



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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS  
EM SOLO POR UHPLC-MS/MS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Michele Câmara De Vicari**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2013**



**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE  
AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM  
SOLO POR UHPLC-MS/MS**

**Michele Câmara De Vicari**

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.**

**2013**

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

Câmara De Vicari, Michele  
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO  
SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS  
VETERINÁRIOS EM SOLO POR UHPLC-MS/MS / Michele Câmara De  
Vicari.-2013.  
216 p.; 30cm

Orientador: Renato Zanella  
Coorientadores: Martha Bohrer Adaime, Osmar Damian  
Prestes  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2013

1. solo 2. agrotóxicos 3. medicamentos veterinários 4.  
QuEChERS 5. UHPLC-MS/MS I. Zanella, Renato II. Bohrer  
Adaime, Martha III. Damian Prestes, Osmar IV. Título.

---

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Michele Câmara De Vicari. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

[micheledevicari@yahoo.com.br](mailto:micheledevicari@yahoo.com.br)

---

**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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE  
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SOLO  
POR UHPLC-MS/MS**

elaborada por

**Michele Câmara De Vicari**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo Ruaro Peralba** (UFRGS)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline do Amaral Friggi** (IFRS)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Cadore Peixoto** (UNIFRA)

---

**Prof. Dr. Enio Marchesan** (UFSM)

Santa Maria, 30 de agosto de 2013



## DEDICATÓRIA

O sonho que se sonha só, é só um sonho,  
mas o sonho que se sonha junto, é realidade.

Dedido este trabalho a todas as pessoas  
importantes que contribuíram para que este  
sonho se tornasse realidade, especialmente  
meu pais, Luiz e Clari e meu amor Giovani.

Obrigada por tudo.

Amo muito vocês!!!





## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por guiar meus caminhos. Obrigada por colocar pessoas tão especiais em minha vida durante esta longa caminhada.

Aos meus pais, Luiz e Clari pelo imenso amor e incentivo, vocês são os grandes responsáveis por esta conquista. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeram por mim. Esta vitória é nossa!

Ao meu marido Giovani pela compreensão, apoio e incentivo. Obrigada por todo o amor e carinho, e por estar ao meu lado em todos os momentos. Você também faz parte desta conquista. Te amo do fundo do coração.

A toda a minha família e amigos que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

A UNIPAMPA que possibilitou a continuação da minha formação, especialmente a direção do Campus São Gabriel, Valdir Stefenon, Luciana Benetti e Luis Eduardo Vieira, que foi compreensiva e me apoiou muito neste período e aos meus colegas de trabalho que desenvolveram as atividades na minha ausência. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela amizade e por ter acreditado na minha capacidade dando-me a oportunidade de fazer parte do LARP. Agradeço a orientação neste trabalho e o conhecimento transmitido desde o mestrado.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha B. Adaime pela orientação desde a minha iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos, pela compreensão e amizade durante todos estes anos. Agradeço também pelas contribuições no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Osmar D. Prestes pela co-orientação neste trabalho e pelas sugestões no exame de qualificação que muito contribuíram para a melhoria deste trabalho. Além disso, quero agradecer pela amizade, pelo carinho e por todos os ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Caroline A. Friggi pela participação no exame de qualificação e na defesa da tese. Obrigada pelas valiosas sugestões e principalmente pela amizade e pelos bons momentos vividos no LARP. Foi um prazer tê-la como minha banca.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra C. Peixoto pela participação na defesa da tese. Você merece um agradecimento especial, pois aprendi os primeiros passos no LARP

contigo. Obrigada pela amizade, pelo carinho e pelo companheirismo todos estes anos.

Aos professores Enio Marchesan e Maria do Carmo R. Peralba pelas suas valiosas participações na defesa da tese, contribuindo com excelentes sugestões e questionamentos para a melhoria deste trabalho.

A minha querida amiga Janice Facco, a quem não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Se não fosse você, tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada pelo carinho, pela amizade, por participar de cada extração e coleta de amostra, sempre me dando força para seguir em frente. Te admiro muito pela força e determinação e te desejo muito sucesso. Esta vitória também é sua! Que Deus abençoe a nossa amizade.

Ao Mateus Brum pela amizade, pelo carinho, pelas palavras de apoio e pelas boas risadas. Você fez as minhas sextas-feiras mais felizes com o bom humor de sempre. Te desejo muito sucesso.

Aos colegas do LARP que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial a Magali, Tiele e Débora pela ajuda no equipamento e a Samile pelo carinho e amizade desde a graduação. Obrigada a todos pela convivência durante este período, tudo o que vivemos juntos foi um aprendizado que levarei para a vida toda.

À UFSM pela oportunidade de estudar em uma instituição de excelência, aos professores do departamento de química pelos ensinamentos e aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela gentileza, disposição e atenção com os alunos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

## SOLO AMBIENTE

Olha só quantos problemas  
Que eu posso encontrar  
Se no solo as boas práticas  
Não consigo implantar

Se não cuido da erosão  
Mais problemas eu vou ter  
Uma grande voçoroca  
De repente pode acontecer

E aí não tem mais jeito  
Do processo reverter  
Se não investir muito dinheiro  
Minha terra vou perder

Dependendo do relevo  
E do clima vou plantar  
Somente aquilo que a terra  
Poderá propiciar

O cuidado com as máquinas  
Com seu peso vou tomar  
Pois não quero por descuido  
O meu solo compactar

Exitem leis pra auxiliar  
A segurança do lugar  
E todas devo seguir  
Se por boas práticas me guiar

Plantio direto na cultura  
Protege o solo também  
Terraços na agricultura  
Dependendo só faz bem.

Curvas de nível ajudam  
A problemas evitar.  
Rotação das culturas  
Também vai facilitar.

Se tem fendas no meu solo  
A água vai percolar.  
E se aplico agrotóxicos,  
Também podem lixiviar.

Vão pro fundo... nos horizontes  
E nos lençóis podem chegar  
Sem boas práticas há perigo  
Da água contaminar.

Se não deixo no descanso  
Meu solo vou estressar.  
Como é vida seu desempenho  
Logo vai se abalar.

E assim novos insumos  
Terei que nele aplicar  
Para que a produtividade  
Tentemos recuperar.

Mas nem sempre é possível  
Com sucesso alcançar  
Caminhos de volta para aquilo  
Que não pensamos estragar.

Por isso sempre iremos  
Na prevenção trabalhar  
Pois sai muitas vezes mais caro  
Consertar do que evitar.

Dessa forma nós teremos  
Boas práticas a seguir  
E no campo junto iremos  
Só sucesso conseguir.

Maria Conceição Peres Young Pessoa  
e Vera Lucia Ferracini  
(Embrapa Meio Ambiente)



## RESUMO

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

### DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS E MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM SOLO POR UHPLC-MS/MS

AUTOR: MICHELE CÂMARA DE VICARI  
ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Santa Maria, 30 de agosto de 2013.

Normalmente, o solo é o destino final dos agrotóxicos utilizados na agricultura e dos medicamentos veterinários utilizados na criação de animais. A preocupação mundial com as possíveis consequências do aumento do uso destes compostos se reflete em regulamentações cada vez mais exigentes sobre os níveis de resíduos nos produtos agrícolas, produtos de origem animal e no ambiente. Isso resulta na intensificação da demanda por certificação ambiental, redução dos limites máximos de resíduos em alimentos e a introdução de procedimentos que permitam a rastreabilidade nos processos produtivos. Neste estudo, comparou-se diferentes métodos de extração, sendo eles, agitação mecânica, ultrassom e QuEChERS para a determinação de 76 agrotóxicos e 9 medicamentos veterinários em solo utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série (UHPLC-MS/MS). O método de extração que apresentou os melhores resultados consistiu na pesagem de 10 g de solo, seguido da adição de 10 mL de água e mantido em repouso por 10 min. Em seguida adicionou-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% (v/v) de ácido acético e procedeu-se a agitação mecânica por 15 min. Logo após, acrescentou-se 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio anidro e agitou-se manual e vigorosamente por 1 min. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 8 min (3400 rpm) e o extrato foi filtrado e diluído (1:4, v/v) em água antes da análise por UHPLC-MS/MS. O método foi validado avaliando-se vários parâmetros, como linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ), efeito matriz, assim como exatidão e precisão, em termos de percentual de recuperação e RSD. As curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato “branco” da matriz apresentaram linearidade adequada para a maioria dos compostos, com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99, sendo que as curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz foram utilizadas para compensar o efeito matriz. Para verificar a exatidão e precisão do método, efetuou-se a fortificação em quatro níveis de concentração (10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), e extração em replicata ( $n = 6$ ), obtendo-se valores de recuperação entre 70 e 120%, com RSD menores que 20% para a grande maioria dos compostos. Os valores de LOD e LOQ do método variaram entre 3,0 e 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Após a validação, o método foi aplicado para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras reais, mostrando-se bastante eficiente para ser aplicado em análises de rotina.

**Palavras-chave:** solo. agrotóxicos. medicamentos veterinários. QuEChERS. UHPLC-MS/MS.



## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Graduate Program in Chemistry  
Universidade Federal de Santa Maria

### DEVELOPMENT OF METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PESTICIDE AND VETERINARY DRUGS RESIDUES IN SOIL BY UHPLC-MS/MS

AUTHOR: MICHELE CÂMARA VICARI  
ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA  
Santa Maria, August 30<sup>th</sup>, 2013.

Typically, soil is the final destination of pesticides applied in agriculture and of veterinary drugs employed in animal production. The global concern about the possible consequences of the increased use of these compounds is reflected in increasingly stringent regulations on the levels of residues in agricultural products, animal products and in the environment. This results in intensifying the demand for environmental certification, reduction of Maximum Residue Levels in food and the introduction of procedures for traceability in production processes. In this study, we compared different extraction methods: mechanical agitation, ultrasound and QuEChERS for the determination of 76 pesticides and 9 veterinary drugs in soil using Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). The extraction method that showed the best results consisted of weighing 10 g of soil followed by the addition of 10 mL of water and kept at rest for 10 min. Then added 10 mL of acetonitrile containing 1% (v/v) acetic acid and proceeded with mechanical shaking for 15 min. Then, it was added 4 g of anhydrous magnesium sulfate and 1.7 g of anhydrous sodium acetate and shaken manually and vigorously for 1 min. Subsequently, the tube was centrifuged for 8 min (3400 rpm) and the extract was filtered and diluted (1:4, v/v) in water before analysis by UHPLC-MS/MS. The method was validated by evaluating several parameters, such as linearity of analytical curves, limits of detection and quantification (LOD and LOQ), matrix effect, as well as accuracy and precision in terms of percentage of recovery and RSD. The analytical curves prepared in solvent and in the "blank" matrix extract showed linearity for most compounds, with coefficients of determination greater than 0.99, and the standard curves prepared in "blank" matrix extract were used to evaluate the matrix effect. To verify the accuracy and precision of the method, fortification in four concentration levels (10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) we performed, and extracted in replicate ( $n = 6$ ), resulting in recovery values between 70 to 120%, with RSD lower than 20% for most of the compounds. Values of method LOQ and LOD were from 3.0 to 7.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and from 10 to 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. After validation, the method was applied to the determination of pesticides and veterinary drugs in real samples, it showed to be very efficient to be applied in routine analysis.

**Keywords:** Soil. Pesticides. Veterinary drugs. QuEChERS. UHPLC-MS/MS.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	38
Figura 2 - Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente.....	51
Figura 3 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS: original, citrato, acetato e modificado.....	68
Figura 4 - Esquema da fonte de ionização ESI.....	81
Figura 5 - Fonte de ionização Z-Spray.....	82
Figura 6 - Modo de operação <i>ScanWave</i> .....	83
Figura 7 - Separação das massas na cela de colisão <i>ScanWave</i> .....	84
Figura 8 - Esquema de um equipamento do tipo triplo quadrupolo, onde os dois analisadores estão separados por uma Câmara de Colisão...	85
Figura 9 - Representação das etapas realizadas nos procedimentos de extração utilizando ultrassom (Ensaio E1) e mesa agitadora (Ensaio E2).....	107
Figura 10 - Fluxograma demonstrando os ensaios realizados baseando-se nos diferentes métodos de QuEChERS.....	109
Figura 11 - Representação das etapas realizadas nos procedimentos de extração utilizando método “QuEChERS original” e combinações utilizando ultrassom e agitação mecânica, incluindo a limpeza do extrato.....	111
Figura 12 - Representação esquemática das etapas realizadas no preparo da amostra utilizando modificações do método “QuEChERS citrato” combinado com ultrassom e agitação mecânica.....	113
Figura 13 - Representação esquemática das etapas realizadas no preparo da amostra utilizando variações do método “QuEChERS acetato” e “QuEChERS modificado” combinado com ultrassom e agitação mecânica.....	116
Figura 14 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS para uma solução analítica (20 µg L <sup>-1</sup> ) preparada em acetonitrila contendo os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados.....	128

Figura 15 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS para uma solução analítica (20 µg L <sup>-1</sup> ), preparada no extrato “branco” da matriz solo, obtido pelo método descrito no item 3.10.5, contendo os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados.....	129
Figura 16 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% obtidos para os ensaios (E1) de extração utilizando ultrassom (A: sem a adição de água e B: com a adição de água).....	131
Figura 17 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% obtidos para os ensaios (E2) de extração utilizando agitação mecânica, sendo A sem adição de água e B com adição de água.....	133
Figura 18 - Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação entre 70 e 120% e RSD ≤ 20% nos ensaios iniciais utilizando o método QuEChERS original (E3), QuEChERS citrato (E4), QuEChERS acetato (E5) e QuEChERS modificado (E6), sendo que A representa os ensaios utilizando etapa de limpeza e B sem a utilização de limpeza dos extratos.....	134
Figura 19 - Percentual de compostos que apresentaram faixas de recuperação de 70-120% e RSD ≤ 20% nos ensaios realizados sem a utilização de água (B) e com a adição de água (C), com o procedimento realizado sem a etapa de limpeza dos extratos, sendo método QuEChERS original (E3), QuEChERS citrato (E4), QuEChERS acetato (E5) e QuEChERS modificado (E6).....	135
Figura 20 - Resultados do percentual de compostos recuperados na faixa de 70 e 120% e RSD ≤ 20% utilizando os diferentes métodos QuEChERS (3: original; 4: citrato; 5: acetato; 6: modificado) com adição de água e sem etapa de limpeza dos extratos, sendo C: agitação em vórtex por 1 min, D: ultrassom por 15 min e E: agitação mecânica por 15 min.....	137
Figura 21 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios baseados no método QuEChERS original (1), QuEChERS citrato (2), QuEChERS acetato (3) e QuEChERS modificado (4), realizados	

	conforme descritos nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, respectivamente.....	138
Figura 22 -	Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de solo.....	139
Figura 23 -	Percentual de agrotóxicos em solo, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS desenvolvido.....	159
Figura 24 -	Percentual de medicamentos veterinários em solo, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS desenvolvido.....	159



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de frações granulométricas de partículas encontradas na fase sólida mineral do solo.....	32
Tabela 2 - Casos e óbitos registrados de intoxicação humana no Brasil, por agrotóxicos e produtos veterinários por diferentes agentes, no ano de 2010.....	39
Tabela 3 - Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por agrotóxicos e medicamentos veterinários nas diferentes regiões do Brasil, no ano de 2010.....	40
Tabela 4 - Limites máximos permitidos de resíduos de agrotóxicos no solo..	49
Tabela 5 - Métodos tradicionais utilizados para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários de amostras de solo.....	62
Tabela 6 - Métodos de extração MAE, PLE, SPME e SFE de agrotóxicos e medicamentos veterinários de solo.....	66
Tabela 7 - Alguns exemplos utilizando o método QuEChERS para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários de solo.....	73
Tabela 8 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e determinados por UHPLC-MS/MS, com a respectiva classe, grupo químico, fórmula molecular e pureza do padrão analítico.....	96
Tabela 9 - Ensaio de extração utilizando ultrassom (Ensaio E1).....	105
Tabela 10 - Ensaio de extração utilizando agitação mecânica (Ensaio E2).	106
Tabela 11 - Ensaio realizado para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS original” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.....	110
Tabela 12 - Ensaio realizado para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS citrato” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.....	112
Tabela 13 - Ensaio realizado para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS acetato” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.....	114

Tabela 14 - Ensaio realizado para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS modificado”, proposto por Prestes (2011) e combinações com ultrassom e agitação mecânica.....	115
Tabela 15 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos compostos.	123
Tabela 16 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS com o respectivo tempo de retenção ( $t_R$ ), faixa de retenção, íon precursor, íon produto e energia de colisão.....	125
Tabela 17 - Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS, a partir de soluções analíticas ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz avaliada.....	141
Tabela 18 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila.....	144
Tabela 19 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções preparadas no extrato da matriz.....	148
Tabela 20 - Valores dos limites de detecção e quantificação do instrumento e do método.....	152
Tabela 21 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....	155
Tabela 22 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ( $n=7$ ).....	160
Tabela 23 - Percentuais de RSD para a repetibilidade do instrumento para a solução analítica $20 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada no extrato da matriz.....	163
Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.....	193

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- % MO - Porcentagem de matéria orgânica
- % C - Porcentagem de carbono orgânico
- ACN - Acetonitrila
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCEL - Asia-Pacific Centre for Environmental Law
- APCI - Ionização química a pressão atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
- AV - Antimicrobianos veterinários
- BEH - Sílica híbrida, do inglês *Ethylene Bridged Hybrid*
- BPA - Boas Práticas Agrícolas
- C18 - Sílica modificada com hidrocarboneto linear C<sub>18</sub>, *octadecilsilano*
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
- CID - dissociação induzida por colisão, do inglês, *collision-induced dissociation*
- cmol<sub>c</sub> - Centimol por carga do íon que está sendo avaliado
- CTC<sub>efet</sub> - Capacidade de Troca de Cátions Efetiva
- d - densidade
- Da - Unidade Dalton
- DAD - Detector por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*
- DCM - Diclorometano
- DF - Distrito Federal
- DL<sub>50</sub> - Dose Letal 50%
- d-SPE - Extração em Fase Sólida dispersiva, do inglês *dispersive Solid Phase Extraction*
- ECD - Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron Capture Detector*
- EMA - Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais, do inglês *European Agency for the Evaluation of Medical Products*
- ESI - Ionização por Eletronebulização, do inglês *electrospray interface*
- EtAc - Acetato de etila
- EU - União Europeia
- EUA - Estados Unidos

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FD - Detector de Fluorescência, do inglês *Fluorescence Detector*

FDA - *Food and Drug Administration*

FID - Detector por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

FLO - Florfenicol

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

GC-MS/MS - Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Gas Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry*

GC-NPD - Cromatografia à Gás com Detector de Fósforo e Nitrogênio, do inglês *Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detector*

H - Constante da Lei de Henry

HAc - Ácido acético

HPLC - Cromatografia à Líquido de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

*i.a.* - Ingredientes ativos

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

JECFA - *Joint Expert Committee on Food Additives*

$K_{ow}$  - Coeficiente de partição octanol-água

LARP - Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*

LMR - Limites Máximos de Resíduos

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

LOD<sub>i</sub> - Limite de Detecção do instrumento, do inglês *Limit of Detection of the Instrument*

LOD<sub>m</sub> - Limite de Detecção do método, do inglês *Limit of Detection of the Method*

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

LOQ<sub>i</sub> - Limite de Quantificação do Instrumento, do inglês *Limit of Quantification of the Instrument*

LOQ<sub>m</sub> - Limite de Quantificação do método, do inglês *Limit of Quantification of the Method*

$m/z$  - Razão entre a massa e o número de cargas do íon



MAE - Extração Assistida por Micro-ondas, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*

MeOH - Metanol

mm - Milímetro

mm Hg - Milímetros de Hg

MRM - monitoramento de reações múltiplas, do inglês *Multiple-Reaction Monitoring*

MS - Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

NPD - Detector de Nitrogênio e Fósforo, do inglês *Nitrogen Phosphorus Detector*

PC - Padrão de Controle

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Padrão interno

pK<sub>a</sub> - Índice da força ácido-básica

PLE - Extração com Líquido Pressurizado, do inglês *Pressurised-Liquid Extraction*

PSA - Amina primária e secundária, do inglês *primary secondary amine*

QuEChERS - rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, do inglês “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*”

r<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

RSD - Desvio padrão relativo

RSD<sub>pi</sub> - Desvio Padrão Relativo da Precisão intermediária

RSD<sub>r</sub> - Desvio Padrão Relativo para Repetitividade

SAX - Cartucho de troca aniônica

SDX - Sulfadimetoxina

SFE - Extração com Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*

SiBCS - Sistema Brasileiro de Classificação de Solos

SIM - Monitoramento do Íon Seleccionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SINDAN -

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Toxicológicas

SLE - Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extraction*

SMT - Sulfametazina

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

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

SRM - Monitoramento de Reação Seleccionada, do inglês *Selected Reaction Monitoring*

Strata X - Cartucho polímero de estireno-divinilbenzeno

$T_{1/2}$  - Tempo de meia vida

TCD - Detector por Condutividade Térmica, do inglês *Thermal Conductivity Detector*

TMP - Trimetoprima

TPP - Trifenilfosfato

$t_R$  - tempo de retenção

UAE - Extração assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasonic-Assisted Extraction*

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

UHPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* ou *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*

UV-vis - Detector de Ultravioleta e Visível

v/v - Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Solo.....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Composição do solo.....	31
2.1.2 Características e propriedades do solo.....	33
<b>2.2 Agrotóxicos.....</b>	<b>35</b>
2.2.1 Definição.....	36
2.2.2 Classificação.....	37
2.2.3 Consumo e intoxicações.....	38
2.2.4 Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos.....	41
<b>2.3 Medicamentos veterinários.....</b>	<b>45</b>
2.3.1 Definição e classificação.....	46
2.3.2 Consumo e intoxicações.....	46
<b>2.4 Resíduos e contaminantes no solo.....</b>	<b>47</b>
<b>2.5 Relação entre os agrotóxicos e o ambiente.....</b>	<b>50</b>
<b>2.6 Relação entre os medicamentos veterinários e o ambiente.....</b>	<b>55</b>
<b>2.7 Preparo da amostra para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>57</b>
2.7.1 Método de extração QuEChERS.....	67
2.7.2 Aplicações do método QuEChERS e comparação de métodos para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de solo.....	69
<b>2.8 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários.....</b>	<b>77</b>
2.8.1 Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários.....	79
<b>2.9 Validação de métodos analíticos.....</b>	<b>86</b>
2.9.1 Seletividade.....	87
2.9.2 Efeito matriz.....	88
2.9.3 Curva analítica e faixa de trabalho.....	89
2.9.4 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ).....	90
2.9.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	91
2.9.6 Exatidão.....	92
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>93</b>
<b>3.1 Instrumentação.....</b>	<b>93</b>
<b>3.2 Materiais utilizados.....</b>	<b>94</b>
<b>3.3 Solventes, reagentes e gases.....</b>	<b>95</b>
<b>3.4 Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados.....</b>	<b>95</b>
<b>3.5 Seleção do padrão interno e do padrão de controle.....</b>	<b>96</b>
<b>3.6 Preparo das soluções analíticas.....</b>	<b>99</b>
<b>3.7 Amostra de solo empregada na etapa de validação.....</b>	<b>101</b>
<b>3.8 Otimização do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>102</b>
3.8.1 Escolha da fase móvel.....	102

3.8.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS.....	103
<b>3.9 Avaliação e otimização do método de extração para a determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>104</b>
3.9.1 Extração utilizando ultrassom (Ensaio E1).....	104
3.9.2 Extração utilizando agitação mecânica (Ensaio E2).....	105
3.9.3 Extração baseada no método QuEChERS.....	107
<b>3.10 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>117</b>
3.10.1 Seletividade.....	117
3.10.2 Efeito matriz.....	117
3.10.3 Curva analítica e faixa de trabalho.....	118
3.10.4 Limite de detecção e limite de quantificação.....	119
3.10.5 Ensaio de fortificação e recuperação para avaliação da exatidão.....	119
3.10.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	121
<b>3.11 Aplicação do método.....</b>	<b>121</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>123</b>
<b>4.1 Otimização do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>123</b>
<b>4.2 Condições de análise por UHPLC-MS/MS para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.....</b>	<b>124</b>
<b>4.3 Avaliação dos métodos de extração.....</b>	<b>130</b>
4.3.1 Avaliação do método utilizando ultrassom.....	131
4.3.2 Avaliação dos ensaios de extração utilizando agitação mecânica.....	132
4.3.3 Avaliação dos ensaios de extração utilizando o método QuEChERS.....	133
<b>4.4 Validação do método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários.....</b>	<b>139</b>
4.4.1 Seletividade.....	140
4.4.2 Avaliação do efeito matriz em UHPLC-MS/MS.....	140
4.4.3 Curva analítica e faixa linear.....	143
4.4.4 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método..	152
4.4.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método.....	154
4.4.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária).....	160
<b>4.5 Aplicação do método.....</b>	<b>164</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>165</b>
<b>DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS.....</b>	<b>167</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>169</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>171</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>191</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>201</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>213</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado não apenas um meio pelo qual se produz alimentos, fibras e energia, mas um componente vivo que fornece nutrientes às plantas, além de ser um reservatório de carbono e água e de abrigar uma enorme diversidade de organismos. Quando utilizado de forma inadequada, as consequências são inúmeras, entre elas a erosão e a diminuição de produtividade e qualidade. Atualmente, os maiores danos causados ao meio ambiente são consequências de desmatamentos, queimadas e uso indiscriminado e irracional de produtos químicos nas práticas agropecuárias, acarretando na redução da biodiversidade, aumento da emissão de gases de efeito estufa, bem como degradação do solo e poluição da água (EMBRAPA, 2013).

Os agrotóxicos são geralmente aplicados diretamente nos solos ou sobre as plantas, sendo que neste último caso, cerca de 50% da dose total aplicada poderá ter como destino final o solo, o qual atua como o principal receptor e acumulador desses compostos. Caso semelhante acontece com os medicamentos veterinários utilizados para prevenção e o controle de doenças, pois estima-se que em alguns casos até 90% da dose administrada seja eliminada, em sua forma não metabolizada ou como metabólitos ativos. Ao entrarem em contato com o solo, estes compostos estão sujeitos a processos físico-químicos que regulam seu destino no ambiente (FARIA, 2004; PEREIRA *et al.*, 2012). Dentre estes processos, destaca-se o escoamento superficial e a drenagem, pois estes são as maiores rotas de dispersão dos agrotóxicos e medicamentos veterinários para sistemas aquáticos, o que pode causar implicações até mesmo na qualidade das águas superficiais e subterrâneas (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011).

Por esse motivo, o monitoramento das possíveis contaminações oriundas do uso de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras ambientais tornou-se um assunto de extrema relevância, devido ao risco que estes compostos oferecem à saúde humana, além da sua persistência no meio ambiente e tendência de bioacumulação (PICÓ *et al.*, 2007).

Os procedimentos analíticos utilizados na determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários são complexos e necessitam de constante atualização

em razão da inserção de novos produtos para o controle de pragas e doenças na agropecuária. Devido ao grande número de compostos a serem analisados, a exigência de monitorar níveis cada vez menores de concentração e a grande complexidade das amostras, os métodos de análise incluem uma etapa de preparo da amostra preliminar, a qual é de fundamental importância para garantir a eficiência do processo analítico. Além disso, todas estas exigências têm demandado o surgimento de novas técnicas de extração, novos equipamentos e novos métodos para análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários.

Considerando a importância da utilização do solo para produção de alimentos, o uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e de medicamentos veterinários na criação de animais e, ainda, a consequente possibilidade destes compostos contaminarem o homem e o meio ambiente, os objetivos deste trabalho foram: (i) comparar diferentes procedimentos de extração a fim de estabelecer um método adequado para o preparo da amostra; (ii) otimizar e validar o método escolhido utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série (UHPLC-MS/MS) para a determinação de resíduos de 76 agrotóxicos e 9 medicamentos veterinários em solo e (iii) demonstrar a aplicabilidade do método validado para a determinação de resíduos dos compostos em estudo em amostras de solo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Solo

O solo é um meio complexo e heterogêneo, produto de alteração do remanejamento e da organização do material original (rocha, sedimento ou outro solo), sob a ação da vida, da atmosfera e das trocas de energia que aí se manifestam. Além disso, é constituído por quantidades variáveis de minerais, matéria orgânica, água da zona não saturada e saturada, ar e organismos vivos, incluindo plantas, bactérias, fungos, protozoários, invertebrados e outros animais (CETESB, 2012).

