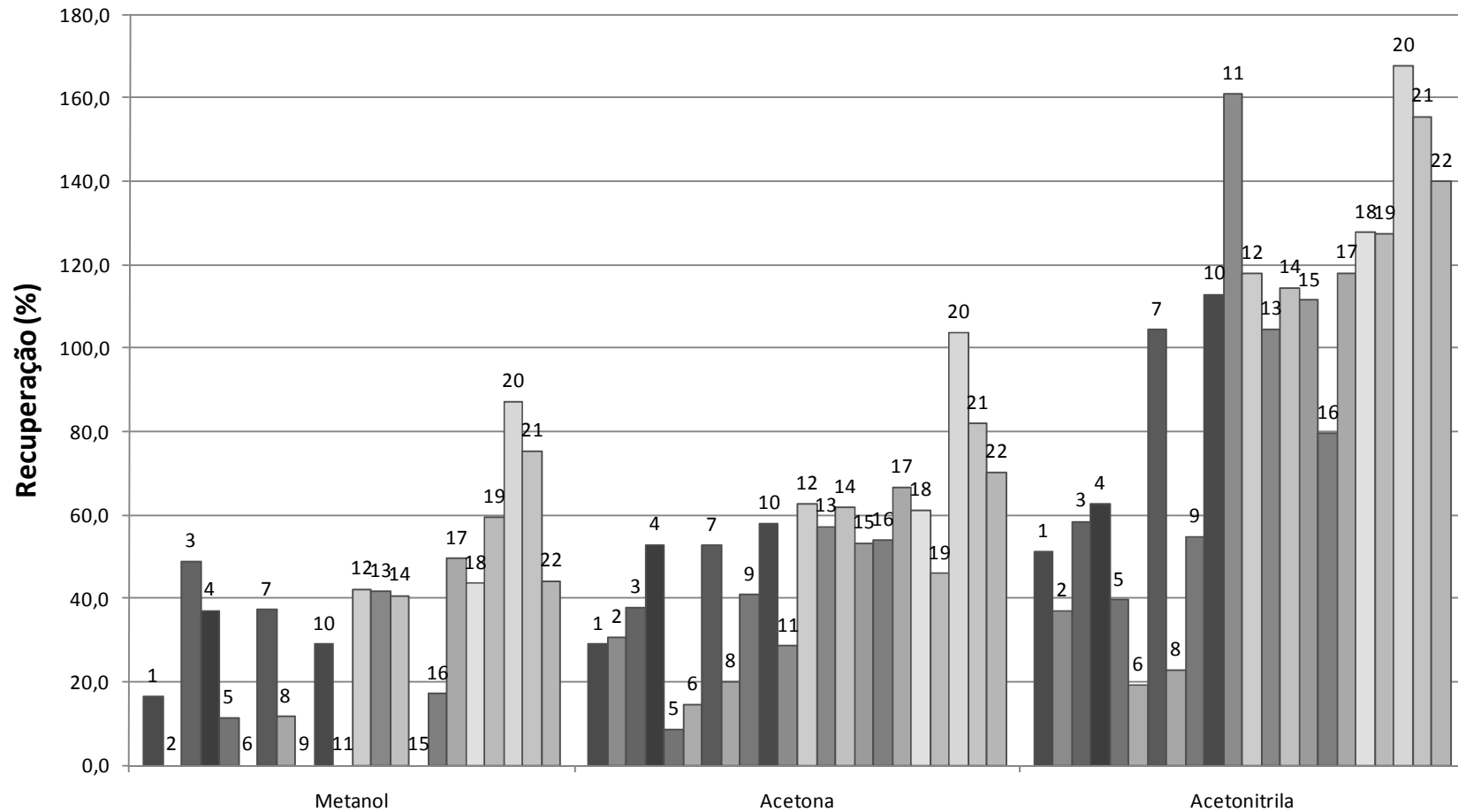
Na Figura 13 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados de recuperações obtidas em cada teste. Com uso de acetonitrila a mediana dos resultados ficou dentro da faixa de 70 a 120%, mas observa-se uma dispersão grande dos resultados com o primeiro e quarto quartis totalmente fora da faixa aceitável de 70 a 120%, indicando necessidade de otimização adicional do método proposto.



**Figura 13:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com, a utilização de diferentes solventes dispersores (acetona, metanol e acetonitrila).

$\text{CCl}_4$  = Tetracloreto de carbono, MeOH = metanol, ACT = acetona e ACN = acetonitrila.

Na Figura 14 estão apresentados os resultados das recuperações onde os melhores resultados foram obtidos com a utilização de acetonitrila (variação entre 22 e 93%) em comparação com a acetona (variação entre 9 e 104%) e metanol (variação entre 0 e 87%). Para os demais testes a acetonitrila foi selecionada como solvente dispersor.



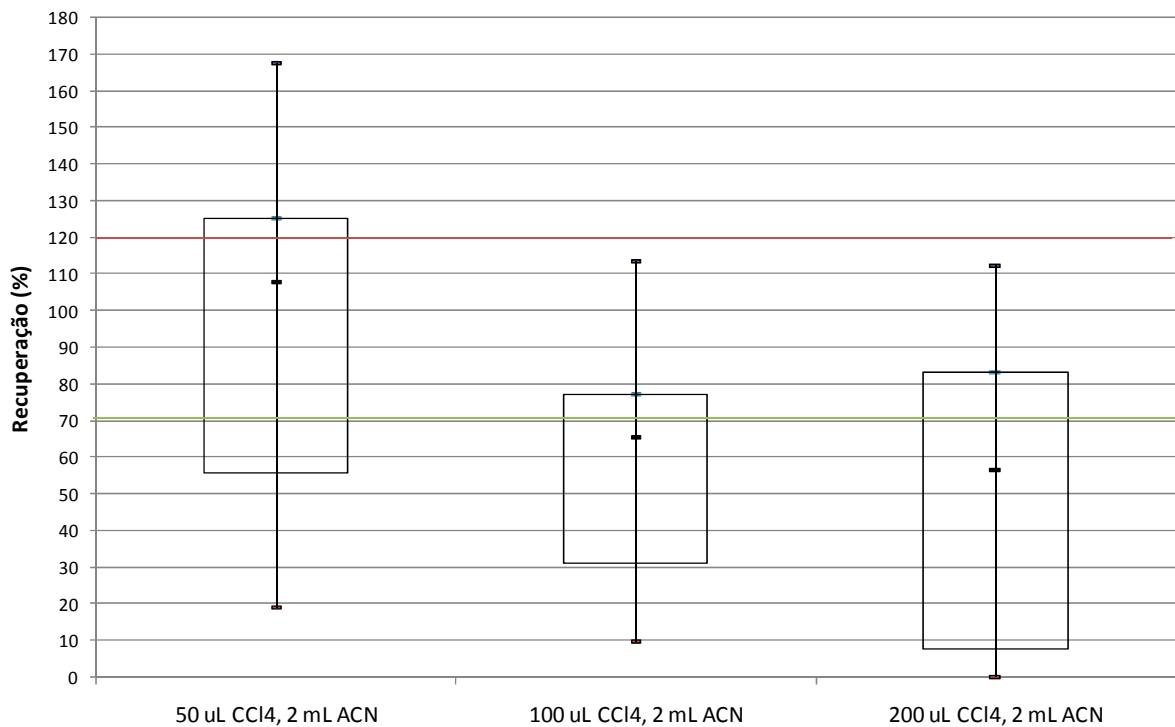
**Figura 14:** Efeito de diferentes solventes dispersores (acetona, metanol e acetonitrila) na recuperação das substâncias químicas analisadas.

Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto, 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloreto de carbono), 2 mL solvente dispersor. Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endosulfan, (21)  $\beta$ -endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.4.3. Efeito da variação do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono

Este teste foi realizado utilizando-se 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, extraída com 50, 100 e 200  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2,0 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

Na Figura 15 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados da recuperações obtidas em cada teste, onde observa-se que a mediana dos resultados tende a diminuir com o volume de solvente extrator utilizado, sendo a dispersão dos resultados razoavelmente uniforme.



**Figura 15:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com, a Influência do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono.

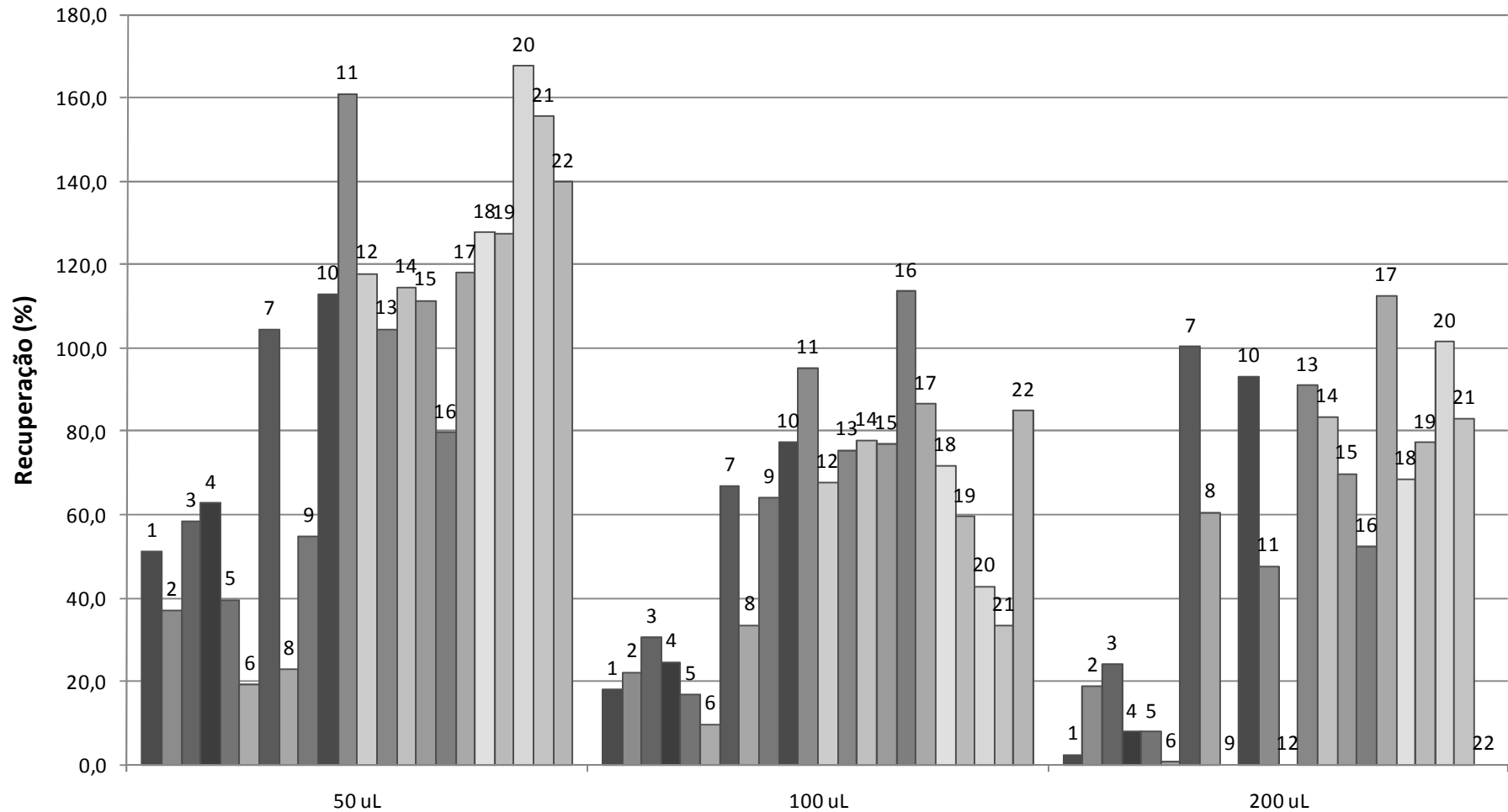
$\text{CCl}_4$  = tetracloreto de carbono, ACN = acetonitrila.

Conforme pode ser observado na Figura 16, os resultados obtidos indicam que o volume de solvente extrator mais adequado é de 100  $\mu\text{L}$ , que apresentou uma variação nos resultados de recuperação entre 10 e 113% em comparação com os volumes de 50 e 200  $\mu\text{L}$ , com recuperações entre 9 e 107% e entre 0 e 112%, respectivamente.

Conforme dados da literatura o volume de solvente extrator é determinante na quantidade e no tamanho das micro-gotas formadas, influenciando diretamente na eficiência de extração (RAZAEE, 2010).

O comportamento observado na Figura 15 não pode ser atribuído a diluição dos extratos pelo aumento do volume do solvente extrator, pois a faixa linear de calibração, que foi de 5 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , abrange as concentrações obtidas nos extratos obtidos com os volumes utilizados.

Não foi utilizada a evaporação até a secura e ajuste do volume dos extratos obtidos porque alguns analitos apresentam alta volatilidade, conforme dados apresentados no item 2.2 e poderia ocorrer perdas por evaporação.



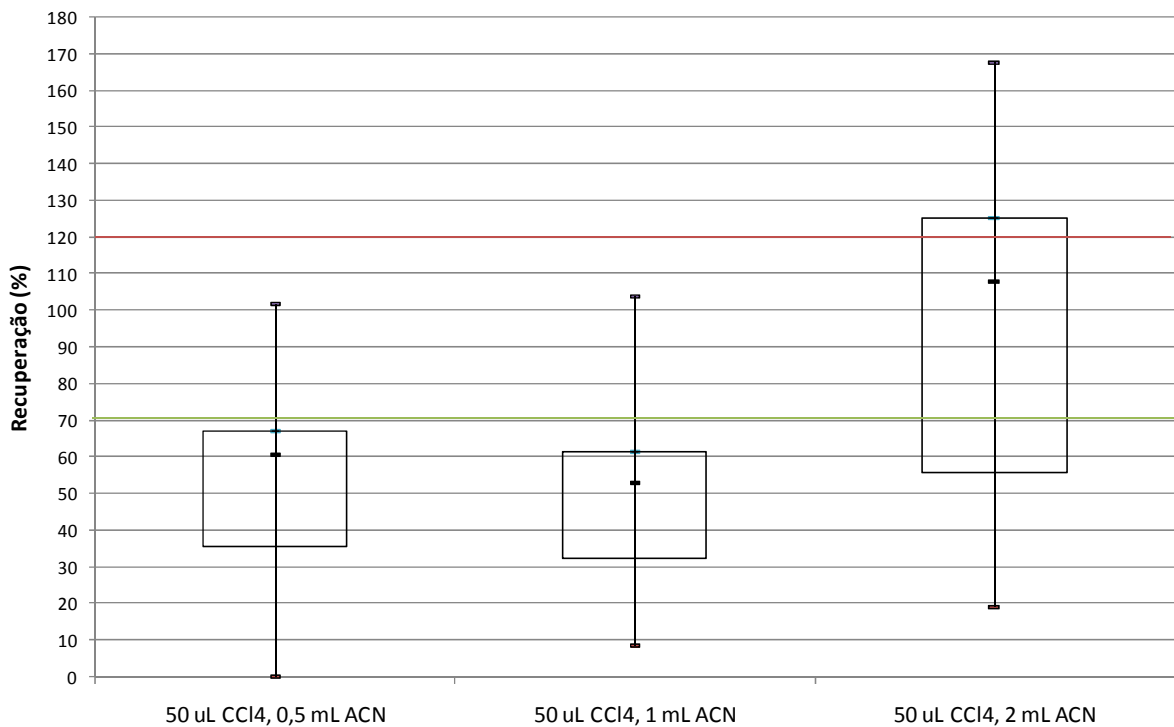
**Figura 16:** Influência do volume do solvente extrator tetracloreto de carbono na recuperação.

Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto, 2 mL solvente dispersor (acetonitrila). Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) cetona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

#### 4.4.4. Volume do solvente dispersor acetonitrila

Este teste foi realizado utilizando-se 5 mL de amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, extraída com 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 0,5 ou 1,0 ou 2,0 ou 4,0 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

Na Figura 17 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas em cada teste. A mediana dos resultados do teste com 2 mL de solvente dispersor ficou próxima a 110%, bem acima das medianas dos testes com 0,5 e 1,0 mL, que ficaram abaixo dos 70%. O 4º Quartil ficou todo acima dos 120% atingindo um máximo de 167%. A causa provável para este comportamento foi a perda por volatilização do solvente extrator durante a adição da mistura dos solventes extratores e dispersores à amostra.



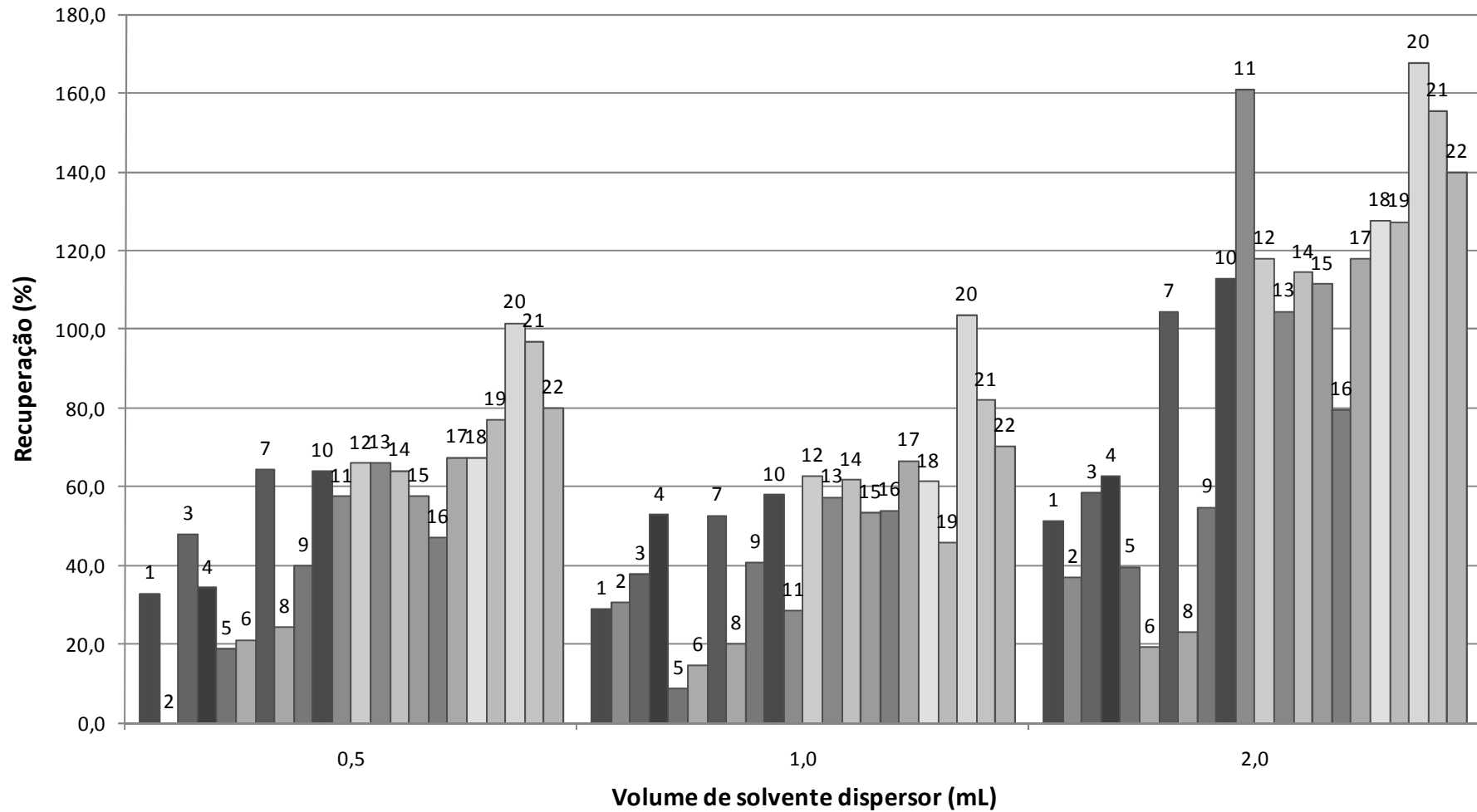
**Figura 17:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com o efeito do volume do solvente dispersor acetonitrila (0,5, 1,0 e 2,0 mL).

CCl<sub>4</sub> = tetracloreto de carbono, ACN = acetonitrila.