O solo é um recurso natural que sustenta a flora e a fauna, a agricultura, a pecuária, o armazenamento de água e as obras de engenharia. Além de ser um meio importante para a agricultura, é também um componente vital do agroecossistema no qual ocorrem processos e ciclos de transformações físicas, químicas e biológicas. Sabe-se que o solo é um recurso natural lentamente renovável, encontrado em diferentes posições na paisagem. Sua origem resulta da alteração de rochas e sedimentos pela ação das variações climáticas (intensidade das chuvas, variação de temperatura) e dos organismos vivos (fauna e flora), nas mais diversas situações da paisagem, ao longo do tempo (STRECK *et al.*, 2008).

#### 2.1.1 Composição do solo

O solo é constituído por três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida é constituída pelo material parental (rocha) local ou transportado e material orgânico, originário da decomposição vegetal e animal. A fase líquida, a água ou a solução do solo (elementos orgânicos e inorgânicos em solução), e a fase gasosa, de composição variável, de acordo com os gases produzidos e consumidos pelas raízes das plantas e dos animais ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ). As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo são determinadas pelo processo geológico de sua formação,

origem dos minerais, e sua evolução de acordo com o clima e o relevo do local, além dos organismos vivos que o habitam (CETESB, 2012).

O solo é formado por uma fase sólida (minerais e material orgânico) e por uma porosa. A proporção destas fases varia de um solo para outro, ou ainda, de horizonte para horizonte, dentro do mesmo solo. A fase sólida do solo é formada por material orgânico decomposto e partículas de diferentes tamanhos (areia, silte e argila) que são agrupadas em agregados ou torrões, formando a estrutura do solo. A agregação das partículas permite a existência de espaços vazios no solo, denominados poros, que são preenchidos por água e ar. Um solo considerado ideal para o crescimento de plantas apresenta as seguintes proporções de fases sólida, líquida e gasosa na camada superficial: 45% de minerais, 5% de matéria orgânica, de 30 a 35% de água e de 15 a 20% de ar. A fase sólida ocupa cerca de 50% do volume do solo e é constituída por minerais e por material orgânico. Na fase sólida mineral encontram-se partículas sólidas de formas e tamanhos variáveis. Estas são classificadas de acordo com o seu diâmetro em frações granulométricas. A Tabela 1 apresenta as escalas de frações granulométricas mais utilizadas no Brasil (MEURER, 2004).

Tabela 1 - Escala de frações granulométricas de partículas encontradas na fase sólida mineral do solo.

Fração granulométrica	Diâmetro médio das partículas (mm)
Matacão	> 200
Calhaus (ou pedras)	200 - 20
Cascalho	20 - 2
Areia grossa	2 - 0,2
Areia fina	0,2 - 0,05
Silte (ou "limo")	0,05 - 0,002
Argila	< 0,002

Fonte: Adaptado de LEPSCH, 2002; MEURER, 2004



A fase líquida do solo é constituída por água acrescida de minerais e compostos orgânicos nela dissolvidos, formando a solução do solo. A solução do solo é um sistema aberto, dinâmico, que troca matéria e energia com suas vizinhanças e sua composição é resultante das inúmeras reações que ocorrem com as outras fases que constituem o solo. O estudo e caracterização da composição da solução do solo podem ser utilizados para prever transformações e reações de sorção, dissolução e precipitação que podem ocorrer no solo. A análise química da solução do solo permite identificar as formas e quantidades de elementos químicos que estão sendo adicionados ao solo e, também, a quantidade deles que está sendo transferida para outros compartimentos do ambiente, através do lençol freático (MEURER, 2004).

A fase gasosa que ocupa o espaço poroso do solo (principalmente macroporos) é preenchida pelo ar do solo, que contém de 10 a 100 vezes mais  $\text{CO}_2$  e pouco menos  $\text{O}_2$  que o ar atmosférico normal (na atmosfera os teores de  $\text{CO}_2$  estão em torno de 0,03% e os de oxigênio em torno de 21%). As plantas não sobrevivem quando o teor de oxigênio no ar do solo é inferior a 10%.

### 2.1.2 Características e propriedades do solo

A textura é uma característica do solo relacionada às diferentes proporções de areia, silte e argila, e influencia muito outras propriedades do solo. Embora existam solos arenosos sem estrutura, a maioria dos horizontes é estruturada na forma de agregados, que podem diferir entre solos e entre horizontes, podendo apresentar diferentes formatos, tamanhos e resistência à desagregação (MEURER, 2004).

Os elementos que fornecem cor aos solos são principalmente o ferro e a matéria orgânica. Enquanto a matéria orgânica fornece coloração escura aos horizontes superficiais, o ferro fornece cores avermelhadas, alaranjadas e amareladas ao solo. Solos sem excesso de água são avermelhados, marrons ou alaranjados. Solos moderadamente drenados ou solos de regiões frias apresentam cores amareladas com horizontes superficiais escuros (ricos em matéria orgânica). Em solos alagados, devido a ausência de ferro, a coloração é mais neutra variando de cinza claro a preto. Além destas, outras características não visíveis a olho nu e

não perceptíveis ao tato também variam entre solos e horizontes e dentre estas, pode-se destacar a acidez, o teor de nutrientes, a porosidade, a água disponível, entre outros. A combinação destas características associada com a paisagem, relevo, clima, geologia e drenagem, é que vai determinar a aptidão dos solos para uso agrícola ou para outros usos (MEURER, 2004).

A matéria orgânica (húmus) do solo inclui todos os compostos orgânicos, exceto os materiais não decompostos e os organismos vivos (biomassa). A matéria orgânica pode ajudar no aquecimento do solo e no suprimento de nutrientes para as plantas, permitir troca de gases, estabilizar a estrutura e aumentar a permeabilidade. Os organismos do solo são responsáveis pelos processos de decomposição (CETESB, 2012).

O Brasil é um país extenso territorialmente e por conta disso apresenta uma grande variedade de tipos de solo, que se diferenciam por conta da sua tonalidade, granulação, composição e produção, e que é classificada de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS) (EMBRAPA, 2013).

No Rio Grande do Sul, a combinação da diversidade geológica, climática e de relevo originou uma grande variedade de tipos de solos que contribuíram para os diferentes padrões de ocupação das terras, do seu uso agrícola e do desenvolvimento regional. Considerando esses vários aspectos, “os solos podem ser definidos como corpos naturais que cobrem a superfície terrestre, são constituídos por matérias minerais e orgânicas, contém organismos vivos e tem potencial para o desenvolvimento de vegetação onde ocorrem e que foram em parte modificados pela atividade humana” (STRECK, 2008).

O solo tem a capacidade de interagir com os compostos químicos, sejam eles agrotóxicos ou medicamentos veterinários e, esta interação depende não só das propriedades físico-químicas dos compostos, como também das características de cada tipo de solo.

Dentre as características do solo, a textura, a permeabilidade e a quantidade de matéria orgânica tem relação direta na sorção/dessorção de substâncias transportadas através do solo (KAH *et al.*, 2007).

Segundo Muller e colaboradores (2007) e Kah e colaboradores (2007), as principais características dos solos que afetam a persistência dos agrotóxicos estão descritas a seguir.

O tipo de solo influencia além da persistência e atividade dos agrotóxicos, a taxa com quem estes são convertidos em outros compostos. O fator mais importante na persistência dos agrotóxicos no solo é o conteúdo de matéria orgânica. Esta quantidade pode variar de menos de 1% a 50%, sendo que quanto maior a porcentagem de carbono orgânico (%C), maior será a persistência dos agrotóxicos no solo.

O conteúdo de argila também é muito importante, pois solos que apresentam uma grande quantidade de argila possuem uma área superficial grande e, portanto, podem reter uma maior quantidade de agrotóxicos, devido a maior área para adsorção.

A acidez do solo, ou a concentração de íons hidrogênio, pode influenciar a quebra das moléculas dos agrotóxicos no solo de muitas maneiras, seja afetando a estabilidade do material argiloso, a capacidade de troca iônica ou a taxa pelas quais as decomposições químicas e bacterianas ocorrem.

O conteúdo de minerais no solo influencia além de seu tipo e estrutura, a persistência dos agrotóxicos, como por exemplo, o processo de decomposição catalítica dos compostos ocorre muito rapidamente em solos com alto teor de ferro.

O aumento da temperatura influencia nos processos de degradação química, decomposição bacteriana ou volatilização, sendo que com temperaturas baixas, estes processos ocorrem muito lentamente e as perdas de agrotóxicos são pequenas. A umidade influencia na persistência dos agrotóxicos devido aos efeitos de adsorção destes compostos nas frações do solo. A água pode competir com os agrotóxicos pelos sítios de adsorção, pois é uma molécula muito polar e fortemente adsorvida pelos colóides do solo.

E por fim, o sistema de estabelecimento da cultura, que de acordo com o cultivo, o solo pode estar exposto à maiores quantidades de chuva, vento e sol, que influenciam fortemente na persistência de agrotóxicos no solo.

## **2.2 Agrotóxicos**

Nas últimas décadas acentuou-se a preocupação quanto à contaminação e poluição do solo e das águas superficiais e subterrâneas devido à grande expansão

urbana e industrial. Este avanço associado ao aumento da produção dos bens de consumo resultou em uma grande carga poluidora, responsável pela geração de resíduos, que por muito tempo, foram descartados indiscriminadamente no ambiente, provocando danos de difícil recuperação e muitas vezes irreversíveis (MEURER, 2004).

Da mesma forma, o processo produtivo agrícola tem ocasionado um aumento na utilização de moléculas com ação biocida (inseticidas, fungicidas, nematicidas, herbicidas) para controlar pragas, moléstias e plantas invasoras que infestam as lavouras. Vários desses produtos contém, além do princípio ativo tóxico, elementos ou compostos potencialmente poluidores, como metais pesados, surfactantes, emulsificantes, entre outros (MEURER, 2004).

### 2.2.1 Definição

Segundo o *Codex Alimentarius*, agrotóxico é toda e qualquer substância utilizada com o propósito de prevenir, destruir, atrair, repelir ou controlar qualquer peste, incluindo espécies indesejáveis de plantas, insetos ou animais, durante as etapas de produção, armazenamento, transporte, distribuição e processamento do alimento ou ração animal (ou que seja fornecido aos animais para controle de ectoparasitas). O termo inclui substâncias utilizadas como reguladoras do crescimento das plantas, desfolhantes, dessecantes, ou inibidores de brotos, e substâncias aplicadas tanto antes como após a colheita, para proteger a mesma da deterioração durante o armazenamento e transporte (FAO, 2005).

No Brasil (2002), o Decreto nº 4.074 regulamenta a Lei nº 7802/1989 e estabelece que os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Os agrotóxicos são moléculas sintetizadas para afetar determinadas reações bioquímicas de insetos, microrganismos, animais e plantas que se quer controlar ou eliminar, mas determinados processos bioquímicos são comuns a todos os seres vivos e, assim, o efeito pode então atingir não só o organismo alvo, como também outros seres do ambiente. Os efeitos de resíduos de agrotóxicos nem sempre são isolados, pois as comunidades têm interações recíprocas de dependência ou cooperação e a ação sobre uma determinada população pode afetar todo o funcionamento de um ecossistema (SPADOTTO & GOMES, 2013).

### 2.2.2 Classificação

Os agrotóxicos podem ser classificados de diferentes maneiras, sendo a principal delas quanto ao seu modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou a natureza da praga combatida, conforme descrito a seguir: herbicidas (combatem as plantas daninhas), inseticidas (combatem os insetos), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), rodenticidas (combatem os roedores), bactericidas (combatem as bactérias), entre outros (BAIRD, 2002).

A classificação dos agrotóxicos conforme o grau de toxicidade para o ser humano é fundamental, pois fornece a toxicidade desses produtos relacionados com a Dose Letal 50% ( $DL_{50}$ ). A  $DL_{50}$  representa a quantidade (dose única) da substância necessária para matar 50% dos animais testados nas condições experimentais utilizadas (BARBOSA, 2004). A Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4074, de 04 de janeiro de 2002, obriga às formulações de pesticidas a apresentarem no rótulo, a cor correspondente à classe de sua toxicidade para alertar sobre o perigo desta formulação, conforme demonstrado na Figura 1 (BRASIL, 2002).

A classificação toxicológica garante a interpretação direta do grau de perigo dos agrotóxicos à saúde humana, facilitando ao consumidor identificar a dimensão do risco na utilização destes compostos. É importante destacar que dentre as substâncias classificadas como extremamente tóxicas (classe I), encontram-se aquelas comprovadamente carcinogênicas e mutagênicas (LEVIGARD, 2001).

<b>Classe I</b>	<b>Rótulo vermelho - Extremamente tóxico</b>	<b>*DL<sub>50</sub> = 0 – 50 mg kg<sup>-1</sup></b>
<b>Classe II</b>	<b>Rótulo amarelo - Altamente tóxico</b>	<b>*DL<sub>50</sub> = 50 – 500 mg kg<sup>-1</sup></b>
<b>Classe III</b>	<b>Rótulo azul - Medianamente tóxico</b>	<b>*DL<sub>50</sub> = 500 – 5000 mg kg<sup>-1</sup></b>
<b>Classe IV</b>	<b>Rótulo verde - Pouco tóxico</b>	<b>*DL<sub>50</sub> &gt; 5000 mg kg<sup>-1</sup></b>

\*DL<sub>50</sub> quantidade de uma determinada substância que é necessária ingerir ou administrar para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo.

Figura 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos. Fonte: BRASIL, 2002.

### 2.2.3 Consumo e intoxicações

O processo produtivo agrícola brasileiro está cada vez mais dependente dos agrotóxicos e fertilizantes químicos. Segundo os dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná, no 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, em Brasília (DF), em abril de 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Assim, em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2012).

Os crescentes índices de produção e produtividade no campo brasileiro tornaram o Brasil atrativo para a indústria química de defensivos agrícolas. O país já é o maior mercado consumidor de agrotóxicos no mundo. Apenas no ano passado, os agricultores brasileiros consumiram 823,2 milhões de toneladas de agrotóxicos. Segundo informações do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), essa posição é resultado da possibilidade que o país tem de produzir mais de uma safra por ano (SINDAG, 2013).

Um mercado nacional que em 2002 representava R\$ 2,5 bilhões chega, passados dez anos, à cifra de R\$ 8,9 bilhões (SINITOX, 2010). Os estudos do impacto desses produtos não acompanham a própria liberação do comércio e,

menos ainda, a informação sobre o uso e como resultado deste crescente consumo, mais pessoas estão morrendo pelo contato com estes compostos.

Segundo o Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no Brasil, foram 5.463 casos registrados de intoxicação por esses produtos em 2010, sendo que destes, 195 chegaram a óbito, conforme apresentado na Tabela 2 (SINITOX, 2010).

Tabela 2 - Casos e óbitos registrados de intoxicação humana no Brasil, por agrotóxicos e produtos veterinários por diferentes agentes, no ano de 2010.

	Agrotóxicos/Usos Agrícola		Produtos Veterinários	
	Casos registrados de intoxicação	Óbitos	Casos registrados de intoxicação	Óbitos
Acidente individual	1217	8	479	-
Acidente coletivo	73	-	3	-
Acidente ambiental	111	1	2	-
Ocupacional	1308	3	56	-
Uso terapêutico	1	-	3	-
Prescrição médica inadequada	-	-	2	-
Erro de administração	5	-	8	-
Automedicação	6	-	1	-
Abuso	4	-	3	-
Ingestão de alimentos	6	-	2	-
Tentativa de suicídio	2439	175	277	1
Tentativa de aborto	4	-	1	-
Violência/ homicídio	38	3	1	-
Uso indevido	32	-	26	-
Outras	218	5	26	-
Total	5463	195	885	1

Fonte: SINITOX, 2010.

Os dados de intoxicações que chegam aos centros de toxicologia ainda são precários, sendo que a maior parte deles não é registrada. O Ministério da Saúde aponta que para cada caso de intoxicação registrado no Brasil, outros 40 casos não são notificados.

Considerando o número de casos de intoxicação e óbitos nas diferentes regiões do Brasil, destaca-se a região sudeste que apresenta o maior índice com 2.823 casos de intoxicação humana por agrotóxicos, sendo que destes, 50 levaram a óbitos, seguida da região sul, com 898 casos de intoxicação e 20 óbitos, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por agrotóxicos e medicamentos veterinários nas diferentes regiões do Brasil, no ano de 2010.

		Agrotóxicos/Uso	Produtos
		Agrícola	Veterinários
Região Norte	Número de casos	115	25
	Número de óbitos	1	-
	Letalidade (%)	0,55	-
Região Nordeste	Número de casos	823	76
	Número de óbitos	82	1
	Letalidade (%)	9,96	1,32
Região Sudeste	Número de casos	2823	305
	Número de óbitos	50	-
	Letalidade (%)	1,77	-
Região Sul	Número de casos	898	255
	Número de óbitos	20	-
	Letalidade (%)	2,23	-
Região Centro-Oeste	Número de casos	804	224
	Número de óbitos	42	1
	Letalidade (%)	5,22	0,45
Brasil	Número de casos	5463	885
	Número de óbitos	195	2
	Letalidade (%)	3,57	0,23

Fonte: SINITOX, 2010



É importante destacar que dos 898 casos de intoxicação na região sul, 244 foram decorrentes de acidente individual, 8 de acidente coletivo, 1 de acidente ambiental, 323 de intoxicação ocupacional, 283 de tentativa de suicídio, 17 de violência/suicídio, 5 de uso indevido e os 17 restantes por causas não especificadas. Além disso, dos 20 óbitos registrados, 1 foi decorrente de intoxicação ocupacional, 18 de tentativa de suicídio e 1 de causa não especificada (SINITOX, 2010).

As medidas mais importantes para minimizar o risco potencial da contaminação por agrotóxicos em humanos são, não somente monitorá-los nos produtos agrícolas e em frutas e verduras, mas também propor e empregar formas alternativas que visem a redução desses compostos durante, principalmente, as etapas de plantio de uma determinada cultura. De modo geral, quando os agrotóxicos são aplicados seguindo as Boas Práticas Agrícolas (BPA), os Limites Máximos de Resíduos (LMR) não são excedidos, porém, a má utilização desses compostos é que se torna preocupante, podendo deixar quantidades significativas de resíduos tanto em alimentos quanto em compartimentos ambientais (JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009).

#### 2.2.4 Propriedades físico-químicas dos agrotóxicos

É possível estimar o comportamento de um agrotóxico no ambiente, desde a sua aplicação até o destino final, por meio do estudo de suas propriedades físico-químicas e das propriedades do ambiente (PRIMEL *et al.*, 2005).

A natureza de cada agrotóxico é uma função composta de sua estrutura molecular expressa pelo tamanho da molécula, ionizabilidade, solubilidade em água, lipofilicidade, polarizabilidade e volatilidade, dentre outras. Cada uma dessas propriedades afeta a natureza geral de uma molécula em alguma extensão, mas geralmente uma ou duas propriedades tem uma influência predominante (SILVA; FAY, 2004).

Portanto, cada agrotóxico tem sua estrutura molecular definida, a qual determina, pelo menos parcialmente, o grau que ele irá interagir no ambiente. Com a presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre, as moléculas orgânicas modificam suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Estes grupos geralmente tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos,

tanto química como biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbono. Muitos desses grupos funcionais também podem conferir características ácidas ou básicas aos compostos. A presença de halogênios como, por exemplo, flúor, cloro e bromo também torna o agrotóxico menos solúvel em água, mais volátil e normalmente menos reativo, tornando-o mais estável ambientalmente (SILVA; FAY, 2004).

Alguns agrotóxicos ainda podem apresentar mais de um grupo funcional em sua estrutura. Sendo assim, a soma dos efeitos individuais de cada grupo funcional determina suas propriedades físicas, químicas e biológicas e, conseqüentemente, seu comportamento e destino ambiental.

Dentre as inúmeras propriedades físico-químicas dos compostos, serão descritas a seguir aquelas de fundamental importância para um bom entendimento do comportamento dos agrotóxicos no ambiente.

#### ⇒ Densidade

É a relação entre a sua massa por unidade de volume e, normalmente, é expressa em  $\text{g cm}^{-3}$ , a uma determinada temperatura. A maioria dos compostos orgânicos, incluindo todos os hidrocarbonetos alifáticos, tem densidades menores que a água ( $d_{\text{água}} = 0,998 \text{ g cm}^{-3}$  a  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), enquanto os compostos orgânicos halogenados tem densidades maiores. A densidade de um composto orgânico determina seu potencial de lixiviação em uma dada situação. Os efeitos da densidade e da miscibilidade são importantes no destino da maioria dos compostos orgânicos (SILVA; FAY, 2004).

#### ⇒ Solubilidade

A solubilidade em água pode ser definida como a quantidade máxima de um composto orgânico que se dissolve em água pura a uma determinada temperatura e pH (SILVA; FAY, 2004). Esta propriedade é de fundamental importância nos processos ambientais, pois afeta o comportamento, transporte e destino dos compostos orgânicos para as águas subterrâneas. A solubilidade em água é dependente da estrutura química do composto, tamanho molecular, presença de

grupos funcionais, estado físico, solvente e das condições ambientais, como temperatura e pressão (CAPEL, 1993).

Moléculas altamente solúveis tendem a ter coeficientes de adsorção, para solos e sedimentos, relativamente baixos e fatores de bioconcentração também relativamente baixos. Tendem a ser mais rapidamente biodegradáveis no solo e na água. A presença de matéria orgânica dissolvida, como ácidos húmicos e fúlvicos, leva a um aumento da solubilidade de vários compostos devido a sua partição na matéria orgânica.

A presença de grupos funcionais contendo nitrogênio, oxigênio, enxofre e moléculas orgânicas, tais como, ácidos, álcoois, cetonas, sais, aminas e tióis, permite ligações destes com água por pontes de hidrogênio e, portanto, aumenta a solubilidade desses agrotóxicos em água. A adição de halogênios ou grupos alquila diminui a solubilidade em água de uma maneira sistemática baseada no tamanho do substituinte (PIERZYNSKI; SIMS; VANCE, 1994).

⇒ Constante de dissociação

O  $pK_a$  é um índice da força ácido-básica de um composto e é definido como o pH no qual a metade do composto está na sua forma ionizada e metade na forma não ionizada. Para as espécies ionizáveis, no valor de  $pH = pK_a$ , a relação das espécies iônicas e moleculares é 1:1. A forma da molécula orgânica tem impacto significativo em sua solubilidade em água e, portanto, em seu comportamento no ambiente (SILVA; FAY, 2004). Quanto menor o valor de  $pK_a$ , maior é o grau de dissociação iônica e, portanto, mais solúvel é a substância. Em geral, a maioria dos compostos orgânicos ácidos tem os valores de  $pK_a$  entre 4 e 5, muitos álcoois orgânicos entre 9 e 11 e a maioria das aminas e nitrocompostos tem  $pK_a$  entre 10 e 12. Além disso, a presença de halogênios na molécula orgânica, diminui o valor do seu  $pK_a$  (BARCELÓ; HENNION, 2003).

⇒ Pressão de vapor

É definida como a pressão à determinada temperatura em que a fase de vapor (gás) está em equilíbrio com a fase líquida e é a principal propriedade da

molécula a ser utilizada no cálculo de sua volatilização. A pressão de vapor é expressa em mm Hg a 25 °C.

Quando um agrotóxico é incorporado ao solo, a perda por volatilização envolve a dessorção do agrotóxico do solo, movimento na superfície do solo e volatilização para a atmosfera. Portanto, os agrotóxicos incorporados ao solo volatilizam a uma velocidade muito reduzida, dependente da pressão de vapor efetiva do agrotóxico no interior do solo e sua velocidade de movimento para a superfície (SILVA; FAY, 2004).

De uma maneira geral, os compostos com baixa pressão de vapor, apresentam menor transporte, menor mobilidade atmosférica, menor volatilização e, conseqüentemente, maior persistência. Já os compostos com alta pressão de vapor apresentam maior transporte, maior mobilidade, maior volatilização e conseqüentemente menor persistência.

#### ⇒ Lei de Henry (H)

A constante da Lei de Henry (H), também chamada de coeficiente de partição ar/água no ambiente, expressa a condição de equilíbrio entre a concentração em solução de uma molécula orgânica dissolvida e a pressão parcial do ar acima da solução a uma dada temperatura.

A constante da Lei de Henry é expressa em  $\text{atm mol}^{-1} \text{ m}^{-3}$  e descreve adequadamente o coeficiente de partição ambiental ar-água. Esta constante juntamente com a pressão de vapor mostra a tendência do agrotóxico a volatilizar ou permanecer na fase aquosa (SILVA; FAY, 2004).

#### ⇒ Coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ )

É definido como a relação da concentração de um agrotóxico na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. Este coeficiente relaciona as propriedades lipofílicas e hidrofílicas, demonstrando a tendência a bioconcentração destes compostos, sendo um fator importante na avaliação de riscos, pois em conjunto com os dados de degradação, o potencial de acumulação pode ser usado na identificação dos agrotóxicos que podem ser transportados via cadeia alimentar (BARCELÓ; HENNION, 2003).

⇒ Tempo de meia vida

A longevidade de uma molécula orgânica é normalmente expressa em termos de meia vida ( $T_{1/2}$ ) do composto parental, que é o tempo requerido para que a metade da concentração do agrotóxico desapareça, independentemente da sua concentração inicial no solo. A degradabilidade dos agrotóxicos, geralmente expressa pela meia vida, é muito variável, incluindo dias, meses ou anos e é fortemente influenciada pelas condições ambientais. O tempo de meia vida é um critério utilizado para determinar os efeitos ambientais relacionados à volatilização, potencial de lixiviação e características de degradação de vários compostos químicos (SILVA; FAY, 2004). É útil para a comparação da persistência relativa de diferentes agrotóxicos no ambiente e é importante para o entendimento do potencial de impacto no solo e na água (CABRERA *et al.*, 2008).

### **2.3 Medicamentos veterinários**

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro e para assegurar a produtividade e competitividade do setor, os medicamentos de uso veterinário tem sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, para garantir a saúde animal, assim como permitir um aumento na produção de alimentos de origem animal (STOLKER; BRINKMAN, 2005; REGITANO; LEAL, 2010). Deste modo, antimicrobianos, endectocidas, coccidios-táticos, antiprotozoários, antifúngicos, promotores de crescimento, hormônios, anestésicos, tranquilizantes, agentes antiinflamatórios não esteroidais e produtos para eutanásia são utilizados para assegurar a saúde animal (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

### 2.3.1 Definição e classificação

Os medicamentos veterinários são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como toda e qualquer substância aplicada, em qualquer animal destinado à produção de alimentos, com fins terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico, ou para modificar as funções fisiológicas, de comportamento ou como promotor de crescimento (ANVISA, 2013).

De acordo com a agência *Food and Drug Administration* (FDA) e a União Europeia (EU) estas substâncias são classificadas em dois grupos. O grupo A compreende as substâncias proibidas (estilbenos, agentes antitireóideos, esteróides, lactonas do ácido resorcílico, beta-antagonistas e nitrofuranos) e o grupo B compreende outros medicamentos veterinários autorizados, mas que possuem limites estabelecidos (bactericidas, anti-helmínticos, carbamatos e piretróides, sedativos, antiinflamatórios não esteróides, organoclorados e organofosforados) (FDA, 2010; FVO, 2010).

### 2.3.2 Consumo e intoxicações

O Brasil é um dos cinco maiores mercados veterinários em todo o mundo. O setor vem apresentando crescimento sustentado devido, principalmente, a três fatores: 1) aumento das exportações de produtos veterinários, uma vez que o Brasil é um centro de produção importante para as multinacionais; 2) maior fiscalização sanitária e critérios cada vez mais exigentes para a comercialização seja interna ou externamente; e 3) maior conscientização dos criadores da importância de manter os rebanhos saudáveis, com programas sanitários eficientes e regulares (CAPANEMA *et al.*, 2007). De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o faturamento deste setor aumentou de 2,51 milhões de reais em 2006 para 3,66 milhões de reais no ano de 2012 (SINDAN, 2013).

Apesar das taxas de excreção dos antimicrobianos veterinários (AV) dependerem da substância administrada, do modo de aplicação, da espécie animal e do tempo de tratamento, estima-se que em alguns casos até 90% da dose administrada seja eliminada, em sua forma não metabolizada ou como metabólitos

ativos, já que a absorção destas substâncias geralmente ocorre de forma incompleta no organismo (KEMPER, 2008; BAO *et al.*, 2009).

Muitos destes compostos podem exercer efeitos genotóxicos, carcinogênicos, endócrinos, entre outros e, portanto, os órgãos fiscalizadores exigem um severo controle no uso destes compostos envolvendo a produção de alimentos.

Segundo o SINITOX, em 2010, foram registrados 885 casos de intoxicação humana e 1 caso de óbito por medicamentos veterinários no Brasil. Dos 885 casos, mais da metade (479) foram decorrentes de acidente individual e 277 foram decorrentes de tentativa de suicídio, conforme apresentado na Tabela 2 (SINITOX, 2010).

De acordo com a Tabela 3 que apresenta os casos de intoxicação humana e óbitos por medicamentos veterinários por região do Brasil, no ano de 2010, pode-se observar que dos 885 casos no país, o maior número registrado foi na região sudeste com 305 casos, seguido da região sul com 255 e da região centro-oeste com 224 casos. Além disso, é possível observar que dos dois óbitos, um foi registrado na região nordeste e outro na região centro-oeste (SINITOX, 2010).

Além disso, é importante destacar que dos 255 casos de intoxicação humana na região sul, 141 foram decorrentes de acidente individual, 32 por intoxicação ocupacional, 1 de erro de administração, 65 de tentativa de suicídio, 9 de uso indevido e os 7 restantes de causas não identificadas, sendo que nenhum destes casos resultou em óbito (SINITOX, 2010).

## **2.4 Resíduos e contaminantes no solo**

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO (do inglês, *Food and Agriculture Organization*) define o termo “resíduo” como sendo a fração de uma substância, seus metabólitos, produtos de conversão ou reação e impurezas que permanecem no alimento proveniente de produtos agrícolas e/ou animais tratados com estas substâncias (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

Já o termo “contaminante” é definido como qualquer substância que não seja intencionalmente adicionada aos alimentos. Os contaminantes podem estar presentes nos alimentos como resultado das etapas de produção, transformação,

acondicionamento, embalagem, transporte e armazenagem do alimento (CODEX ALIMENTARIUS, 2010).

As deficiências nas boas práticas para a utilização de agrotóxicos e medicamentos de uso veterinário resultam no aparecimento de resíduos que, em níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), podem representar risco à saúde humana. Estes riscos estão estritamente correlacionados com o desrespeito às instruções de uso do fabricante contidas na bula dos agrotóxicos e dos medicamentos veterinários, tais como: indicação de uso para a espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência (PRESTES, 2011).

O LMR é a quantidade legalmente permitida, ou reconhecida, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada composto aprovado para uso em um determinado alimento. O LMR sempre está correlacionado à Ingestão Diária Aceitável.

O *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA), órgão da FAO, e o FDA dos EUA, que são as organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, estabelecem as diretrizes para os Limites Máximos de Resíduos (LMR) (DENOBI, 2004). Já no Brasil, a competência para estabelecer estes limites, seja de medicamentos veterinários ou de agrotóxicos, é do Ministério da Saúde através da ANVISA.

Apesar de haver recomendações para alimentos, até os dias atuais não existem legislações que estabeleçam limites específicos para a concentração de medicamentos veterinários no solo. Somente em 2001 a Agência Europeia, para a Avaliação de Produtos Medicinais (EMEA, *European Agency for the Evaluation of Medical Products*), determinou um limite genérico de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  para fármacos veterinários em solo. Este valor foi estabelecido com base em estudos toxicológicos realizados com os fármacos autorizados nos Estados Unidos e está abaixo dos níveis prejudiciais observados em minhocas, micróbios e plantas (VICH, 2010).

Com relação aos agrotóxicos, são precárias as informações referentes aos limites máximos permitidos em solo. A *Asia-Pacific Centre for Environmental Law* (APCEL, 1995) propõe limites máximos permitidos de resíduos de agrotóxicos para serem usados como padrões no controle e na avaliação do nível de contaminação do solo. A Tabela 4 apresenta as concentrações máximas permitidas para alguns agrotóxicos pela APCEL.



No que diz respeito à legislação ambiental brasileira, mais especificamente no estado de São Paulo, em 2005, a CETESB, em conjunto com o Ministério da Saúde, estabeleceu valores orientadores (valores de referência de qualidade, de alerta e de intervenção) para alguns agrotóxicos presentes em compartimentos ambientais, como solos e águas subterrâneas, conforme apresentado no Anexo A. Esses valores são descritos apenas para alguns tipos de agrotóxicos (aldrin e dieldrin, Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), endrin, lindano e hexaclorobenzeno (HCB)) e foram definidos com base em dados nacionais e em avaliação de risco à saúde humana, cujas respostas foram obtidas a partir do gerenciamento da qualidade dos solos e das águas subterrâneas (CETESB, 2005).

Tabela 4 - Limites máximos permitidos de resíduos de agrotóxicos no solo.

Agrotóxico	Concentração Máxima Permitida (mg kg <sup>-1</sup> )
2,4-D	0,2
Atrazina	0,2
Cipermetrina	0,5
Dimetoato	0,1
Metolaclor	0,5
Monocrotofós	0,1
Paration-metílico	0,1
Simazina	0,2

Fonte: Asia-Pacific Centre for Environmental Law (APCEL, 1995).

Diante do exposto, constata-se que existe uma lacuna de conhecimento quanto aos indicadores de risco ambiental de agrotóxicos e medicamentos veterinários para o solo. Por constituírem um grupo muito grande ingredientes ativos (i.a.) em uso no Brasil, há necessidade de que os trabalhos avancem no sentido de estabelecer valores permitidos e/ou aceitáveis para esses compostos nos solos do país.

## 2.5 Relação entre os agrotóxicos e o ambiente

Os agrotóxicos são os compostos de maior interesse agronômico, dentre os poluentes orgânicos sintéticos, pois são utilizados em grandes quantidades e, normalmente, seu destino final é o solo. Estes compostos atingem o solo não só pela incorporação direta, como também pelo tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas, no controle de fungos patogênicos e pragas e pela eliminação de plantas invasoras pelos herbicidas. A contaminação ainda pode ocorrer de forma indireta, pela pulverização das partes verdes dos vegetais e pela queda de frutos e folhas que receberam a aplicação de agrotóxicos (MEURER, 2004).

Os mecanismos físicos e biológicos possibilitam a distribuição dos resíduos de agrotóxicos nos ecossistemas pelo ar, pela água e pela migração nos organismos. Devido à alta complexidade dos processos ambientais, o estudo do efeito ambiental dos agrotóxicos também é extremamente complexo. Geralmente, a absorção de agrotóxicos no solo é mais forte em comparação à absorção dos agrotóxicos de outras matrizes, como por exemplo, frutas e vegetais (SCORZA, 2010).

A duração do efeito dos agrotóxicos e sua permanência no ambiente estabelecem a sua persistência, sendo esta influenciada pela estrutura química do composto, pelas condições do ambiente e pela presença de micro-organismos capazes de degradar estes compostos (MEURER, 2004).

Depois da aplicação de um agrotóxico, adubo ou fertilizante no solo, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seus respectivos comportamentos. O destino desses agroquímicos no ambiente é governado por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e escoamento superficial), e por interações desses processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental de agrotóxicos, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, bem como nas características e condições ambientais, podem afetar esses processos (GOMES; CERDEIRA; SPADOTTO, 2013). Na Figura 2 são apresentados, esquematicamente, os principais processos que atuam na movimentação e na degradação de agrotóxicos na

natureza, ilustrando os meios mais prováveis onde esses compostos podem ser encontrados.

A única forma de prever a dinâmica desses produtos no ambiente é compreender os processos básicos que os levam a dissipação e degradação no ambiente e entender como tais processos são controlados pelas condições ambientais.

O aspecto mais importante que governa o destino dos agrotóxicos no sistema solo-água é a natureza da partição entre o vapor, a solução e as partículas do solo. A partição entre a solução e a fase sólida é determinada pela solubilidade do composto e pelos processos de adsorção/dessorção. A partição entre a solução e a fase sólida ou gasosa é controlada pelo processo de volatilização (LAVORENTI, 2002).

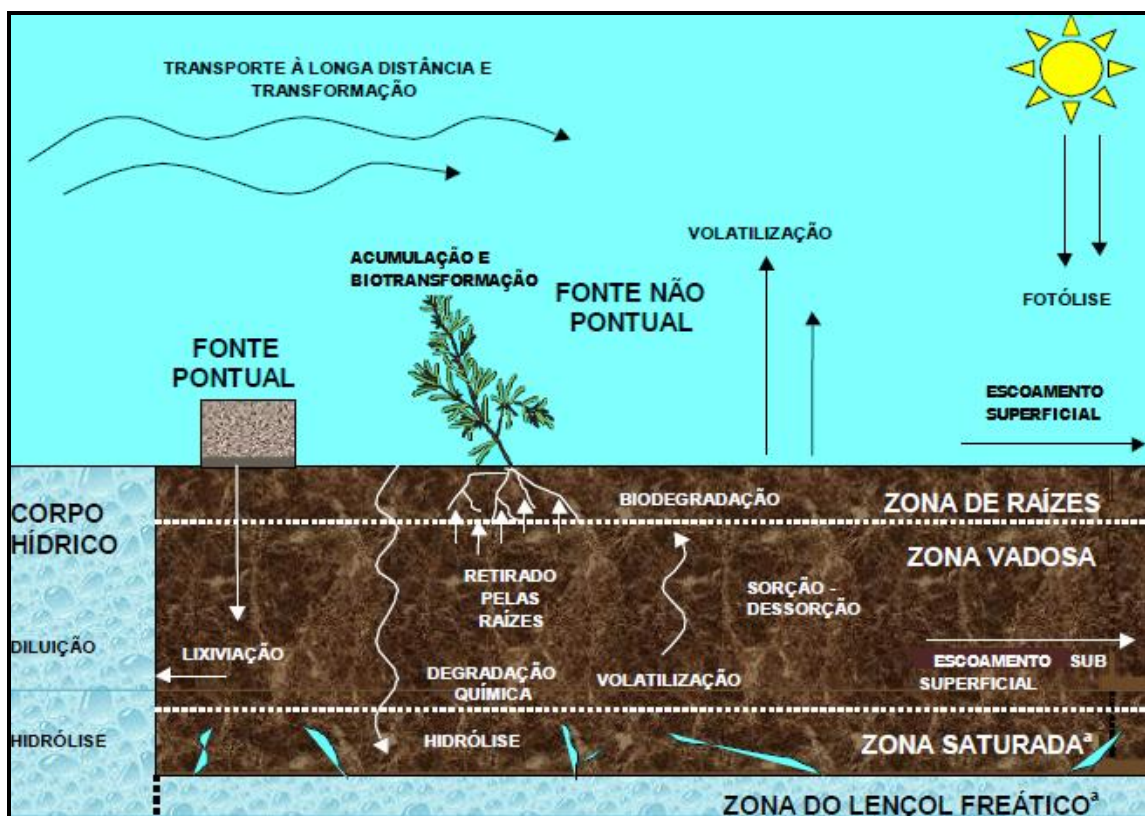


Figura 2 - Principais rotas de transporte e degradação de agrotóxicos no ambiente. Fonte: adaptado de JARDIM; ANDRADE; QUEIROZ, 2009.

A retenção dos agrotóxicos e de outros compostos orgânicos por sorbentes naturais (solo, argila e sedimento) é normalmente denominada de sorção, sem especificar a natureza da interação entre soluto e sorbente. A sorção envolve processos de adsorção, absorção e dessorção. A adsorção descreve a transferência das moléculas do agrotóxico da fase móvel (líquida ou vapor) para a fase estacionária (partículas do solo), o que reduz a mobilidade das moléculas orgânicas no solo. Por outro lado, a dessorção representa o processo inverso. Já o processo de absorção refere-se à captação pelas plantas dos agrotóxicos do solo e é, provavelmente, a maior fonte de bioacumulação na cadeia alimentar e uma fonte importante de exposição à contaminação dos animais e do homem (PATERSON *et al.*, 1990). Em geral, os compostos com baixa solubilidade em água são fortemente adsorvidos, mas o contrário nem sempre é verdadeiro (SILVA & FAY, 2004).

Os principais processos envolvidos na degradação química dos agrotóxicos segundo Schnoor e colaboradores (2011), Havens e colaboradores (1995) e Radosevich e colaboradores (1997) estão descritos a seguir.

A fotólise envolve a degradação das moléculas no ambiente pela ação da luz solar. Esse processo atinge principalmente as moléculas que apresentam alto grau de volatilidade, já que resultam da ativação de elétrons, através da excitabilidade pela luz. Além da fotólise direta, pode-se contar também com a fotólise indireta, onde a luz funciona como um catalisador para outros processos físico-químicos especialmente na água. Como é um processo que atinge a qualquer produto que esteja sobre a superfície do solo e da água, apresenta o maior espectro de ação.

A hidrólise é considerada o processo físico-químico mais relevante para a degradação de moléculas de agrotóxicos. Ela provoca a quebra da molécula em partes cada vez menores, facilitando sua absorção e transformação pela biota do meio. Existem produtos que inclusive prevêm a ação da hidrólise para a ativação de seu mecanismo de ação. Uma das necessidades da hidrólise para sua ação é a presença de água, por ser um processo que ocorre preferencialmente, em ambiente líquido. Entretanto, muitas vezes, a própria umidade presente no solo já é suficiente para ativar o processo.

O processo de oxidação-redução atua principalmente nas trocas químicas que o agrotóxico efetua em suas reações com os componentes do solo, fundamentalmente com a matéria orgânica presente. A oxi-redução geralmente age em conjunto com outras reações aqui listadas.

Os processos de adsorção-dessorção envolvem a adesão da molécula do agrotóxico com outras partículas do solo ou mesmo dissolvida na água (partículas em suspensão). Nesses momentos, dependendo das forças envolvidas, pode haver a liberação de radicais, que contribuem para a degradação das moléculas de agrotóxicos. É também um processo muito importante quando levado em conta que ele é responsável pela retenção dos produtos em determinadas camadas do solo, liberando-o lentamente para a solução do solo, permitindo a ação de outras forças degradantes, como a biodegradação e a hidrólise. Esse processo é principalmente regulado pelos coeficientes de partição da molécula, além do volume de água presente na solução do solo.

A volatilização é um processo mais ligado com o transporte do que com transformação em si. Entretanto passa pela mudança de estado físico, o que pode tornar o agrotóxico mais vulnerável à degradação. Está intimamente relacionado com a taxa de vapor do produto, e pode contribuir para que a degradação do produto seja acelerada no solo, ao reduzir seu volume pela transferência do mesmo à atmosfera, onde entram em ação forças como a fotólise. Quanto menor a volatilidade e a pressão de vapor, menor será a evaporação dos agrotóxicos e menores serão as perdas (SANTOS, 2009).

A biodegradação é mais ativa na chamada zona de raízes, decrescendo sua ação gradualmente, à medida que o produto se aprofunda no solo.

A degradação microbiológica é talvez o método singular mais importante de remoção de agrotóxicos do solo devido à presença de certos grupos polarizados nas moléculas que proporcionam pontos de ataque ao organismo, sendo eles, OH, NHR, COOH e NR (SANTOS, 2009). Os maiores grupos de micro-organismos do solo são os actinomicetes, fungos e bactérias. Os micro-organismos do solo têm uma função importante na atenuação dos efeitos ambientais dos compostos orgânicos, uma vez que podem adaptar-se à presença desses compostos potencialmente tóxicos e sobreviver por meio de sua degradação, ou seja, utilizar essas moléculas como nutriente e energia (SILVA; FAY, 2004).

Os agrotóxicos são decompostos pelos micro-organismos, desde que, estes possuam a capacidade de produzir as enzimas específicas necessárias para o processo. Dependendo do grau de resistência à decomposição que o princípio ativo do agrotóxico apresentar, haverá uma atividade microbiana mais ou menos intensa

e, conseqüentemente, um tempo de residência do poluente no solo diferenciado (MEURER, 2004).

Alguns agrotóxicos dissipam-se rapidamente no solo através do processo de mineralização, resultando na transformação do produto em H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>. Embora parte desse processo seja ocasionada por reações químicas, como a hidrólise e a fotólise, o catabolismo (conjunto das reações bioquímicas que regem a transformação da matéria prima em detritos que devem ser expelidos) microbiológico e o metabolismo são, geralmente, os principais meios de mineralização.

Alguns organismos possuem grande capacidade de bioacumular substâncias químicas, caracterizando o processo de bioacumulação (processo no qual os organismos (inclusive humanos) podem adquirir contaminantes mais rapidamente do que seus corpos podem eliminá-los, como muitos contaminantes ambientais) ou bioconcentração. Se o processo de bioacumulação atingir níveis elevados em uma cadeia trófica, passa a caracterizar, então, a biomagnificação (aumento na concentração de um contaminante a cada nível da cadeia alimentar) (GOMES; CERDEIRA; SPADOTTO, 2013).

O transporte dos agrotóxicos pode ocorrer de muitas formas, incluindo a migração em água (em suspensão ou dissolvidos), em partículas do solo (adsorvidos) ou no estado de vapor pelo ar do solo. A água pode dispersar os agrotóxicos no ambiente via lavagem das folhas (plantas), escoamento superficial (perda de agrotóxico do local de aplicação pela força do fluxo da água de superfície) e lixiviação (transporte de solutos para camadas subsuperficiais). O escoamento pode contribuir para a contaminação da água superficial e a lixiviação para a contaminação da água subterrânea, mas os ciclos hidrológicos permitem a conexão direta entre estes dois compartimentos (LEONARD, 1990).

As condições meteorológicas, a composição das populações de microorganismos no solo, a presença ou ausência de plantas, a localização do solo na topografia e as práticas de manejo dos solos podem também afetar o destino dos agrotóxicos no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água em movimento na superfície e através do perfil do solo têm um grande impacto na mobilidade desses compostos de uso agrícola. Um entendimento dos processos de transporte de agrotóxicos no ambiente, por exemplo, é essencial para direcionar planos de monitoramento e avaliação de impactos ambientais (GOMES; CERDEIRA; SPADOTTO, 2013).

Laabs e colaboradores (2000); Reichenberger e colaboradores (2002); Allaire e colaboradores (2009) realizaram alguns estudos e tem mostrado que agrotóxicos considerados pouco móveis foram lixiviados para camadas profundas do solo evidenciando, assim, o processo de transporte preferencial (JARVIS, 2007).

Estudos apontam que agrotóxicos utilizados em áreas com cultivo de soja, milho, cana-de-açúcar e algodão em Mato Grosso foram transportados preferencialmente pelos macroporos, independentemente do potencial de retenção do pesticida no solo através da sorção (LAABS *et al.*, 2000; REICHENBERGER *et al.*, 2002). O termo transporte preferencial implica que a água e o pesticida, infiltrando no solo, não têm tempo suficiente para se equilibrar com a matriz deste. Dessa maneira, o tempo de contato do agrotóxico com a camada superficial do solo, a qual possui maior capacidade para degradar o composto devido sua maior atividade microbiana, é pequeno. Consequentemente, os agrotóxicos transportados preferencialmente pelos macroporos poderão chegar rapidamente às camadas mais profundas, onde os processos de degradação e sorção são, geralmente, menos efetivos. Diante desse cenário, é evidente que o transporte preferencial de agrotóxicos através dos macroporos pode aumentar os riscos de contaminação do lençol freático. Em alguns solos argilosos estruturados, os macroporos podem dominar a hidrologia, já que funcionam como poros com alta condutividade hidráulica (SCORZA; RIGITANO; FRANCO, 2010).

## **2.6 Relação entre os medicamentos veterinários e o ambiente**

Muitos dos medicamentos veterinários administrados não são plenamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008). Além das excreções dos animais em pastejo, o esterco é muitas vezes lançado diretamente no pasto ou empregado como fertilizante em terras cultiváveis sem nenhum cuidado prévio. Além disso, a contaminação ambiental pode ocorrer pelas más condições de armazenagem de produtos não utilizados ou com prazo de validade expirado (RATH *et al.*, 2012).

O comportamento e o destino dos medicamentos veterinários no ambiente são regulados, assim como os agrotóxicos, por processos químicos, físicos e biológicos. Após o composto atingir o solo, os processos de sorção, transformação (degradação) e transporte (lixiviação e escoamento superficial) serão os principais responsáveis em ditar seu destino final no ambiente (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Estes processos são, por sua vez, governados pelas propriedades físico-químicas da molécula do fármaco (estrutura molecular, tamanho, forma, solubilidade, especiação, hidrofobicidade, entre outros) e do solo (pH, textura, quantidade de matéria orgânica, entre outros), além das condições edafo-climáticas locais (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006; KEMPER, 2008).

A bioacumulação de antimicrobianos em plantas e organismos pequenos é um dos impactos provocados pela dispersão destes compostos no solo. Kinney e colaboradores (2008) observaram a bioacumulação de trimetoprima (TMP) e diversos compostos orgânicos em minhocas, após a aplicação de esterco e de lodo de esgoto ao solo. Boxall e colaboradores (2006) detectaram florfenicol (FLO) e trimetoprima em alface, além de enrofloxacin, florfenicol e trimetoprima nas raízes da cenoura, ambas cultivadas em solos contaminados com os fármacos. A sulfametazina (SMT) foi detectada, em concentrações variando entre 0,1 a 1,2 mg kg<sup>-1</sup>, em tecidos de milho, alface e batata (DOLLIVER; KUMAR; GUPTA, 2007).

Embora não existam evidências de que a bioacumulação de antimicrobianos em plantas ofereça riscos à saúde humana, há estudos que mostraram que o crescimento de espécies vegetais foi prejudicado por alguns fármacos. Migliori e colaboradores (1998) confirmaram a inibição do desenvolvimento pós-germinativo de várias plantas empregando concentrações elevadas de sulfadimetoxina (SDX) no solo. *Hordeum disthicum* (cevada) e *Zea mays* (milho) apresentaram peso inferior em relação às plantas cultivadas em solos não contaminados. O tamanho das raízes, cotilédones e da folhagem da *Amaranthus retroflexus*, *Plantago major* e *Rumex acetosella* foi menor quando comparado às amostras de controle.

Além dos prejuízos causados às espécies vegetais, outros danos também podem ser provocados, já que muitos micro-organismos do solo são sensíveis aos antimicrobianos. Estima-se que, em solos cultiváveis, respectivamente, 10<sup>6</sup> e 10<sup>9</sup> bactérias por grama, sejam responsáveis pela imobilização de minerais e processos naturais de decomposição. Com a morte destes micro-organismos a capacidade do



solo em degradar outros contaminantes, como os agrotóxicos, seria prejudicada (BOXALL *et al.*, 2003; KEMPER, 2008).

Em comparação a outros poluentes orgânicos, em especial os agrotóxicos, os antibióticos de uso veterinário apresentam uma série de particularidades, como padrões de uso, ocorrência no ambiente em associação com material orgânico (lodo ou esterco animal), elevado peso molecular, presença de diferentes grupos funcionais ionizáveis, entre outros, o que torna o conhecimento já acumulado nos estudos com agrotóxicos nem sempre válido ou aplicável para o entendimento do seu comportamento no ambiente (KAY *et al.*, 2005). O comportamento de fármacos no meio ambiente ainda não tem sido extensivamente estudado. Sendo assim, existe uma carência de dados quantitativos que estimem a extensão desta contaminação, de estudos sobre a mobilidade destes compostos, de métodos adequados para a determinação dos mesmos no solo e dos impactos ambientais provocados por sua presença no ambiente (KEMPER, 2008; CONNOR; AGA, 2007).

## **2.7 Preparo da amostra para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo**

Os agrotóxicos desempenham um papel importante na agricultura, assim como os medicamentos veterinários na criação de animais, porém eles devem ser utilizados de forma eficiente a fim de serem economicamente viáveis e ambientalmente sustentáveis. Muitos agrotóxicos foram classificados como poluentes orgânicos persistentes e altamente tóxicos e por isso foram banidos pelas organizações reguladoras e substituídos por produtos mais ecológicos. Devido à legislação de muitos países para a proteção ambiental da contaminação desses compostos, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a detecção de agrotóxicos e medicamentos veterinários em baixa concentração no ambiente. O solo destaca-se como uma importante matriz, uma vez que os agrotóxicos são frequentemente aplicados diretamente ou encontrados no solo após a sua aplicação nas plantas (TADEO *et al.*, 2012).

A determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários, devido ao fato das concentrações dos analitos serem geralmente muito baixas,

apresentarem propriedades químicas distintas, bem como a complexidade das matrizes, faz com que ocorra a necessidade de uma etapa prévia antes da determinação destes, denominada de preparo da amostra. Devido ao fato de que as medidas são normalmente efetuadas em baixos níveis de concentração, as interferências são problemas frequentes que devem ser considerados. Portanto, os principais objetivos do preparo da amostra são promover a extração e o enriquecimento dos analitos de interesse e remover, tanto quanto possível, os interferentes. As perdas de analito nesta etapa podem comprometer o resultado das análises e, por isso, o preparo da amostra é uma etapa crucial dentro de todo o processo analítico (HERCEGOVÁ; DÖMÖTÖROVÁ; MATISOVÁ, 2007; CHEN *et al.*, 2010).

A extração seletiva de agrotóxicos do solo é baseada nas diferenças de suas propriedades físico-químicas. Estas incluem a solubilidade, polaridade, massa molecular e volatilidade. A técnica de extração mais seletiva pode eliminar ou reduzir a necessidade de limpeza do extrato (TADEO *et al.*, 2012).

A extração do analito em amostras sólidas continua sendo um passo crítico na análise de contaminantes. Deve-se avaliar o método de extração sempre levando em conta os seguintes aspectos: seletividade para os componentes de interesse, recuperação do analito, volume do solvente orgânico necessário, toxicidade do solvente, tempo de extração e número de etapas de limpeza do extrato requeridas após a extração. Cada técnica tem seu próprio mérito e a escolha da extração depende, ainda, de outros fatores como o custo e a simplicidade de operação e a disponibilidade de um método padrão ou validado (FEDOTOV *et al.*, 2004; HAWTHORNE *et al.*, 2000).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários do solo. Dentre os métodos mais tradicionalmente utilizados, destaca-se a extração sólido-líquido (SLE, do inglês *Solid-Liquid Extraction*), que se baseia no contato de uma amostra sólida com um solvente apropriado. A SLE inclui três técnicas principais, sendo elas, Soxhlet, agitação e extração assistida por ultrassom (UAS, do inglês *Ultrasonic-Assisted Extraction*) (TADEO *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2010).

A extração por Soxhlet é uma técnica utilizada para extrair compostos não polares e semi-polares de amostras de solo. A amostra é colocada em um extrator Soxhlet e a extração dos compostos é obtida por meio da condensação a quente de um solvente orgânico que é continuamente refluxado através da amostra em um

sistema fechado. Xin-Li e colaboradores e Wong e Bidleman (2010) isolaram agrotóxicos organoclorados de amostras de solo utilizando a extração por Soxhlet e diclorometano, enquanto Bangui e colaboradores (2010) realizaram o procedimento de extração utilizando uma mistura de hexano e acetona como solvente de extração.

Apesar da excelente recuperação, é um procedimento tedioso, pois o tempo de extração é longo, com aproximadamente 16 h e somente uma amostra pode ser extraída por aparelho. Além disso, pode degradar compostos termicamente lábeis e requer a utilização de grandes volumes de solvente orgânico, o que torna essa técnica ambientalmente inadequada e dispendiosa (QUINETE, 2005; BANJOO; NELSON, 2005).

A técnica de agitação consiste na extração sucessiva de amostras sólidas com solvente orgânico empregando agitação vigorosa, sendo que esta agitação pode ser manual ou mecânica. Existem diversos equipamentos que são utilizados para a agitação mecânica como, por exemplo, agitadores do tipo orbital, vortex e pendular (TADEO *et al.*, 2012).

Em geral, a maioria dessas técnicas emprega solventes orgânicos em alguma de suas etapas. Os solventes mais comumente usados são acetona, metanol e acetonitrila devido a sua miscibilidade em água, embora alguns solventes imiscíveis, tais como, diclorometano e hexano podem ser usados (PRESTES *et al.*, 2009; TADEO *et al.*, 2012).

A acetonitrila é considerada um dos melhores solventes, uma vez que promove uma extração bastante eficiente (altos percentuais de recuperação) e extrai baixas concentrações de coextrativos da matriz, sendo eficaz na desnaturação de proteínas e na inativação de enzimas (PRESTES *et al.*, 2009). Metanol e acetato de etila também são amplamente utilizados, mas extraem elevadas quantidades de coextrativos da matriz (MARAZUELA; BOGIALLI, 2009; LEDOUX, 2010; LEHOTAY *et al.*, 2010).

A técnica de extração utilizando agitação é mais barata e eficaz em alguns casos, mas na maioria das vezes é demorada ou apresenta baixos valores de recuperação (DISERENS, 2001).

Métodos multirresíduos confiáveis para a análise de diferentes grupos químicos com uma grande faixa de polaridade são necessários para os programas de monitoramento de resíduos de agrotóxicos em solo. Com esse objetivo, amostras de solo foram extraídas utilizando agitação com acetona pura ou misturada com

água (DIEZ *et al.*, 2007; AMELUNG *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2008), com metanol-acetato de etila (NIELLI *et al.*, 2010), ou com acetonitrila (NISHINA *et al.*, 2010). A adição de água tem sido utilizada para aumentar as recuperações de compostos polares, como alguns organofosforados, bem como compostos não polares, tais como piretróides, pois favorecem a transferência de massa do solo para a fase do solvente orgânico (TADEO *et al.*, 2012).