Na Figura 18 são apresentados os resultados de recuperação obtidos, que variaram de 0 a 102% para um volume de 0,5 mL, de 9 a 104% para um volume de 1,0 mL e de 19 a 167% para um volume de 2,0 mL. No teste utilizando o volume de 4 mL não houve separação de fases, provavelmente devido ao aumento da solubilidade do solvente extrator na fase aquosa..

Para 3,4-dicloro-anilina, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato as recuperações obtidas ficam acima de 120%, conforme pode ser visualizado na Figura 18.



**Figura 18:** Efeito do volume do solvente dispersor acetonitrila (0,5, 1,0 e 2,0 mL) na recuperação.

Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto,  $50 \mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloreto de carbono) e utilizando acetonitrila como solvente dispersor. Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

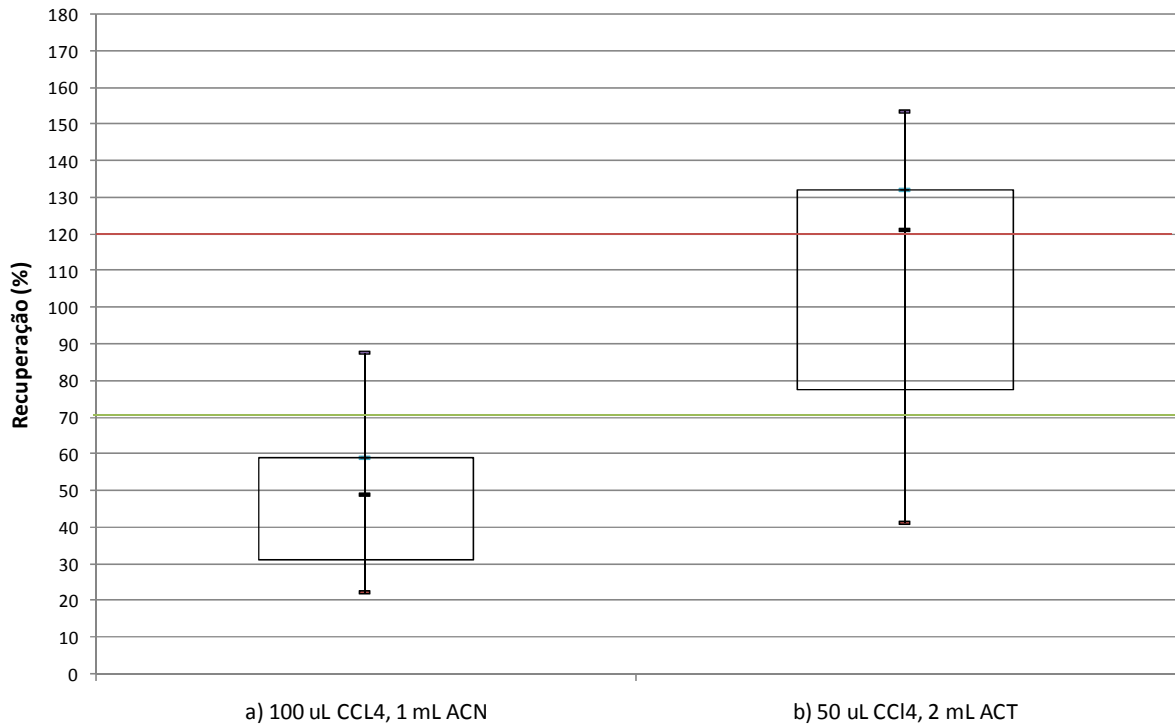
#### 4.4.5. Melhores condições obtidas.

Na Figura 19 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas no teste comparativo com dois procedimentos de extração utilizando: (a) 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$ , 1 mL de acetonitrila e (b) 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$  e 2 mL de acetona.

Uma vez que no teste de avaliação do volume do solvente extrator os volumes de 50 e de 100  $\mu\text{L}$  apresentaram resultados semelhantes e que, no teste de escolha dos solvente dispersor, os solventes acetona e acetonitrila também apresentaram resultados semelhantes, o objetivo deste teste foi verificar quais condições selecionadas para o procedimento otimizado produziram melhores resultados de recuperação.

No teste onde foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$ , 1 mL de acetonitrila obteve-se recuperações menores para todos os compostos, com a mediana situada em 49% contra 120% para o teste onde foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$  e 2 mL de acetona. Apesar disso, as recuperações de (10) dinitro, (12) cetona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato ficaram acima de 120%. A recuperação máxima observada foi de 153%.

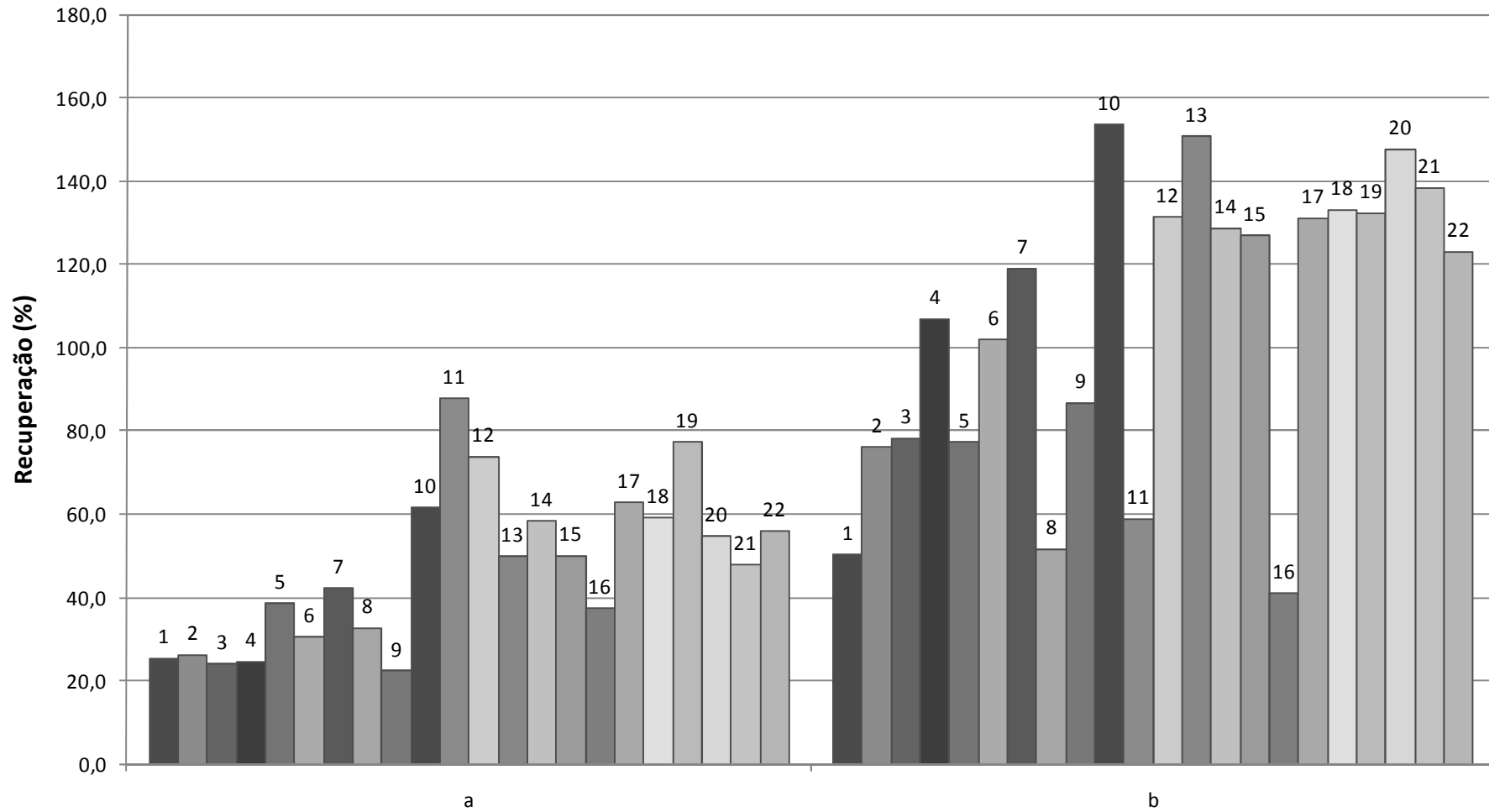
Estas altas recuperações obtidas indicam que nesta condição pode ter ocorrido a perda do solvente extrator por volatilização, levando à obtenção de um extrato mais concentrado, aumentando a faixas de recuperação acima da faixa aceitável de 70 a 120%.



**Figura 19:** Gráfico *Box and Whisker* entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se dois procedimentos. a - 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$  1 mL de acetonitrila e b – 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{CCl}_4$  e 2 mL de acetona.

$\text{CCl}_4$  = tetracloreto de carbono, ACT= acetona, ACN = acetonitrila.

Os resultados das recuperações obtidas para cada uma das substâncias químicas avaliadas podem ser vistos na Figura 20. Com a condição (a) as recuperações variaram de 22 a 88% e na condição (b) de 41 a 153%. Com base neste resultado a condição (b) foi adotada como procedimento para continuar testes de otimização do método.



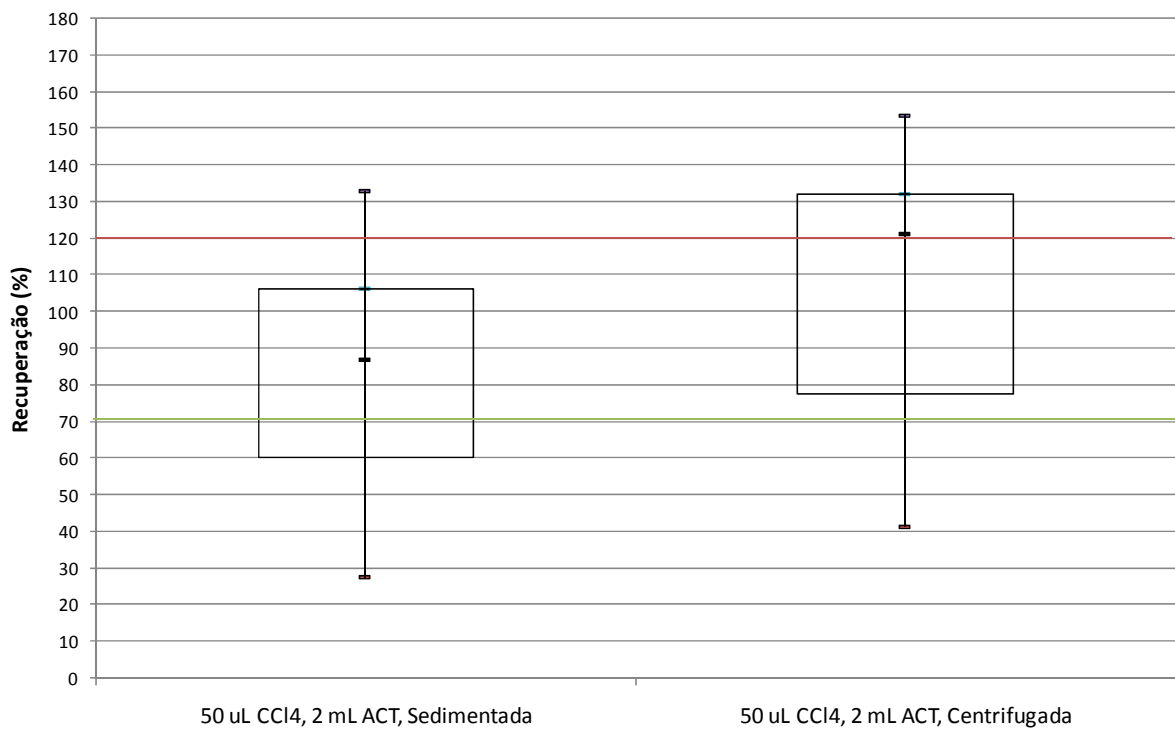
**Figura 20:** Comparação entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se dois procedimentos.

a - 100 µL de CCl<sub>4</sub>, 1 mL de acetonitrila e b – 50 µL de CCl<sub>4</sub> e 2 mL de acetona. Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20) α-endosulfan, (21) β-endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.4.6. Centrifugação e sedimentação

No teste realizado com o uso de centrifugação (2000 rpm durante 5 min) para separação da fase sedimentada (gota) e a separação por sedimentação simples durante 10 min, utilizando-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto em estudo, extraída com 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2,0 mL de acetona como solvente dispersor.

Na Figura 21 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas em cada teste. Observa-se que para a amostra sedimentada obteve-se recuperações com a mediana situada em 88% contra 121% para o teste onde foi utilizada a centrifugação. Cerca de 50% dos resultados, representados pelo 3º e 4º quartis ficaram acima dos 120%, provavelmente porque o solvente extrator é perdido por volatilização levando a concentração dos analitos no extrato final obtido e conseqüentemente dos valores de recuperação.



**Figura 21:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito da utilização da centrifugação.

CCl<sub>4</sub> = tetracloreto de carbono, ACT = acetona.

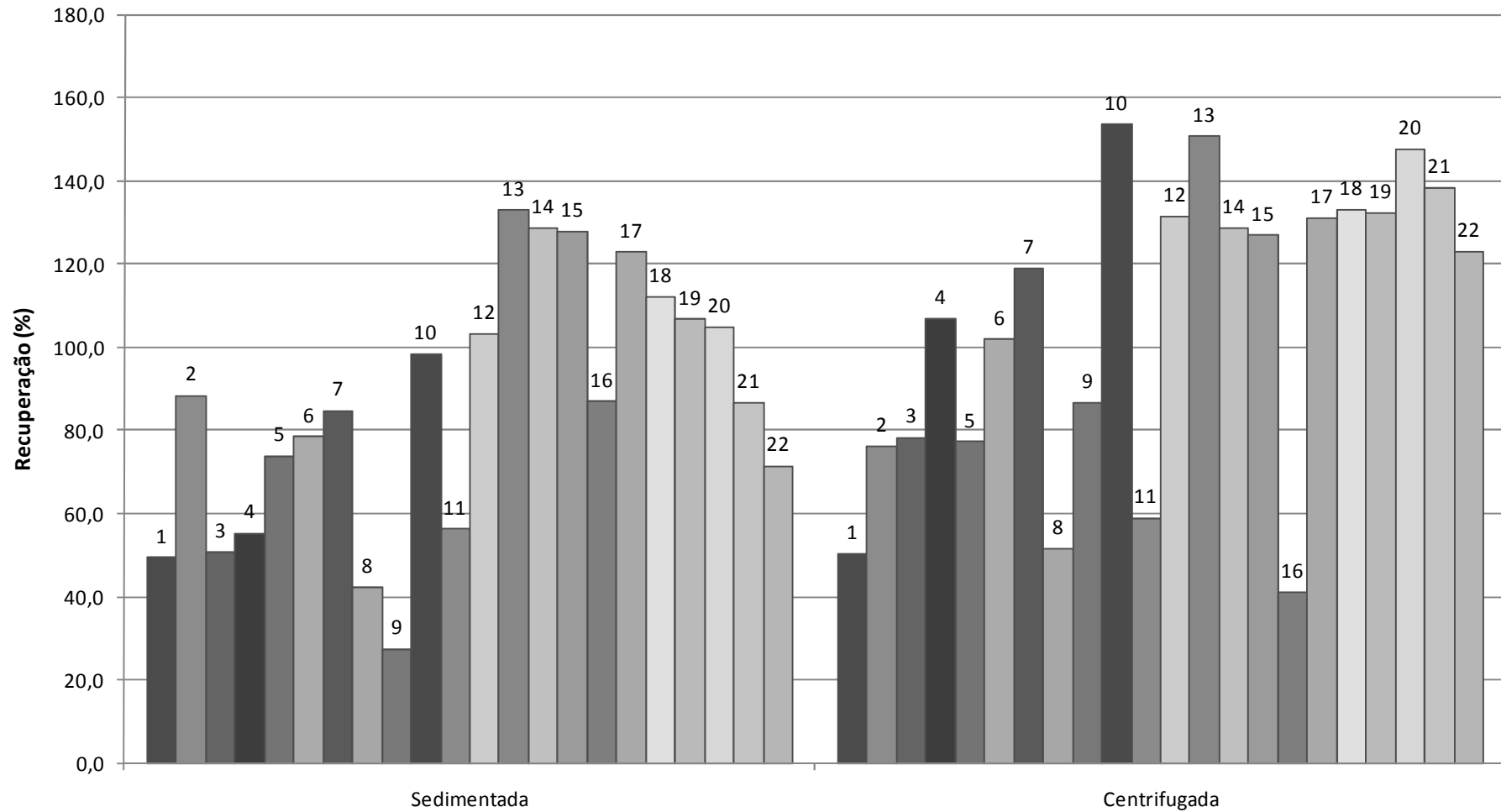
Observa-se na Figura 22 que os resultados das recuperações para amostra que passou pela etapa de centrifugação foram, em geral, maiores que 100%. A causa provável foi a perda de solvente extrator durante a centrifugação. Apesar de o volume de fase sedimentada coletado ser de 25  $\mu\text{L}$ , o restante pode ter evaporado da solução amostra + solvente extrator + solvente dispersor, causando aumento da concentração no extrato final obtido.

A utilização do padrão interno não permitiu a correção dos resultados, pois este é adicionado à fase sedimentada, após extração e transferência para o frasco, servindo apenas para correção do volume da fase sedimentada.

O padrão de controle normalmente é utilizado para monitorar erros aleatórios no processo de extração e controle de qualidade de rotina, pelo monitoramento da recuperação obtida, não sendo utilizado nos cálculos.

Não foi utilizada a evaporação até a secura e ajuste do volume dos extratos obtidos porque alguns analitos apresentam alta volatilidade, conforme dados apresentados no item 2.2 e poderia haver perdas por evaporação.

Para os testes subseqüentes foi eliminada a etapa de centrifugação do procedimento.



**Figura 22:** Efeito da utilização da centrifugação na recuperação das substâncias químicas analisados.

Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto, 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloroeto de carbono), 2 mL de solvente dispersor (acetona). Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.



#### 4.4.7. Resfriamento da mistura de solventes extrator e dispersor

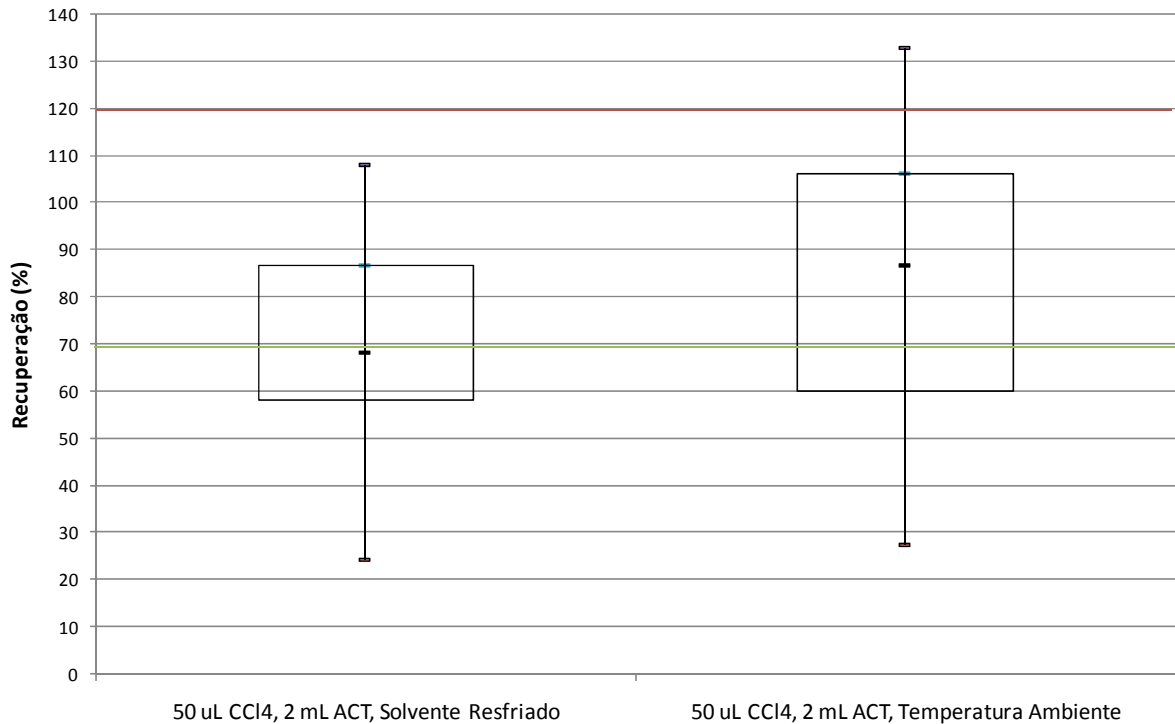
No teste comparativo utilizando-se dois procedimentos de preparo da mistura de solventes descritos a seguir:

- “Solvente resfriado”: foi utilizado um banho de gelo com temperatura entre 0 e 4 °C onde foi colocado um tubo de vidro no qual foram adicionados 2 mL do solvente dispersor acetona, com auxílio de uma seringa. Em seguida foram adicionados 50 µL do solvente extrator tetracloreto de carbono.
- “Temperatura ambiente”: o tubo de vidro onde foi feita a mistura de 2 mL de solvente dispersor acetona e 50 µL de solvente extrator (tetracloreto de carbono) foi mantido a temperatura ambiente de 20 °C durante a adição dos solventes com auxílio de seringa.