Esta técnica de preparo da amostra é simples, mas demorada e normalmente envolve a utilização de várias vidrarias e grandes volumes de solventes nocivos ao ambiente.

A extração assistida por ultrassom é uma técnica convencional baseada na extração de amostras com um solvente orgânico apropriado através da aplicação de radiação ultrassônica. Esta técnica de extração é uma poderosa ferramenta utilizada para acelerar o processo analítico no solo, pois o efeito mecânico do ultrassom induz uma maior penetração do solvente na amostra e melhora a transferência de massa, levando a um aumento da eficiência de extração dos analitos (TADEO *et al.*, 2012).

As transformações observadas em um meio sob sonicação são consequência da grande quantidade de energia gerada pelo fenômeno da cavitação, que é definido como o fenômeno de formação, crescimento e subsequente colapso de microbolhas no centro de um líquido (SUSLICK *et al.*, 1999). A importância da cavitação acontece quando as bolhas colapsam, pois em certo momento, as bolhas não mais absorvem a energia do ultrassom e, então, implodem. A rápida compressão adiabática de gases e vapores dentro das bolhas ou cavidades produz altas temperaturas e pressões. O tamanho das bolhas é pequeno com relação ao volume total do líquido e por isso o aquecimento que produzem é rapidamente dissipado sem nenhuma mudança apreciável nas condições ambientais (QUINETE, 2005; CAPELO, MOTA; CURR, 2005).

Quando a cavitação ocorre em um líquido próximo de uma superfície sólida, a dinâmica do colapso é diferente em comparação com líquidos puros onde a cavidade mantém seu formato esférico durante a implosão. Próximo à superfície sólida, o colapso da cavidade é assimétrico e produz microjatos de líquido de alta velocidade ( $v > 100 \text{ m s}^{-1}$ ) responsáveis pela limpeza e/ou renovação da superfície sólida, assim como também pela extração dos analitos da matriz sólida.

As altas e efetivas temperaturas no sistema sob sonicação irão aumentar a solubilidade e difusibilidade, que aliadas às pressões geradas, favorecem a

penetração e transporte na interface entre uma mistura de solventes e a matriz sólida, e que combinadas com a energia oxidativa dos radicais (hidroxila e peróxido de hidrogênio para água) gerados durante a sonólise (quebra de moléculas através das ondas acústicas), resultam em alto poder extrativo (LUQUE-GARCÍA; CASTRO, 2003; CAPELO; MOTA; CURR, 2005).

Para melhorar a extração, é necessário otimizar diferentes fatores, tais como, o tipo de solvente e as condições de irradiação (temperatura e amplitude de sonicação). Além disso, o tempo de sonicação, o tamanho das partículas da amostra, a quantidade de amostra utilizada e o instrumento de ultrassom utilizado são outros fatores que influenciam na eficiência da extração (TADEO *et al.*, 2012).

Esta técnica é rápida, barata e é uma alternativa aos outros métodos de extração convencionais e, por isso tem sido bastante utilizada por diversos autores. Os agrotóxicos organofosforados são compostos polares solúveis em água e foram extraídos de amostras de solo utilizando ultrassom e metanol ou uma mistura de solventes (RAMOS *et al.*, 2009). Por outro lado, os agrotóxicos organoclorados que são lipofílicos e tendem a permanecer adsorvidos na superfície da matéria orgânica presente no solo foram extraídos utilizando metanol (MARTINEZ-PARREFIO; LLORCA-PORCEL; VALOR, 2008) ou misturas de n-hexano com um outro solvente orgânico mais polar como acetona (CHENG *et al.*, 2008; LV *et al.*, 2010). Para compostos contendo nitrogênio, tais como triazinas (HU *et al.*, 2010) e pirimidinas (LIU *et al.*, 2011), solventes orgânicos como metanol, sozinho ou em mistura com água, tem sido comumente utilizados.

A escolha de um solvente para a extração simultânea de compostos de diferentes classes químicas com uma ampla faixa de polaridade é difícil e frequentemente realizada com um solvente semipolar tal como acetato de etila ou acetonitrila (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2004). Fenoll e colaboradores (2009) utilizaram um procedimento rápido com ultrassom utilizando uma mistura de acetonitrila-água (1:1, v/v) como solvente de extração para a determinação simultânea de 54 agrotóxicos em solo.

Alguns exemplos de determinações de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários utilizando as técnicas tradicionais (Soxhlet, agitação e ultrassom) estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Métodos tradicionais utilizados para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários de amostras de solo.

Analito (nº)	Solvente de extração (mL)	Procedimento de extração	Referências
Organoclorados (13)	DCM (100)	Soxhlet (24 h)	WONG <i>et al.</i> , 2010
Organoclorados (20)	Acetona/hexano (1:1, v/v) (250)	Soxhlet (16 h)	BANGUI <i>et al.</i> , 2009
Multiclasse (6)	ACN (50)	Agitação mecânica (1 h)	NISHINA <i>et al.</i> , 2010
Multiclasse (37)	Acetona com 1% HAc (30)	Agitação mecânica (30 min)	DIEZ <i>et al.</i> , 2008
Multiclasse (9)	MeOH ou MeOH/EtAc (70:30, v/v) (20)	Agitação mecânica (4 h)	PAREJA <i>et al.</i> , 2010
Organoclorados (17)	MeOH (15)	Ultrassom	MARTINEZ-PARREÑO <i>et al.</i> , 2008
Organofosforados (7)	MeOH/ACN (1:1, v/v) (10)	Ultrassom	RAMOS <i>et al.</i> , 2009
Multiclasse (50)	EtAc (10)	Ultrassom	SANCHEZ-BRUNETE <i>et al.</i> , 2004
Multiclasse (54)	ACN/H <sub>2</sub> O (1:1, v/v) (20)	Ultrassom	FENOLL <i>et al.</i> , 2009
Antibióticos veterinários (9)	MeOH:ACN:EDTA:tampão Mcllvaine (30:20:25:25) (5)	Ultrassom	HO <i>et al.</i> , 2012
Sulfonamidas (4)	MeOH (18)/ HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup> (2)	Ultrassom	LIU <i>et al.</i> , 2011
Organoclorados (12)	Éter de petróleo/acetona (1:1, v/v) (50)	Ultrassom	TOR <i>et al.</i> , 2006

ACN: acetonitrila; HAc: ácido acético; EtAc: acetato de etila; MeOH: metanol; tampão Mcllvaine: ácido cítrico e hidrogeno fosfato de sódio.

Várias novas técnicas de extração têm sido desenvolvidas nos últimos anos, na tentativa de ultrapassar as principais limitações dos métodos convencionais. Em geral, estas técnicas permitem uma redução do consumo de solvente orgânico e um aumento de rendimento da amostra, tais como Extração Assistida por Micro-ondas (MAE, do inglês *Microwave-Assisted Extraction*), Extração com Líquido Pressurizado (PLE, do inglês *Pressurised-Liquid Extraction*), Extração com Fluido Supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) e Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*).

Na técnica de Extração Assistida por Micro-ondas, a amostra é imersa num frasco aberto ou fechado contendo solvente, sendo posteriormente irradiada com micro-ondas. A principal limitação da técnica é o uso de solventes que absorvam energia de micro-ondas, pois solventes não polares não absorvem essa energia (CABRERA *et al.*, 2012). Embora hexano não seja um bom solvente para MAE, tem sido descrito como adequado para a extração de diferentes tipos de agrotóxicos do solo quando misturado com um solvente polar (WANG *et al.*, 2007; FUENTES; BAEZ; LABRA, 2007; MORAIS *et al.*, 2007). Nesta técnica, a energia das micro-ondas causam movimentos moleculares que aquecem o solvente extrator e promovem a extração dos analitos da matriz. Portanto, esta técnica não pode ser utilizada para compostos termolábeis. A MAE é uma técnica moderna que promove uma redução significativa no consumo de solvente e na quantidade de amostra utilizada, além da extração simultânea de diversas amostras e de menores tempos de extração. Por outro lado, é uma técnica de extração pouco seletiva e necessita de limpeza do extrato (CAMEL, 1998; PAPADAKIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2006; TADEO *et al.*, 2012).

Na Extração com Líquido Pressurizado (PLE), o solvente é bombeado para uma célula de extração que contém a amostra, onde é submetido a elevadas temperaturas e pressões. A temperatura é o parâmetro que exerce maior impacto na velocidade de extração e recuperação dos analitos. No entanto, os compostos sensíveis ao calor podem ser degradados durante o processo de extração. As pressões elevadas aumentam a penetração de solventes orgânicos na matriz, como uma consequência da diminuição da viscosidade e tensão superficial, e a capacidade de superar as fortes interações solvente-matriz (ALBASEER *et al.*, 2010).

Dentre as vantagens da PLE, pode-se destacar a automação do processo de extração, o curto tempo de extração, o consumo moderado de solventes e a simplicidade no preparo da amostra. Por outro lado, tem-se custos elevados para aquisição e manutenção do equipamento, baixa seletividade de extração, necessidade de limpeza do equipamento entre as extrações e não pode ser utilizada na extração de compostos termolábeis (SINGH; FOSTER; KHAN, 2004; CARABIAS-MARTINEZ *et al.*, 2005; GIERGIELEWICZ-MOZAJSKA; DABROWSKI; NAMIESNIK, 2001).

Vários autores tem utilizado a PLE para a extração de compostos organoclorados (WESTBOM *et al.*, 2008; VEJA *et al.*, 2008), piretróides (LUO; SHAO; ZHANG, 2010), triazinas (GARCIA; DIAZ; BARCELÓ, 2010), multiclasse (LESUEUR *et al.*, 2008; MARTINEZ VIDAL *et al.*, 2010), dentre outros.

A técnica de SFE utiliza um fluido supercrítico como uma ferramenta de extração para extrair os compostos orgânicos de matrizes sólidas. Normalmente CO<sub>2</sub> é utilizado para esta finalidade, uma vez que possui uma temperatura crítica relativamente baixa (31 °C) e baixa pressão crítica (73 kPa), que não é reativo e é acessível a um elevado grau de pureza e baixo custo (ATKINS, 2002). A SFE é capaz de extrair compostos termolábeis, pois não há degradação durante a extração, tem um consumo reduzido de solventes e um curto tempo de extração. Apesar destas vantagens, apresenta custos elevados de aquisição e manutenção do equipamento, necessidade de limpeza do equipamento entre as extrações e operação complicada, quando comparada com as outras técnicas de extração (ABBAS *et al.*, 2008; CAMEL, 1998; LEHOTAY, 2002; WARDENCKI; MICHULEC; CURYŁO, 2004).

A SFE tem sido utilizada para a extração de compostos organoclorados (HUSSEN *et al.*, 2007), biopesticidas (PRESTES *et al.*, 2012), agrotóxicos multiclasse (LESUEUR *et al.*, 2008), entre outros.

Para analitos voláteis, a Microextração em Fase Sólida é uma opção considerável. Na SPME ocorre a partição dos analitos de interesse entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra em estudo até que o equilíbrio seja atingido, utilizando uma microsseringa contendo uma fibra com revestimento de material adsorvente, próprio para o analito de interesse. Pode ser operada em modo direto ou *headspace* (ALMEIDA *et al.*, 2004). Nesta técnica, a utilização de solventes pode ser completamente eliminada, existe a possibilidade de reanalisar uma



determinada amostra, a fibra pode ser utilizada muitas vezes sem perda de adsorção e pode ser acoplada diretamente ao sistema cromatográfico. Por outro lado, existem alguns problemas de precisão, poucas fibras são disponíveis comercialmente, a otimização do método é demorada e o percentual de recuperação dos analitos é relativamente baixo (VALSAMAKI *et al.*, 2006; CORREIA; DELERUE-MATOS; ALVES, 2001).

Dentre as aplicações de SPME em solo, pode-se destacar a determinação de organoclorados (ZHAO *et al.*, 2006; HERBERT *et al.*, 2006) e a determinação de agrotóxicos de diferentes grupos químicos (ĐUROVIĆ *et al.*, 2010a, 2010b).

Estas técnicas apresentam, dentre outras características, elevada eficiência, entretanto geralmente demandam investimento considerável em instrumentação. Além disso, têm como base a instrumentação, sendo a extração muitas vezes automatizada, demandam analistas treinados e etapas de limpeza entre extrações, o que implica em um maior tempo de análise. Outra desvantagem geralmente apresentada é o escopo limitado de agrotóxicos que podem ser extraídos sob determinadas condições. Sendo assim, estes procedimentos podem ser empregados em algumas aplicações, mas estão distantes de serem considerados ideais para um método multirresíduo (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007).

Na Tabela 6 estão apresentados alguns exemplos de métodos de extração utilizando Extração Assistida por Micro-ondas, Extração com Líquido Pressurizado, Extração com Fluido Supercrítico e Microextração em Fase Sólida.

Tabela 6 - Métodos de extração MAE, PLE, SPME e SFE de agrotóxicos e medicamentos veterinários de solo.

Analito (nº)	Solvente de extração (mL)	Procedimento de extração	Referências
Organoclorados (10)	acetona/hexano (1:1, v/v) (25)	MAE	WANG <i>et al.</i> , 2007
Organofosforados (6)	H <sub>2</sub> O/MeOH (1:1, v/v) (1 a 2 mL) e 0,02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> homogeneização 5 mL hexano	MAE	FUENTES <i>et al.</i> , 2007
Organoclorados	acetona/hexano (1:1, v/v) (10)	MAE	CONCHA-GRAÑA <i>et al.</i> , 2003
Multiclasse (30)	Acetona/DCM (1:1, v/v)	PLE	HILDEBRANDT <i>et al.</i> , 2007
Multiclasse (122)	EtAc/MeOH (3:1, v/v)	PLE	MARTÍNEZ VIDAL <i>et al.</i> , 2010
Multiclasse (24)	H <sub>2</sub> O/ACN (1:2, v/v)	PLE	LESUEUR <i>et al.</i> , 2008
Multiclasse (20)	MeOH, evaporação, dissolução em acetona e diluição (1:50, v/v, com 5% NaCl em água)	SPME	DUROVIC, 2010
Multiclasse (36)	H <sub>2</sub> O	SPME	FERNANDEZ-ALVAREZ <i>et al.</i> , 2008, FERNANDEZ-ALVAREZ <i>et al.</i> , 2010
Organoclorados	MAE: acetona/hexano (1:1, v/v) (20) e SPME: etanol (720 µL) e água (40)	MAE e SPME	HERBERT <i>et al.</i> , 2006
Organoclorados	H <sub>2</sub> O (5)	SPME	ZHAO <i>et al.</i> , 2006
Multiclasse (37)	Acetona (80)	SFE	RISSATO <i>et al.</i> , 2005

DCM: diclorometano; ACN: acetonitrila; EtAc: acetato de etila; MeOH: metanol.

### 2.7.1 Método de extração QuEChERS

A necessidade por um método multirresíduo simples, rápido, de baixo custo e efetivo, capaz de promover alta qualidade dos resultados analíticos, levou Anastassiades e colaboradores (2003) a desenvolver um novo método para preparo das amostras. QuEChERS, do inglês “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*” que significa rápido, fácil, barato, efetivo, robusto e seguro, é uma técnica de preparo de amostra que emprega solventes de extração como acetonitrila, acetato de etila ou outros solventes orgânicos e partição com sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) combinado com outros sais, geralmente cloreto de sódio (NaCl), seguido por uma etapa de limpeza utilizando Extração em Fase Sólida dispersiva (d-SPE, do inglês *dispersive Solid Phase Extraction*) adicionando pequenas quantidades de sorventes ao extrato. O sorvente mais utilizado para d-SPE é a amina primária e secundária (PSA, do inglês *Primary Secondary Amine*), no entanto, outros sorventes tais como C18, Oasis HLB, carbono grafitizado, florisil também podem ser utilizados. Após a etapa de limpeza, o extrato é centrifugado e o sobrenadante pode ser diretamente analisado ou, se necessário, pode ser concentrado (NÚÑEZ *et al.*, 2012).

Apesar da versão original (Figura 3A) proposta por Anastassiades e colaboradores (2003) ter fornecido excelentes resultados para diferentes tipos de amostras (LEHOTAY *et al.*, 2005; PAYA *et al.*, 2007), algumas aplicações mostraram que certos compostos apresentavam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com o pH da matriz e, dessa forma, durante o período de otimização, percebeu-se que a utilização de tampões promoviam recuperações satisfatórias para compostos dependentes do pH (LEHOTAY *et al.*, 2005; LEHOTAY; MASTOVSKA; LIGHTFIELD, 2005; ANASTASSIADES *et al.*, 2007).

Lehotay, Mastovska e Lightfield (2005) desenvolveram o método “QuEChERS acetato” (Figura 3B), no qual o efeito tamponante (pH 4,8) é promovido pela adição de acetato de sódio. Anastassiades *et al.* (2007) propuseram o método “QuEChERS citrato” (Figura 3C) que utiliza uma mistura de citrato de sódio dihidratado e hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado como responsáveis pelo efeito tamponante (pH entre 5,0 e 5,5). Além disso, Prestes (2011) desenvolveu um método baseado no método “QuEChERS acetato” utilizando diferentes quantidades

de amostra e acetonitrila, diferentes quantidades de sais, além de utilizar C18 na etapa de limpeza do extrato, conforme apresentado na Figura 3D.

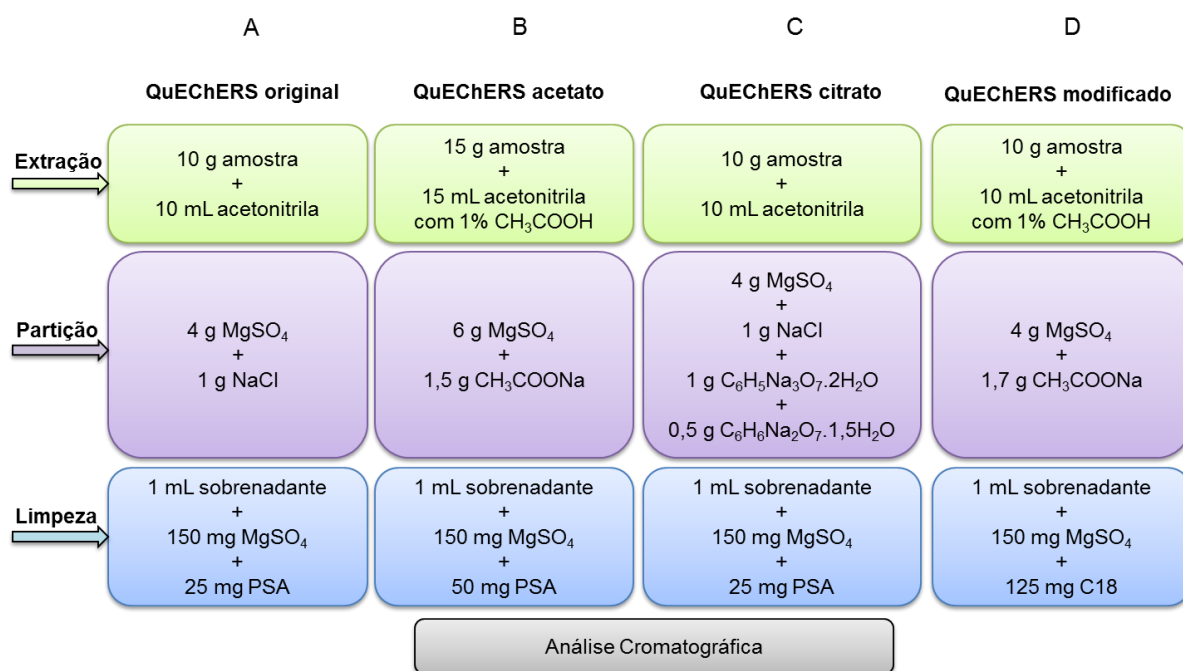


Figura 3 - Representação das etapas das principais versões do método QuEChERS: original, citrato, acetato e modificado.

O uso de acetonitrila, ao invés de acetona e acetato de etila, tem diversas vantagens, pois possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra, como por exemplo, ceras, gorduras e pigmentos (MAŠTOVSKA; LEHOTAY, 2004), proporciona a extração de uma ampla faixa de pesticidas com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de pesticidas que geralmente apresentam problemas de estabilidade, a facilidade de remoção de água residual com agentes secantes e a forma diferenciada de partição das fases com solventes não polares, o qual pode promover uma limpeza eficiente do extrato, caso necessário (TADEO *et al.*, 2012). Outra grande vantagem é que acetonitrila é mais adequada para LC-MS/MS que acetona e acetato de etila e pode ser utilizada sem problemas na análise por GC-MS/MS (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

Dependendo da natureza do solvente utilizado, a adição de sais para promover o efeito *salting out* aumenta os percentuais de recuperação para analitos polares, uma vez que a adição de sais diminui a solubilidade destes compostos na

fase aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PIZZUTTI *et al.*, 2007). A adição de sais é muito conveniente na extração utilizando acetonitrila, uma vez que é fácil, rápida e de baixo custo. Além disso, não ocorre a diluição do extrato da amostra e proporciona a separação das fases aquosa e orgânica (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

A adição de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) como sal secante tem a finalidade de melhorar a recuperação de compostos polares. A utilização de sulfato de magnésio anidro ( $\text{MgSO}_4$ ) ocorre devido a maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais. Esta redução do volume de fase aquosa é decorrente da hidratação do sal, que é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento da amostra entre 40 e 45 °C durante as etapas de extração/partição, o que favorece a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES *et al.*, 2003).

A etapa de limpeza utilizando d-SPE permite uma rápida e simultânea limpeza do extrato e redução de água residual. A remoção de água resulta em um extrato final de menor polaridade, facilitando a precipitação de co-extrativos polares. O sorvente PSA retém as interferências da matriz, como ácidos graxos livres e outros compostos polares presentes na matriz. Já o sorvente C18 juntamente com PSA promove uma limpeza mais eficiente de algumas matrizes, em especial aquelas que contêm gordura. Esta técnica tem atraído a atenção de laboratórios de análise de agrotóxicos de todo o mundo e é mais comumente empregada no preparo de amostras visando a análise multirresíduo de agrotóxicos em frutas e vegetais (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

### 2.7.2 Aplicações do método QuEChERS e comparação de métodos para extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de solo

Recentemente foi demonstrado grande interesse na aplicação do método QuEChERS em outras matrizes, como por exemplo, o solo. Modificações do método QuEChERS original utilizando extrações com tampões ácidos, adição de água para obter uma umidade adequada ou utilização de diferentes adsorventes na etapa de limpeza dos extratos tem sido descritas para a extração de agrotóxicos de solos com bons resultados (TADEO *et al.*, 2012).

Muitos autores adicionam água às amostras de solo para facilitar o acesso do solvente de extração aos poros do solo, a fim de extrair os analitos mais fortemente ligados. Alguns autores adicionam água às amostras de solo 30 min antes da extração com acetonitrila (RASHID *et al.*, 2010; YANG; YING; KOOKANA, 2010), enquanto outros adicionam água e acetonitrila ao mesmo tempo (DROZDZYNSKI; KOWALSKA, 2009; DONG *et al.*, 2009; PADILLA-SANCHEZ *et al.*, 2010).

Vários autores realizaram a etapa de extração com tampão citrato ou acetato com o objetivo de melhorar as recuperações dos compostos dependentes do pH. A fim de estabilizar as possíveis perdas dos agrotóxicos devido ao aumento da temperatura durante a extração inicial com acetonitrila pela adição de  $MgSO_4$ , em alguns casos, a acidificação foi realizada (DROZDZYNSKI; KOWALSKA, 2009; RASHID *et al.*, 2010; PADILLA-SANCHEZ *et al.*, 2010).

Xia e colaboradores (2011) desenvolveram um método para a determinação simultânea de 5 herbicidas em solo utilizando UHPLC-MS/MS. O preparo das amostras foi realizado utilizando o método QuEChERS modificado, que consistiu em 1 g de solo, 0,5 mL de água ultrapura, 4 mL de acetonitrila e agitação por 2 min. Logo após, foi adicionado 0,1 g de  $MgSO_4$  e agitado por 20 s. A limpeza dos extratos foi realizada com C18 e PSA. A faixa linear foi entre 0,5 e 200  $\mu g L^{-1}$  com coeficiente de correlação de 0,9984. Os limites de detecção foram na faixa de 0,005 a 0,020  $\mu g kg^{-1}$  e os limites de quantificação foram na faixa de 0,017 a 0,067  $\mu g kg^{-1}$ . O método foi validado com amostras de solo fortificadas em dois níveis de concentração (4 e 40  $\mu g kg^{-1}$ ) e as recuperações obtidas foram na faixa de 75,4 a 98,5% com desvio padrão relativo de 3,2 a 11,8%.

Caldas e colaboradores (2011) determinaram os agrotóxicos clomazone, fipronil, tebuconazole, propiconazole e azoxistrobina em solo de lavoura de arroz por LC-MS/MS. A extração dos compostos foi realizada utilizando o método QuEChERS, onde algumas condições de extração foram testadas, como por exemplo, adição de sais, acidificação das amostras, uso de tampão e etapa de limpeza dos extratos. O método otimizado trata de uma extração simples de 10 g de solo com 10 mL de acetonitrila acidificada, seguida da adição de 4 g de  $MgSO_4$  e 1 g de NaCl. Foram realizados estudos de validação e as recuperações das amostras fortificadas nos níveis 10, 50, 100 e 500  $\mu g kg^{-1}$  foram entre 70,3 e 120% com desvio padrão relativo menor que 18,2%. Os limites de detecção foram na faixa de 4 a 17  $\mu g kg^{-1}$  e os limites de quantificação foram entre 10 e 50  $\mu g kg^{-1}$ .

Yang e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram um método para a determinação simultânea de 38 agrotóxicos em água de drenagem e solo utilizando SPE e QuEChERS para a extração, respectivamente e GC-MS com ionização por impacto de elétrons para a análise. A extração das amostras de solo consistiu de 10 g de solo, 4 mL de água, 20 mL de acetonitrila e agitação por 1 min. Para induzir a separação das fases e a partição dos pesticidas, uma mistura de sais (8 g de  $MgSO_4$ , 2 g de NaCl, 2 g de citrato de sódio dihidratado e 1,0 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado) foi adicionada a suspensão derivada da primeira extração e agitada por 1 min. Após centrifugação, 10 mL da fase de acetonitrila foi transferida para um tubo contendo 1,5 g de  $MgSO_4$  e 250 mg de PSA. O extrato foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e redissolvido com 1 mL de acetonitrila. Os estudos de recuperação foram realizados a partir de amostras fortificadas nos níveis de concentração de 10, 50 e 100  $ng\ g^{-1}$  e os resultados obtidos apresentaram valores de recuperação na faixa de 70 e 120% para a maioria dos compostos com desvio padrão relativo (RSD, do inglês *relative standard deviation*) menor que 15%. Os limites de quantificação para os pesticidas estudados foram na faixa de 4,0 a 31,8  $\mu g\ kg^{-1}$ .

Salvia e colaboradores (2012) desenvolveram um método analítico baseado no método QuEChERS para a análise de traços de hormônios esteróides e medicamentos humanos e veterinários em solo, utilizando LC-MS. As amostras foram extraídas com 10 mL de água e 15 mL de ACN. Em seguida, foi adicionado o tampão acetato e agitado manualmente por 30 s e em vórtex por 30 s. Após a centrifugação, 10 mL da fase orgânica (ACN) foi transferida para um tubo e evaporado até à secura sob fluxo de nitrogênio a uma temperatura de 40 °C. Após a extração, o extrato dissolvido em ácido cítrico (0,04 mol  $L^{-1}$ )/metanol (97:3, v/v, pH = 2,5) foi percolado em um cartucho de troca aniônica forte (SAX) e em seguida em um cartucho do sorvente polimérico Strata X (estireno-divinilbenzeno com superfície modificada). A eluição foi realizada com 10 mL de metanol e o extrato foi evaporado a secura sob fluxo de nitrogênio a 40 °C. O resíduo seco foi dissolvido em 200  $\mu L$  de uma mistura de água:metanol (95:5, v/v) e analisado por LC-MS/MS. Os antibióticos veterinários apresentaram limites de detecção entre 0,005 e 0,79  $\mu g\ L^{-1}$  e limites de quantificação na faixa de 0,016 e 1,27  $\mu g\ L^{-1}$ . Para todos os compostos, o coeficiente de correlação foi maior que 0,99. Bons resultados foram obtidos para a precisão intra-dia, com valores de RSD menores que 20% e para a precisão inter-dia, os

valores obtidos foram menores que 30%. Além disso, as sulfonamidas apresentaram valores de recuperação entre 35 e 107%.

Alguns exemplos de procedimentos de extração que utilizaram o método QuEChERS para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários de solo estão apresentados na Tabela 7.

Embora QuEChERS seja um método rápido e fácil, condições de extração mais fortes que agitação podem ser necessárias para romper as fortes ligações características do solo. Desta forma, Ramos e colaboradores (2010) e Santalad e colaboradores (2010) utilizaram ultrassom em conjunto com o método QuEChERS para melhorar a extração dos agrotóxicos do solo e Padilla-Sanchez e colaboradores (2010) utilizaram agitação mecânica.

Ramos e colaboradores (2010) desenvolveram um método modificado para a determinação de 10 pesticidas organofosforados em três diferentes tipos de solos (florestal, ornamental e agrícola) utilizando Cromatografia à Gás com Detector de Fósforo e Nitrogênio (GC-NPD, do inglês Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detection) e Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês Gas Chromatography-Mass Spectrometry). A extração foi realizada utilizando 10 g de solo e 20 mL de acetonitrila seguida da agitação por 1 min e adição de 4 g de  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 1 g de NaCl, 1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado, 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado e sonificação por 5 min. Em seguida foi realizado a limpeza do extrato utilizando 1,5 g de  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , 0,25 g de PSA e sonificação durante 1 min. O método foi validado e apresentou limites de detecção do método na faixa de 0,48 a 12,5  $\mu g kg^{-1}$  e limites de quantificação na faixa de 1,61 a 41,6  $\mu g kg^{-1}$ . As recuperações ficaram entre 45 e 96% para todos os pesticidas e solos, com exceção do malation e malaoxon em solos florestais e ornamentais.

Santalad *et al.*, (2010) desenvolveram um procedimento baseado no método QuEChERS para a extração de 6 inseticidas carbamatos utilizando cromatografia eletrocínética micelar. A extração foi realizada utilizando 5 g de solo que foi sonicada por 1 min com 3 mL de água deionizada e em seguida, foi adicionado 5 mL de acetonitrila e sonicado por 1 min. A partição foi realizada com 2 g de  $MgSO_4$



Tabela 7 - Alguns exemplos utilizando o método QuEChERS para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários de solo.

Analito (nº)	Solvente de extração (mL)	Sais	Referências
Multiclasse (38)	H <sub>2</sub> O (4) e ACN (20)	8 g MgSO <sub>4</sub> , 2 g NaCl, 1 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado, 2 g citrato de sódio dihidratado	YANG <i>et al.</i> , 2010
Multiclasse (24)	ACN (20)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 0,5 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado, 1 g citrato de sódio dihidratado	LESUEUR <i>et al.</i> , 2008
Carbamatos	H <sub>2</sub> O (3) e ACN (5)	2 g MgSO <sub>4</sub> , 0,5 g NaCl	SANTALAD <i>et al.</i> , 2010
Organofosforados (10)	ACN (20)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl, 0,5 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado	RAMOS <i>et al.</i> , 2010
Inseticidas	H <sub>2</sub> O (5) e ACN com 1% HAc (5)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 2 g NaCl, 0,5 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado, 1 g citrato de sódio dihidratado	DROZDZYNSKI <i>et al.</i> , 2009
Metaflumizona	H <sub>2</sub> O (5) e ACN (10)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	DONG <i>et al.</i> , 2009
Procimidona	H <sub>2</sub> O (3) e ACN (10)	2 g NaCl	CHEN <i>et al.</i> , 2010
Oxadiargil	ACN (15)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	SHI, <i>et al.</i> , 2010
Organoclorados (19)	H <sub>2</sub> O (10) e ACN com 1% HAc (10)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1,7 g NaAc	RASHID <i>et al.</i> , 2010
Organoclorados (14)	H <sub>2</sub> O (3) e ACN (7)	6 g MgSO <sub>4</sub> , 1,5 g NaCl, 0,75 g hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado, 1,5 g citrato de sódio dihidratado	CORREIA-SÁ <i>et al.</i> , 2012
Imidacloprido e tiametoxam	ACN (20)	4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl	RAMASUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2012

ACN: acetonitrila; HAc: ácido acético.

e 0,5 g NaCl, seguido de agitação vigorosa. O extrato foi filtrado e evaporado à secura sob fluxo de nitrogênio. O extrato foi redissolvido em 10 mL de água deionizada antes da etapa de limpeza realizada com SPE utilizando cartuchos C18. O método foi linear para todos os compostos na faixa de 1 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99, com exceção do metomil que apresentou faixa linear entre 10 e 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os estudos de recuperação foram realizados a partir de amostras fortificadas nos níveis de concentração de 70 e 100  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  para metomil e 25 e 40  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  para os demais compostos e os resultados obtidos apresentaram valores de recuperação na faixa de 82,3 e 114,3% para a maioria dos compostos com RSD menor que 10,4%.

Padilla-Sanchez e colaboradores (2010) desenvolveram e validaram um método, baseado no método QuEChERS para a análise de 13 compostos fenólicos em solo agrícola utilizando GC-MS/MS. O método de extração proposto consistiu em 10 g de solo, 10 mL de acetonitrila (ácido acético 1%, v/v), 5 mL de água purificada, agitação por 1 h em agitador rotatório. Em seguida, foi adicionado 1,7 g de acetato de sódio, 6 g de  $\text{MgSO}_4$  e 4 g de NaCl e agitou-se por 1 min. Após centrifugação por 5 min, 1,5 mL da camada de acetonitrila foi transferido para um tubo contendo 0,75 g de  $\text{MgSO}_4$ . Colocou-se 860  $\mu\text{L}$  do extrato em um frasco de 2 mL, adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de piridina e 100  $\mu\text{L}$  de ácido anidrido acético e agitou-se em vórtex por 1 min para realizar a reação de derivatização. O procedimento otimizado foi validado, obtendo-se recuperações na faixa de 69-103% (10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 65-98% (50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), 76-112% (100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e 76-112% (300  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), com valores de precisão, expressos como RSD < 22%.

Alguns autores utilizam duas ou mais técnicas, para fins comparativos, com o objetivo de avaliar a técnica de extração que apresenta os melhores resultados de recuperação para os agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

Lesueur e colaboradores (2008) compararam quatro métodos para a extração de pesticidas em solo, sendo eles, extração utilizando ultrassom, extração com líquido pressurizado, extração conforme a Norma Europeia DIN 12393 para gêneros alimentícios (extração com acetona, partição com acetato de etila/ciclohexano e limpeza com Cromatografia de Permeação em Gel) e método QuEChERS. Dentre os métodos avaliados, o método QuEChERS apresentou os melhores resultados. O método QuEChERS consistiu em uma etapa de extração de 10 g de solo com 20 mL de acetonitrila, seguida de uma etapa de partição com 4 g de  $\text{MgSO}_4$ , 1 g de NaCl, 1

g de citrato de sódio dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado. A etapa de limpeza das amostras foi realizada com 15 mg de PSA e 950 mg de  $\text{MgSO}_4$  antes da filtração em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . O método foi validado e apresentou valores de limites de detecção entre 0,02 e 88  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e limites de quantificação entre 0,08 e 292  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Todas as substâncias apresentaram comportamento linear nas análises de GC-MS e LC-MS/MS na faixa de concentração de 20 a 4000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . As recuperações foram na faixa de 27,3 a 120,9% com desvio padrão relativo entre 1,5 e 18,3%.

Prestes e colaboradores (2012) compararam vários procedimentos de extração para a determinação de 10 bioagrotóxicos em solo por UHPLC-MS/MS. Dentre os métodos testados (extração sólido-líquido usando agitação mecânica, sonificação, extração com líquido pressurizado e QuEChERS modificado), o método QuEChERS apresentou os melhores resultados para os compostos analisados. A extração consistiu em 5 g de solo, 2,5 mL de água (30 min), 5 mL de acetonitrila (1% ácido acético) e agitação por 1 min. Em seguida, foi adicionado 4,0 g de  $\text{MgSO}_4$  anidro, 4,0 g de NaCl, 1 g de citrato de sódio dihidratado e 0,5 g de hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado e agitado por 5 min. Logo após, o sobrenadante foi filtrado através de filtro de nylon 0,2  $\mu\text{m}$  e analisado. O método foi validado para todos os compostos na faixa de concentração de 10 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e as recuperações foram na faixa de 68 a 116%, exceto para dois compostos que apresentaram valores menores que 50%. A precisão foi estimada através de estudos intra e inter-dia, obtendo-se valores de precisão intra-dia menor que 20% para a maioria dos compostos e precisão inter-dia menor que 25%. Os limites de detecção foram na faixa de 1 a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e os limites de quantificação foram na faixa de 4 a 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Por fim, o método foi aplicado em 20 amostras reais de solo agrícola e nenhum resíduo de bioagrotóxico foi encontrado acima do limite de quantificação.

Amadori e colaboradores (2013) compararam dois procedimentos (agitação e ultrassom) para a extração de atrazina e seus principais metabólitos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos. Um ensaio preliminar foi realizado utilizando, como solvente de extração, 3 mL de uma mistura composta por 80% acetonitrila e 20% água. Para a extração por agitação, as amostras foram mantidas sob agitação por 1 h, em seguida centrifugada e o sobrenadante reservado. Esta etapa foi realizada três vezes e os sobrenadantes foram misturados. Para extração por ultrassom, as amostras foram sonicadas por

10, 20 e 30 min, centrifugadas e os sobrenadantes misturados, conforme realizado com a extração com agitação. Os melhores resultados foram obtidos utilizando agitação e por isso, mais alguns ensaios foram realizados para avaliar o melhor tempo de extração, a composição do solvente extrator e o número de extrações. Os melhores resultados foram obtidos utilizando 3 extrações, com acetonitrila/água (40:60, v/v), por um tempo de 30 min. As curvas analíticas para a faixa de concentração de 5 a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentaram valores de  $r$  maiores que 0,999 para todos os compostos. Os valores de limite de quantificação foram entre 1,6 e 2,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  e as recuperações foram na faixa entre 61 e 108%.

Ozcan, Tor e Aydin (2009) desenvolveram um procedimento de extração com ultrassom miniaturizado para a determinação de diferentes agrotóxicos organoclorados em solo por Cromatografia Gasosa com Detecção por Micro Captura de Elétrons (GC- $\mu$ ECD, do inglês Gas Chromatography-microElectron Capture Detection) e compararam esta técnica com agitação, soxhlet e ultrassom em grande escala. A extração foi realizada utilizando 0,5 g de solo com 5 mL acetona-éter de petróleo (1:1, v/v) e sonicação, sendo que este processo foi repetido 3 vezes. Os limites de detecção foram na faixa de 0,02 a 1,34  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Os ensaios de recuperação, realizados nos níveis 25, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  apresentaram recuperações na faixa de 82 a 106% com RSD menor que 15%. Para fins de comparação, a extração com ultrassom em grande escala foi realizada duas vezes usando 10 g de solo e 25 mL de éter de petróleo/acetona (1:1, v/v) por 20 min. Para a extração com agitação, 10 g de solo foram agitados com éter de petróleo/acetona (1:1, v/v) por 12 h. A extração soxhlet foi realizada utilizando 10 g de amostra e 150 mL de éter de petróleo/acetona (1:1, v/v) por 18 h. Os resultados obtidos com o método proposto são comparáveis aos resultados obtidos com a extração soxhlet e ultrassom em grande escala. Além disso, a eficiência de extração do procedimento proposto é geralmente maior que a extração utilizando agitação.

Chitescu e colaboradores (2012) desenvolveram um método para a determinação simultânea de 42 compostos (fármacos, biocidas e fungicidas) em solo. O uso de ultrassom e PLE foram comparados como técnicas de extração. A extração utilizando ultrassom foi realizada com 5 g de solo e 20 mL de metanol/ácido cítrico 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (50:50, v/v), seguido de ultrassom por 1 h e agitação por 1 h. Para a PLE, 5 g de solo foram extraídos com acetona/ácido cítrico 0,2 mol  $\text{L}^{-1}$  (50:50, v/v). Os extratos foram purificados e concentrados utilizando SPE, seguidos pela

separação por UHPLC e detecção por espectrometria de massas. A PLE apresentou melhores valores de recuperação que ultrassom e permitiu a detecção de todos os compostos de interesse, a maioria deles no nível  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . As recuperações dos analitos foram entre 70 e 100% para 68% dos compostos, entre 40 e 70% para 21% dos compostos e  $< 40\%$  para 11% dos compostos.

De acordo com Hercegová e colaboradores (2007) um método multirresíduo de preparo de amostra para análise de pesticidas deve apresentar as seguintes propriedades: incluir o maior número de pesticidas possíveis, recuperações próximas a 100%, remover os possíveis compostos interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade e segurança (utilizar pequenos volumes de solventes de baixa toxicidade).

## **2.8 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários**

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A Cromatografia à Gás (que utiliza um gás como fase móvel) é uma técnica com um poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Esta técnica pode ser empregada na análise de substâncias voláteis ou volatilizáveis, que sejam termicamente estáveis. As substâncias presentes na amostra passam através de uma coluna cromatográfica, onde são separadas, e chegam ao sistema de detecção (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009).

Já que a maioria dos compostos não apresenta volatilidade suficiente para ser analisados por Cromatografia à Gás, a Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência

(HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), que utiliza um líquido como fase móvel, tem tido grande destaque, uma vez que o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2001). A HPLC é uma técnica bem estabelecida e empregada nas mais diversas áreas para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica como, por exemplo, o desenvolvimento de novas fases estacionárias e avanços na instrumentação, o que permite que as análises sejam mais rápidas e mais eficientes (MALDANER; JARDIM, 2012).

Nos últimos anos, um novo conceito de cromatografia à líquido baseado nas modificações dos parâmetros de fase estacionária (coluna) e aumento de pressão do sistema, possibilitou, no início de 2004, o primeiro sistema comercialmente disponível denominado Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* ou *Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*). É uma técnica que combina a utilização de colunas de dimensões reduzidas (5 a 10 cm de comprimento e diâmetro interno de 1 a 2,1 mm), recheadas com partículas de fase estacionária de diâmetro menor que 2 µm e uma instrumentação que permite operar a altas pressões da fase móvel. As altas pressões, variando de 6.000 a 15.000 psi, possibilitam uma diminuição significativa do tempo de análise em comparação à Cromatografia Líquida convencional (MALDANER; JARDIM, 2009, 2012).

O uso destas partículas, juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel, aumenta a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo das análises. Além disso, pode-se citar como vantagens, a economia de fase estacionária e fase móvel, o pequeno volume de amostra, a facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UHPLC, a grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e a menor geração de resíduos (WATERS, 2013a).

O sistema de UHPLC requer algumas exigências para a obtenção de alto desempenho como, por exemplo, equipamento capaz de operar a pressões elevadas, acima de 1000 bar (~15.000 psi), sistema de injeção rápido, exato e preciso na faixa de pequenos volumes, sistema de bombeamento robusto, volumes internos reduzidos, detectores com alta taxa de aquisição de dados e colunas e fases estacionárias adequadas. Entre estas fases estacionárias, destacam-se as partículas de sílica híbrida de terceira geração, produzidas pela empresa Waters,

que consistem de partículas de sílica híbrida (BEH, do inglês *Ethylene Bridged Hybrid*) incorporadas com uma pequena quantidade de carga na superfície. Devido a estabilidade química intrínseca da tecnologia de partículas híbridas, a coluna que possui esta fase estacionária possui uma gama mais ampla de pH utilizável (pH de 1 a 12), permitindo uma tecnologia de separação versátil e robusta para o desenvolvimento de métodos analíticos (MALDANER; JARDIM, 2012; WATERS, 2013b).

Como qualquer outra técnica, também possui as suas dificuldades ou limitações, principalmente no que diz respeito ao uso de rotina, como por exemplo, a exigência de maiores cuidados com a limpeza cromatográfica e os problemas decorrentes do emprego de pressões elevadas. A redução significativa nos diâmetros internos das tubulações e na porosidade dos filtros que retêm as partículas de fase estacionária dentro das colunas de um sistema de UHPLC faz com que estas peças sejam muito mais suscetíveis ao entupimento que aquelas empregadas em HPLC. O emprego de pressões elevadas pode gerar alguns inconvenientes como, por exemplo, mudança no volume molar das moléculas, que em uma análise cromatográfica, pode implicar em mudanças na seletividade (alteração na ordem de eluição dos compostos) ou na retenção cromatográfica (provocando o deslocamento ou a sobreposição de picos cromatográficos). Além disso, o atrito entre as duas fases, gerado quando a fase móvel passa através de um leito cromatográfico formado por pequenas partículas de fase estacionária, provoca um aquecimento. Este calor é dissipado ao longo e através da coluna cromatográfica, resultando em gradientes de temperatura longitudinal e radial que podem influenciar na retenção e na eficiência cromatográfica e são dependentes do controle da temperatura da parede externa da coluna (MALDANER; JARDIM, 2012).

### 2.8.1 Cromatografia acoplada à Espectrometria de Massas para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários

Apesar da cromatografia líquida ser uma excelente técnica de separação, o uso de detectores clássicos, de um modo geral, torna as análises quantitativas mais limitadas, pois a identificação do analito através do seu tempo de retenção ( $t_R$ ) característico pode gerar um grande problema, visto que vários compostos podem

coeluir, ou seja, apresentar o mesmo  $t_R$  ou valores muito próximos a este. Por isso, existe a necessidade de uma técnica confirmatória quando a confirmação da estrutura química é também necessária. A espectrometria de massas é a técnica que melhor fornece as informações estruturais necessárias e assim, o acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta versátil e de grande potencial na análise quali e quantitativa (LANÇAS, 2009). O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

A Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de Massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas. O resultado de uma análise por MS se dá pela forma de um espectro, onde a abscissa corresponde à razão entre a massa e o número de cargas do íon ( $m/z$ ) e a ordenada está relacionada à sua intensidade. A  $m/z$  tem como unidade o Dalton (Da). Em virtude do alto grau informativo das análises, a MS pode ser utilizada tanto qualitativamente (ou seja, para identificação de composição elementar de compostos e elucidação estrutural) quanto como para análises quantitativas, em geral onde se buscam determinar analitos nos níveis de traços em matrizes complexas (GROSS, 2004).

Um espectrômetro de massas é constituído basicamente das seguintes partes: sistema de introdução de amostras, fonte de ionização, analisador de massas e detector (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006). Em cromatografia à líquido as fontes de ionização geralmente mais utilizadas são a ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e a *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Interface*) (ALDER *et al.*, 2006). De acordo com Lanças (2009), a APCI é empregada na análise de moléculas menores e menos polares e a ESI é utilizada na análise de moléculas de maior polaridade e massa molecular. Devido à importância da fonte de ionização, um enfoque será dado na ESI a qual foi utilizada neste trabalho, sendo o seu funcionamento descrito a seguir.

Na fonte de ionização eletrospray, a fase móvel contendo o analito de interesse dissolvido na mesma, passa através de um capilar à pressão atmosférica,



que está mantido sob alta voltagem e, forma pequenas gotas altamente carregadas ("spray") que são dessolvatadas.

Em geral, no caso de analitos básicos, é adicionado um aditivo à fase móvel com o objetivo de auxiliar a protonação do mesmo; esses aditivos devem ser voláteis e presentes em baixas concentrações, a fim de se evitar que o mesmo interfira no processo de ionização do analito (processo esse conhecido como supressão de ionização) (TRUFELLI *et al.*, 2010).

Como resultado desse processo, ao final do capilar são geradas pequenas gotas que contém além da fase móvel, íons carregados positivamente em excesso. Nessa região do espectrômetro de massas, coaxialmente ao fluxo da fase móvel, é aplicado um gás com alto fluxo e temperatura (em geral N<sub>2</sub>, com fluxos superiores a 500 L h<sup>-1</sup> e temperaturas superiores a 350 °C). Esse gás, conhecido como gás de dessolvatação, tem como objetivo eliminar as moléculas de solvente, diminuindo as gotas previamente formadas até o limite onde a repulsão entre as cargas positivas, localizadas preferencialmente na superfície das mesmas, supere a força de coesão dessa gota (tensão superficial). Ocorre então, a "explosão coulômbica", que produz gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas das quais originaram. Inúmeras explosões então ocorrem até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas e estes são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por uma série de dispositivos de focalização (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Um esquema da fonte de ionização ESI pode ser visualizado na Figura 4.

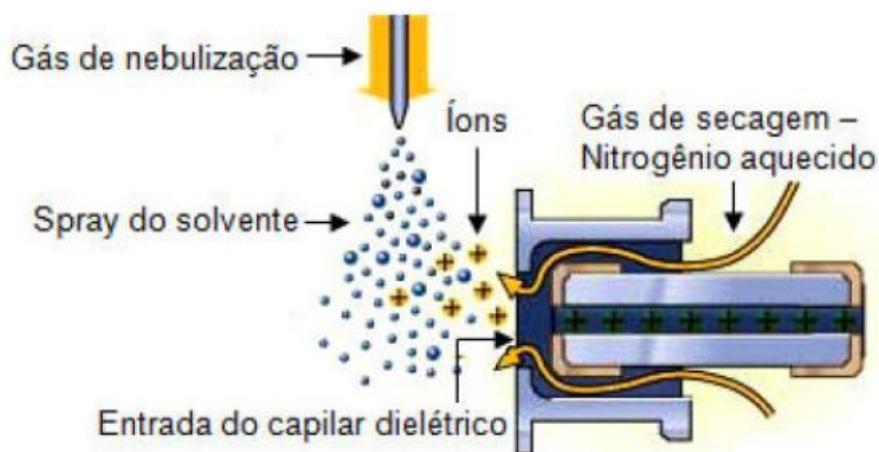


Figura 4 - Esquema da fonte de ionização ESI. Fonte: Adaptado de CHROMEDIA, 2013.

A ESI permite que os compostos sensíveis à temperatura sejam ionizados sem sofrer degradação, pois a ionização ocorre diretamente na solução. Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação a compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados é favorecida (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Em virtude do processo descrito, em geral se faz necessário o uso de água na composição de solventes para favorecer a separação das cargas. Além disso, para favorecer a separação cromatográfica, usa-se um solvente orgânico miscível com água (acetonitrila e/ou metanol). No caso de ESI positivo, pode-se adicionar ácidos voláteis para favorecer a protonação do analito; os mais comuns são ácido fórmico ou acético. Já no caso de ESI negativo, utiliza-se hidróxido de amônio para favorecer a desprotonação. Além disso, pode-se utilizar tampões voláteis para controle do pH, sendo os exemplos mais comuns acetato e formiato de amônio (CAHILL *et al.*, 2004; CERNY *et al.*, 2003).

A empresa Waters desenvolveu e patenteou uma fonte de ionização para UPLC-MS/MS que embora seja ESI é conhecida com *Z-Spray*, onde o caminho dos íons gerados na solução e transferidos para a fase gasosa no “spray” até a chegada ao hexapolo apresenta o formato da letra Z, como pode ser visualizado na Figura 5. Esta tecnologia tem como principal vantagem promover a diminuição do ruído na análise.

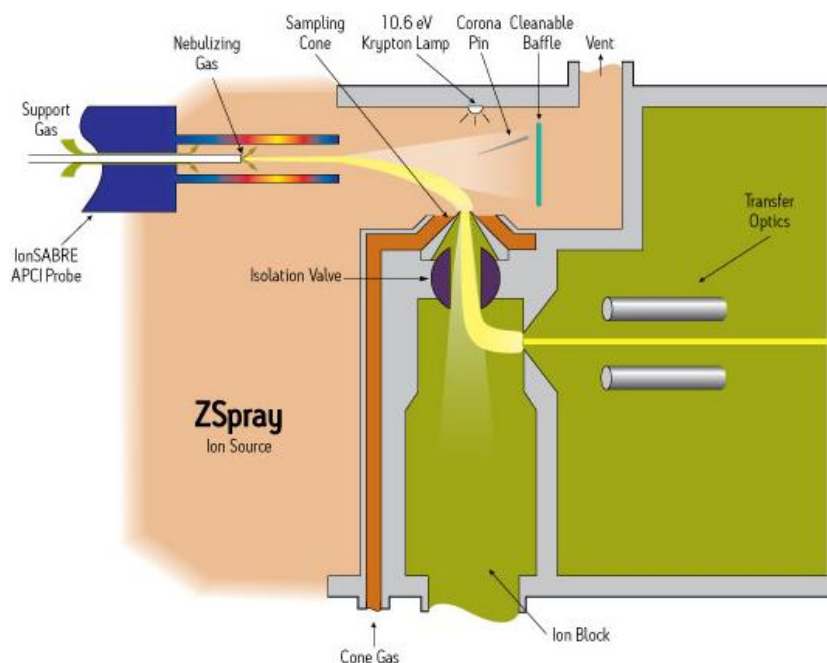


Figura 5 - Fonte de ionização Z-Spray. Fonte: Adaptado de Waters, 2010.

De acordo com a Waters (2010), este modo é muito similar ao convencional modo de íon produto (ou varredura do íon produto) onde se seleciona um íon de interesse específico para ser fragmentado na cela de colisão e assim obter as informações estruturais. No entanto, o modo *ScanWave* acumula íons (intactos ou fragmentos) no Q2 ou cela de colisão e depois libera os mesmos de acordo com a sua massa, isso é realizado em sincronia com Q3 ou MS2, como mostra a Figura 6.

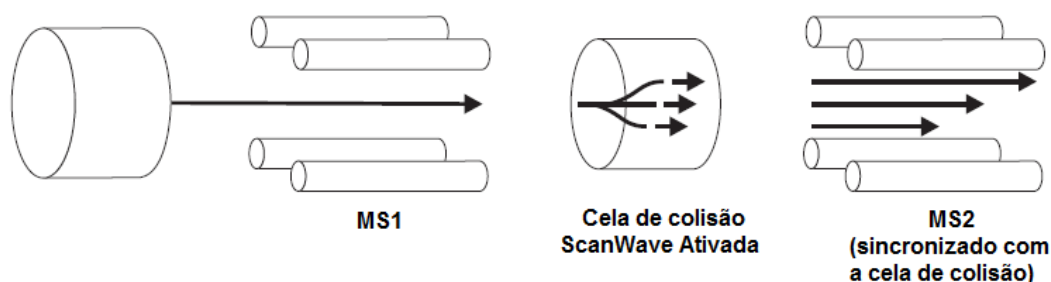


Figura 6 - Modo de operação *ScanWave*. Fonte: Adaptado de Waters (2010) e CHROMEDIA (2013).

Vale ressaltar que esta cela pode ser dividida em duas regiões, uma para o estoque dos íons e a outra a própria região do *ScanWave*, como mostra a Figura 5. Este modo de operação resulta em um significativo aumento na intensidade do sinal do espectro do *full scan*.

Na *ScanWave*, a operação da cela de colisão acontece em três estágios, são eles: o acúmulo, a transferência e a ejeção do íon, conforme Figura 7. O acúmulo dos íons ocorre após os mesmos entrarem na cela de colisão e encontrarem uma barreira de DC e ficarem retidos na mesma como pode ser visto em "A". Em seguida, a barreira é rebaixada e uma *T-Wave* é aplicada nesta região a fim de transferir os íons, conforme mostrado em "B". Posteriormente, a transferência dos íons se dá quando a barreira DC é erguida novamente e estes são confinados em um compartimento da *ScanWave*, como pode ser observado em "C". A ejeção dos íons ocorre quando uma *T-Wave* é aplicada na região *ScanWave* para que os íons sejam forçados a passar pela barreira de radiofrequência em direção ao segundo quadrupolo (Q3), como pode ser visualizado em "D", e conforme vai sendo feita esta ejeção a barreira de radiofrequência vai diminuindo permitindo a passagem de todos os íons. Esta separação é feita de acordo com a razão massa/carga de cada analito,

sendo que os íons de maior massa saem primeiro e os de menor massa por último, como pode ser observado em “E” (WATERS, 2010).

Vale ressaltar que este modo de aquisição tem a vantagem de não precisar de segmentação, apresentar menores *dwell time*, além da rapidez eletrônica proveniente destas características.