Para prevenir a volatilização, a ponta da agulha foi mergulhada no solvente dispersor durante a adição do solvente extrator.

Em ambos procedimentos, para extração utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com 10 µg L<sup>-1</sup> de cada composto em estudo, extraída com 50 µL de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2,0 mL de acetonitrila como solvente dispersor.

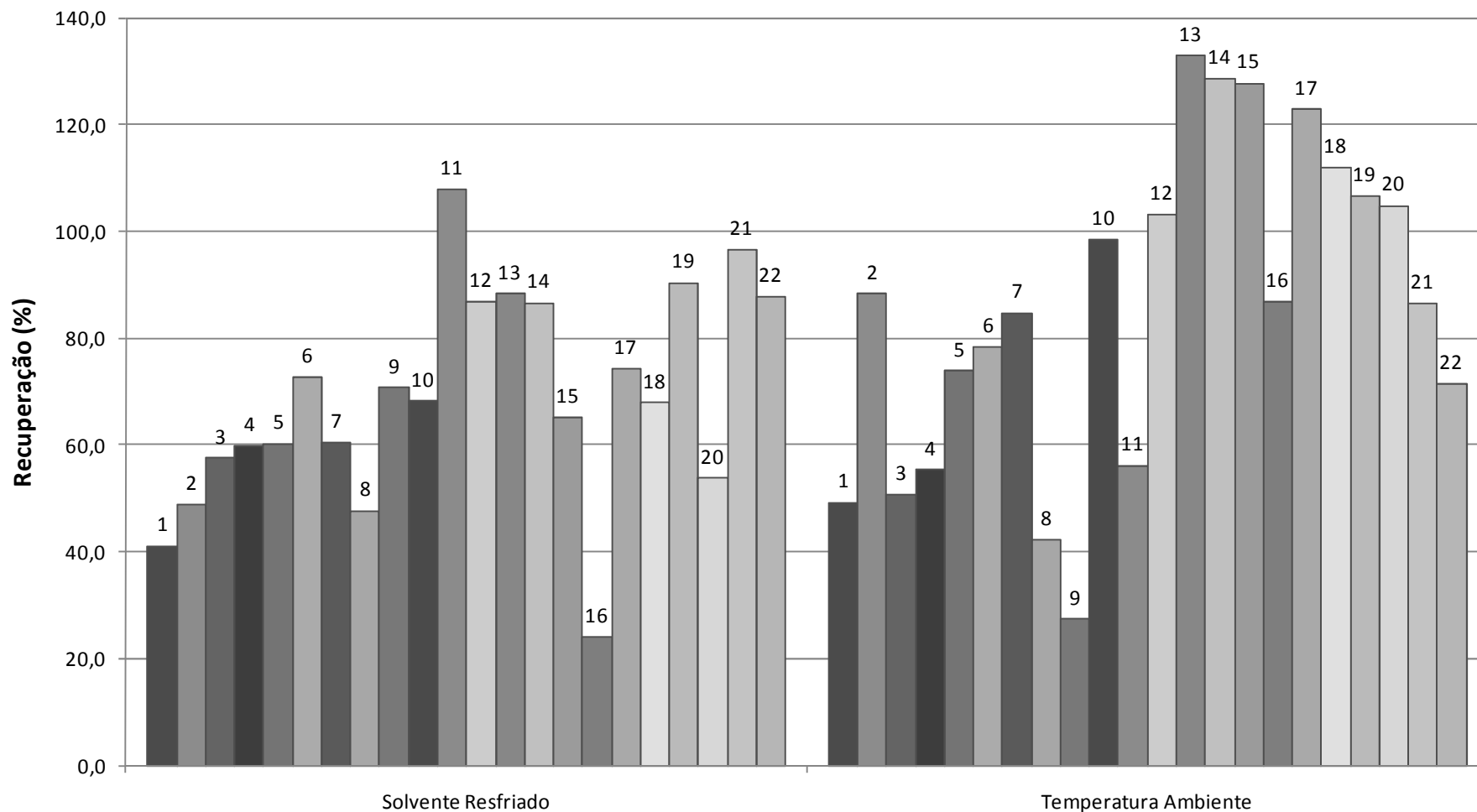
Na Figura 23 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas em cada teste, onde observa-se que para a amostra em que foram utilizados os solventes resfriados obteve-se recuperações com a mediana situada em 70% contra 88% para o teste com temperatura ambiente, onde no 4º quartil, temos resultados de recuperação acima dos 120%.



**Figura 23:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito do resfriamento da mistura de solventes.

CCl<sub>4</sub> = tetracloreto de carbono, ACT = acetona.

Conforme a Figura 24 as recuperações para a amostra extraída com mistura de solventes resfriada são inferiores a 100%, com exceção da 3,4 dicloro-anilina, o mesmo não ocorrendo para amostra onde a mistura de solvente não foi resfriada, onde trifluralina, oxirano, lindano e 2,4-D-éster apresentaram recuperações acima de 120%. Estes dados indicam que o solvente extrator é perdido por volatilização levando a concentração dos analitos no extrato final obtido e conseqüentemente ao aumento dos valores de recuperação. Considerando estes resultados foi mantido o resfriamento da mistura de solventes nos testes subseqüentes.



**Figura 24:** Efeito do resfriamento da mistura de solventes na recuperação das substâncias químicas analisadas.

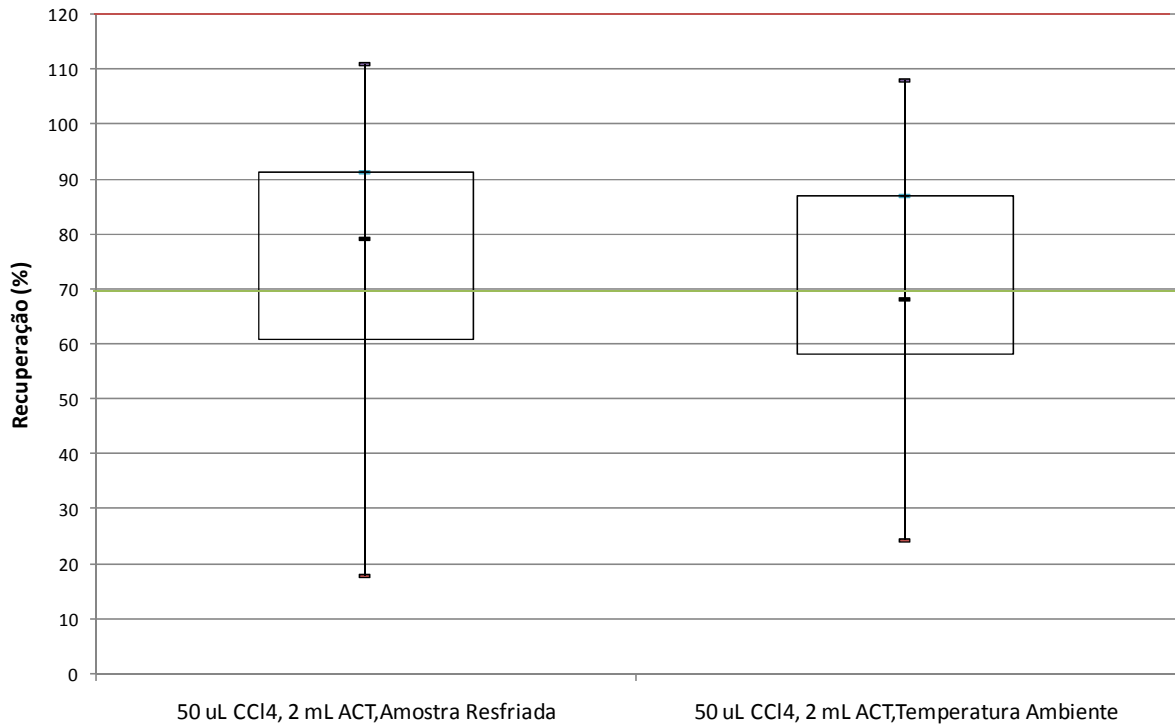
Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto,  $50 \mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloreto de carbono), 2 mL de solvente dispersor (acetona). Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (*o+m+p*), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

#### 4.4.8. Resfriamento da amostra

No teste com resfriamento da amostra esta foi mantida em banho de gelo (0 a 4 °C) durante a extração. No teste sem resfriamento a amostra foi mantida a temperatura ambiente durante o procedimento de extração. Em ambos os casos, utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 2 mL de acetona como solvente dispersor.

Na Figura 25 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas em cada teste. Observa-se que para a amostra em que foi utilizado o resfriamento a mediana ficou em 79% e no teste em que a amostra não foi resfriada a mediana em 69%, com o 1º e 2º quartis indicando que cerca de 50% dos valores de recuperação ficaram abaixo do mínimo aceitável de 70%.

Na Figura 26 são apresentados os resultados para recuperação de cada uma dos pesticidas e das substâncias químicas em estudo no teste realizado. A média das recuperações para o extrato obtido com a amostra resfriada foi de 75% e para a amostra extraída a temperatura ambiente a média das recuperações foi de 69%.

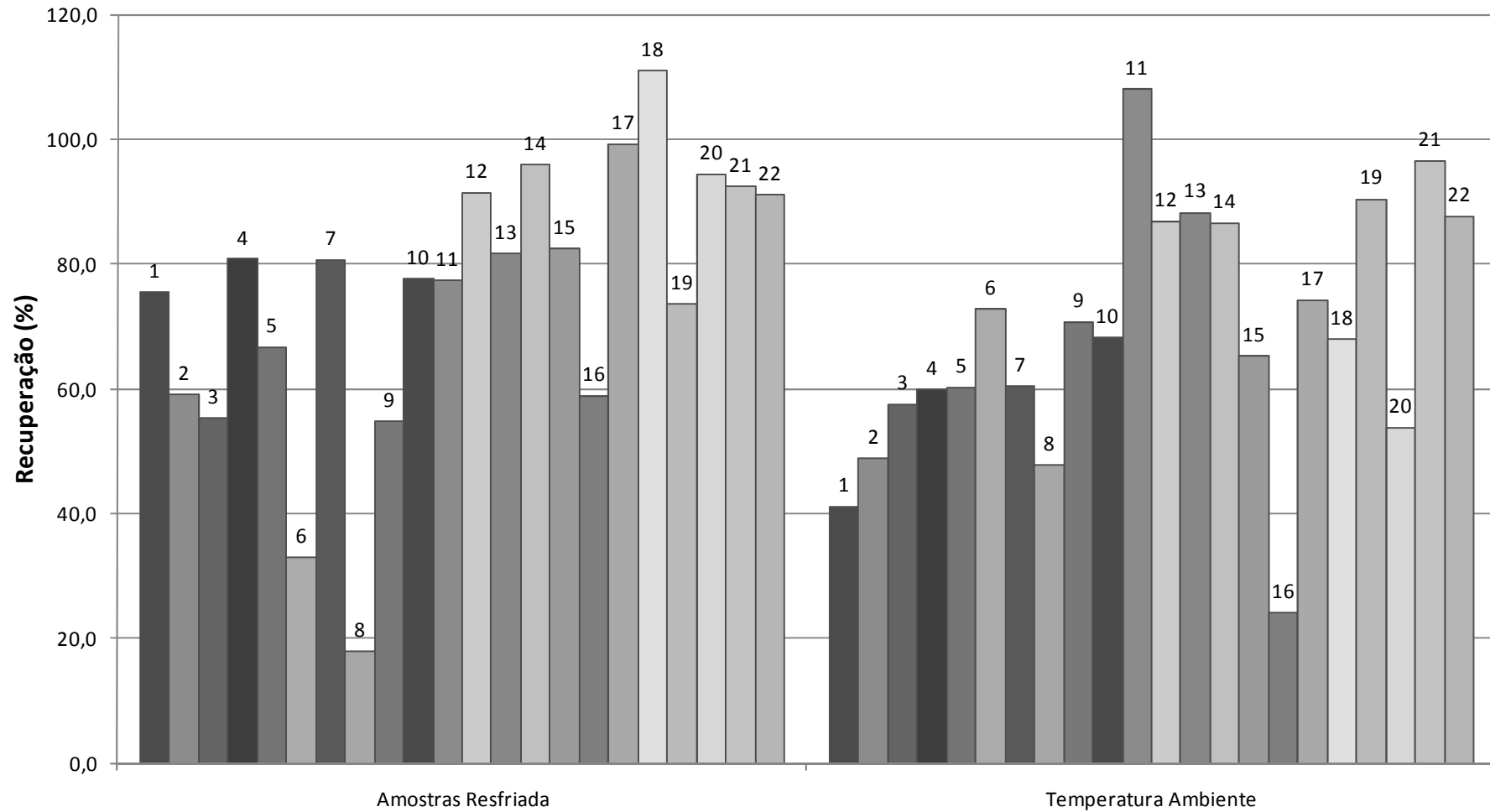


**Figura 25:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste comparando o efeito utilização de resfriamento da amostra.

CCl<sub>4</sub> = tetracloreto de carbono, ACT = acetona.

Em ambos os casos as recuperações obtidas foram, em sua maioria, menores que 100%, indicando que não ocorreu perda significativa do solvente extrator, devido a volatilização deste durante o procedimento de extração.

Estes resultados, quando comparados com os resultados obtidos nos testes com resfriamento dos solventes, indicam que volatilização do solvente extrator se dá principalmente durante a mistura e adição dos solventes à amostra, mas a condição de resfriamento da amostra foi mantida para prevenir a volatilização do solvente durante o processo de extração.



**Figura 26:** Efeito da utilização de resfriamento da amostra na recuperação dos pesticidas e das substâncias químicas analisadas. Condições de extração: 5 mL de amostra contendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto,  $50 \mu\text{L}$  de solvente extrator (tetracloreto de Carbono), 2 mL de solvente dispersor (acetona). Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endosulfan, (21)  $\beta$ -endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.4.9. Procedimento otimizado

O método está baseado na injeção rápida, com auxílio de uma seringa de uma mistura previamente resfriada em banho de gelo a uma temperatura entre 0 e 4 °C dos solventes extrator (**50 µL de tetracloreto de carbono**) e dispersor (**2,0 mL de acetona**) em uma amostra aquosa (5,0 mL) contida em um tubo de vidro, com fundo cônico, graduados com capacidade para um volume de 10 mL, sem correção de pH e mantida resfriada em banho de gelo entre 0 e 4 °C. O resfriamento é utilizado para prevenir a perda por volatilização dos analitos de menor ponto de ebulição nas amostras presentes na amostra e a perda por volatilização do solvente extrator da mistura de solventes.

A ponta da agulha é posicionada imediatamente acima da superfície do líquido, à uma distância de 1 a 2 mm e o êmbolo pressionado rapidamente, formando um jato de líquido constituído pela mistura dos solvente extrator e dispersor, promovendo a mistura com a fase aquosa (amostra).

No momento da mistura, uma solução turva é formada onde as microgotas do solvente extrator são dispersas na fase aquosa. Após um tempo de espera de 10 min em que a mistura é mantida resfriada, as microgotas sedimentam no tubo cônico. Não é necessário agitar a amostra nesta etapa.

Retira-se a fase sedimentada do fundo do tubo cônico com auxílio de uma microseringa de 25 µL e transfere-se para um frasco de 200 µL, onde foram previamente adicionados 5 µL da solução analítica de padrão interno. O volume recolhido é de 20 a 25 µL e não é o volume total da fase sedimentada para evitar introdução de água no extrato. Um diagrama demonstrando as etapas do procedimento pode ser visto na Figura 27.

Utilizou-se o volume de fase sedimentado medido na microseringa nos cálculos de correção pelo método do padrão interno. Para cálculo do fator de pré-concentração é utilizado o volume de solvente extrator adicionado. O fator de pré-concentração obtido é de 100 vezes. A modificação deste procedimento em relação ao proposto na literatura é a eliminação do passo de centrifugação e o resfriamento da amostra e dos solventes durante todo o processo de extração.

Alternativamente pode ser utilizado o clorofórmio como solvente extrator e a acetonitrila como solvente dispersor, mantendo-se as demais condições previstas no procedimento otimizado. Apesar de o clorofórmio ser mais solúvel em água e ser mais

volátil que o tetracloreto de carbono, cujo ponto de ebulição é 76,7 °C contra 61 °C do clorofórmio, a condição de resfriamento permite a redução significativa do efeito de volatilização do solvente extrator. No entanto, devido às dificuldades de obtenção comercial do tetracloreto de carbono e aos riscos ambientais advindos do custo deste solvente, o solvente mais recomendado é o clorofórmio.



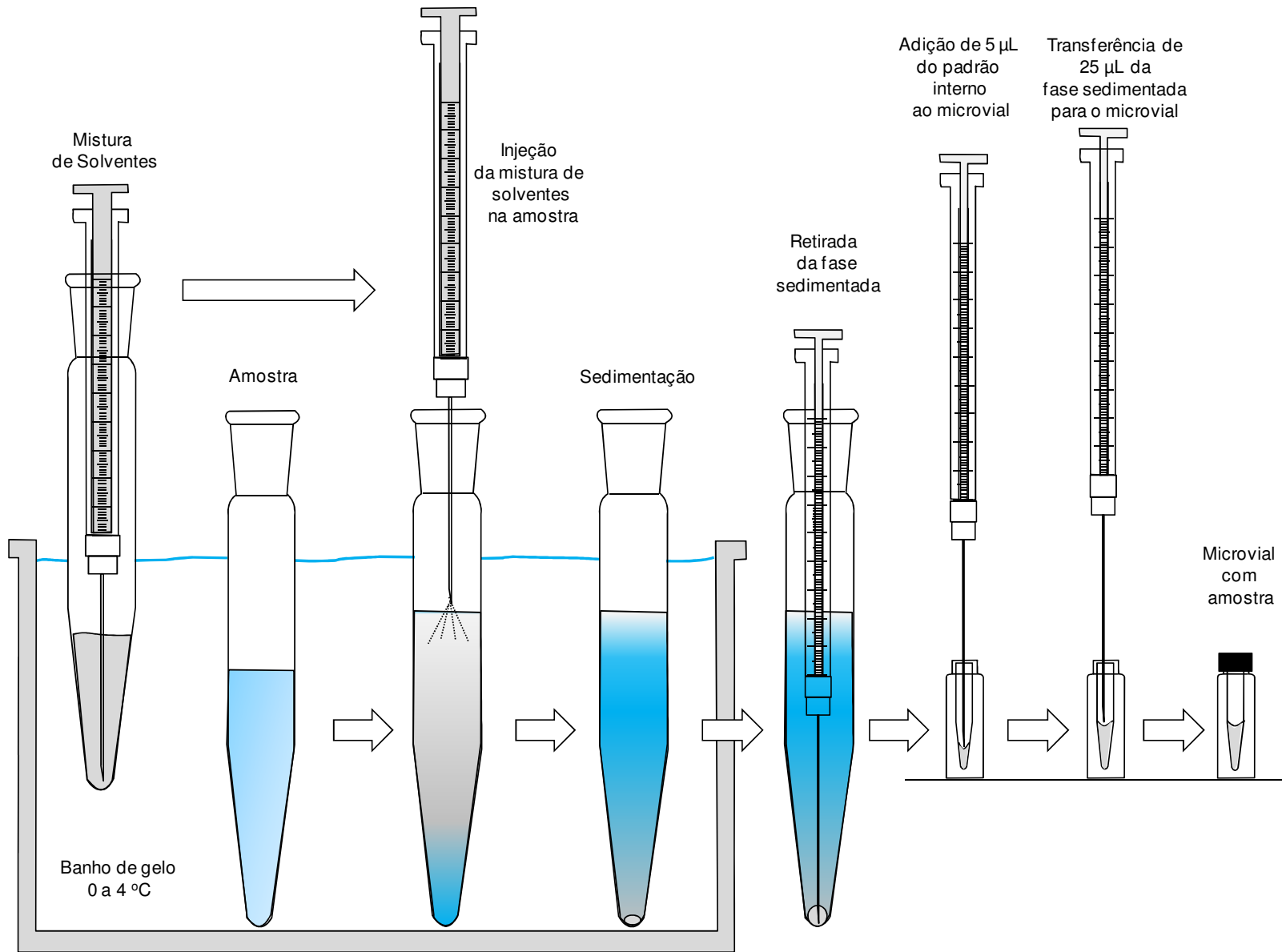
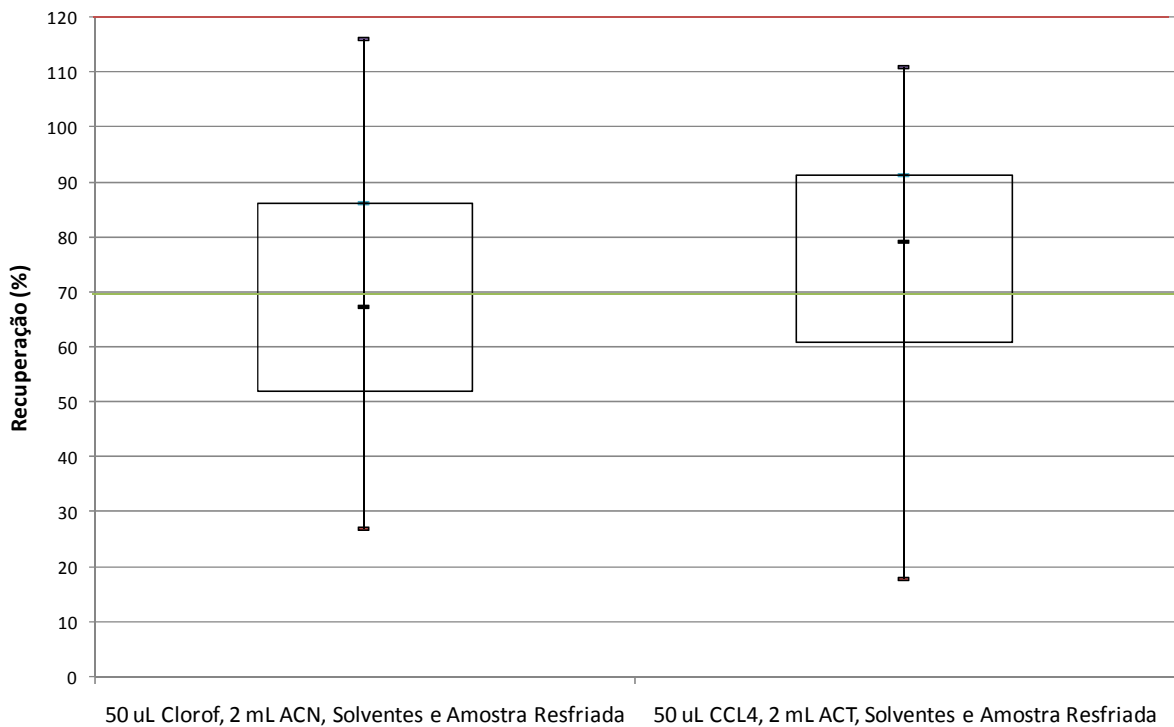