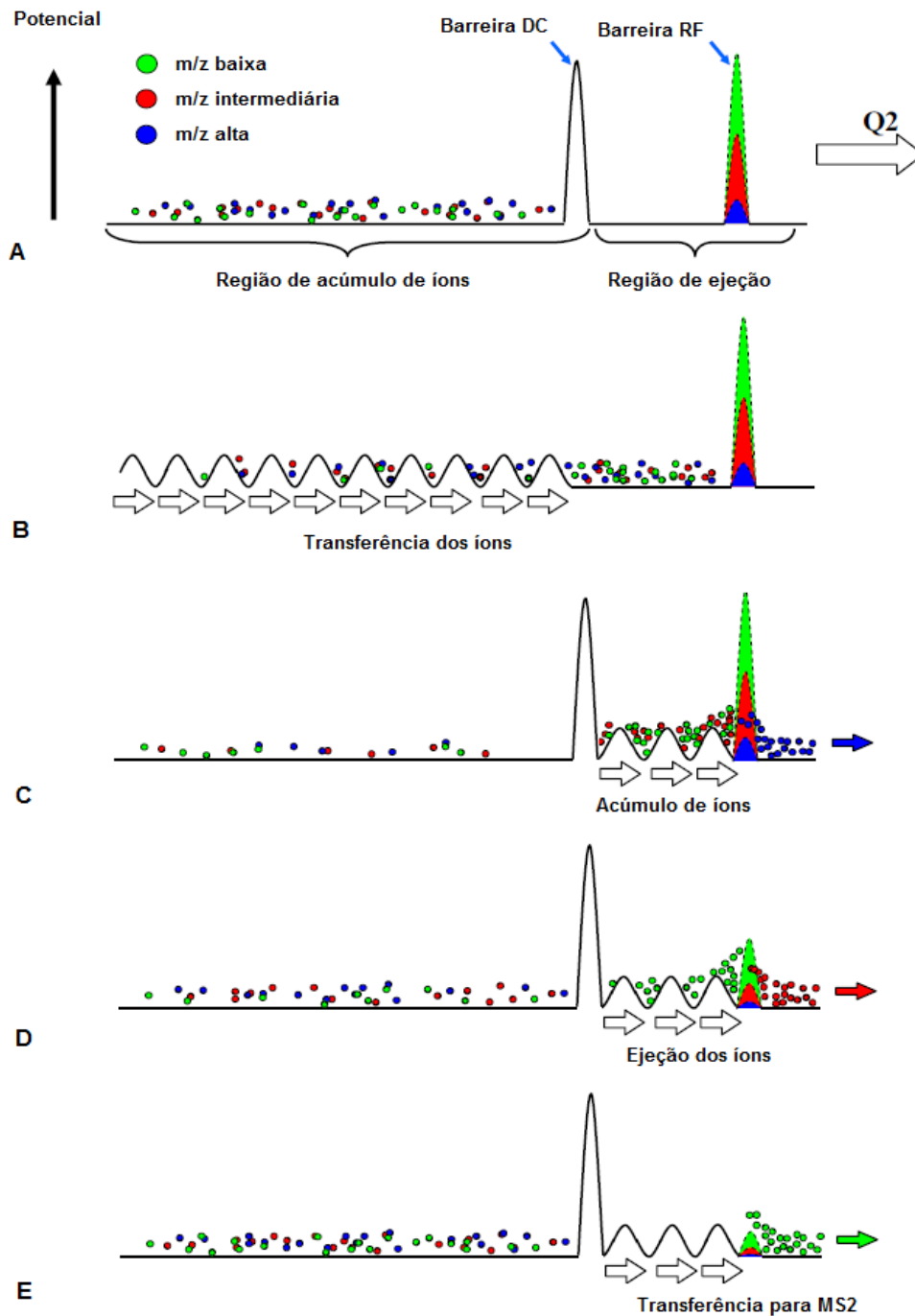


Figura 7 - Separação das massas na célula de colisão *ScanWave*. Fonte: KENNY; WORTHINGTON; HOYES, 2010.

O analisador de massas é a parte de um espectrômetro responsável por separar os íons de acordo com sua  $m/z$ . Atualmente, com a grande variedade de analisadores de massas disponíveis, a escolha do mais apropriado depende de fatores como, por exemplo, a aplicação (faixa de massas desejada), o desempenho (resolução) e o custo. Dentre os exemplos disponíveis, quadrupolo (e triplo quadrupolo), trapeamento de íons (do inglês, *ion trap*), tempo de voo e quadrupolo-tempo de voo, será dada ênfase ao analisador do tipo triplo quadrupolo que foi utilizado neste trabalho (KEMMERICH, 2013).

O analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ) é constituído por três quadrupolos em série, sendo que o segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão  $m/z$ , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um gás inerte (CID, do inglês *collision-induced dissociation*) e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  para gerar informação analítica mais exata (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O TQ, representado na Figura 8, apresenta algumas vantagens como, por exemplo, a alta seletividade, alta reprodutibilidade e baixo ruído (HARRIS, 2001).

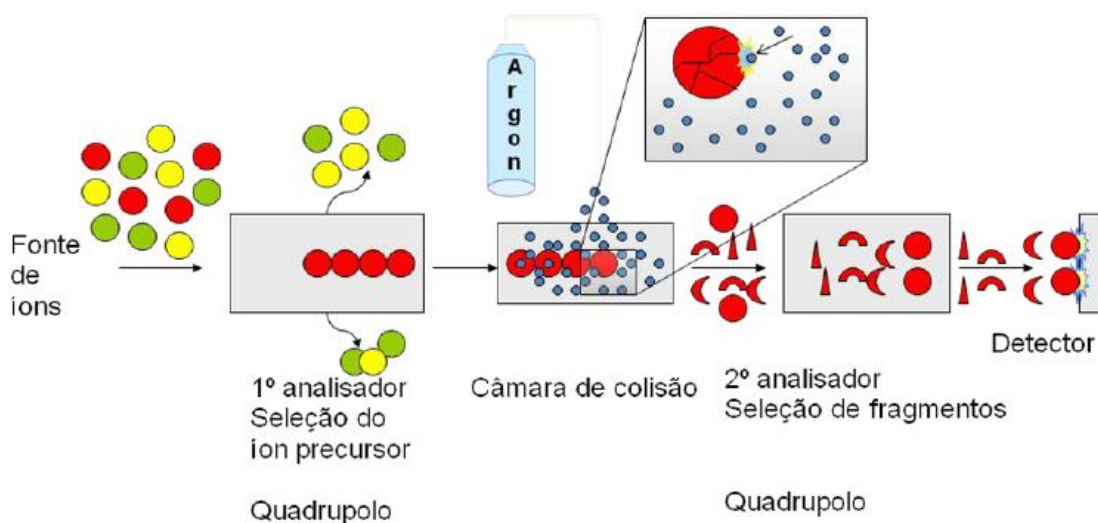


Figura 8 - Esquema de um equipamento do tipo triplo quadrupolo, onde os dois analisadores estão separados por uma câmara de colisão. Fonte: IGLESIAS, 2013.

Na dissociação induzida por colisão (CID, do inglês *collision-induced dissociation*), o íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com um gás inerte de elevada energia (geralmente Ar, He ou N<sub>2</sub>), o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

Existem diferentes técnicas de operação para a obtenção do espectro de massas em MS/MS, sendo elas: a varredura completa (*full scan*), o monitoramento do íon selecionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), a varredura do íon produto, a varredura do íon precursor e monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*), também denominado “monitoramento de reações múltiplas” (MRM, do inglês *Multiple-Reaction Monitoring*) quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente.

Neste trabalho, foi utilizado o modo de varredura SRM onde é monitorada a fragmentação de um íon precursor selecionado no quadrupolo Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados no quadrupolo Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o íon precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, associado ao aumento na seletividade (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010; DEMOLINER, 2008).

## 2.9 Validação de métodos analíticos

Segundo Ribani e colaboradores (2004), para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis.

Segundo Lanças (2004), validação é o ato ou efeito de validar, tornar válido, tornar legítimo ou legal. Visa a diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado.

A validação de determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado. A validação visa garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões (BRASIL, 2011).

A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece os resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (LANÇAS, 2004).

Segundo as orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos estabelecidos pela ANVISA (2003), INMETRO (2003) e SANCO (2010), os parâmetros utilizados para a validação do método analítico desenvolvido foram seletividade, curva analítica e linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetitividade e precisão intermediária) e exatidão.

### 2.9.1 Seletividade

A seletividade é a extensão na qual um procedimento analítico pode determinar analito(s) particular(es) em mistura(s) ou matriz(es) sem a interferência de outros componentes de comportamento semelhante. Portanto, é a capacidade do procedimento analítico de discriminar entre a substância a analisar e substâncias análogas (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, componentes que possam gerar interferências, entre outros) (BRASIL, 2011).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos 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).

### 2.9.2 Efeito matriz

O efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental (BRASIL, 2011b).

Em cromatografia à Gás, o efeito matriz, além de gerar porcentagens de recuperação superiores a 100%, pode causar outras alterações na análise cromatográfica, como: *i*) mascaramento do pico do analito de interesse, gerando um resultado falso negativo. Isso ocorre, por exemplo, quando há perdas de quantidade do agrotóxico no sistema de injeção, fornecendo baixa resposta e dificultando a integração (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2005); *ii*) erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente identificados como o analito de interesse quando, na verdade, este está ausente, gerando resultado falso positivo. Este problema é mais fácil de ser contornado, com a utilização de um espectrômetro de massas para monitoramento dos analitos (HAJSLOVÁ *et al.*, 1998; SALVADOR *et al.*, 2006); *iii*) aumento no sinal do detector, levando à superestimação do resultado. Isso ocorre quando impurezas voláteis são eluídas com mesmo tempo de retenção dos agrotóxicos (HAJSLOVÁ *et al.*, 2003); extinção do sinal no detector, ou seja, o sinal do analito é diminuído gerando uma subestimação do resultado, fato comum aos detectores fotométricos de chama (MONTIGNY *et al.*, 1998).

É possível observar o efeito matriz quando existe uma diferença considerável na resposta obtida utilizando padrões preparados no solvente e padrões preparados no extrato da matriz, com boa precisão (PICÓ *et al.*, 2004). A matriz pode exercer efeito positivo (aumento de sinal) ou efeito negativo (diminuição de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for maior que 10%, pode-se considerar que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (HAJSLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

A minimização e/ou eliminação do efeito matriz pode ser obtida através da redução da quantidade de componentes da matriz que co-eluem com os analitos no detector e, por isso, é necessário o desenvolvimento de métodos de extração mais seletivos e etapas de limpeza dos extratos mais eficientes (PICÓ *et al.*, 2004).



### 2.9.3 Curva analítica e faixa de trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2011).

A resposta para um procedimento analítico é a relação existente, dentro de uma faixa específica, entre a resposta (sinal, área, altura do pico, absorção) e a concentração (quantidade) de analito na amostra (ROZET *et al.*, 2007).

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (RIBANI *et al.*, 2004). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica, a qual é geralmente aceita com um mínimo de 5 pontos (NETO *et al.*, 2002; LANÇAS, 2004). Esta relação produz uma equação de regressão linear  $y = ax + b$ , que relaciona as duas variáveis  $x$  e  $y$  e gera os coeficientes de regressão  $a$  e  $b$  que se referem a inclinação da curva e a interseção da curva analítica com o eixo  $y$ , quando  $x = 0$ , respectivamente.

A partir desta equação é possível calcular o coeficiente de correlação  $r$ , que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica, uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 for o valor de  $r$  (RIBANI *et al.*, 2004). Segundo a ANVISA (2003) e INMETRO (2003), são recomendados valores de coeficiente de correlação iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, respectivamente. Os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (CHASIN *et al.*, 1998).

Segundo Ribani e colaboradores (2004), a quantificação do composto de interesse pode ser obtida através dos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição padrão, sendo que o método de padronização deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão.

Neste trabalho foi utilizado o método da padronização interna, que consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno (PI). Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) da substância. A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra.

A substância utilizada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz e não fazer parte da amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a detectabilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico. A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio (INMETRO, 2003).

#### 2.9.4 Limite de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (INMETRO, 2003).

O limite de detecção (LOD, do inglês *Limit of Detection*) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação (LOQ, do inglês *Limit of Quantification*) é o menor valor de concentração em que o analito pode ser quantificado com certo limite de confiança, ou seja, abaixo deste valor medições não apresentam suficiente confiança para quantificação (THOMPSON *et al.*, 2002).

Os limites de detecção e quantificação são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito e são expressos em unidade de concentração (BRASIL, 2003; ICH, 1995; INMETRO, 2003).

Os LOD e LOQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo que neste trabalho estes valores foram estabelecidos como sendo a concentração que apresentou um sinal analítico no mínimo 3 e 10 vezes a relação sinal/ruído, respectivamente.

#### 2.9.5 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003). Segundo Ribani e colaboradores (2004), a precisão pode ser considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade 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 de medição usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI *et al.*, 2004; ALBANO *et al.*, 2009).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, mesmo laboratório, mas alterando algumas condições, tais como: dias de análise, analistas, equipamentos e condições ambientais, entre outras (BRASIL, 2011; ALBANO *et al.*, 2009). 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 de avaliar a precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá resultados semelhantes (RIBANI *et al.*, 2004). Tanto a repetibilidade como a precisão intermediária podem ser expressas através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard*

*Deviation*) (RIBANI *et al.*, 2004) e para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD de até 20% são aceitáveis (HUBER, 1998).

### 2.9.6 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 (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão. Quando não se tem disponível os materiais de referência certificados, pode-se avaliar a exatidão através de ensaios de fortificação e recuperação (CODEX ALIMENTARIUS, 2010), geralmente expressa em percentual.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas desta. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações.

Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método (RIBANI *et al.*, 2004). Como a quantidade do analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra, isto se torna uma limitação desse procedimento (INMETRO, 2003). Para avaliação da exatidão do método pode-se fazer uso do padrão de controle (*surrogate*) o qual, é uma substância de concentração conhecida adicionada as amostras com o objetivo de monitorar diferenças nos valores de recuperação, bem como, detectar problemas durante a extração. Esta substância deve ter propriedades similares aos compostos em estudo (FRIGGI, 2012).

Para a análise de resíduos de pesticidas, geralmente os intervalos aceitáveis estão entre 70 e 120%, com precisão de no máximo 20% (HUBER, 1998; SANCO, 2011).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e consistiu na avaliação de diferentes técnicas de preparo de amostra para a extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de solo e posterior otimização e validação do método proposto, utilizando análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série (UHPLC-MS/MS).

Para o processo de validação, os seguintes parâmetros analíticos foram avaliados: seletividade, efeito matriz, faixa linear, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermediária.

#### 3.1 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão descritos abaixo:

- ⇒ Agitador vórtex - Biomixer Modelo QL-901 (Microtécnica, Brasil);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (AND, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão, modelo AUW-220D (Shimadzu, Japão);
- ⇒ Balança analítica de precisão UX-420H (Shimadzu, Japão);
- ⇒ Centrífuga Centribio, modelo 80-2B (Centribio, Brasil);
- ⇒ Centrífuga refrigerada, modelo NT 825 (Nova técnica, Brasil);
- ⇒ Estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/1 (Tecnal, Brasil);
- ⇒ Mesa agitadora pendular, modelo TE-240/1, operando a 150 rpm (Tecnal, Brasil);
- ⇒ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- ⇒ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct UV3<sup>®</sup> (Millipore, EUA);

- ⇒ Ultrassom Sonorex, modelo RK 510, frequência de 40 KHz e potência de 135 W (Bandelin, Alemanha);
- ⇒ Sistema UHPLC<sup>TM</sup>-MS/MS (Waters, USA) equipado com:
  - Cromatógrafo Líquido com sistema binário de bombas;
  - Amostrador automático *sample manager* (Acquity);
  - Coluna analítica: ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>, (50 x 2,1 mm d.i) e 1,7 µm de tamanho de partícula (Waters, EUA);
  - Detector espectrométrico de massas do tipo triplo quadrupolo, modelo Xevo TQ;
  - Interface/Fonte de Ionização por eletronebulização;
  - Sistema de aquisição de dados através do software *MassLynx* (versão 4.1) (Waters, EUA).
  - Sistema gerador de nitrogênio, modelo SF2FF (Atlas Copco, EUA);

### 3.2 Materiais utilizados

Os materiais utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão listados a seguir:

- ⇒ Filtros de nylon de 13 mm de diâmetro e 0,2 µm de tamanho de poro (Vertical Chromatography, Tailândia);
- ⇒ Frascos de vidro (*vial*), capacidade de 4,0 e 2,0 mL;
- ⇒ Ponteiras de polipropileno com capacidade de 200 µL, 1 mL e 10 mL (Brand, Alemanha);
- ⇒ Tubos de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 e 15 mL (Sarstedt, Alemanha);
- ⇒ Vidrarias de laboratório em geral.

### 3.3 Solventes, reagentes e gases

Os solventes, reagentes e gases utilizados neste trabalho estão listados abaixo:

- ⇒ Acetato de sódio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA);
- ⇒ Acetona 99,5% ACS (Tedia, EUA);
- ⇒ Acetonitrila grau HPLC (Mallinckrodt, EUA);
- ⇒ Ácido acético glacial 99,9% (Merck, Brasil);
- ⇒ Ácido fórmico 98% (Sigma-Aldrich, Brasil)
- ⇒ Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q Direct UV3<sup>®</sup> (resistividade de 18,2 MΩ cm);
- ⇒ Citrato de sódio dihidratado p.a. (Sigma Aldrich, EUA);
- ⇒ Cloreto de sódio p.a. (Merck, Brasil);
- ⇒ Extran<sup>®</sup> neutro (Merck, Brasil);
- ⇒ Gás argônio usado como gás de colisão no sistema UPLC-MS/MS com 99,9992% de pureza (Air Products, Brasil);
- ⇒ Hexano p.a. 98,5% (Caledon, Canadá);
- ⇒ Hidrogenocitrato de sódio sesquihidratado p.a. (Sigma Aldrich, EUA);
- ⇒ Metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA);
- ⇒ Sorvente Bondesil C<sub>18</sub> com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ⇒ Sorvente Bondesil PSA com tamanho de partícula de 40 µm (Agilent, EUA);
- ⇒ Sulfato de magnésio anidro p.a. (J.T. Baker, EUA).

### 3.4 Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados

Os agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados para este estudo são compostos comumente utilizados na agricultura e no tratamento de animais. Estes compostos foram adquiridos da companhia Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Alemanha) e estão listados na Tabela 8, contendo informações referentes à classe química, grupo químico, fórmula molecular e grau de pureza. A fórmula estrutural de cada composto estudado está apresentada na Tabela 24, no APÊNDICE A.

### 3.5 Seleção do padrão interno e do padrão de controle

A correta execução do procedimento de extração e da análise de cada amostra pode ser assegurada através da utilização de padrões em diferentes fases do procedimento analítico. Estes compostos, além de auxiliar na localização de fontes de erros, podem ser utilizados para melhorar a robustez de métodos, corrigindo vários fatores dentro de um procedimento analítico que pode ter um impacto sobre os resultados da análise. Os compostos que são adicionados antes da etapa de extração são denominados Padrão de Controle (PC) e aqueles adicionados no extrato final, imediatamente antes da injeção são denominados Padrão Interno (PI) SANCO (2011).

Neste trabalho, trifenilfosfato (TPP, do inglês *triphenyl phosphate*) foi utilizado como padrão interno na concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  e linurom deuterado (linuron-d6) como padrão de controle nas mesmas concentrações empregadas para a avaliação dos ensaios de recuperação ( $100, 50$  e  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). A quantificação foi realizada utilizando calibração externa. O padrão interno foi utilizado somente para verificação da resposta do equipamento, ou seja, não foi empregado na quantificação.

Tabela 8 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e determinados por UHPLC-MS/MS, com a respectiva classe, grupo químico, fórmula molecular e pureza do padrão analítico.

(continua)

Composto	Classe	Grupo químico	Fórmula molecular	Pureza (%)
Atrazina	Herbicida	Triazina	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	99,0
2,4-D	Herbicida	Ácido ariloxialcanóico	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$	99,0
Azinfós metílico	Inseticida	Organofosforado	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}_2$	99,0
Azoxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	$\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$	99,0
Bentazona	Herbicida	Benzotiadiazinona	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$	97,0
Bispiribaque-sódico	Herbicida	Ácido pirimidiniloxibenzóico	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$	99,0
Bitertanol	Fungicida	Triazol	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$	98,5
Boscalida	Fungicida	Anilida	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	99,5
Bromuconazole	Fungicida	Triazol	$\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrCl}_2\text{N}_3\text{O}$	99,0



Tabela 8 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e determinados por UHPLC-MS/MS, com a respectiva classe, grupo químico, fórmula molecular e pureza do padrão analítico.

(continuação)				
Composto	Classe	Grupo químico	Fórmula molecular	Pureza (%)
Buprofezina	Inseticida	Tiadiazinona	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> OS	99,0
Carbaril	Inseticida	Carbamato	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	98,5
Carbendazina	Fungicida	Benzimidazol	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	99,0
Carbofurano	Nematicida/ inseticida	Metilcarbamato de benzofuranila	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	98,5
Carbofurano 3-OH	Inseticida	Carbamato	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	98,6
Cianazina	Herbicida	Triazina	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> CIN <sub>6</sub>	99,0
Clomazone	Herbicida	Isoxazolidinona	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> CINO <sub>2</sub>	98,5
Cloranfenicol	Antibiótico	Aminopropanodiol	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> C <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	98,5
Clorimuron etílico	Herbicida	Sulfonilureia	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S	97,0
Clorpirifós etílico	Inseticida	Organofosforado	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	99,5
Clorpirifós metílico	Inseticida	Organofosforado	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> PS	97,0
Clorprofam	Herbicida	Carbamato	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> CINO <sub>2</sub>	99,5
Diazinona	Inseticida	Organofosforado	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	99,0
Diclofluanida	Fungicida	Organoclorado	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	99,0
Difenoconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	99,0
Dimetoato	Inseticida	Organofosforado	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	98,0
Epoxiconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> CIFN <sub>3</sub> O	99,0
Fempropatrina	Inseticida	Piretróide	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>3</sub>	99,5
Fempropimorfe	Fungicida	Morfolina	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	94,5
Fenarimol	Fungicida	Pirimidina	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	97,5
Fentiona	Inseticida	Organofosforado	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> PS <sub>2</sub>	97,0
Fipronil	Inseticida	Pirazol	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS	96,5
Fluquiconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O	98,5
Fluroxipir	Herbicida	Ácido piridiniloxialcanóico	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	96,5
Flutolanil	Fungicida	Carboxamida	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>	99,0
Imazalil	Fungicida	Imidazol	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	97,5
Imidacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> CIN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	98,0
Iprovalicarbe	Fungicida	Carbamato	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	97,5
Linurom	Herbicida	Úreia	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99,4
Linuron d6 (PC)	-	-	C <sub>9</sub> D <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99,9

Tabela 8 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e determinados por UHPLC-MS/MS, com a respectiva classe, grupo químico, fórmula molecular e pureza do padrão analítico.

(continuação)				
Composto	Classe	Grupo químico	Fórmula molecular	Pureza (%)
Malationa	Inseticida	Organofosforado	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub> PS <sub>2</sub>	99,0
Mecarbam	Inseticida	Carbamato	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> PS <sub>2</sub>	98,0
Mepronil	Fungicida	Carboxamida	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>2</sub>	99,0
Metaconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	99,0
Metalaxil	Fungicida	Acilanicinato	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	99,5
Metiocarbe sulfona	Inseticida	Carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S	99,0
Metiocarbe sulfóxido	Inseticida	Carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> S	95,0
Metsulfurom metílico	Herbicida	Sulfoniluréia	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S	99,0
Mevinfós	Inseticida	Organofosforado	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> P	92,0
Miclobutanil	Fungicida	Triazol	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub>	98,5
Monesina	Anticoccidiano	Ionóforo	C <sub>36</sub> H <sub>61</sub> NaO <sub>11</sub>	98,0
Monocrotofós	Inseticida	Organofosforado	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>5</sub> P	97,5
Monolinurom	Herbicida	Uréia	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99,0
Paraoxon etílico	Inseticida	Organofosforado	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>6</sub> P	99,0
Piraclostrobina	Fungicida	Estrobilurina	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	97,5
Pirazofós	Inseticida	Organofosforado	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PS	97,0
Piridaben	Inseticida	Piridazinona	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> OS	99,0
Piridafentiona	Fungicida	Organofosforado	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> PS	97,5
Piridato	Herbicida	Fenilpiridazina	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	96,5
Pirimetanil	Fungicida	Anilino pirimidina	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub>	99,0
Pirimicarbe	Inseticida	Carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	98,5
Pirimifós metílico	Inseticida	Organofosforado	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	99,0
Profenofós	Inseticida	Organofosforado	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> BrClO <sub>3</sub> PS	98,0
Propargito	Acaricida	Sulfito de alquila	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> S	91,5
Propiconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	99,0
Propizamida	Herbicida	Benzimidazol	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO	99,5
Propoxur	Inseticida	Carbamato	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	99,0
Quinoxifeno	Fungicida	Quinolina	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FNO	99,0
Robenidina	Anticoccidiano	Guanidina	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	95,0
Salbutamol	Antibiótico	Betagonista	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	99,0
Salinomicina	Antibiótico	Ionóforo	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>11</sub>	98,0

Tabela 8 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários selecionados e determinados por UHPLC-MS/MS, com a respectiva classe, grupo químico, fórmula molecular e pureza do padrão analítico.

(conclusão)				
Composto	Classe	Grupo químico	Fórmula molecular	Pureza (%)
Simazina	Herbicida	Triazina	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>	98,5
Sulfadimetoxina	Antibiótico	Sulfonamida	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	97,5
Sulfametazina	Antibiótico	Sulfonamida	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	99,0
Sulfatiazol	Antibiótico	Sulfonamida	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	99,5
Tebuconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O	98,8
Terbutilazina	Herbicida	Triazina	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>	99,0
Tetraconazole	Fungicida	Triazol	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O	98,5
Tiacloprido	Inseticida	Neonicotinóide	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> S	98,0
Tiametoxam	Inseticida	Neonicotinóide	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	98,0
Tiodicarbe	Inseticida	Metilcarbamato de oxima	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>	99,5
Tolcofós metílico	Fungicida	Clorofenil	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	99,5
Triadimefom	Fungicida	Triazol	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	99,5
Triadimenol	Fungicida	Triazol	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	98,0
Triazofós	Inseticida	Organofosforado	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> PS	97,0
Triclorfom	Inseticida	Organofosforado	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	97,0
Trifenilfosfato (PI)	Inseticida	Organofosforado	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	99,5
Trifloxistrobina	Fungicida	Estrobilurina	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	99,0
Triflumizole	Fungicida	Imidazol	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	98,5
Trimetoprima	Antibiótico Anticoccidiano	Pirimidina	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	99,5
Vamidationa	Fungicida	Organofosforado	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> PS <sub>2</sub>	98,0

PC: Padrão de controle; PI: Padrão interno.

### 3.6 Preparo das soluções analíticas

O preparo das soluções analíticas estoque, na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi iniciado efetuando-se o cálculo para determinar a quantidade de cada padrão

sólido a ser pesado, considerando a sua pureza, para se obter soluções individuais de cada composto nesta concentração.

Em seguida, os padrões sólidos foram pesados individualmente, em vidraria apropriada para pesagem de padrões, transferidos para balões volumétricos e dissolvidos em 10 mL de acetonitrila grau HPLC. Logo após, foram agitados em vórtex por 1 minuto para completa dissolução.

A partir das soluções de concentração  $1000,0 \text{ mg L}^{-1}$ , preparou-se 25 mL de uma solução de trabalho na concentração  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários estudados, incluindo o padrão de controle, linuron-deuterado (d6). Esta solução foi utilizada para o estudo da linearidade do método e para os ensaios de fortificação. A partir da mistura  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações de  $250,0$ ;  $200,0$ ;  $150,0$ ;  $100,0$ ;  $50,0$ ;  $25,0$ ;  $10,0$ ;  $5,0$  e  $2,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em acetonitrila e no extrato da matriz avaliada.

Para a injeção no sistema UHPLC-MS/MS, foram realizadas diluições das soluções de trabalho em água. Para isto, em um vial foi adicionado  $200 \text{ } \mu\text{L}$  das soluções de trabalho preparadas em acetonitrila ou no extrato da matriz,  $800 \text{ } \mu\text{L}$  de água purificada e  $20 \text{ } \mu\text{L}$  de padrão interno ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), resultando em soluções com concentrações iguais a  $50,0$ ;  $40,0$ ;  $30,0$ ;  $20,0$ ;  $10,0$ ;  $5,0$ ;  $2,0$ ;  $1,0$  e  $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Para o preparo do padrão interno trifenilfosfato, soluções estoque de  $1000,0$  e  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi preparado 10 mL de uma solução na concentração de  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  contendo apenas TPP. A partir dessa solução preparou-se uma solução na concentração  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , a qual foi adicionada  $20 \text{ } \mu\text{L}$  ao extrato final para injeção.

Todas as soluções analíticas foram armazenadas em frascos âmbar a temperatura menor que  $-10 \text{ } ^\circ\text{C}$ , sendo que antes de serem utilizadas as soluções foram retiradas do freezer e esperou-se que estas atingissem a temperatura ambiente para posterior análise.