Figura 27: Desenho esquemático do procedimento DLLME.

#### 4.4.10. Comparação do procedimento otimizado com um procedimento alternativo

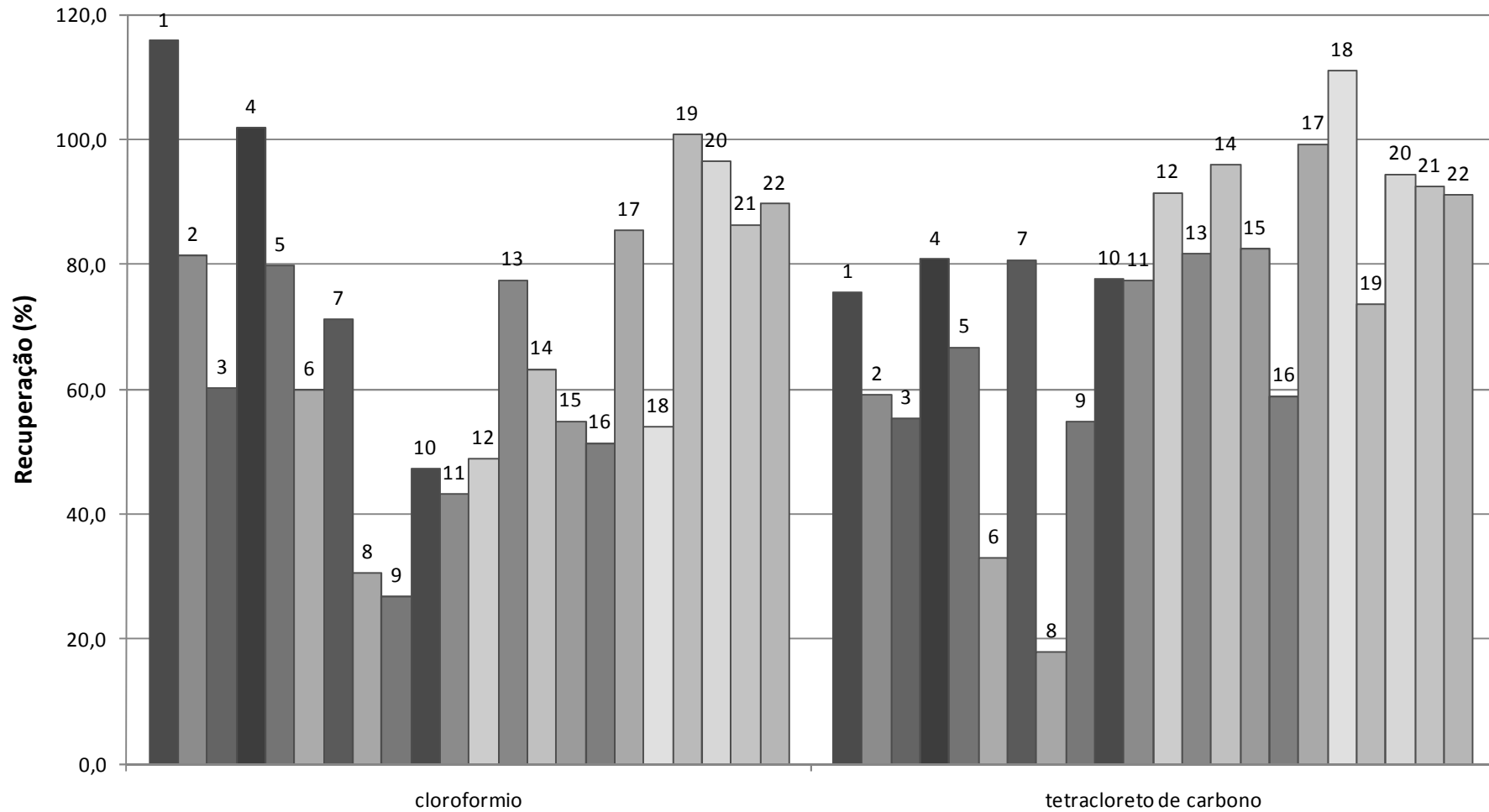
Na validação do método foi utilizado o tetracloreto de carbono, em conformidade com os testes de otimização realizados. Os gráficos das Figuras 28 e 29 apresentam os resultados das recuperações obtidas utilizando-se as duas combinações de solvente proposta, ou seja, clorofórmio/acetona ou tetracloreto de carbono/acetona, onde se observa resultados bastante semelhantes em ambos os casos, mas com uma dispersão menor para o tetracloreto de carbono/acetona.

Para este teste utilizou-se 5 mL de amostra (água de torneira) fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada composto em estudo. Para extração foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  de solvente extrator e 2 mL de solvente dispersor.



**Figura 28:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste utilizando-se dois procedimentos recomendados.

Clorof.= clorofórmio,  $\text{CCl}_4$  = tetracloreto de carbono, ACT = acetona, ACN = acetonitrila.



**Figura 29:** Comparação entre as recuperações obtidas na extração utilizando-se as misturas de solventes: a - 50  $\mu$ L de cloroformio, 2 mL de acetona e b – 50  $\mu$ L de tetracloreto de carbono e 2 mL de acetona, ambos com resfriamento.

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endosulfan, (21)  $\beta$ -endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.4.11. Comparação das recuperações em diferentes níveis de concentração

A Figura 30 apresenta gráfico *Box and Whiskert* para todos os testes realizados de otimização do procedimento DLLME onde é possível observar que houve uma significativa redução na dispersão dos resultados com a utilização do resfriamento da mistura de solventes e da amostra.

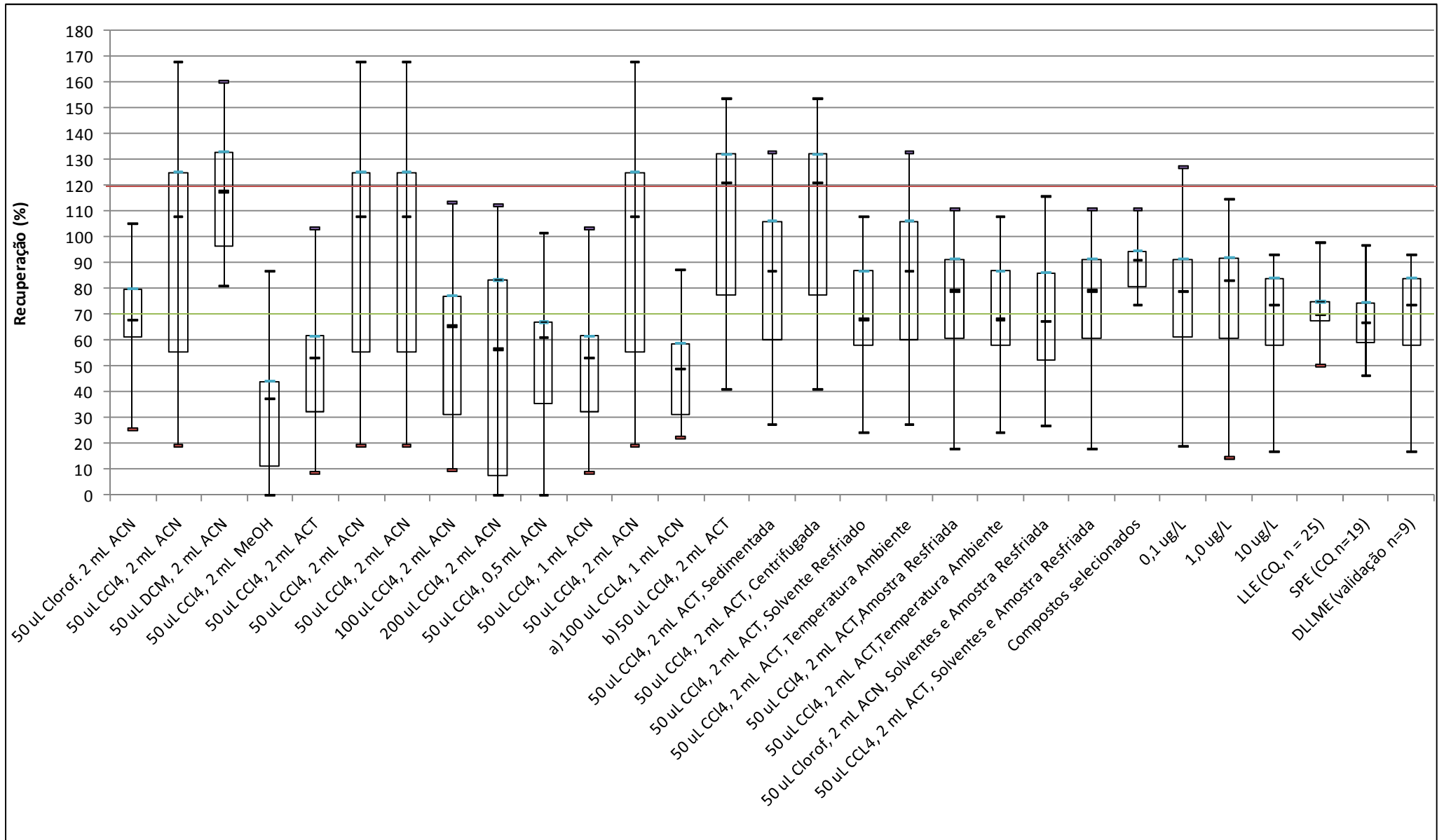
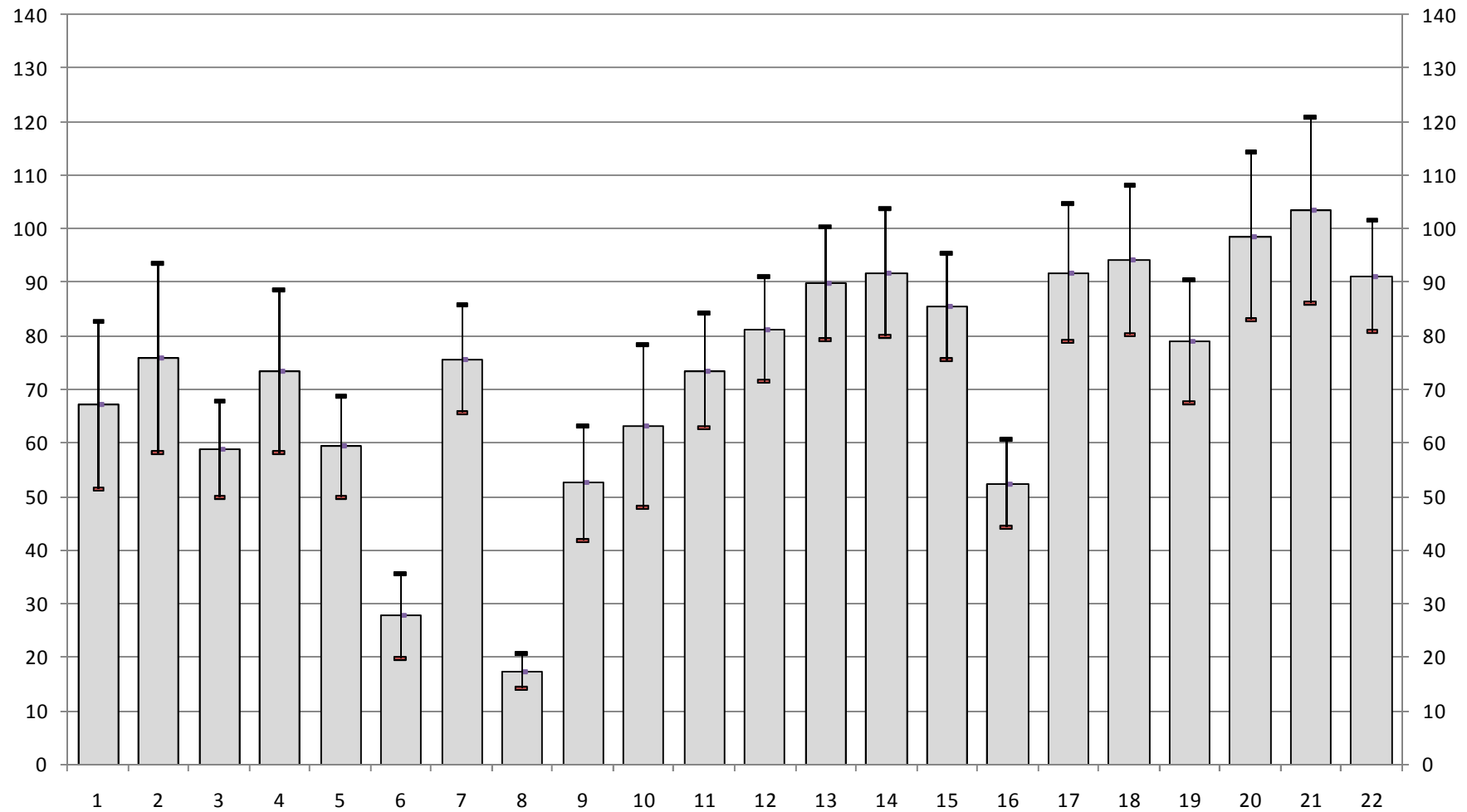


Figura 30: Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em todos os testes realizados para DLLME.

A Figura 31 apresenta o gráfico com as médias recuperações obtidas em três níveis de concentração, considerando a faixa de aceitação, na qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120% (MAMUN *et al.*, 2009), os valores de recuperação obtidos foram considerados aceitáveis para mononitro, 3,4 dicloro-anilina, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

PCBTF, xileno (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, 1,2-diclorobenzeno, DCPI+diuron, dinitro e propanil apresentaram valores de recuperação entre 46,6 e 70%, para um ou mais níveis de concentração, não sendo adequados para determinação quantitativa por este método, conforme considerando a abordagem empregada neste trabalho, onde se avaliou a DLLME como uma técnica de extração exaustiva.

As recuperações obtidas para nitrobenzeno e DDVP + triclorfon ficaram muito abaixo da média dos demais, variando entre 14,3 e 33,9% o que pode ser explicado pela solubilidade em água, cujo valor de  $1.900 \text{ mg L}^{-1}$  ( $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para o nitrobenzeno,  $18.000 \text{ mg L}^{-1}$  ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para o DDVP e  $120.000 \text{ mg L}^{-1}$  ( $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para o triclorfon, que dificulta a extração pela mistura de solventes acetona e tetracloreto de carbono.

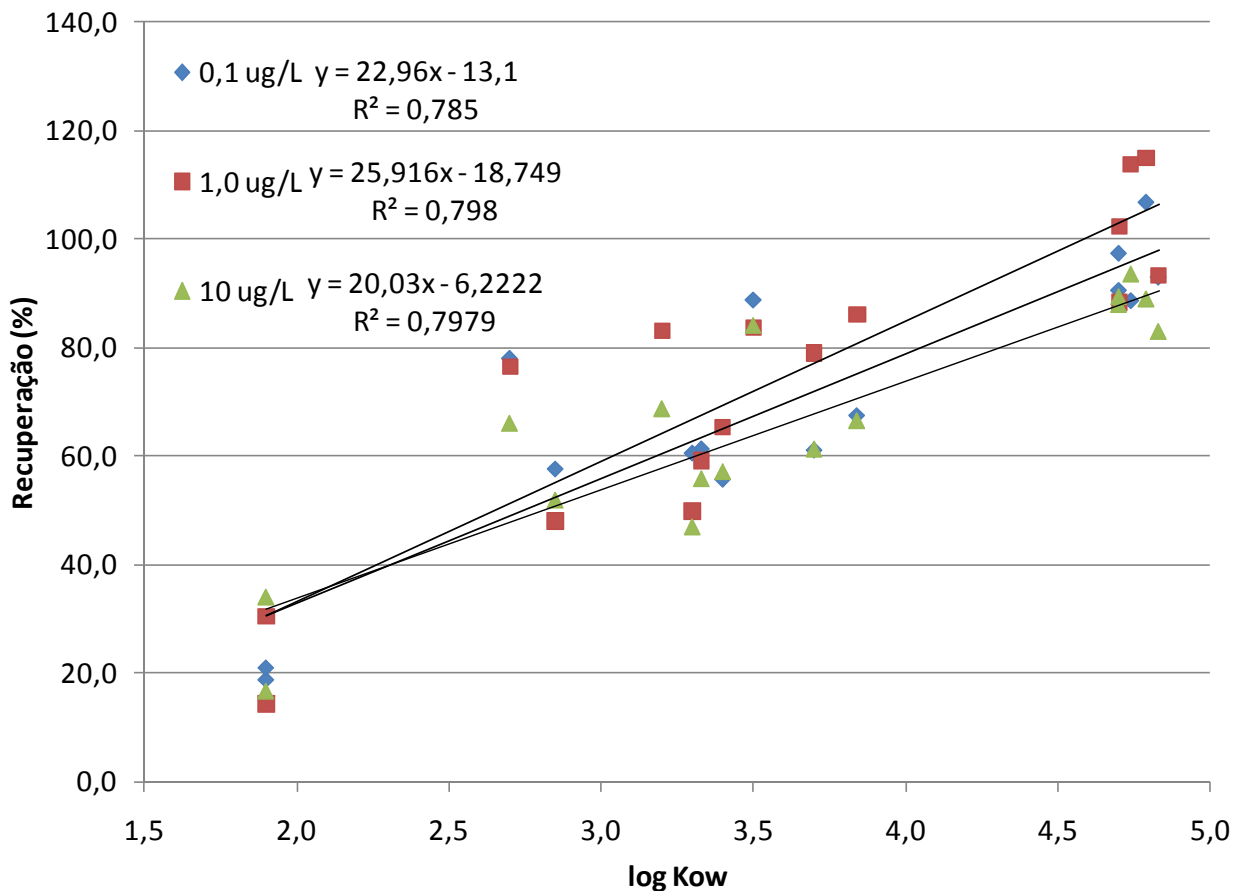


**Figura 31:** Gráfico das médias das recuperações (%) em três níveis de fortificação (0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endosulfan, (21)  $\beta$ -endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.4.12. Comparação dos resultados de recuperação com parâmetros físico-químicos

Na Figura 32 é apresentado o gráfico construído a partir dos resultados das recuperações em três níveis de concentração versus o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água para cada composto. Para cada concentração foi calculada a equação linear da correlação e o respectivo coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

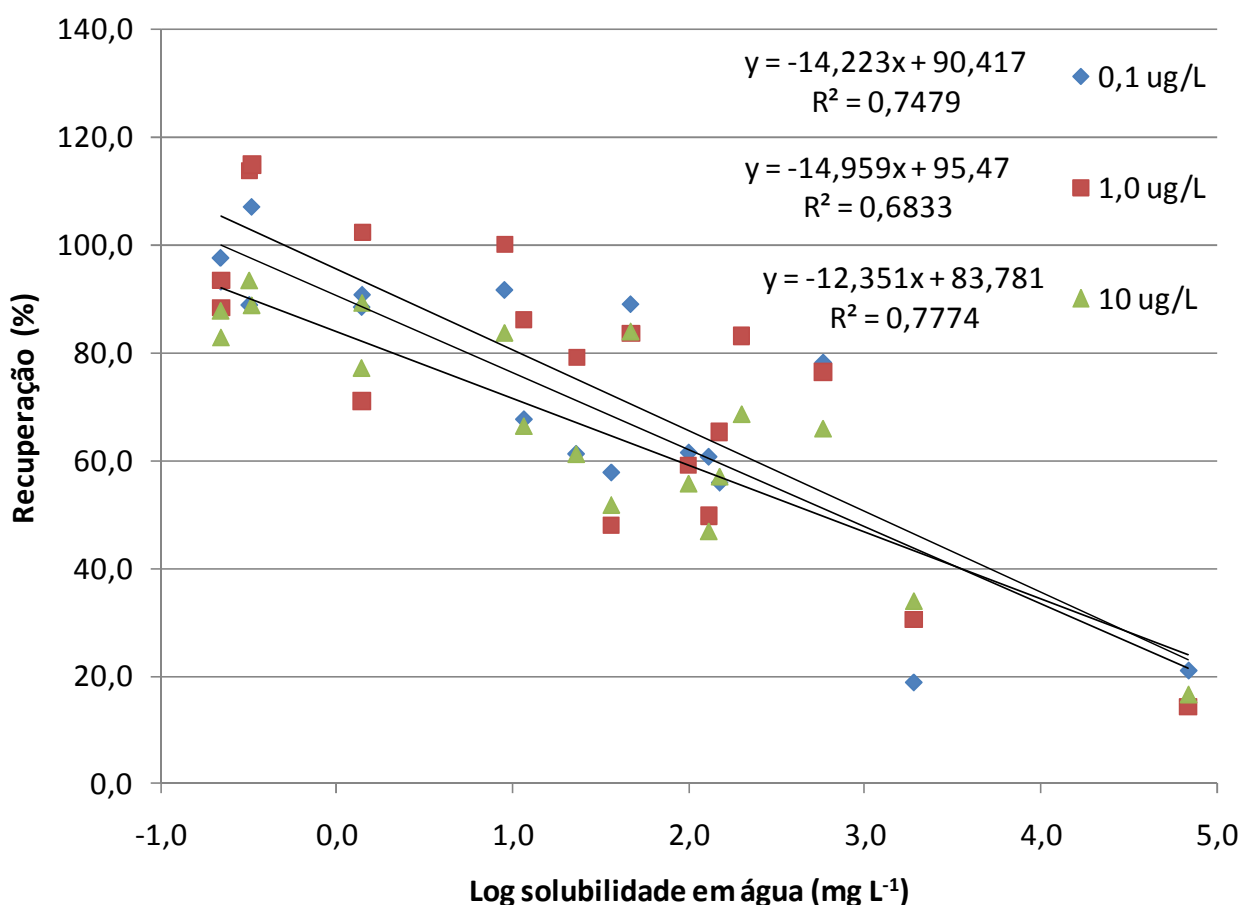


**Figura 32:** Gráfico do logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) versus as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação.

Os resultados obtidos confirmam o comportamento esperado em função do coeficiente de partição de cada composto em estudo, ou seja, quanto maior o  $K_{ow}$ , maior hidrofobicidade, e, portanto, maior a eficiência de extração, sendo este comportamento uniforme ao longo da faixa de concentração avaliada no teste.



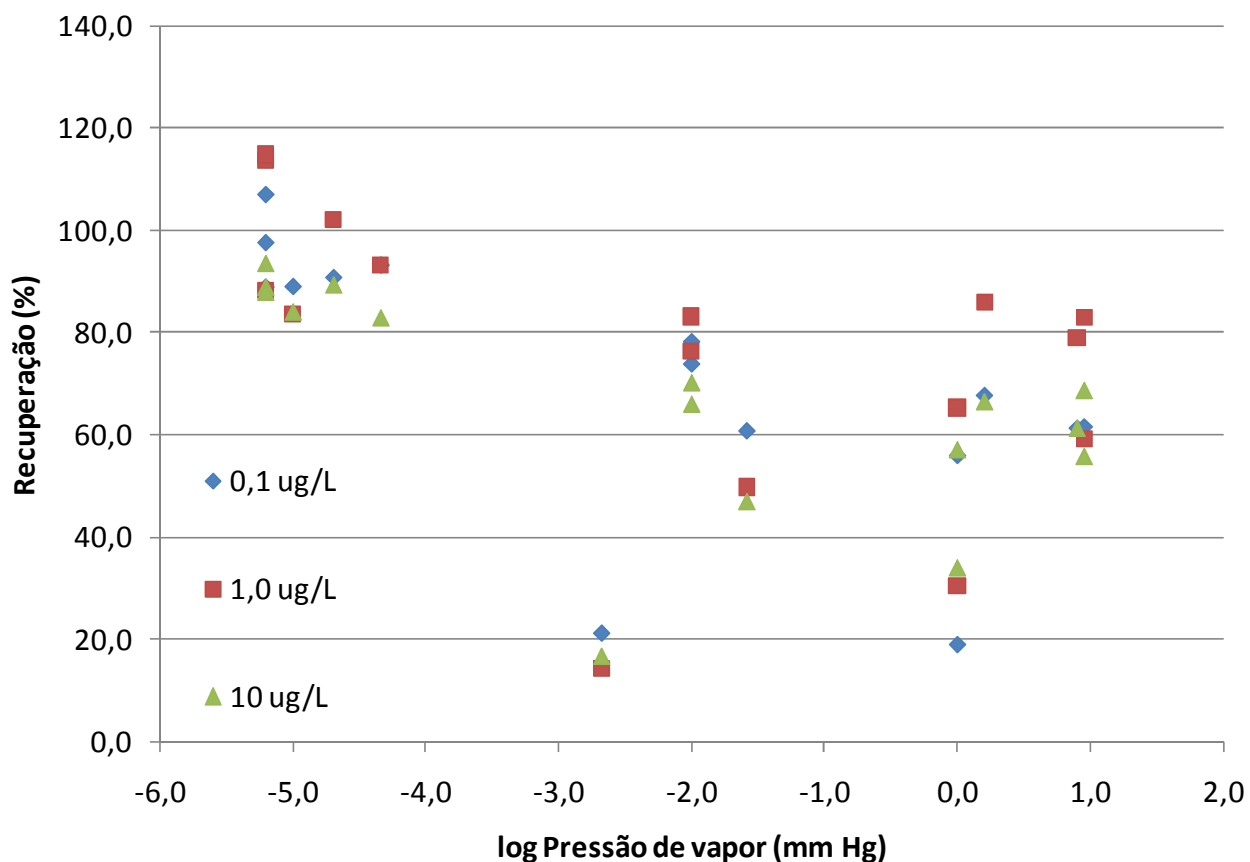
Na Figura 33 é apresentado o gráfico construído a partir dos resultados das recuperações em três níveis de concentração *versus* o logaritmo da solubilidade em água dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Para cada concentração foi calculada a equação linear da correlação e o respectivo coeficiente de determinação ( $r^2$ ).



**Figura 33:** Gráfico do logaritmo da solubilidade em água (mg L<sup>-1</sup>) *versus* as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação.

Os resultados obtidos confirmam o comportamento esperado em função da solubilidade de cada composto em estudo, ou seja, quanto maior a solubilidade menor a eficiência de extração, sendo este comportamento uniforme ao longo da faixa de concentração avaliada no teste, com coeficiente de determinação entre 0,68 e 0,77.

Na Figura 34 é apresentado o gráfico construído a partir dos resultados das recuperações em três níveis de concentração *versus* a pressão de vapor para cada composto.



**Figura 34:** Gráfico do logaritmo da pressão de vapor (mm Hg) *versus* as recuperações (%) obtidas em três níveis de fortificação.

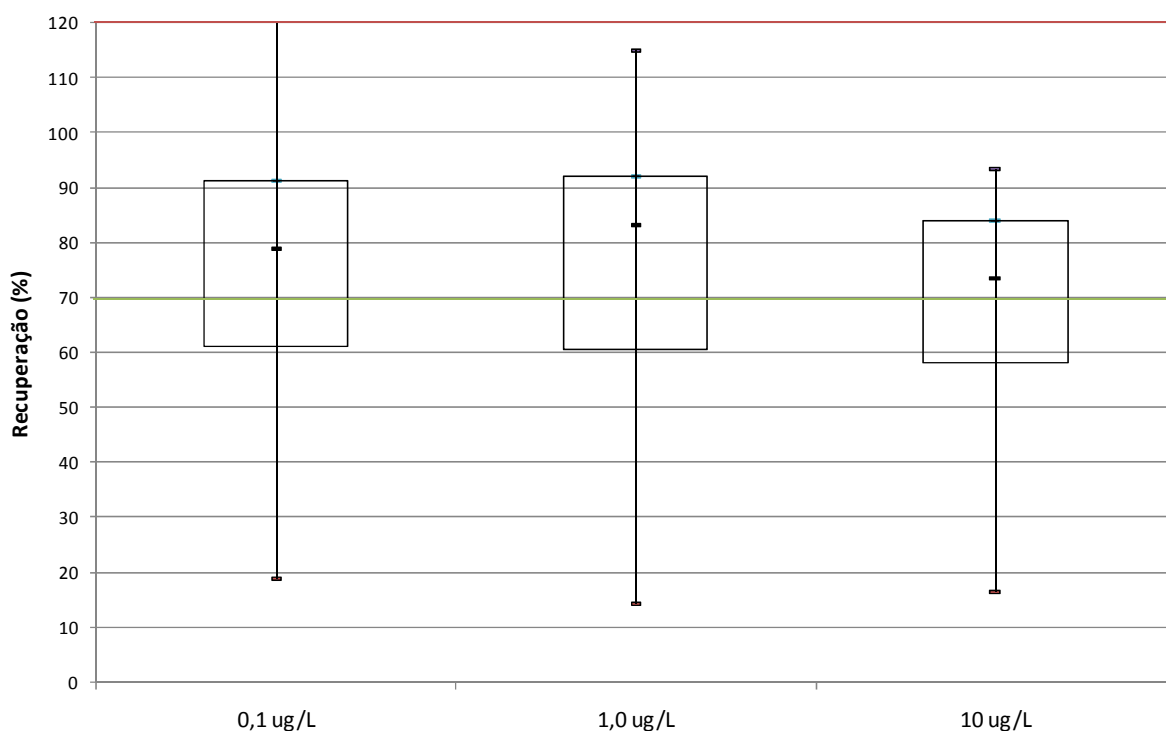
Nas condições otimizadas com o resfriamento dos solventes e amostras, ficou demonstrado que não ocorrem perdas por volatilização dos analitos durante a extração, fato evidenciado pela baixa correlação entre a pressão de vapor e as recuperações obtidas em diferentes níveis de concentração.

Devido a baixa correlação entre os dados, não foram traçadas linhas de tendência para no gráfico da Figura 34, assim como são apresentadas as equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação.

#### 4.4.13. Escolha dos pesticidas e substâncias químicas para validação do método analítico

Na Figura 35 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas para os três níveis de concentração, onde se observa que com o aumento da concentração da fortificação, há uma pequena redução na dispersão dos resultados.

Nos três grupos houve recuperação bem abaixo do mínimo aceitável de 70% para alguns dos analitos avaliados.

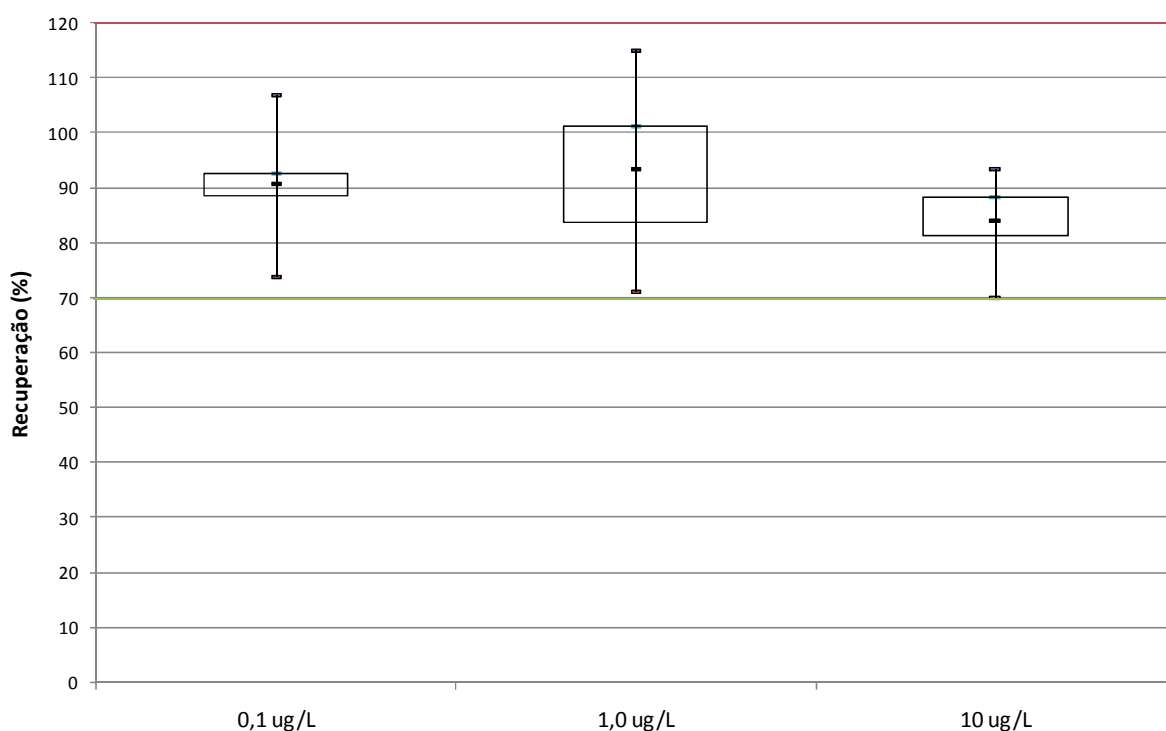


**Figura 35:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com diferentes níveis de concentração.

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro, (8) DDVP + triclorfon, (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano, (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

Com base nestes resultados foram escolhidos para validação do método analítico: mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal 1,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

Na Figura 36 é apresentado o gráfico tipo *Box and Whisker* para os resultados das recuperações obtidas para os três níveis de fortificação, para os pesticidas e substâncias químicas escolhidas para validação do método.



**Figura 36:** Gráfico *Box and Whisker* para as recuperações obtidas em cada teste com diferentes níveis de concentração para mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal 1,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

Os resultados obtidos para os pesticidas e substâncias químicas selecionados, além de obviamente estarem dentro da faixa de aceitação dos resultados de recuperação, apresentam pouca dispersão, com uma distribuição muito próxima da curva normal.

#### 4.4.14. Avaliação da DLLME como técnica extração de equilíbrio

A Tabela 8 apresenta as equações do modelo matemático de descrição das curvas analíticas obtidas em amostras fortificadas, bem como os valores do coeficiente de determinação do modelo ( $r^2$ ).

**Tabela 8:** Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas e substância químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para amostras fortificadas.

Composto	Equação do Modelo	$r^2$
PCBTF (1)	$2,7777.10^6 x - 4,4483.10^5$	0,9997
Xileno (o+m+p) (2)	$4,5646.10^6 x + 1,1790.10^7$	0,9996
PCT (3)	$3.6084.10^6 x - 5,1108.10^5$	0,9996
3,4-DCBTF (4)	$7,4266.10^5 x - 1,4152.10^5$	0,9997
1,2-diclorobenzeno (5)	$5,8761.10^6 x - 86287.10^5$	0,9997
Nitrobenzeno (6)	$1,9119.10^6 x - 2.1266.10^5$	0,9999
Mononitro (7)	$7,7862.10^5 x - 6.6558.10^4$	0,9999
DDVP + triclorfon (8)	$4,1520.10^5 x - 4,5043.10^4$	0,9999
DCPI+diuron (9)	$1,9507.10^6 x - 9,5044.10^4$	0,9999
Dinitro (10)	$2,2474.10^5 x - 1,4769.10^4$	0,9999
3,4-DCA (11)	$1,3984.10^6 x - 2,0745.10^4$	0,9999
Ketona (12)	$3,2888.10^6 x - 1,1109.10^5$	0,9998
Trifluralina (13)	$3,4825.10^6 x - 3,0233.10^5$	9,9999
Oxirano (14)	$3,1876.10^6 x - 1,0567.10^5$	0,9998
Lindano (15)	$1,4371.10^6 x - 2,8947.10^4$	0,9999
Propanil (16)	$1,1072.10^6 x - 1,4572.10^5$	0,9999
2,4-D Éster (17)	$9,1193.10^5 x - 3,5793.10^3$	0,9998
Clorpirifós (18)	$7,1531.10^5 x - 2,3970.10^4$	0,9998
Bromoketal (19)	$2,4827.10^6 x - 1,1560.10^5$	0,9999
$\alpha$ -Endosulfan (20)	$2,0879.10^6 x - 7,3091.10^5$	0,9997
$\beta$ -Endosulfan (21)	$3,2291.10^6 x - 1,4354.10^4$	0,9999
Endosulfan Sulfato (22)	$4,1929.10^6 x - 1,1154.10^5$	0,9999

Conforme os resultados, apresentados na Tabela 8, obtidos para as equações das curvas analíticas na faixa de 0,1 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pode-se concluir que, nesta faixa de concentração o modelo de regressão linear é adequado já que os valores de  $r^2$  foram maiores que 0,9996, o que é satisfatório segundo a literatura (INMETRO, 2007).

A Tabela 9 apresenta os valores de exatidão, representados pelos percentuais de recuperação calculados a partir das curvas analíticas de calibração construídas a partir da injeção de amostras fortificadas.

Esta abordagem, que considera a DLLME uma técnica de extração por equilíbrio, levou a obtenção de melhores resultados de recuperação, para PCBTF, xileno (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, nitrobenzeno, 1,2-diclorobenzeno, DDVP + triclorfon, DCPI+diuron, dinitro e propanil.

Para validação do método analítico foi mantida a avaliação da DLLME como uma técnica de extração exaustiva, mas os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que, mediante estudos complementares, a DLLME poderia ser aplicada aos compostos excluídos da validação.

**Tabela 9:** Recuperações (R) e Desvio Padrão Relativo (RSD) em % obtidas para o nível de concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  nas amostras fortificadas ( $n = 8$ ), considerando a DLLME como uma técnica de equilíbrio.