### 3.7 Amostra de solo empregada na etapa de validação

A amostra de solo utilizada neste estudo foi coletada em uma propriedade rural, que não desenvolve atividade agropastoril, localizada no interior de São Martinho da Serra - RS. Para a coleta, foi retirado cerca de 2,0 cm da cobertura vegetal existente no local e coletado o solo até uma profundidade de aproximadamente 20 cm. O solo foi seco em estufa com circulação e renovação de ar a uma temperatura de 25 °C por aproximadamente 24 h e em seguida peneirado em peneira com malha de 2 mm.

A amostra coletada foi analisada no Departamento de Solos, do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, apresentando os seguintes resultados:

- Acidez do solo e calagem:  $\text{pH}_{\text{água}} (1:1) = 4,9$ ;  $\text{Ca} = 5,9 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ;  $\text{Mg} = 1,4 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ;  $\text{Al} = 0,8 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ;  $\text{H} + \text{Al} = 9,7 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ;  $\text{CTC}_{\text{efet.}} = 8,1 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ; Saturação (%):  $\text{Al} = 9,9$ ; Bases = 43,1;  $\text{SMP} = 5,3$ .

- Macronutrientes: % MO (matéria orgânica) = 2,2 (m/v); % argila = 20 (m/v); textura = 3,0;

- Micronutrientes e relações molares:  $\text{Cu} = 6,0 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ;  $\text{Zn} = 2,0 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ;  $\text{B} = 0,3 \text{ mg}/\text{dm}^3$ ;  $\text{Ca}/\text{Mg} = 4,3$ ;  $(\text{Ca} + \text{Mg})/\text{K} = 70,80$ ;  $\text{K}/(\text{Ca} + \text{Mg})^{1/2} = 0,038$ .

A amostra foi acondicionada em frascos âmbar e armazenada à temperatura ambiente até a etapa de extração para a etapa de desenvolvimento do método e de validação. No processo de validação de um método devem ser utilizadas amostras isentas dos compostos que serão avaliados, uma vez que, isto pode interferir nas análises, levando a uma quantificação errônea dos analitos de interesse. Estas amostras isentas dos compostos avaliados são denominadas amostras “branco”.

Sendo assim, para avaliar a ausência de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo na amostra coletada, esta foi submetida ao processo de extração descrito no item 3.10.5 e analisada por UHPLC-MS/MS.

### 3.8 Otimização do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo

As análises foram realizadas empregando a Cromatografia à Líquido de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Série (UHPLC-MS/MS). Esta técnica tem se tornado uma tendência mundial, visto que tem como vantagem principal o aumento expressivo na eficiência de separação dos analitos, mesmo com vazões elevadas da fase móvel. Como resultado, há o aumento da eficiência e também se obtém uma melhor resolução, um menor tempo de análise e uma melhor detectabilidade (QUEIROZ, 2012).

A combinação de UHPLC-MS/MS fornece vantagens significativas com relação à seletividade, detectabilidade e velocidade de análise, sendo a detecção por espectrometria de massas uma ferramenta analítica essencial para análise e confirmação dos analitos de interesse em níveis de traços.

#### 3.8.1 Escolha da fase móvel

A escolha da fase móvel levou em consideração as condições utilizadas frequentemente no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas (LARP-UFSM) onde foi desenvolvido este trabalho.

Inicialmente, a fase móvel consistiu do uso do aditivo ácido fórmico aos solventes utilizados, porém foi verificado que alguns compostos que já estavam na *Quanpedia* foram infusionados com a adição de formiato de amônio e ácido fórmico aos solventes. Logo, optou-se por testar uma fase móvel contendo os dois aditivos. Após o teste foi possível verificar que a fase móvel contendo apenas ácido fórmico como aditivo foi mais eficaz para a maioria dos compostos e, portanto, a fase móvel empregada neste trabalho foi uma mistura água:metanol (98:2, v/v) acidificada com 0,1% de ácido fórmico como solvente A e metanol acidificado com 0,1% (v/v) de ácido fórmico como solvente B.

### 3.8.2 Condições utilizadas no sistema UHPLC-MS/MS

A espectrometria de massas em série foi utilizada para a operação do equipamento, no modo de varredura MRM e ionização por eletronebulização no modo positivo.

Com o objetivo de otimizar as condições de análise para cada um dos compostos estudados e montar o método, inicialmente fez-se uso de um banco de dados, presente no UHPLC-MS/MS, chamado “*Quanpedia*”, onde constam informações dos compostos, tais como os íons precursores e íons produtos, as energias de colisão e as energias do cone. Para os compostos ausentes neste banco de dados, foram realizadas injeções diretas (infusões) no espectrômetro de massas, com a solução analítica na concentração  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito individualmente, no modo combinado, ou seja, sem coluna analítica e na presença de fase móvel. A partir destas infusões os íons característicos de cada composto selecionado foram monitorados no modo SIM no quadrupolo (Q1) e no quadrupolo (Q3) foi realizada a varredura do íon produto variando as energias de colisão, com o objetivo de otimizar as melhores condições de detecção. Com isso, selecionou-se o modo de ionização da fonte (eletronebulização positiva), voltagem do capilar, energias de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos.

Em seguida, foram avaliadas as transições, no modo SRM a serem utilizadas para a quantificação (transição de maior intensidade) e confirmação (transição de segunda maior intensidade) dos compostos estudados e estes dados foram inseridos no banco de dados “*Quanpedia*”.

Posteriormente, realizou-se a análise de uma solução analítica contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários na concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada em acetonitrila, a fim de verificar o tempo de retenção dos analitos e a intensidade do sinal analítico.

### 3.9 Avaliação e otimização do método de extração para a determinação simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo

O preparo da amostra é uma etapa muito importante na análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo, devido à complexidade da matriz e aos baixos níveis de concentração em que estes compostos são encontrados nas amostras. Neste estudo, foram avaliados diferentes procedimentos para o preparo das amostras de solo a fim de se obter o método de extração mais eficiente para os compostos em estudo.

Para isto, foram realizados vários ensaios com o objetivo de avaliar os percentuais de recuperação dos analitos utilizando ultrassom (ensaios E1), agitação mecânica (ensaios E2) e procedimentos baseados no método QuEChERS, incluindo algumas combinações dos ensaios citados anteriormente (ensaios E3, E4, E5 e E6).

Cabe salientar que todos os ensaios de recuperação foram avaliados no nível de concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  em triplicata ( $n = 3$ ), sendo que após a diluição dos extratos em água, a concentração injetada corresponde a uma solução analítica na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (concentração teórica).

#### 3.9.1 Extração utilizando ultrassom (Ensaio E1)

Para avaliar a eficiência da extração utilizando ultrassom, inicialmente pesou-se  $10,0 \pm 0,1$  g de solo diretamente em tubos de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade de 50 mL) com tampa rosqueada. Em seguida, a amostra foi fortificada no nível de concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo. Após um tempo de contato de 1 h para permitir a interação dos analitos com o solo (PRESTES *et al.*, 2012), adicionou-se 10 mL de acetonitrila (ACN) e agitou-se o tubo fechado vigorosamente para misturar o solvente e o solo. As amostras foram submetidas a diferentes tempos de extração no ultrassom, sendo eles, 5, 10, 15, 20 e 30 min, para avaliar o melhor tempo de extração. Logo após a extração, adicionou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e agitou-se manual e vigorosamente durante 1 min, a fim de garantir a ausência de água no extrato. Logo após a centrifugação realizada por 8 min em 3400 rpm, o



extrato foi filtrado em filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro (sendo que foi utilizado um filtro para cada extrato) e diluído em água (1:4, v/v).

O mesmo procedimento foi repetido utilizando a adição de 10 mL de água purificada ao solo, e este mantido em repouso por 10 minutos (LESUEUR *et al.*, 2008), antes da etapa de adição de acetonitrila.

A representação utilizada para identificar os ensaios realizados nos diferentes tempos de extração com ultrassom está apresentada na Tabela 9.

Na Figura 9 estão representadas as etapas realizadas no procedimento de extração utilizando ultrassom.

Tabela 9 - Ensaios de extração utilizando ultrassom (Ensaios E1).

Ensaios		Identificação do ensaio	Tempo de ultrassom (min)
A	Sem a adição de água	E1_5_A	5
		E1_10_A	10
		E1_15_A	15
		E1_20_A	20
		E1_30_A	30
B	Com a adição de água	E1_5_B	5
		E1_10_B	10
		E1_15_B	15
		E1_20_B	20
		E1_30_B	30

### 3.9.2 Extração utilizando agitação mecânica (Ensaios E2)

A extração utilizando mesa agitadora foi realizada pesando-se  $10 \pm 0,1$  g de amostra em tubos de polipropileno tipo Falcon de fundo cônico (capacidade de 50 mL) com tampa rosqueada. Em seguida, realizou-se a fortificação da amostra no nível de concentração de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Após uma 1 h de contato, adicionou-se 10 mL de acetonitrila (ACN) e agitou-se o tubo fechado vigorosamente para misturar o solvente e o solo. As amostras foram agitadas em mesa agitadora (150 rpm) em diferentes tempos de agitação (5, 10, 15, 20 e 30 min). Logo após, adicionou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro, agitou-se manualmente durante 1 min e centrifugou-se por 8 min em 3400 rpm. As amostras foram filtradas em filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro e diluídas em água (1:4, v/v) antes da análise.

O mesmo procedimento foi repetido utilizando a adição de 10 mL água purificada ao solo, e este mantido em repouso por 10 minutos (KVICALOVÁ *et al.* 2012), antes da etapa de adição de acetonitrila.

A representação utilizada para identificar os ensaios de extração realizados utilizando diferentes tempos de agitação mecânica está demonstrada na Tabela 10.

Tabela 10 - Ensaios de extração utilizando agitação mecânica (Ensaios E2).

Ensaios		Identificação do ensaio	Tempo de ultrassom (min)
A	Sem a adição de água	E2_5_A	5
		E2_10_A	10
		E2_15_A	15
		E2_20_A	20
		E2_30_A	30
B	Com a adição de água	E2_5_B	5
		E2_10_B	10
		E2_15_B	15
		E2_20_B	20
		E2_30_B	30

Na Figura 9 estão representadas as etapas realizadas no procedimento de extração utilizando a mesa agitadora.

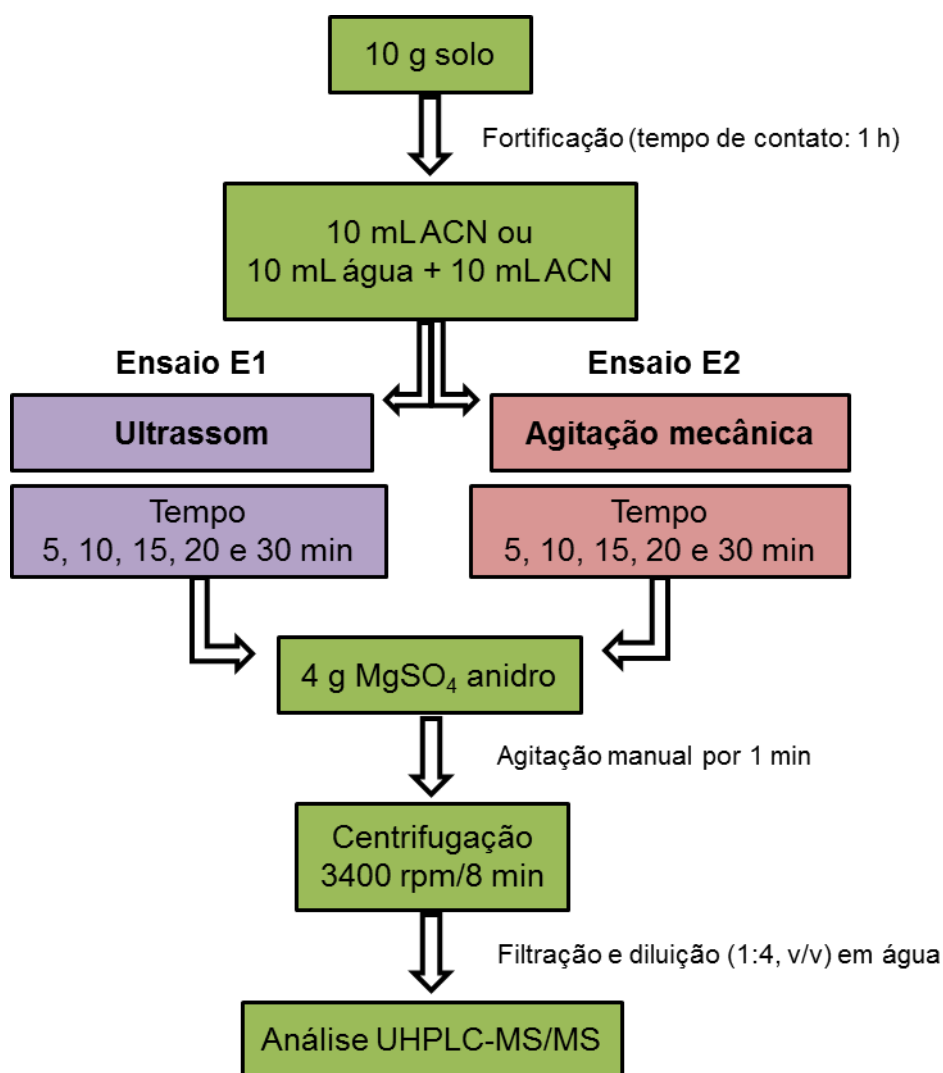


Figura 9 - Representação das etapas realizadas nos procedimentos de extração utilizando ultrassom (Ensaio E1) e mesa agitadora (Ensaio E2).

### 3.9.3 Extração baseada no método QuEChERS

A partir do método “QuEChERS original” proposto por Anastassiades e colaboradores (2003), do método “QuEChERS acetato” proposto por Lehotay e colaboradores (2005), do método “QuEChERS citrato” proposto por Anastassiades e colaboradores (2007) e do método “QuEChERS modificado” proposto por Prestes (2011), foram realizados os ensaios para avaliar a eficiência destes métodos na extração dos compostos em estudo da amostra de solo.

Os ensaios foram realizados utilizando para a etapa de partição os sais sulfato de magnésio, cloreto de sódio, acetato de sódio, hidrogenocitrato de sódio

sesquihidratado e citrato de sódio dihidratado e para a etapa de limpeza dos extratos foram utilizados amina primária e secundária (PSA) e C18 como adsorventes, conforme apresentado na Figura 3.

A fim de verificar a eficiência da etapa de limpeza dos extratos, os mesmos ensaios anteriores foram repetidos, excluindo-se esta etapa do procedimento. Logo após, foram realizados ensaios, baseados nos métodos já descritos, porém utilizando a adição de água purificada (DONG *et al.*, 2009; RASHID *et al.*, 2010) a amostra de solo antes da adição de acetonitrila e sem a etapa de limpeza dos extratos. Em seguida, novos ensaios foram realizados com as melhores condições determinadas nos ensaios anteriores, ou seja, com adição de água e sem a etapa de limpeza dos extratos, substituindo a agitação em vórtex ou manual, normalmente utilizadas, por agitação mecânica e utilização de ultrassom no procedimento de extração.

A identificação dos ensaios foi realizada da seguinte maneira:

- Ensaios baseados no método “QuEChERS original”: E3;
- Ensaios baseados no método “QuEChERS citrato”: E4;
- Ensaio baseado no método “QuEChERS acetato”: E5;
- Ensaios baseados no método “QuEChERS modificado”: E6

A identificação descrita acima foi seguida por uma identificação alfabética de acordo com a modificação das etapas realizadas, conforme descrito a seguir:

A: ensaio com etapa de limpeza do extrato;

B: ensaio sem etapa de limpeza do extrato e sem adição de água;

C: ensaio sem etapa de limpeza do extrato, com adição de água e agitação em vortex;

D: ensaio sem etapa de limpeza do extrato, com adição de água e agitação mecânica por 15 min;

E: ensaio sem etapa de limpeza do extrato, com adição de água e utilização de ultrassom por 15 min.

A Figura 10 apresenta um fluxograma que demonstra os ensaios realizados com as diferentes modificações do método QuEChERS.

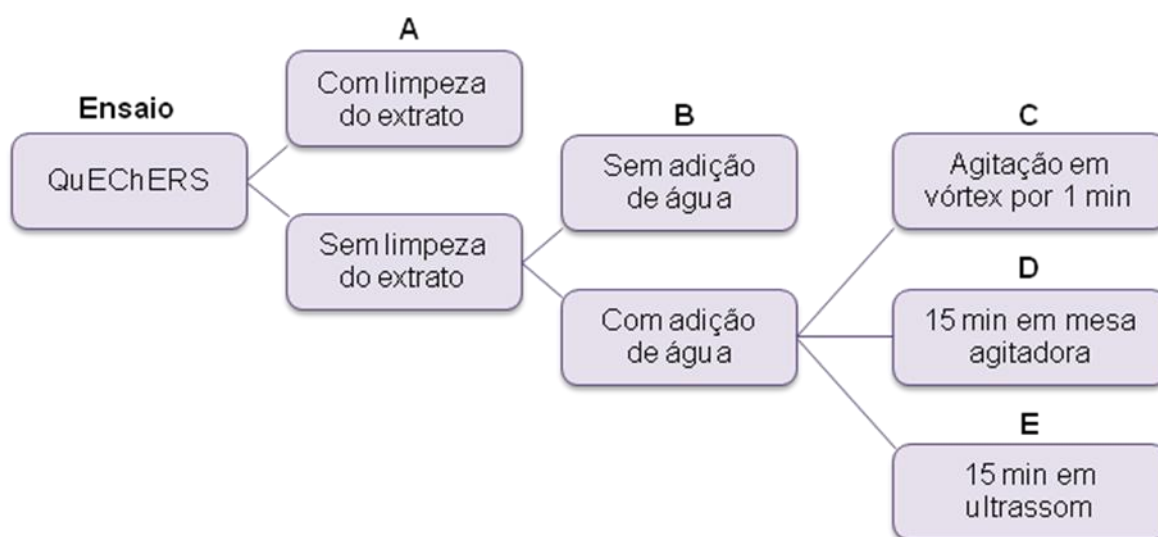


Figura 10 - Fluxograma demonstrando os ensaios realizados baseando-se nos diferentes métodos de QuEChERS.

Na Tabela 11 e na Figura 11 estão descritos e demonstrados os ensaios (E3) baseados no método “QuEChERS original” e as modificações deste com agitação mecânica e ultrassom.

Tabela 11 - Ensaio realizados para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS original” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.

Ensaio		Procedimentos baseados no Método “QuEChERS original”						
E3_A	10 g solo	10 mL ACN	agitação em vórtex 1 min	4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,0 g NaCl	agitação manual 1 min	centrifugação 3400 rpm/8,0 min	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA	centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS
E3_B							centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E3_C			agitação em vórtex 1 min		agitação manual 1 min			
E3_D	10 g solo	10 mL água → repouso por 10 min → 10 mL ACN		4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,0 g NaCl	ultrassom 15 min			centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS
E3_E			agitação mecânica 15 min (150 rpm)		agitação manual 1 min			

A etapa de filtração foi realizada utilizando filtros de nylon de 0,2 µm de tamanho de poro e a diluição foi realizada em água (1:4, v/v).

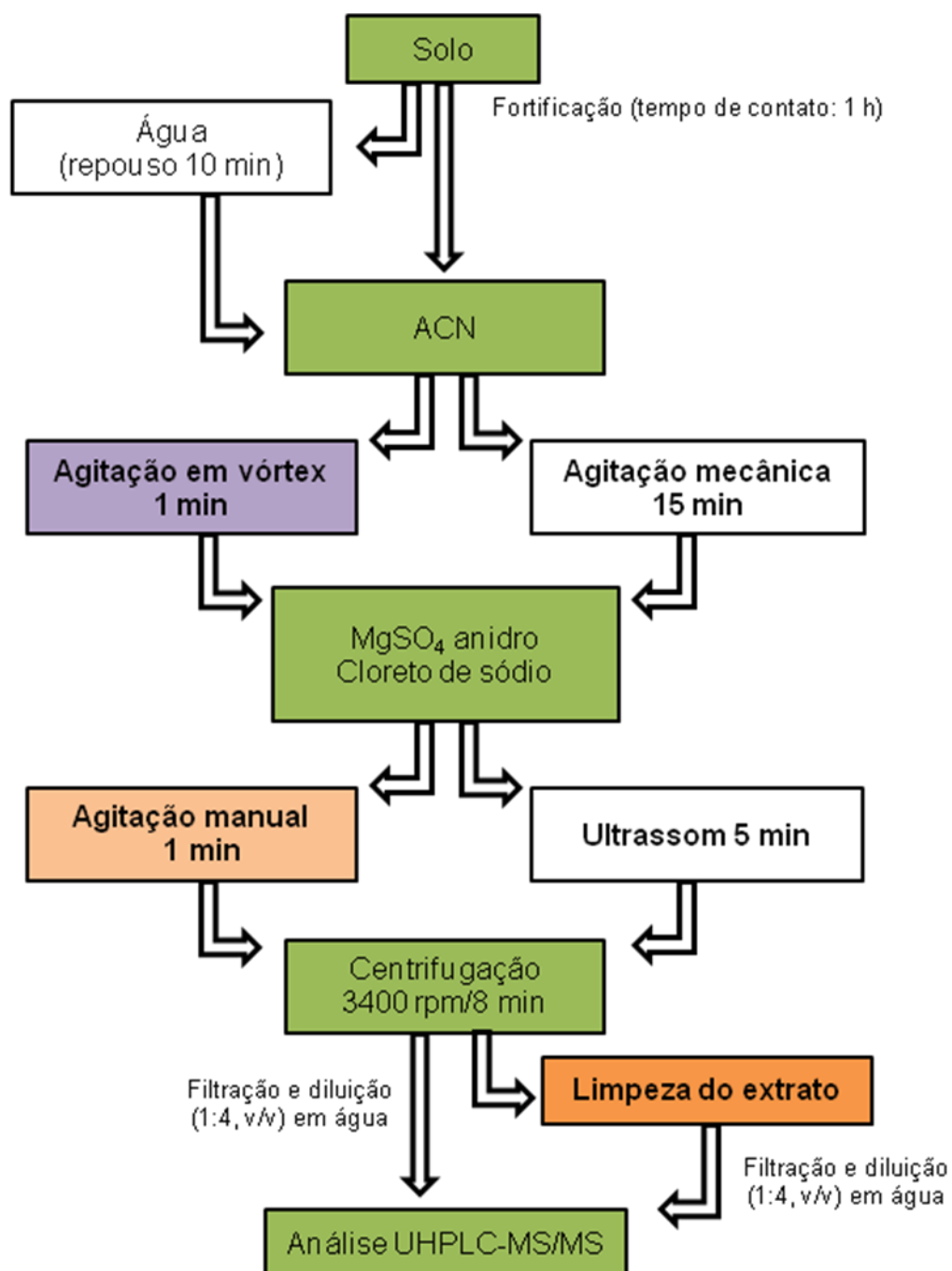


Figura 11 - Representação das etapas realizadas nos procedimentos de extração utilizando método “QuEChERS original” e combinações utilizando ultrassom e agitação mecânica, incluindo a limpeza do extrato.

Na Tabela 12 e na Figura 12 estão apresentados os ensaios realizados baseados no método “QuEChERS citrato” utilizando agitação mecânica e ultrassom combinados na etapa de extração dos compostos da matriz solo (ensaios E4).

Tabela 12 - Ensaios realizados para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS citrato” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.

Ensaio		Procedimentos baseados no Método “QuEChERS citrato”						
E4_A	10 g solo	10 mL ACN	agitação em vórtex 1 min	4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,0 g NaCl + 1,0 g citrato trissódico dihidratado + 0,5 g hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado	agitação manual 1 min	centrifugação 3400 rpm/8,0 min	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA	centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS
E4_B							centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E4_C			agitação em vórtex 1 min	4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,0 g NaCl + 1,0 g citrato trissódico dihidratado + 0,5 g hidrogenocitrato dissódico sesquihidratado	agitação manual 1 min			
E4_D	10 g solo	10 mL água → repouso por 10 min → 10 mL ACN			ultrassom 15 min		centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E4_E			agitação mecânica 15 min (150 rpm)		agitação manual 1 min			

A etapa de filtração foi realizada utilizando filtros de nylon de 0,2 µm de tamanho de poro e a diluição foi realizada em água (1:4, v/v).



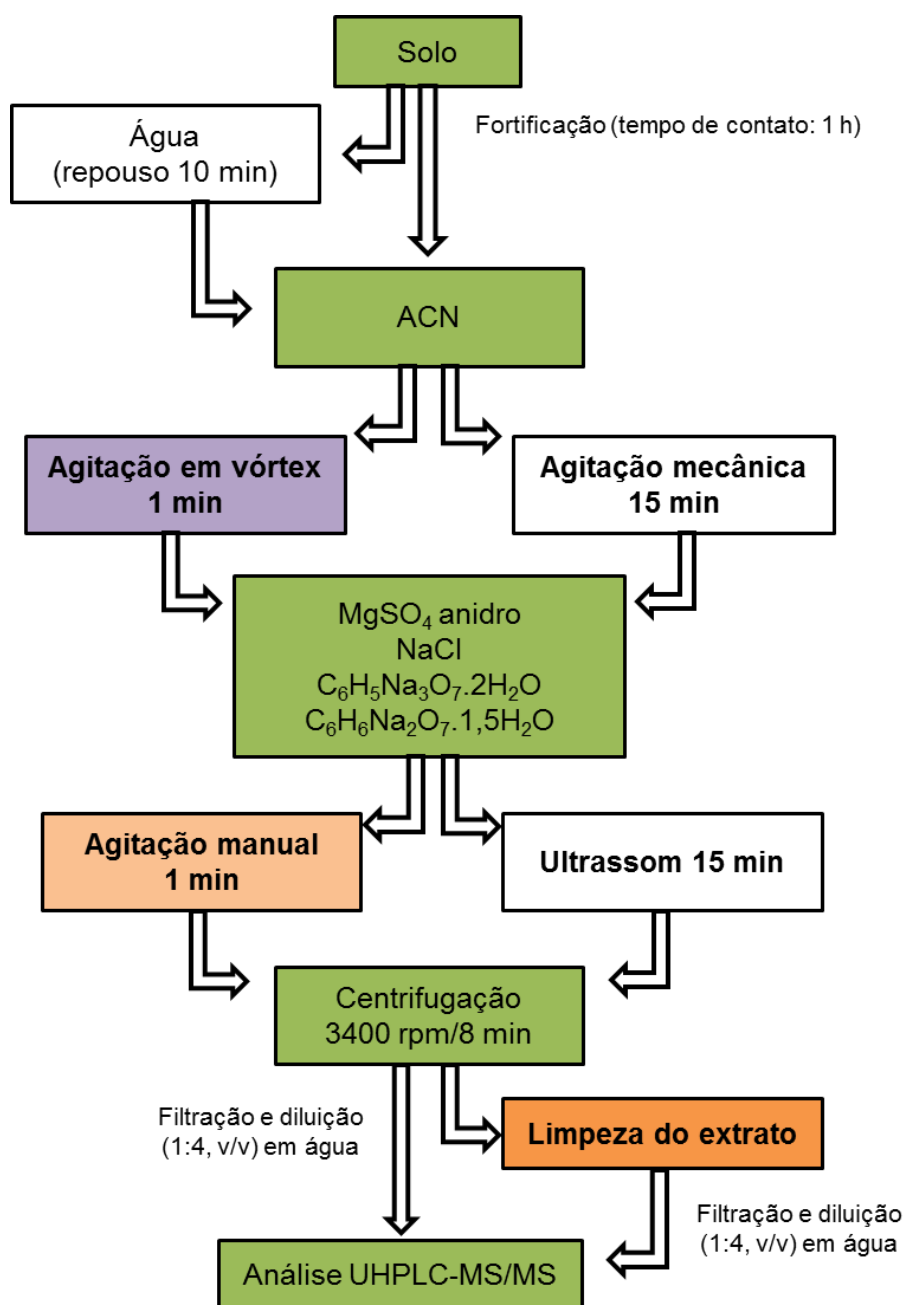


Figura 12 - Representação esquemática das etapas realizadas no preparo da amostra utilizando modificações do método “QuEChERS citrato” combinado com ultrassom e agitação mecânica.

Os ensaios baseados no método “QuEChERS acetato” e em combinação com as técnicas de ultrassom e agitação mecânica estão apresentados na Tabela 13 (ensaios E5) e os ensaios (E6) baseados no método “QuEChERS modificado” incluindo etapas de agitação mecânica e utilização de ultrassom estão descritos a Tabela 14.

Tabela 13 - Ensaio realizados para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS acetato” e combinações com ultrassom e agitação mecânica.