Composto	Exaustiva	Equilíbrio
	R (%) $\pm$ RSD (%)	R (%) $\pm$ RSD (%)
PCBTF (1)	61,2 $\pm$ 12,7	78,6 $\pm$ 19,4
Xileno (o+m+p) (2)	68,6 $\pm$ 17,6	77,5 $\pm$ 14,8
PCT (3)	55,7 $\pm$ 9,6	77,2 $\pm$ 11
3,4-DCBTF (4)	66,4 $\pm$ 12,3	87,1 $\pm$ 15,4
1,2-diclorobenzeno (5)	57 $\pm$ 9,8	94,5 $\pm$ 15,7
Nitrobenzeno (6)	33,9 $\pm$ 5,3	93,1 $\pm$ 10,1
Mononitro (7)	70,1 $\pm$ 9,8	82,9 $\pm$ 12,9
DDVP + triclorfon (8)	16,5 $\pm$ 1,8	114,1 $\pm$ 11,9
DCPI+diuron (9)	51,7 $\pm$ 9,5	102,8 $\pm$ 22
Dinitro (10)	76,9 $\pm$ 8,9	120,1 $\pm$ 11,8
3,4-DCA (11)	65,9 $\pm$ 12,1	88,2 $\pm$ 17,4
Ketona (12)	79,9 $\pm$ 11,4	115,8 $\pm$ 16,3
Trifluralina (13)	82,8 $\pm$ 11,6	87,2 $\pm$ 9,2
Oxirano (14)	85,3 $\pm$ 12,4	95,7 $\pm$ 12,9
Lindano (15)	83,9 $\pm$ 12,2	91,8 $\pm$ 9,9
Propanil (16)	46,8 $\pm$ 6,6	83,7 $\pm$ 16
2,4-D Éster (17)	83,7 $\pm$ 12	116,2 $\pm$ 20,4
Clorpirifós (18)	89,3 $\pm$ 15,4	99,8 $\pm$ 18,2
Bromoketal (19)	77,2 $\pm$ 12,5	126,5 $\pm$ 26,3
$\alpha$ -Endosulfan (20)	93,4 $\pm$ 15,3	113,2 $\pm$ 14,2
$\beta$ -Endosulfan (21)	88,8 $\pm$ 12,3	104,2 $\pm$ 12,2
Endosulfan Sulfato (22)	87,8 $\pm$ 12,5	88,3 $\pm$ 10,5

Esta abordagem, que considera a DLLME uma técnica de extração por equilíbrio, levou a obtenção de melhores resultados de recuperação, para PCBTF, xileno (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, nitrobenzeno, 1,2-diclorobenzeno, DDVP + triclorfon, DCPI+diuron, dinitro e propanil.

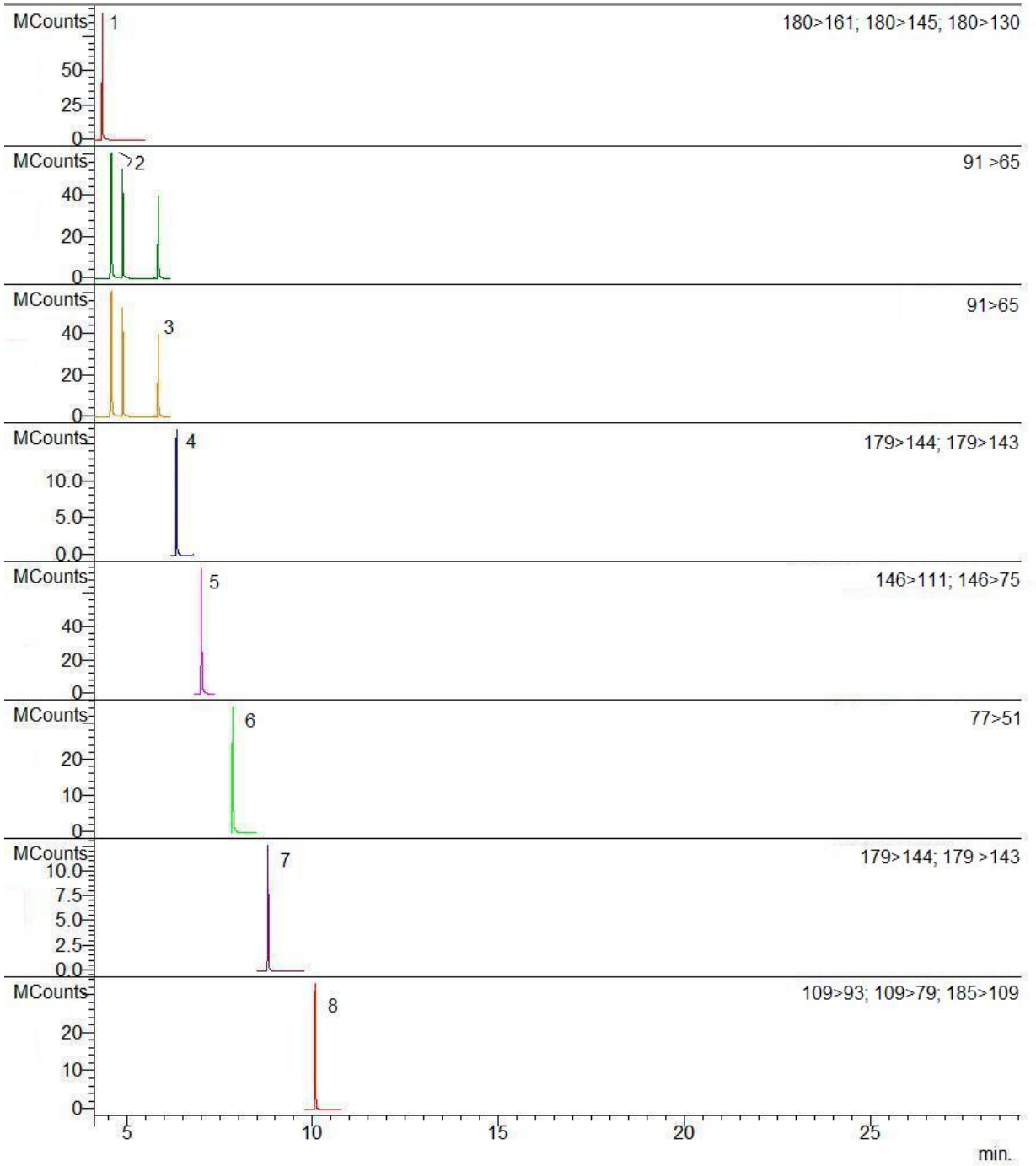
Para validação do método analítico foi mantida a avaliação da DLLME como uma técnica de extração exaustiva, mas os resultados apresentados na Tabela 9 indicam que, mediante estudos complementares, a DLLME poderia ser aplicada aos compostos excluídos da validação.



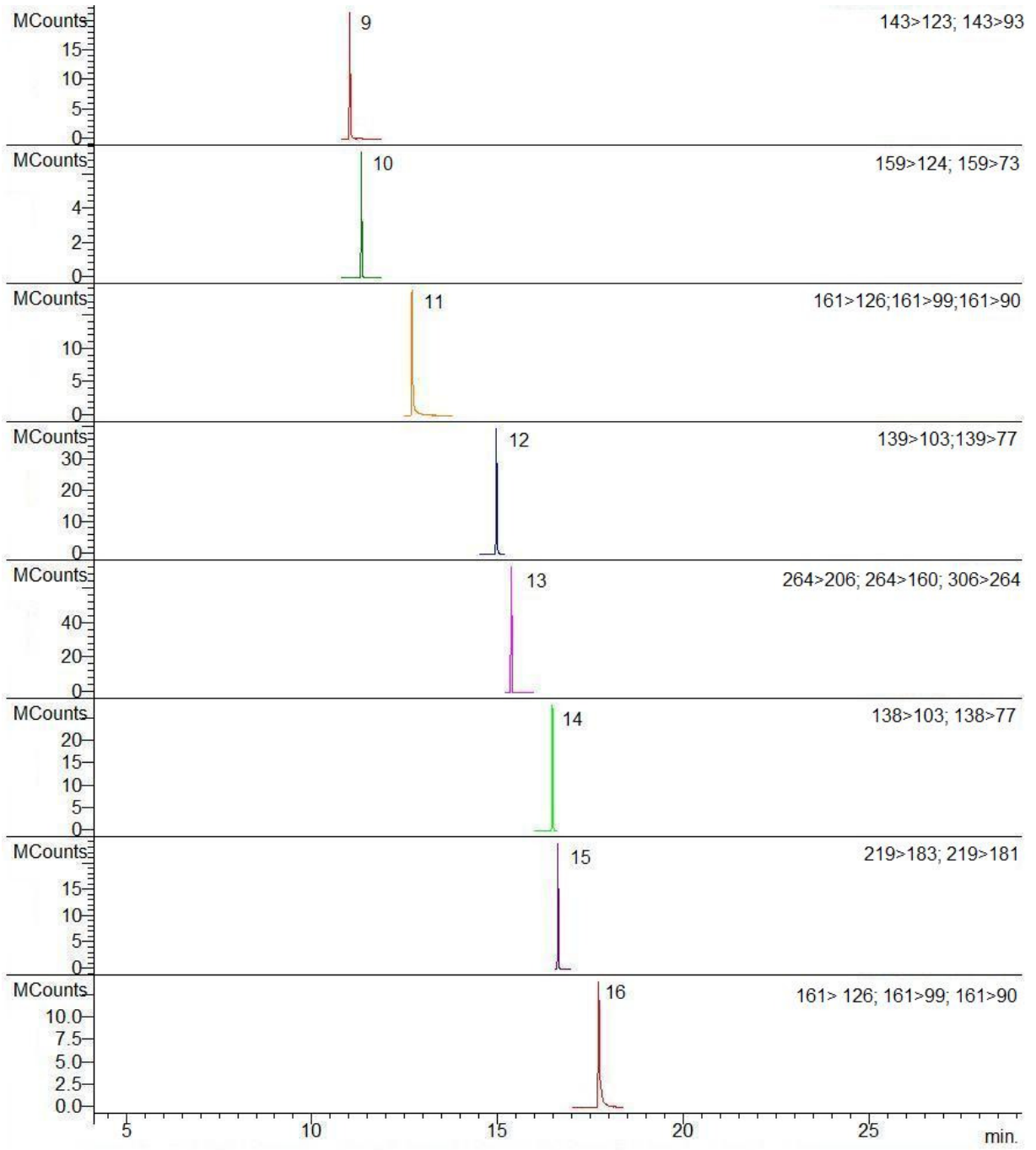
## 4.5. Validação do método analítico

### 4.5.1. Seletividade

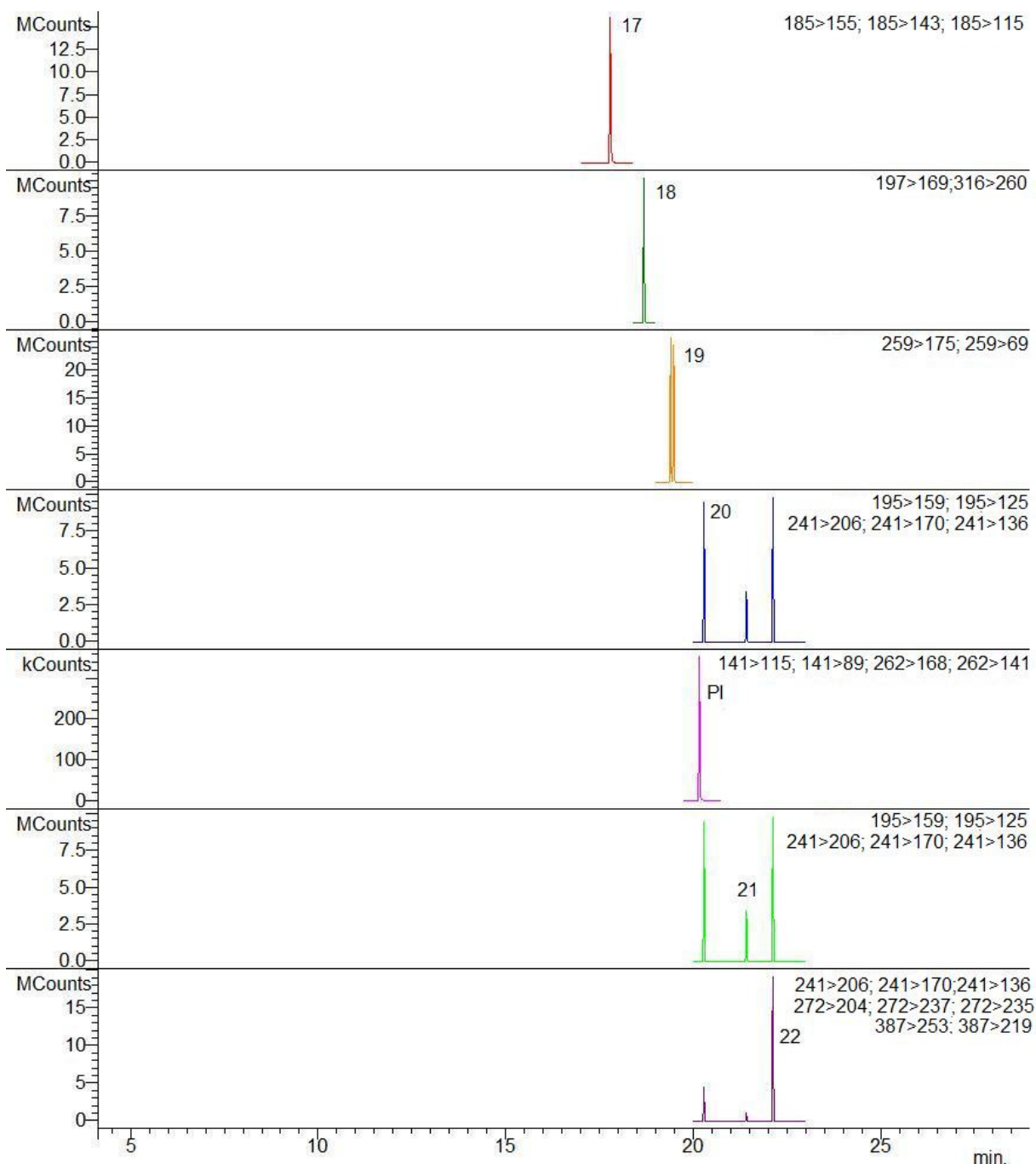
Na Figura 37 é apresentado o cromatograma obtido pela injeção no sistema GC-(TQ)MS/MS do extrato de uma amostra de água de torneira fortificada com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  dos pesticidas e substâncias químicas em estudo, com os respectivos segmentos das transições monitorados.



Continua na página seguinte (Figura 37).



Continua na página seguinte (Figura 37).



**Figura 37:** Cromatograma do nível de fortificação  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  em água de torneira com os segmentos e as transições utilizadas.

Identificação: (1) PCBTF, (2) xileno (o+m+p), (3) PCT, (4) 3,4-DCBTF, (5) 1,2-diclorobenzeno, (6) nitrobenzeno, (7) mononitro e (8) DDVP + triclorfon, : (9) DCPI+diuron, (10) dinitro, (11) 3,4 dicloro-anilina, (12) ketona, (13) trifluralina, (14) oxirano, (15) lindano e (16) propanil, (17) 2,4-D-éster, (18) clorpirifós, (19) bromoketal 1, (20)  $\alpha$ -endossulfan, (21)  $\beta$ -endossulfan e (22) endossulfan sulfato.

A comparação dos picos observados neste cromatograma, com o cromatograma apresentado na Figura 39, item 4.6.2. e a avaliação dos respectivos espectros de massas indicam que não existe sobreposição de entre os picos cromatográficos dos analitos e de possíveis interferentes.

#### **4.5.2. Curva analítica e ajuste do modelo de calibração**

A Tabela 10 apresenta as equações do modelo matemático de descrição das curvas analíticas obtidas para cada composto na faixa de concentração de 50 a 1000  $\mu$  L<sup>-1</sup>, bem como os valores do coeficiente de determinação do modelo ( $r^2$ ).

**Tabela 10:** Resultados obtidos para as curvas de calibração dos pesticidas e substâncias químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para a faixa de 50 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$

Composto	Equação do Modelo	$r^2$
PCBTF (1)	$1,5025x^2+6305,6x+2,4354.10^4$	0,9997
Xileno (o+m+p) (2)	$1,2634x^2+2,880.10^4x+1,6345.10^7$	0,9993
PCT (3)	$2,9324x^2+1,8546.10^4x+4,5027.10^4$	0,9996
3,4-DCBTF (4)	$0,9057x^2+2877,8467x+9266,4678$	0,9998
1,2-diclorobenzeno (5)	$1,5744x^2+7894,1421x+1,7590.10^5$	0,9995
Nitrobenzeno (6)	$0,8082x^2+5256,2153x+2,9153.10^5$	0,9994
Mononitro (7)	$0,7001x^2+1738,5366x+1,4169.10^4$	0,9998
DDVP + triclorfon (8)	$0,7372x^2+2290,3975x-2,3817.10^4$	0,9999
DCPI+diuron (9)	$0,3778x^2+2113,2725x-5,7793.10^4$	0,9993
Dinitro (10)	$1,0790x^2+2656,1018x-2,0726.10^4$	0,9999
3,4-DCA (11)	$1,7362x^2+2202,8954x+9,3177.10^4$	0,9998
Ketona (12)	$2,3011x^2+7429,5034-2,6145.10^4$	0,9998
Trifluralina (13)	$3,5242x^2+4723,9717x-3,1064.10^4$	0,9999
Oxirano (14)	$0,9000x^2+2189,7188x-7640,4951$	0,9999
Lindano (15)	$0,7016x^2+2246,2576x-6278,5874$	0,9996
Propanil (16)	$3,1111x^2+4671,0273x+9878,6260$	0,9999
2,4-D Éster (17)	$1,3382x^2+3900,8071x-4,9505.10^4$	0,9998
Clorpirifós (18)	$1,0055x^2+1298,7068x-1073,7756$	0,9999
Bromoketal (19)	$0,9296x^2+2053,9434x-14,3744.10^4$	0,9998
$\alpha$ -Endosulfan (20)	$0,2067x^2+864,5015x+5449,4858$	0,9988
$\beta$ -Endosulfan (21)	$0,6055x^2+519,3625x+9566,8848$	0,9999
Endosulfan Sulfato (22)	$0,4320x^2+772,7104x-7372,6372$	0,9998

Conforme os resultados obtidos para as equações das curvas analíticas (Tabela 10) pode-se concluir que o modelo de regressão utilizado (quadrático) é adequado para esta faixa de concentração, já que os valores obtidos para  $r^2$  foram maiores que 0,998, o que é satisfatório segundo a literatura (INMETRO, 2007).

A Tabela 11 apresenta as equações do modelo matemático de descrição das curvas analíticas obtidas para faixa de concentração de 5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , bem como os valores do coeficiente de determinação do modelo ( $r^2$ ).

**Tabela 11:** Resultados obtidos para as curvas analíticas dos pesticidas e substância químicas no sistema GC-(TQ)MS/MS para a faixa de 5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$

Composto	Equação do Modelo	$r^2$
PCBTF (1)	$4,3798 \cdot 10^4 x - 8,9606 \cdot 10^4$	0,9992
Xileno (o+m+p) (2)	$5,7648 \cdot 10^4 x + 9,9990 \cdot 10^6$	0,9997
PCT (3)	$5,4675 \cdot 10^4 x + 5,5175 \cdot 10^4$	0,9997
3,4-DCBTF (4)	$9795,2549x - 4,4137 \cdot 10^4$	0,9994
1,2-diclorobenzeno (5)	$1,1283 \cdot 10^5 x - 79221 \cdot 10^4$	0,9993
Nitrobenzeno (6)	$5,2397 \cdot 10^4 x + 1,1039 \cdot 10^5$	0,9999
Mononitro (7)	$8588,0889x - 3,4362 \cdot 10^4$	0,9997
DDVP + triclorfon (8)	$3,1197 \cdot 10^4 x - 3,7670 \cdot 10^4$	0,9997
DCPI+diuron (9)	$3,9933 \cdot 10^4 x - 1,7840 \cdot 10^4$	0,9935
Dinitro (10)	$2560,5474x - 1,5887 \cdot 10^4$	0,9940
3,4-DCA (11)	$1,7895 \cdot 10^4 x - 7,5745 \cdot 10^4$	0,9979
Ketona (12)	$5,5572 \cdot 10^4 x - 1,1271 \cdot 10^5$	0,9998
Trifluralina (13)	$3,1963 \cdot 10^4 x - 7,8824 \cdot 10^4$	0,9998
Oxirano (14)	$3,8367 \cdot 10^4 x - 8,2586 \cdot 10^4$	0,9999
Lindano (15)	$1,6814 \cdot 10^4 x - 5,8436 \cdot 10^4$	0,9996
Propanil (16)	$1,9330 \cdot 10^4 x - 9,1587 \cdot 10^4$	0,9994
2,4-D Éster (17)	$1,2797 \cdot 10^4 x - 56535 \cdot 10^4$	0,9998
Clorpirifós (18)	$8689,3477x - 2,3375 \cdot 10^4$	0,9996
Bromoketal (19)	$2,6233 \cdot 10^4 x - 8,0082 \cdot 10^4$	0,9999
$\alpha$ -Endosulfan (20)	$4,0919 \cdot 10^4 x - 1,7666 \cdot 10^4$	0,9993
$\beta$ -Endosulfan (21)	$4,2607 \cdot 10^4 x - 1,3585 \cdot 10^4$	0,9997
Endosulfan Sulfato (22)	$4,7589 \cdot 10^4 x - 5,5923 \cdot 10^4$	0,9999

Conforme os resultados, apresentados na Tabela 11, obtidos para as equações das curvas analíticas na faixa de 5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pode-se concluir que, nesta faixa de concentração o modelo de regressão linear é adequado já que os valores de  $r^2$  foram maiores que 0,993, o que é satisfatório segundo a literatura (INMETRO, 2007).

Para os cálculos dos resultados das determinações feitas nas amostras com resultados de concentração dos analitos nos extratos acima de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi utilizada a curva analítica na faixa de 50 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para os resultados menores de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  foi utilizada a curvas analíticas na faixa de 5 a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$

### **4.5.3. Sensibilidade**

A sensibilidade é representada de forma indireta pela descrição da equação obtida através da regressão linear da curva analítica, constante na Tabela 11. Pode-se observar que as retas obtidas apresentam sensibilidade adequada ao método proposto, o que pode ser avaliado pelo coeficiente angular das equações de calibração, destacando-se o 1,2-diclorobenzeno que apresentou a maior sensibilidade em relação aos demais.

### **4.5.4. Limite de detecção e limite de quantificação instrumental e do método**

A Tabela 12 apresenta os valores de LOD e LOQ do instrumento e do método. Vale ressaltar que os valores apresentados para este fim foram obtidos a partir de soluções analíticas preparadas no solvente tetracloreto de carbono e confirmados por injeção de brancos fortificados no sistema GC-(TQ)MS/MS.



**Tabela 12:** Limites de detecção e de quantificação instrumental e do método

Analito	Instrumental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		Método ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
PCBTf (1)	3,0	5,4	-	-
Xileno (o+m+p) (2)	*	*	*	*
PCT (3)	1,2	3,1	-	-
3,4-DCBTf (4)	5,0	6,3	-	-
1,2-diclorobenzeno (5)	1,7	3,3	-	-
Nitrobenzeno (6)	1,3	4,0	-	-
Mononitro (7)	4,3	5,8	0,05	0,07
DDVP + triclorfon (8)	4,5	9,0		
DCPI+diuron (9)	5,4	15,4		
Dinitro (10)	6,5	7,1		
3,4-DCA (11)	4,4	5,8		
Ketona (12)	2,7	4,1	0,05	0,08
Trifluralina (13)	3,0	4,5	0,06	0,09
Oxirano (14)	2,9	4,3	0,06	0,09
Lindano (15)	3,9	5,9	0,05	0,08
Propanil (16)	5,0	6,9		
2,4-D Éster (17)	4,9	6,9	0,07	0,10
Clorpirifós (18)	3,2	5,3	0,07	0,09
Bromoketal (19)	3,4	4,9	0,04	0,07
$\alpha$ -Endosulfan (20)	3,5	7,4	0,04	0,06
$\beta$ -Endosulfan (21)	1,2	4,2	0,02	0,03
Endosulfan Sulfato (22)	3,0	6,8	0,06	0,08

\* Não calculado devido à interferência de xileno no solvente de extração (tetracloreto de carbono).

- não apresentaram recuperação adequada para estabelecer o LOD e LOQ do método.

Para a comparação dos LODs e LOQs instrumentais com os LODs e LOQs do método analítico é necessário levar em consideração do fator de pré-concentração do procedimento que é de 100 vezes.

Quando comparados com os valores de recuperação apresentados na Tabela 13 e considerando os valores das concentrações absolutas de cada analito nas soluções analíticas e nas fortificações, os valores de LOD e LOQ instrumentais e do método foram considerados adequados para o estudo da detectabilidade e da exatidão do método proposto.

Os valores de LOD e LOQ do instrumento comprovaram que o equipamento GC-(TQ)-MS/MS utilizado possui alta detectabilidade para a determinação dos pesticidas e substâncias químicas avaliadas. Posto que a energia de fragmentação no primeiro quadrupolo é fixa em 70 eV, no segundo quadrupolo (ou câmara colisional) os íons formados são novamente fragmentados e no terceiro quadrupolo os íons formados são isolados e detectados, a detectabilidade do sistema TQ-MS/MS varia principalmente em função da quantidade de íons formados durante a fragmentação primária da estrutura do composto. A quantidade de íons formados na fragmentação primária, quantitativamente e qualitativamente, depende da estrutura molecular do composto, ou seja, da energia de ligação, do tipo de ligação e da carga de cada átomo presente nesta estrutura

O processo de otimização no sistema (TQ)-MS/MS por impacto de elétrons no modo positivo, consiste em seleccionar os íons formados na fragmentação primária, que sejam mais adequados para fragmentação colisional no segundo quadrupolo e que formem íons produtos adequados para isolamento no terceiro quadrupolo e posterior detecção na eletromultiplicadora. Este processo aumenta muito a sensibilidade da detecção desde que os íons formados sejam característicos de cada analito em estudo e não da matriz.

O sistema GC-(TQ)MS/MS permite o ajuste da eletromultiplicadora para cada segmento, o que se reflete na detectabilidade, o que permitiu obter valores de LOD e LOQ bastante similares para os diferentes analitos.

#### 4.5.5. Exatidão

A Tabela 13 apresenta os valores de exatidão, representados pelos percentuais de recuperação, do método em estudo, considerando os níveis de concentração utilizados na etapa de fortificação.

**Tabela 13:** Recuperações (R) e Desvio Padrão Relativo (RSD) em % obtidas para os níveis de concentração 0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  nas amostras fortificadas (n = 7)

Composto	R (%) $\pm$ RSD (%)		
	0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$
Mononitro (7)	73,7 $\pm$ 9,6	83,1 $\pm$ 10,3	70,1 $\pm$ 14,0
Ketona (12)	79,8 $\pm$ 11,9	83,8 $\pm$ 8,9	79,9 $\pm$ 14,2
Trifluralina (13)	93,0 $\pm$ 9,2	93,3 $\pm$ 8,1	82,8 $\pm$ 14,0
Oxirano (14)	92,3 $\pm$ 12,0	97,7 $\pm$ 8,3	85,3 $\pm$ 14,5
Lindano (15)	88,8 $\pm$ 8,5	83,6 $\pm$ 10,2	83,9 $\pm$ 14,5
2,4-D Éster (17)	91,5 $\pm$ 11,9	100,1 $\pm$ 9,9	83,7 $\pm$ 14,3
Clorpirifós (18)	90,6 $\pm$ 12,9	102,2 $\pm$ 10,4	89,3 $\pm$ 17,2
Bromoketal (19)	88,3 $\pm$ 7,5	71,0 $\pm$ 9,2	77,2 $\pm$ 16,2
$\alpha$ -Endosulfan (20)	88,7 $\pm$ 12,8	113,6 $\pm$ 4,8	93,4 $\pm$ 16,3
$\beta$ -Endosulfan (21)	106,9 $\pm$ 12,6	114,9 $\pm$ 12,8	88,8 $\pm$ 13,8
Endosulfan Sulfato (22)	97,4 $\pm$ 7,7	88,2 $\pm$ 8,4	87,8 $\pm$ 14,3

Para o desenvolvimento deste estudo, seguiu-se a recomendação para a validação de métodos cromatográficos, na qual os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004; MAMUN *et al.*, 2009). Considerando este critério, os valores de recuperação obtidos foram aceitáveis para mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

#### 4.5.6. Precisão

A Tabela 14 apresenta os valores percentuais de repetitividade para o instrumento (RSD) e de repetitividade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o método validado.

**Tabela 14:** Precisão analítica em termos de repetitividade para o instrumento (RSD) e em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o método validado

Analitos	Equipamento		Método	
	RSD(%)	$RSD_r$ (%)	$RSD_{pi}$ (%)	
Mononitro (7)	5,1	11,3	14,0	
Ketona (12)	4,5	11,7	14,2	
Trifluralina (13)	2,0	10,4	14,0	
Oxirano (14)	4,5	11,6	14,5	
Lindano (15)	2,1	11,1	14,5	
2,4-D Éster (17)	8,1	12,0	14,3	
Clorpirifós (18)	6,9	13,5	17,2	
Bromoketal (19)	4,5	10,9	16,2	
$\alpha$ -Endosulfan (20)	2,2	11,3	16,3	
$\beta$ -Endosulfan (21)	1,5	13,1	13,8	
Endosulfan Sulfato (22)	1,2	10,1	14,3	

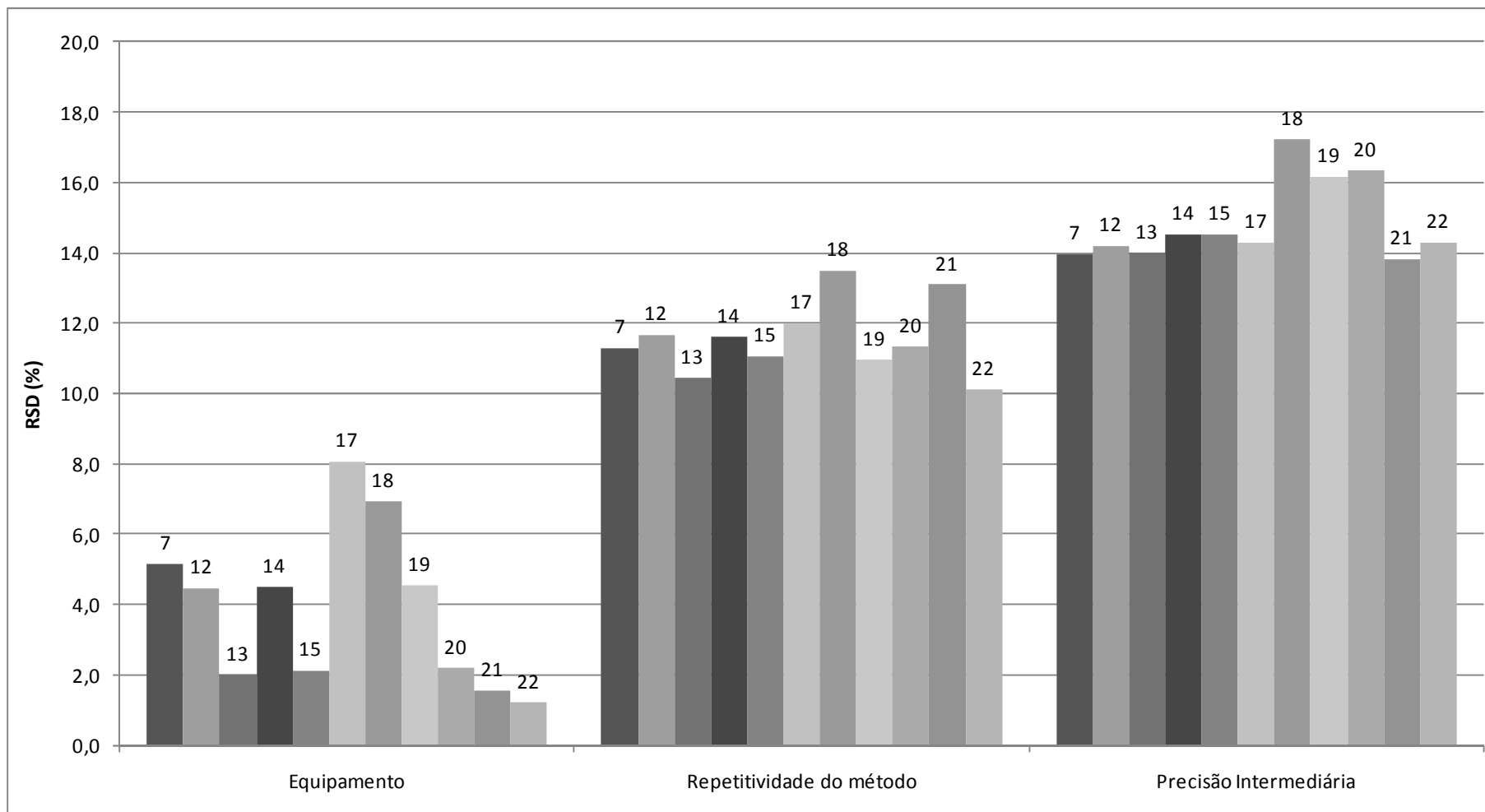
Nota: Para repetitividade do instrumento (RSD), n=6; para repetitividade ( $RSD_r$ ), n= 7 e para precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ), n= 7.

Os valores obtidos para precisão do instrumento (RSD) variaram de 1,2 a 8,1%. A concentração da solução analítica utilizada foi de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  e os valores obtidos foram considerados aceitáveis em comparação com a repetitividade e precisão do método, como pode ser visto no gráfico da Figura 38.

Para o desenvolvimento deste estudo, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual os valores de precisão na faixa de trabalho avaliada devem apresentar  $RSD \leq 20\%$  (RIBANI *et al.*, 2004).

Os valores obtidos para a repetitividade ( $RSD_r$ ) do método variaram de 10,9 a 13,5% e representam a variação ao longo da faixa linear do método, em três níveis de fortificação, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , encontrando-se dentro dos limites considerados aceitáveis ( $RSD \leq 20\%$ ) para concentração de até 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Os valores obtidos para a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) do método variaram de 13,8 a 17,2% e foram considerados aceitáveis, estando dentro do limite recomendado ( $RSD \leq 20\%$ ).



**Figura 38:** Valores percentuais de repetitividade para o instrumento ( $RSD$ ) e de repetitividade ( $RSD_r$ ) e precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o método validado.

Identificação: Mononitro (7), Ketona (12), Trifluralina (13), Oxirano (14), Lindano (15), 2,4-D Éster (17), Clorpirifós (18), Bromoketal (19), (20)  $\alpha$ -endosulfan, (21)  $\beta$ -endosulfan e (22) endosulfan sulfato.

#### 4.6. Aplicação do método

A Tabela 15 apresenta os resultados das determinações em amostras de efluente industrial e em amostras de água subterrânea, extraída por DLLME, para comparação com os métodos de LLE e SPE.

**Tabela 15:** Resultados obtidos na aplicação do método em amostra de água subterrânea e amostra de efluente industrial

Composto	Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	Efluente		Água Subterrânea	
	LLE	DLLME	SPE	DLLME
PCBTF (1)	<0,67*	<0,03*	61,5	42,7
Mononitro (7)	<0,60*	<0,07*	43,5	42,6
3,4 dicloro-anilina (11)	0,70	0,27	<0,62*	<0,04*

\* Corresponde ao LOQ do método.

Não foram detectados nas amostras analisadas: xilenos (o+m+p), PCT, 3,4-DCBTF, 1,2-diclorobenzeno, nitrobenzeno, DDVP+triclorfon, DCPI+diuron, dinitro, cetona, trifluralina, oxirano, lindano, propanil, 2,4-D-ester, clorpirifós, bromoketal 1,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

A amostra de efluente industrial foi preparada por LLE, baseado na norma USEPA 3510C (1996), e a determinação da concentração foi efetuada utilizando o sistema GC-(IT)-MS/MS. Esta mesma amostra foi extraída por DLLME e analisada por GC-(TQ)-MS/MS.

Na amostra de efluente industrial foi detectado 3,4-dicloro-anilina, que é uma matéria prima para síntese de propanil, e, portanto passível de estar presente no efluente. A diferença dos resultados foi de 259%, e uma investigação mais detalhada poderá indicar a causa desta diferença, já que pelos resultados das recuperações para a 3,4 dicloro-anilina são satisfatórios tanto empregando-se LLE quanto DLLME, conforme pode ser visto na Figura 40.

A amostra de água subterrânea foi preparada por extração em fase sólida (SPE), conforme método proposto por MARTINS (2004), e a determinação da concentração foi efetuada utilizando o sistema GC-(IT)MS/MS. Esta mesma amostra foi extraída por DLLME e analisada por GC-(TQ)-MS/MS.

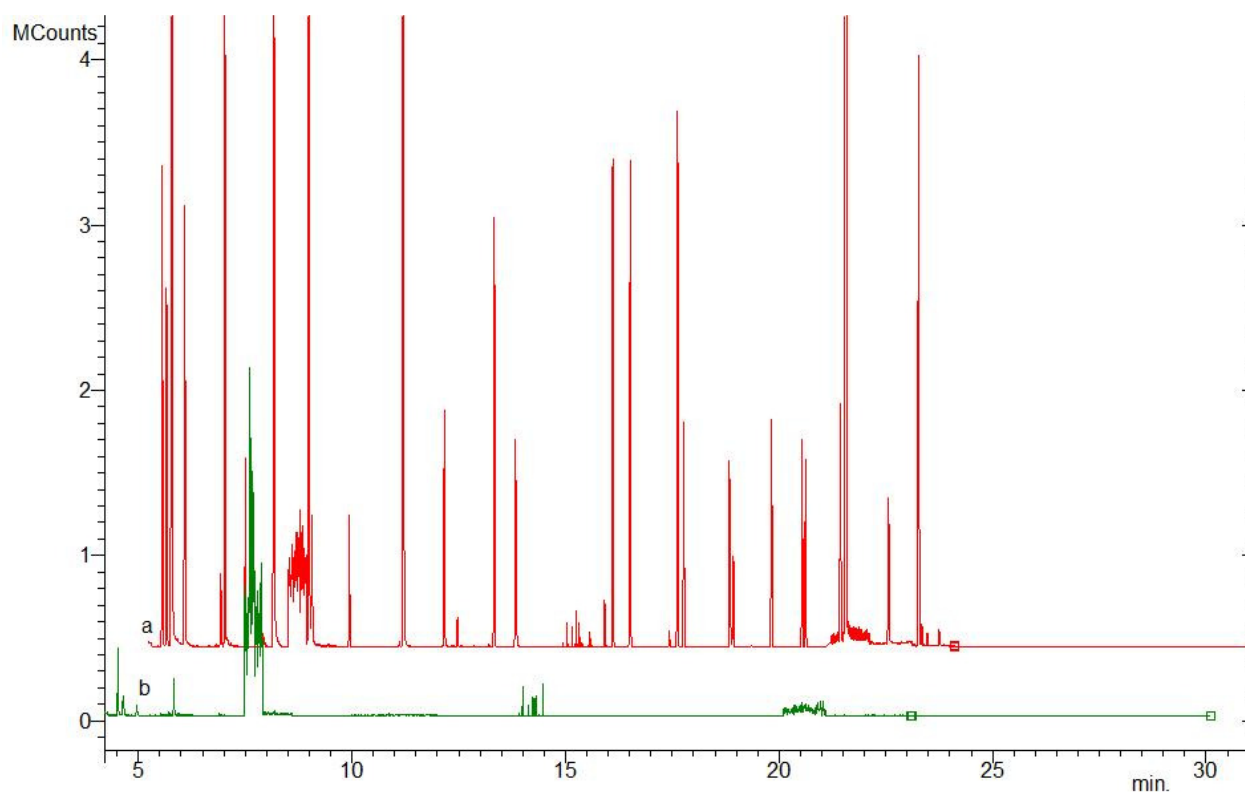
Na amostra de água subterrânea foram detectados PCBTF e mononitro. Os resultados de PCBTF apresentaram diferença 615, explicada pela baixa eficiência na recuperação obtida por DLLME para o composto PCBTF.

Dentre os pesticidas e substâncias químicas validados não foram detectados nas amostras analisadas: mononitro, ketona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato.

#### **4.6.2. Água de torneira**

A Figura 39 apresenta o cromatograma obtido pela injeção no sistema GC-(TQ)-MS/MS para uma amostra de água de torneira coletada no próprio laboratório, conforme item 3.3., e extraída por DLLME.





**Figura 39:** Cromatograma obtido por GC-(TQ)MS/MS para o extrato branco de água de torneira, nas condições experimentais descritas nos itens 4.2 e 4.3.

a = solução analítica 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , b = extrato de água torneira.

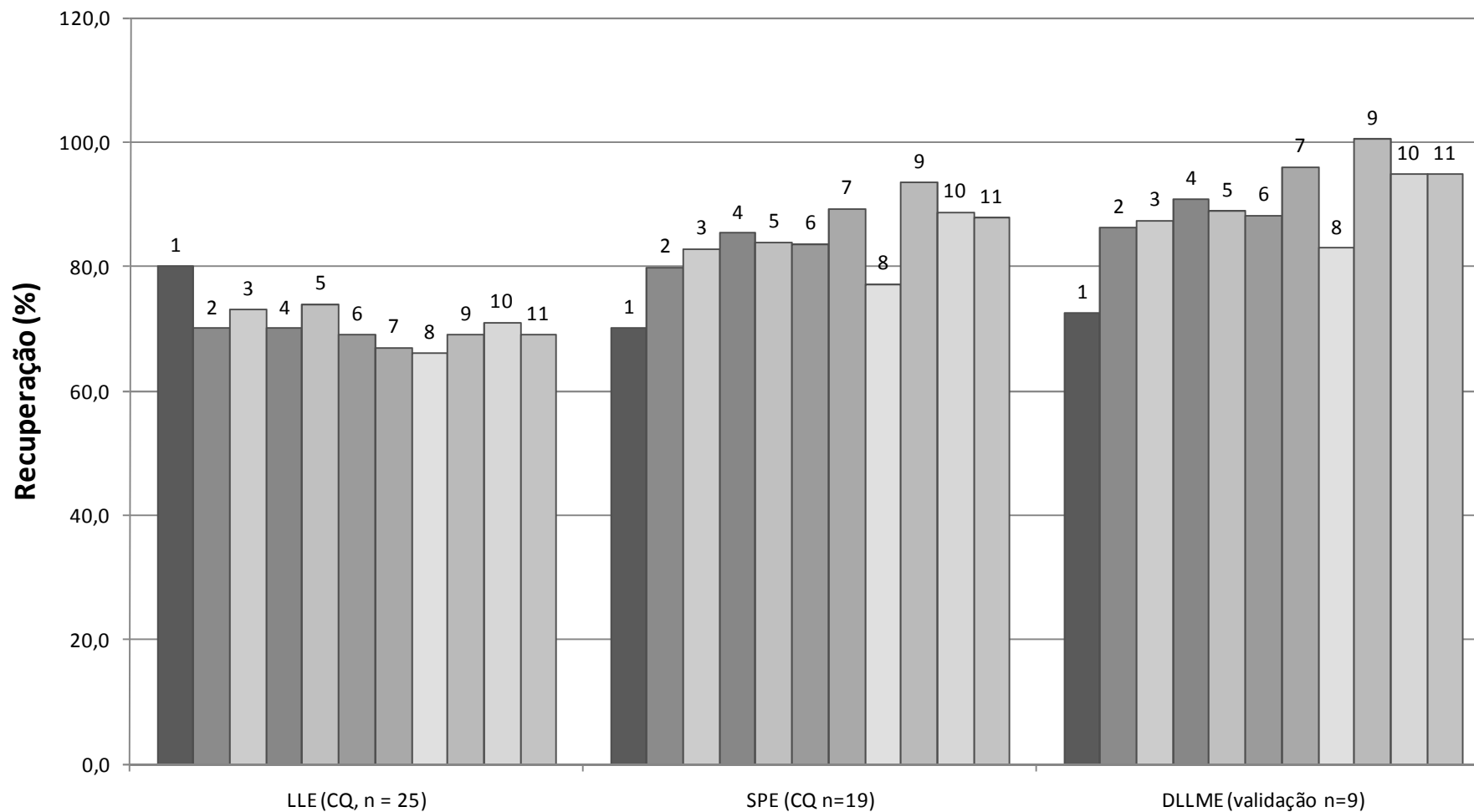
No cromatograma da Figura 39 pode-se observar que na amostra analisada não foram encontrados os pesticidas e substâncias químicas em estudo, com exceção do xileno (o+m+p) que é um contaminante do solvente tetracloreto de carbono utilizado, conforme apresentado no item 4.1. e, portanto, transferido para o extrato da amostra de água de torneira.

Devido a alta seletividade do sistema GC-(TQ)-MS/MS, que foi programado de forma a monitorar somente os íons e transições específicos para os pesticidas e compostos em estudo, não são observados picos correspondentes a outras substâncias químicas que poderiam estar presentes na amostra.

#### 4.6.3. Resultados da comparação com outros métodos

Na Figura 40 estão representados os resultados das recuperações das amostras de água de torneira fortificadas com os pesticidas e substâncias químicas em estudo na concentração de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , após extração por DLLME e determinação por GC-(TQ)MS/MS, extração por LLE e determinação por GC-(IT)MS/MS e extração por SPE e determinação por GC-(IT)MS/MS.

Os resultados das recuperações obtidos com os métodos de preparo de amostra avaliados indicam que o método com extração por DLLME, cuja média das recuperações foi de 89% foi mais eficiente que as técnicas LLE e SPE, com médias de recuperações em 71 e 84%.



**Figura 40:** Comparação entre as recuperações obtidas utilizando as técnicas de extração c.

LLE – extração Líquido-Líquido, SPE – Extração em Fase Sólida, DLLME – Microextração Líquido-Líquido Dispersiva e HFLPME -Hollow Fiber Liquid Micro Extraction para extração de amostras fortificadas com  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada um dos pesticidas e substâncias químicas em estudo. Identificação: (1) mononitro, (2) ketona, (3) trifluralina, (4) oxirano, (5) lindano, (6) 2,4-D-éster, (7) clorpirifós, (8) bromoketal 1, (9)  $\alpha$ -endossulfan, (10)  $\beta$ -endossulfan e (11) endossulfan sulfato. CQ: Controle de Qualidade

## 5. CONCLUSÕES

O método de extração DLLME modificado proposto se mostrou simples, rápido e de baixo custo, com alto potencial para aplicação direta em campo, para preparação da amostra imediatamente após a coleta, visto não ser necessário nenhum equipamento nesta etapa. Outra vantagem é que requer um pequeno volume de amostra, facilitando a amostragem.

No entanto, a robustez do método de extração é um ponto crítico, visto que o manuseio do pequeno volume de solvente extrator utilizado requer mais cuidado para a retirada da fase sedimentada isenta de água, de forma a tornar o extrato adequado para determinação por Cromatografia Gasosa, sem outros pré-tratamentos, tais como secagem com sulfato de sódio, evaporação e redissolução, entre outros.

O controle da temperatura durante o procedimento de extração é crítico, pois pode levar a evaporação do solvente extrator e até dos próprios analitos, o que foi resolvido pela utilização de banho de gelo para garantir o controle da temperatura do processo.

A DLLME pode ser combinada com outras técnicas para pré-concentração de extratos, sendo uma alternativa à evaporação do extrato obtido, pois esta é uma etapa que introduz grande variação a eficiência do processo de extração, sendo uma das principais fontes de incerteza no processo de preparação de amostras de água.

Para alguns dos analitos estudados a eficiência de extração foi baixa, devido a alta solubilidade destes em água, provavelmente aumentada na mistura de água+solvente dispersora.

Ao adotar uma abordagem adequada para uma técnica de extração por equilíbrio, aplicável a DLLME neste caso, construindo as curvas analíticas de calibração a partir da injeção de extratos de amostras fortificadas, os resultados de recuperações obtidos foram significativamente melhores, indicando uma possibilidade de estudos complementares como sugestão para trabalhos futuros.

Os valores de limite de quantificação do método ficaram entre 0,02 e 0,09  $\mu\text{g L}^{-1}$ , destacando-se aqui a alta seletividade do método de detecção por MS/MS utilizado permitindo que sejam determinados resíduos de pesticidas e de outras substâncias químicas em amostras de água com confiabilidade.

A faixa linear de trabalho foi de 0,05 a 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , considerando o fator de pré-concentração de 100 vezes obtidos na extração, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,993, também apresentando valores adequados conforme literatura.

O método de extração DLLME modificado e determinação por GC-(TQ)MS/MS, otimizado neste trabalho para pesticidas e outras substâncias químicas em amostras de água tem como vantagens a utilização de pouca quantidade de solvente, baixo custo, não necessitar equipamentos, requer uma pequena quantidade de amostra, alta seletividade e detectabilidade, além da simplificação de etapas lentas e trabalhosas, geralmente empregadas em outros métodos de extração.

O método demonstrou ser um método eficiente apresentando resultados de recuperação entre 70,1 e 114,9% para amostras de água fortificada, comprovando a confiabilidade do método desenvolvido. Os valores de precisão obtidos ficaram entre 10,9 e 17,2%, encontrando-se dentro dos limites considerados aceitáveis ( $\text{RSD} \leq 20\%$ ).

O método proposto é sensível, preciso, exato e possibilita a identificação e quantificação de mononitro, cetona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato em amostras de água, 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.

Nas amostras analisadas neste estudo, não foi detectada a presença dos pesticidas para os quais o método foi validado (mononitro, cetona, trifluralina, oxirano, lindano, 2,4-D-éster, clorpirifós, bromoketal,  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ -endosulfan e endosulfan sulfato).

## **DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS**

Os solventes e resíduos gerados durante o estudo foram coletados, separados em frascos rotulados ficando estocados no LARP aguardando a correta destinação.

Os resíduos sólidos e solventes das técnicas LLE e SPE foram coletados, separados e enviados para incineração.

O restante das amostras fortificadas ou que tiveram contato com solventes foram coletadas e enviadas para o tratamento de efluentes da ETE de uma indústria de produção de pesticidas.

## SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Combinar a DLLME com outras técnicas de extração para aumento do fator de pré-concentração e para purificação dos extratos obtidos.

Utilização de planejamento fatorial em função das propriedades físico-químicas dos compostos na otimização da mistura de solventes extrator e dispersor, assim como na escolha dos solventes a serem utilizados.

Estudar a utilização de modificadores químicos específicos, tais como adição de sais, reagentes de derivatização ou emulsionantes.

Utilização de solventes menos tóxicos para diminuição do impacto ambiental da técnica DLLME.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R.; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisa**, v. 12, p. 116-131, 2001.

BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M.; HOSSEINI, M. R.; M.; AGHAEI, E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A** 1123 (2006) 1-9.

BERNARDO, M. S.; GONÇALVES, M.; LAPA, N.; BARBOSA, R.; MENDES, B.; PINTO, F.; GULYURTLU, I. Determination of aromatic compounds in eluates of pyrolysis solid residues using HS-GC-MS and DLLME-GC-MS. **Talanta** 80 (2009) 104-108.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 10 (2006) 881-887.

BRASIL. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. 2003.

CALDAS, S. S. **Otimização de validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para a determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química)- FURG, Rio Grande, RS.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G.; Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid



microextraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta** 665 (2010) 55–62.

CHEN, H.; CHEN, H.; YING, J.; HUANG, J.; LIAO, L. Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. **Analytica Chimica Acta** 632 (2009) 80–85.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Fast analysis of multiple pesticide residues in apple juice using dispersive liquid–liquid microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009) 8835–8844.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOTFI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC–UV. **Journal of Chromatography B** 877 (2009) 456–460

DORES, E. F. G. C; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, mato grosso – análise preliminar. **Química Nova** 24 (2001) 27-36.

EEC. **European Environmental Commission- The EU Water Framework Directive**, 2000. Disponível em: < [http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html) >. Acessado em 21/11/2010.

FARAHANI, H.; NOROUZI, P.; DINARVAND, R.; GANJALI, M. R. Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. **Journal of Chromatography A** 1172 (2007) 105–112.

FATTAHI, N.; SAMADI, S.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. R. M. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction-ultra preconcentration of

chlorophenols in aqueous samples. **Journal of Chromatography A** 1169 (2007) 63–69.

FU, L.; LIU, X.; HU, J.; ZHAO, X.; WANG, H.; WANG, X. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta** 632 (2009) 289–295.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A.; YAZDANFAR, N.; MORADI, M. A new concept of hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction compatible with gas chromatography based on two immiscible organic solvents. **Journal of Chromatography A** 1217 (2010) 5652–5658.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Carlos Alberto da Silva Riehl e Alcides Wagner Serpa Guarino (Trad.). 5. ed. Rio de Janeiro : LTC, 2001. 862p.

HERRERA-HERRERA, A. V.; ASENSIO-RAMOS, M.; BORGES, J. H.; DELGADO, M. A.R. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry** 29 (2010) 728-751.

IGARASHI, S.; TAKAHASHI, A.; UEKI, Y.; YAMAGUCHI, H. Homogeneous liquid–liquid extraction followed by X-ray fluorescence spectrometry of a microdroplet on filter-paper for the simultaneous determination of small amounts of metals. **Analyst** 125 (2000) 797–798

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL), **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008 revisão 2, 2007.

KAMAREI, F.; EBRAHIMZADEHA, H.; YAMIN, Y. Optimization of temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for analysis of chlorobenzenes in water samples. **Talanta** 83 (2010) 36–41.

KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINI, Y.; SHARIATI, S.; JONSSON, J. A. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. **Analytica Chimica Acta** 585 (2007) 286–293.

KHALILI-ZANJANI, M. R.; YAMINIA, Y.; YAZDANFARB, N.; SHARIATIA, S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame photometric detection. **Analytica Chimica Acta** 606 (2008) 202–208.

KOZANI, R. R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F.; HOSSEINI, M. R. M.; JAMALI, M. R. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gaschromatography–electron capture detection. **Talanta** 72 (2007) 387–393.

KUSTER, M.; ALDA, M. L.; BARCELÓ, D. Analysis of pesticides in water by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric techniques. **Mass Spectrometry Reviews**, 2006, 25, 900.

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

LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta** 624 (2008) 253–268.

LEONG, M.; HUANG, S.; Dispersive liquid–liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A** 1211 (2008) 8–12.

LEONG, M.; CHANG, C.; FUH, M.; HUANG, S. D. Low toxic dispersive liquid–liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A** 1217 (2010) 5455–5461

LIU, L.; CHENG, J.; MATSADIQ, G.; ZHOU, H.; LI, J. Application of DLLME to the Determination of Pyrethroids in Aqueous Samples. **Chromatographia** 72 (2010) *in press*.

LIU, X.; LI, J.; ZHAO, Z.; ZHANG, W.; LIN, K.; HUANG, C.; WANG, X. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction for the determination for polybrominated diphenyl ethers in different environmental matrices. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009) 2220–2226.

LIU, Y.; ZHAO, E.; ZHU, W.; GAO, H.; ZHOU, Z. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersiveliquid–liquid microextraction in water samples. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009) 885–891.

LIU, Z. M.; ZANG, X. H.; LIU, W; H.; WANG, C.; WANG, Z. Novel method for the determination of five carbamate pesticides in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Chinese Chemical Letters** 20 (2009) 213–216

MAHAVEER B.; MELWANKI, MING-REN F. Partitioned dispersive liquid–liquid microextraction An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. **Journal of Chromatography A** 1207 (2008) 24–28.

MAMUN, I. R.; PARK, J. H.; CHOI, J. H.; KIM, H. K.; CHOI, W. J.; HAN, S. S.; HWANG, K.; JANG, M.; ASSAYED, M. E.; EL-DIB, M. A.; SHIN, H.; EL-ATY, A. M. A.; SHIM, J. Development and validation of a multiresidue method for determination of 82 pesticides in water using GC. **Journal of Separation Science** 32 (2009) 559-574.

MARTINS, A. F.; VASCONCELOS, T. G.; WILDE, M. L. Influence of variables of the combined coagulation-Fenton-sedimentation process in the treatment of trifluraline effluent. **Journal of Hazardous Materials** B127 (2005) 111-119.

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando Extração em Fase Sólida e**

**Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.** 2004. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

MELWANKI, M. B.; FU, M. R. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with semi-automated *in-syringe* back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1198–1199 (2008) 1–6.

NAGARAJU, D.; HUANG, S. D. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1161 (2007) 89–97.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em Fase Líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova** 31 (2008) 637-644.

OSHITE, S.; FURUKAWA, M.; IGARASHI, S. Homogeneous liquid–liquid extraction method for the selective spectrofluorimetric determination of trace amounts of tryptophan. **Analyst** 126 (2001) 703–706.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova** 31(2008) 1190-1198.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F.; FIDÉLIS, C. H. V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC). **Química Nova** 32 (2009) 421-430.

PEIXOTO, S. C. **Validação e aplicação de método empregando quechers modificado e gc-ecd para determinação de resíduos de pesticidas em grão e casca de arroz.** Tese de Doutorado em Química, UFSM, Santa Maria, 2010.

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

PICO, Y.; BLASCO, FONT, G. Environmental and food applications of lc–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, 2004, 23, 45.

PINTO, M. I.; SONTAG, G.; BERNARDINO, R. J.; NORONHA, J. P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. **Microchemical Journal** (2010) *in press*.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para a determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova** 32 (2009) 1620 1634.

PRIMEL, E. G., **Aplicação de Extração em Fase Sólida e Técnicas Cromatográficas para a Determinação de Herbicidas em Águas de Superfície e Acompanhamento da Degradação a Campo e no Laboratório**. 2003 170f. Tese de Doutorado em Química UFSM, Santa Maria\_RS,

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. R. S.; GONÇALVES F. F.; MARTINS, M. L.; MACHADO, S. L. O.; MARCHESAN, E.; Risk Assessment Of Surface Water Contamination By Herbicide Residues: Monitoring Of Propanil Degradation In Irrigated Rice Field Waters. Using HPLC-UV And Confirmation By GC-MS **Journal. Brazilian. Chemical. Society** 18 (2007) 585-589.

REGUEIRO, J.; LLOMPART, M.; GARCIA-JARES, C.; GARCIA-MONTEAGUDO J. C.; CELA, R. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. **Journal of Chromatography A** 1190 (2008) 27–38.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEIN, M. M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A** 1116 (2006) 1–9.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M.; Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A** 1217 (2010) 2342–2357.

RIBANI, M. ; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. M.; Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova** 27 (2004) 771-780.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHENEIDER, R. P. Planilha de Validação: Uma Nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados. **Química Nova** 31 (2008) 164-171.

RODIL R.; QUINTANAB J. B.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009) 2958–2969.

SANAGI, M. M.; ABIDIN, N. A. Z.; IBRAHIM, W. A. W.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Application of Double-Phase Liquid Phase Microextraction in the Determination of Partition Coefficients and Analysis of Pesticides in Water Samples. **Chromatographia** 72 (2010) *in press*.

SERESHTI, H.; KARIMI, M.; SAMADI, S. Application of response surface method for optimization of dispersive liquid–liquid microextraction of water-soluble components of *Rosa damascena Mill.* essential oil. **Journal of Chromatography A**, 1216 (2009) 198–204.

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

SILVA; M. F.; CERUTTI, E. S.; MARTINEZ, L. D. Coupling Cloud Point Extraction to Instrumental Detection Systems for Metal Analysis **Microchimica Acta** 155 (2006) 349–364.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. **Principels of Instrumental Analysis**. 4.ed. Orlando: Saunders College Publishing, 1992. p. 423

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1996. OSW 846: Method 3510C – Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. Rev. 3.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1996. OSW 846: Method 8270C – Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). Rev. 3.

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

XIA, J.; XIANG, B.; ZHANG, W. Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design. **Analytica Chimica Acta** 625 (2008) 28–34.

XIONG, C.; RUAN, J.; CAI, Y, TANG, Y. Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 49 (2009) 572–578.

YAN, H.; LIU, B.; DU, J.; YANG, G.; ROW, K. H. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water. **Journal of Chromatography A** 1217 (2010) 5152–5157.

YANA, H.; WANGA, H.; QINB, X.; LIUA, B.; DU, J. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for determination of fluoroquinolones in pharmaceutical wastewater. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 54 (2011) 53–57.



ZANELLA, R.; MISTURA, C. M.; KURZ, M. H. S.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F. F. Determination of Residues of the Fungicide Metalaxyl in Water by Solid-Phase Extraction with Gas Chromatography and Nitrogen-Phosphorous Detection. **Analytical Letters** 36 (2003) 1393-1400.

ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES F. F.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B.; MARCHESAN, E.; MACHADO, S. L. O. Study of the Degradation of the Herbicide Clomazone in Distilled and in Irrigated Rice Field Waters using HPLC-DAD and GC-MS **Journal Brazilian Chemical Society** 19 (2008) 987-995.

ZENKER, A.; SCHMUTZ H.; FENT, K. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. **Journal of Chromatography A** 1202 (2008) 64–74.

ZHOU, Q.; BAI, H.; XIE, G.; XIAO, J. Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A** 1188 (2008) 148–153.

ZHOU, Z.; ZHAO, D.; ZHAO, J. W.; YANG, M. Study of cloud point extraction and high-performance liquid chromatographic determination of isoniazid based on the formation of isonicotinylhydrazone. **Journal of Chromatography A** 1216 (2009) 30–35.