Ensaio		Procedimentos baseados no Método “QuEChERS acetato”						
E5_A	15 g solo	15 mL ACN 1% HAc em ACN	agitação em vórtex 1 min	6,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g acetato de sódio	agitação manual 1 min	centrifugação 3400 rpm/8,0 min	1 mL sobrenadante + 150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA	centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS
E5_B							centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E5_C			agitação em vórtex 1 min		agitação manual 1 min			
E5_D	15 g solo	15 mL água → repouso por 10 min → 15 mL ACN 1% HAc em ACN		6,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g acetato de sódio	ultrassom 15 min		centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E5_E			agitação mecânica 15 min (150 rpm)		agitação manual 1 min			

A etapa de filtração foi realizada utilizando filtros de nylon de 0,2 µm de tamanho de poro e a diluição foi realizada em água (1:4, v/v).

Tabela 14 - Ensaio realizados para a otimização da etapa de extração baseados no método “QuEChERS modificado”, proposto por Prestes (2011) e combinações com ultrassom e agitação mecânica.

Ensaio		Procedimentos baseados no Método “QuEChERS modificado”						
E6_A	10 g solo	10 mL 1% HAc em ACN	agitação em vórtex 1 min	4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,7 g acetato de sódio	agitação manual 1 min	centrifugação 3400 rpm/8,0 min	1 mL sobrenadante + 600 mg MgSO <sub>4</sub> + 500 mg C18	centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS
E6_B							centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E6_C			agitação em vórtex 1 min		agitação manual 1 min			
E6_D	10 g solo	10 mL água → repouso por 10 min → 10 mL 1% HAc em ACN		4,0 g MgSO <sub>4</sub> + 1,7 g acetato de sódio	ultrassom 15 min		centrifugação 3400 rpm/8,0 min → filtração e diluição → UHPLC-MS/MS	
E6_E			agitação mecânica 15 min (150 rpm)		agitação manual 1 min			

A etapa de filtração foi realizada utilizando filtros de nylon de 0,2 µm de tamanho de poro e a diluição foi realizada em água (1:4, v/v).

A Figura 13 apresenta as etapas realizadas para os ensaios baseados no método “QuEChERS acetato” e “QuEChERS modificado”.

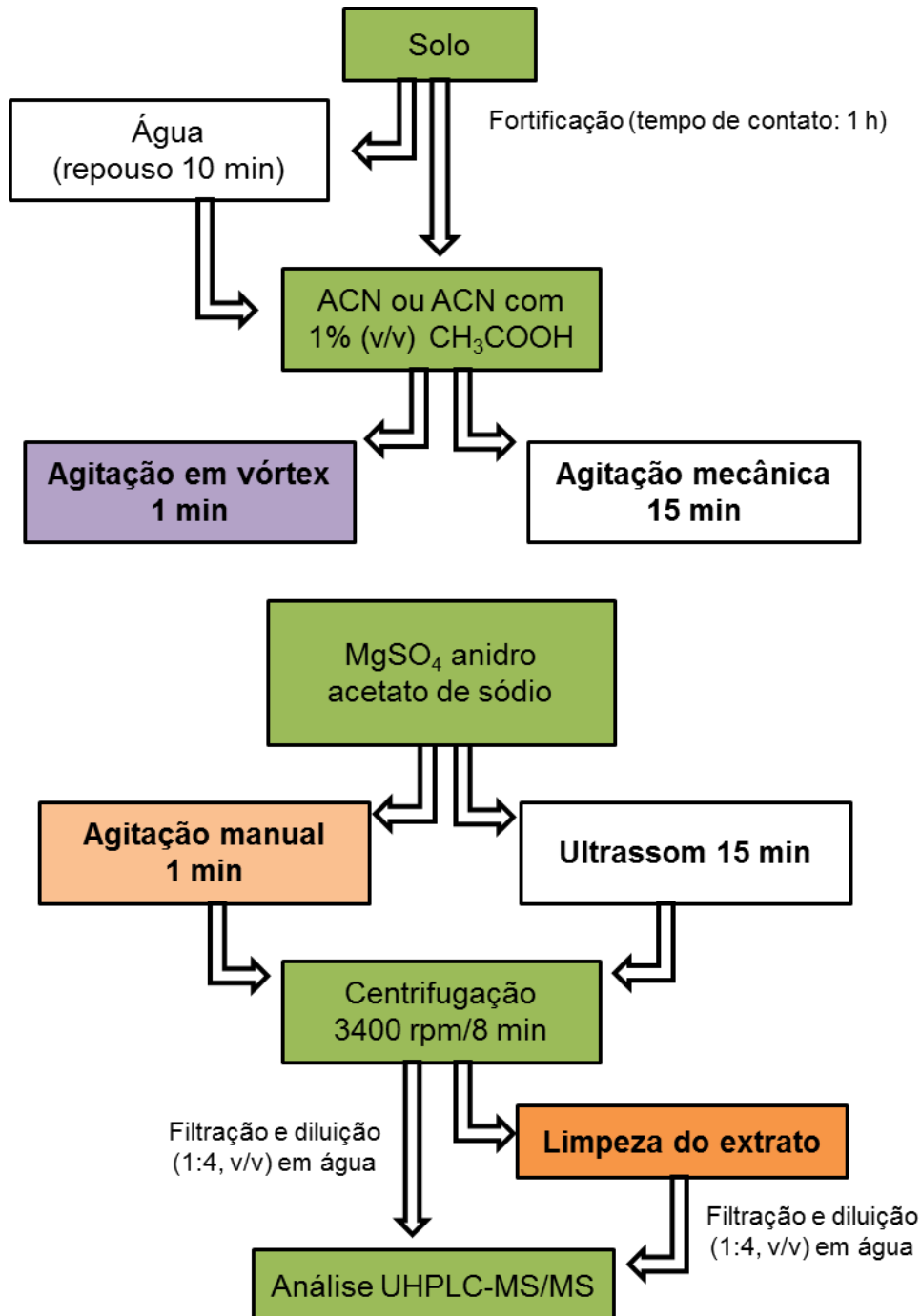


Figura 13 - Representação esquemática das etapas realizadas no preparo da amostra utilizando variações do método “QuEChERS acetato” e “QuEChERS modificado” combinado com ultrassom e agitação mecânica.

### 3.10 Validação do método QuEChERS modificado para análise de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo

Para a validação do método analítico foram utilizados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito matriz, curva analítica e faixa de trabalho, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003; SANCO, 2010).

#### 3.10.1 Seletividade

A avaliação da seletividade do método foi realizada através da comparação dos cromatogramas obtidos por injeções dos extratos de amostras “branco” e extratos de amostras fortificadas no sistema UHPLC-MS/MS. Esta avaliação tem por objetivo verificar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos em estudo. Os solventes e reagentes também foram avaliados, através do procedimento de extração, porém sem a presença de amostra de solo.

#### 3.10.2 Efeito matriz

Algumas considerações devem ser feitas em relação ao efeito matriz quando a espectrometria de massas for empregada como sistema de detecção em associação com a cromatografia líquida, uma vez que a matriz pode causar uma supressão da eficiência de ionização e, conseqüentemente, pode ocorrer uma redução na sensibilidade do método (ROGATSKI; STEIN, 2005).

Os possíveis efeitos da matriz na análise cromatográfica devem ser levados em consideração no desenvolvimento de um método analítico e, por isso foram preparadas curvas analíticas tanto em solvente, como no extrato “branco” da matriz e realizou-se a comparação das áreas obtidas para a avaliação do efeito matriz. A Equação 1 foi utilizada para a realização do cálculo do efeito matriz (GOSETTI *et al.*, 2010; SANCO 2010).

$$\text{EfeitoMatriz\%} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (1)$$

onde:

$X_1$  = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparado no extrato da matriz, em uma dada concentração;

$X_2$  = Média das áreas da solução analítica de cada composto avaliado, preparada em solvente, em uma dada concentração.

Deste modo, é possível verificar se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (diminuição de sinal) sobre o resultado da análise. O efeito matriz começa a exercer influência nas análises quando o resultado for acima de 20% e, então recomenda-se a construção das curvas analíticas no extrato da matriz para minimizar o efeito (GOSETTI *et al.*, 2010; FERRER *et al.*, 2011).

### 3.10.3 Curva analítica e faixa de trabalho

A curva analítica foi obtida a partir das soluções analíticas, contendo todos os agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo, preparadas de acordo com o item 3.6, tanto em solvente, quanto no extrato da matriz solo, nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

As soluções para obtenção das curvas analíticas foram injetadas em triplicata e posteriormente, realizaram-se os cálculos da média das áreas e do RSD (%). Além disso, através dos dados de regressão, obtidos com o auxílio do *software* (MassLynx 4.1) do equipamento, avaliou-se através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), o modelo de calibração mais adequado para ser utilizado (linear ou quadrático) e ainda foi determinada a faixa de trabalho para cada composto analisado por UHPLC-MS/MS.

### 3.10.4 Limite de detecção e limite de quantificação

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas e dos ensaios de fortificação, de cada um dos compostos estudados, procedeu-se a determinação da estimativa do limite de detecção do instrumento ( $LOD_i$ ) e do método ( $LOD_m$ ), bem como do limite de quantificação do instrumento ( $LOQ_i$ ) e do método ( $LOQ_m$ ).

A determinação do  $LOQ_i$  foi realizada adotando-se o menor ponto da curva analítica para cada analito, levando em consideração a relação sinal ruído (INMETRO, 2011). Para isto, foram realizadas injeções de soluções analíticas de diferentes concentrações preparadas em acetonitrila, seguida de diluição 1:4 (v/v) em água. A partir destes valores, o  $LOD_i$  foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o  $LOQ_i$ . Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram expressos em  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

O limite de quantificação do método é considerado como sendo a menor concentração que, fortificada na matriz, apresenta resultados de recuperação entre 70 e 120%, com RSD menor ou igual a 20% (SANCO, 2011).

Para os compostos que não apresentaram resultados satisfatórios no nível de fortificação de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , preparou-se um nível de fortificação extra, na concentração de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ , para ser adotado com o  $LOQ_m$ . Já o limite de detecção foi determinado como sendo a concentração 3,33 vezes menor que o  $LOQ_m$ , obtendo-se os valores de  $LOD_m$  e  $LOQ_m$  em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

### 3.10.5 Ensaios de fortificação e recuperação para avaliação da exatidão

Para avaliar a exatidão, o preparo da amostra foi realizado utilizando um procedimento baseado no método “QuEChERS modificado”, proposto por Prestes (2011). Sendo assim, pesou-se  $10 \pm 0,05$  g de amostra de solo, diretamente em tubos de polipropileno com tampa rosqueável (capacidade de 50 mL), e efetuou-se a fortificação com a mistura dos pesticidas estudados, nas concentrações de 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , adicionando para isso, respectivamente, 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0  $\mu\text{L}$  de uma solução analítica  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Os tubos contendo o solo fortificado foram agitados por 1 min em agitador tipo vórtex e mantidos em repouso por 1 h.

Logo após, adicionou-se 10 mL de água, agitou-se por 1 min e a mistura foi mantida em repouso, por aproximadamente 10 min para hidratação das amostras.

Adicionou-se 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético em cada tubo, e após fechá-los efetuou-se agitação em mesa agitadora por 15 minutos. Em seguida, acrescentou-se 4,0 g de sulfato de magnésio anidro e 1,7 g de acetato de sódio, e agitou-se o tubo manual e vigorosamente por 1 minuto. Após a centrifugação dos extratos a 3400 rpm durante 8 minutos, os extratos foram filtrados e diluídos em água na proporção de 1:4 (v/v) e adicionou-se 20 µL do padrão interno na concentração 1 mg L<sup>-1</sup>. Cabe ressaltar que após a adição do padrão interno, as soluções seguiram diretamente para a análise por UHPLC-MS/MS, ou seja, sem passar por nenhum procedimento de purificação, mesmo se tratando de uma matriz complexa.

Foram realizados ensaios de fortificação utilizando amostras “branco”, isto é, livre da presença dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo, para o estudo da exatidão do método, avaliando-se, assim, a recuperação dos compostos em estudo.

O procedimento de extração das amostras fortificadas foi realizado 6 vezes, para cada um dos níveis de fortificação (10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg kg<sup>-1</sup>) e, cada nível foi injetado uma vez, obtendo-se 6 replicatas (n= 6, 6 extrações x 1 injeção cada).

A exatidão foi calculada com auxílio do *software* (MassLynx 4.1) do equipamento e é expressa em percentagem. O cálculo de recuperação foi realizado de acordo com a Equação 2, conforme recomendações do guia de validação do INMETRO (2011).

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

C<sub>1</sub> = Concentração determinada na amostra fortificada;

C<sub>2</sub> = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C<sub>3</sub> = Concentração teórica.



### 3.10.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do instrumento foi avaliada através de quatro injeções, no sistema UHPLC-MS/MS, de cada concentração das soluções analíticas preparadas no extrato da matriz.

Para avaliar a precisão do método, em termos de repetibilidade ( $RSD_r$ ), foram realizadas sete extrações de cada nível de fortificação e cada extrato foi injetado uma vez ( $n = 7$ ).

A precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) do método foi avaliada realizando o procedimento analítico em dias diferentes, através da injeção da curva analítica e das amostras “branco” fortificadas no nível intermediário  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

A precisão foi avaliada a partir de um valor numérico obtido da fórmula do desvio padrão relativo (RSD), conforme a Equação 3.

$$RSD (\%) = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

$s$  = estimativa de desvio padrão absoluto;

$s = \{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$ ;

$x_i$  = valores individuais;

$x_m$  = média das medidas em replicatas;

$N$  = número de medidas.

### 3.11 Aplicação do método

A aplicação do método desenvolvido e validado foi realizada em quatorze (14) amostras coletadas em áreas experimentais de cultivo de arroz, soja e pastagem onde são aplicados agrotóxicos. A coleta foi realizada da mesma forma que foram coletadas as amostras de solo “branco”. As amostras foram coletadas em Santa Maria-RS, no mês de junho de 2013.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Otimização do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para a determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo

O trabalho foi desenvolvido utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em série (UHPLC-MS/MS), empregando analisador Triplo Quadrupolo.

As condições empregadas no sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados neste estudo estão descritas a seguir:

- ⇒ Cromatografia em fase reversa utilizando coluna analítica ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm);
- ⇒ Fase móvel: água : metanol (98:2, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico (A) e metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico (B);
- ⇒ Gradiente de eluição: 95% (A) e 5% (B) de 0 a 0,25 min; alternando até atingir 100% (B) em 7,75 min (permanecendo até 8,50 min); alternando até 95% (A) e 5% (B) em 8,51 min (permanecendo até 10 min), conforme apresentado na Tabela 15;

Tabela 15 - Gradiente de fase móvel utilizado para a eluição dos compostos.

Tempo (min)	% A	% B
0,00	95	5
0,25	95	5
7,75	0	100
8,50	0	100
8,51	95	5
10,00	95	5

A: água: metanol (98:2, v/v), acidificada com 0,1% de ácido fórmico; B: metanol acidificado com 0,1% de ácido fórmico.

- ⇒ Vazão da fase móvel: 0,225 mL min<sup>-1</sup>;
- ⇒ Volume de injeção: 10 µL;
- ⇒ Fonte de ionização: ESI;
- ⇒ Detector: Espectrômetro de massas, do tipo Triplo Quadrupolo, operando no modo MS/MS;
- ⇒ Tempo da análise cromatográfica: 10 min.

#### **4.2 Condições de análise por UHPLC-MS/MS para determinação de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo**

Os principais parâmetros do sistema cromatográfico UHPLC-MS/MS foram otimizados previamente no LARP-UFSM e as condições utilizadas para a otimização do método e análise dos agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de solo estão descritas a seguir.

- ⇒ Temperatura da coluna: 40 °C;
- ⇒ Pressão: 15000 psi;
- ⇒ Voltagem capilar: 2,0 kV;
- ⇒ Temperatura de dessolvatação: 500 °C;
- ⇒ Vazão do gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>): 600 L h<sup>-1</sup>;
- ⇒ Vazão do spray: 80 L h<sup>-1</sup>;
- ⇒ Vazão do gás colisão (Argônio): 0,15 mL min<sup>-1</sup>;
- ⇒ Temperatura da fonte: 150 °C.

Os agrotóxicos e medicamentos veterinários que foram analisados por UHPLC-MS/MS, utilizando o modo de ionização ESI (+), com exceção de 2,4-D, cloranfenicol e fipronil que utilizam ESI (-), e modo de aquisição SRM estão listados na Tabela 16, com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), faixas de retenção, íons precursores, íons produto e energia de colisão das transições monitoradas. Como apresentado na Tabela 16, foram selecionadas duas transições características para cada composto, sendo a transição mais intensa (mais estável)

utilizada para a quantificação dos compostos e a segunda transição mais intensa para a confirmação dos mesmos.

Tabela 16 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS com o respectivo tempo de retenção ( $t_R$ ), faixa de retenção, íon precursor, íon produto e energia de colisão.

(continua)

Compostos	$t_R$ (min)	1ª transição Quantificação			2ª transição Confirmação		
		Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)
Atrazina	5,37	216,1	174,1	23	216,1	96,1	18
Azoxistrobina	5,86	404,0	329,0	30	404,0	372,0	15
Bentazona	4,96	241,1	107,2	26	241,1	199,1	12
Bispiribaque-sódico	6,04	431,3	275,2	20	431,3	196,1	14
Bitertanol	6,87	338,1	99,1	8	338,1	70,1	16
Boscalida	5,90	342,9	307,0	20	342,9	139,9	20
Bromoconazole	6,50	376,0	158,9	25	376,0	70,1	35
Buprofezina	7,01	306,1	201,0	20	306,1	57,4	12
Carbaril	5,02	202,0	145,0	28	202,0	117,0	22
Carbendazina	2,06	192,0	160,1	28	192,0	132,1	18
Carbofurano	4,81	222,1	165,1	16	222,1	123,0	16
Carbofurano 3-OH	3,56	238,0	163,0	16	238,0	181,0	10
Cianazina	4,30	241,0	214,0	25	241,0	96,0	17
Clomazone	5,65	240,0	89,0	46	240,0	125,0	18
Cloranfenicol	3,80	321,0	152,1	18	321,0	257,1	12
Clorpirifós etílico	7,40	349,9	97,0	32	349,9	198,0	20
Clorpirifós-metílico	6,99	321,8	289,0	20	321,8	125,0	16
Clorprofam	6,48	214,1	154,0	18	214,1	172,0	8
Diazinona	6,70	305,1	96,9	35	305,1	169,0	22
Diclofluanida	6,30	330,2	123,0	17	330,2	141,0	18
Difenoconazole	7,04	406,0	251,1	60	406,0	111,1	25
Dimetoato	3,22	230,1	199,0	20	230,1	125,0	10
Epoxiconazole	6,30	330,0	101,0	50	330,0	121,0	22
Fempropatrina	7,60	350,1	97,0	34	350,1	125,0	14
Fempropimorfe	5,60	304,2	147,1	30	304,2	57,2	28
Fenarimol	6,30	331,0	268,0	34	331,0	81,0	22
Fentiona	6,67	279,1	169,1	16	279,1	247,1	13
Fipronil	6,50	435,3	330,2	26	435,3	250,1	16
Fluroxipir	4,50	254,9	208,8	22	254,9	180,8	16
Flutolanil	6,00	324,1	65,0	40	324,1	262,1	18
Imidacloprido	3,10	256,1	175,1	20	256,1	209,1	15

Tabela 16 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS com o respectivo tempo de retenção ( $t_R$ ), faixa de retenção, íon precursor, íon produto e energia de colisão.

(continuação)

Compostos	$t_R$ (min)	1ª transição Quantificação			2ª transição Confirmação		
		Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)
Iprovalicarbe	6,20	321,1	119,1	16	321,1	203,1	10
Linurom	6,20	249,1	160,1	18	249,1	181,1	16
Linurom d6 (PC)	5,84	255,3	160,0	20	255,3	185,5	17
Malationa	6,00	331,0	99,0	24	331,0	127,0	12
Mecarbam	6,30	330,0	97,0	35	330,0	227,1	8
Mepronil	6,00	270,1	91,0	44	270,1	119,0	28
Metaconazole	6,80	320,1	125,0	22	320,1	70,0	36
Metalaxil	5,40	280,1	192,1	17	280,1	220,1	13
Metiocarbe sulfona	3,50	258,1,0	107,1	15	258,1	122,1	38
Metiocarbe sulfóxido	3,70	242,0	185,0	28	242,0	122,0	14
Metsulfurom metílico	4,70	382,0	167,0	16	382,0	198,9	22
Mevinfós	3,57	225,1	127,1	15	225,1	193,1	8
Miclobutanil	6,10	289,1	70,2	18	289,1	125,1	32
Monesina	8,30	693,5	461,4	50	693,5	479,5	52
Monocrotófos	2,47	224,1	127,1	12	224,1	98,1	16
Monolinurom	4,96	215,0	99,0	34	215,0	126,0	22
Paraoxon metílico	4,30	248,0	90,0	25	248,0	202,0	19
Piraclostrobina	6,70	388,1	163,0	25	388,1	193,9	12
Pirazofós	6,80	374,0	194,0	32	374,0	222,1	22
Piridaben	7,80	365,1	147,1	24	365,1	309,1	12
Piridafentiona	6,10	341,0	92,0	34	341,0	189,0	22
Piridato	8,00	379,0	207,0	18	379,0	351,1	10
Pirimetanil	5,11	200,0	82,0	24	200,0	107,0	24
Pirimicarbe	3,56	239,1	72,0	18	239,1	182,1	15
Pirimifós metílico	6,60	306,1	108,1	32	306,1	162,1	22
Profenofós	7,20	372,9	127,9	40	372,9	302,6	20
Profoxidim	7,90	466,4	238,2	19	466,4	280,2	16
Propargito	7,59	368,0	175,0	15	368,0	231,0	15
Propiconazole	6,70	342,0	69,0	22	342,0	159,0	34
Propizamida	6,47	256,2	156,1	15	256,2	190,1	15
Propoxur	4,76	210,0	111,0	16	210,0	168,0	10
Quinoxifeno	7,40	308,0	161,9	44	308,0	197,0	32
Robenidina	6,30	372,2	159,0	32	372,2	172,1	48
Salbutamol	0,80	240,2	121,0	30	240,2	148,1	20
Salinomicina	8,50	773,6	403,4	61	773,6	431,4	50
Simazina	4,73	202,0	96,0	22	202,0	124,0	16
Sulfadimetoxina	3,80	311,1	92,0	32	311,1	156,0	20

Tabela 16 - Agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS com o respectivo tempo de retenção ( $t_R$ ), faixa de retenção, íon precursor, íon produto e energia de colisão.

Compostos	$t_R$ (min)	1ª transição Quantificação			2ª transição Confirmação			(conclusão)
		Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de colisão (V)	
		Sulfametazina	2,70	279,1	92,0	28	279,1	186,0
Sulfatiazol	2,00	256,0	92,0	25	256,0	156,0	15	
Tebuconazole	6,60	308,0	70,1	22	308,0	125,0	40	
Terbutilazina	6,00	230,0	96,0	28	230,0	174,0	16	
Terbutilazina	6,00	230,0	96,0	28	230,0	174,0	16	
Tetraconazole	6,30	372,0	70,1	20	372,0	159,0	30	
Tiacloprido	3,80	253,0	90,1	40	253,0	126,0	20	
Tiamethoxam	2,70	292,0	132,0	22	292,0	211,2	12	
Tiodicarbe	5,00	355,0	87,9	16	355,0	107,9	16	
Tolcofos metil	6,80	301,1	125,0	17	301,1	174,9	29	
Triadimefom	6,10	294,1	69,3	20	294,1	197,2	15	
Triadimenol	6,20	296,1	70,2	10	296,1	99,1	15	
Triazofós	6,20	314,1	118,9	35	314,1	161,9	18	
Triclorfom	3,20	256,9	127,0	17	256,9	257,0	5,0	
Trifenilfosfato (PI)	6,70	327,2	152,1	37	327,2	215,2	28	
Trifloxistrobina	7,30	409,0	145,0	40	409,0	186,0	16	
Triflumizole	6,70	346,0	60,0	10	346,0	277,9	10	
Trimetroprima	2,60	291,0	123,0	27	291,0	230,0	25	
Vamidationa	3,40	288,0	118,0	28	288,0	146,0	10	

PC: Padrão de controle; PI: Padrão interno

As Figuras 14 e 15 apresentam, respectivamente, os cromatogramas obtidos por UHPLC-MS/MS para a solução analítica preparada no solvente (acetonitrila) e no extrato “branco” da matriz de solo contendo os agrotóxicos e medicamentos veterinários em estudo na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Analisando as Figuras 14 e 15 é possível observar que vários compostos co-eluíram, pois apresentaram tempos de retenção muito próximos. Isso ocorre devido ao grande número de compostos analisados em um pequeno período de tempo e à complexidade da matriz.

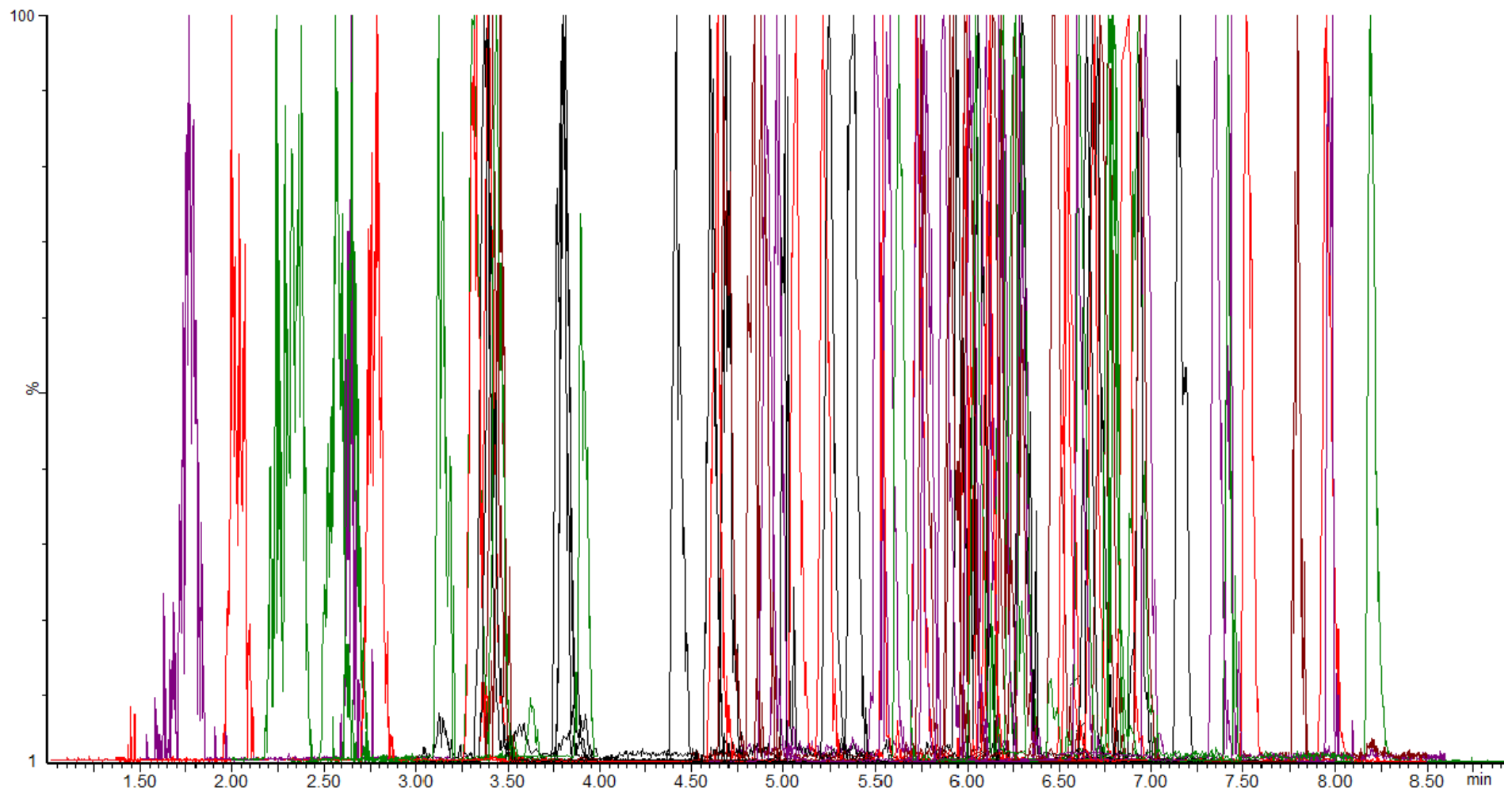


Figura 14 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS para uma solução analítica ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada em acetonitrila contendo os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados.



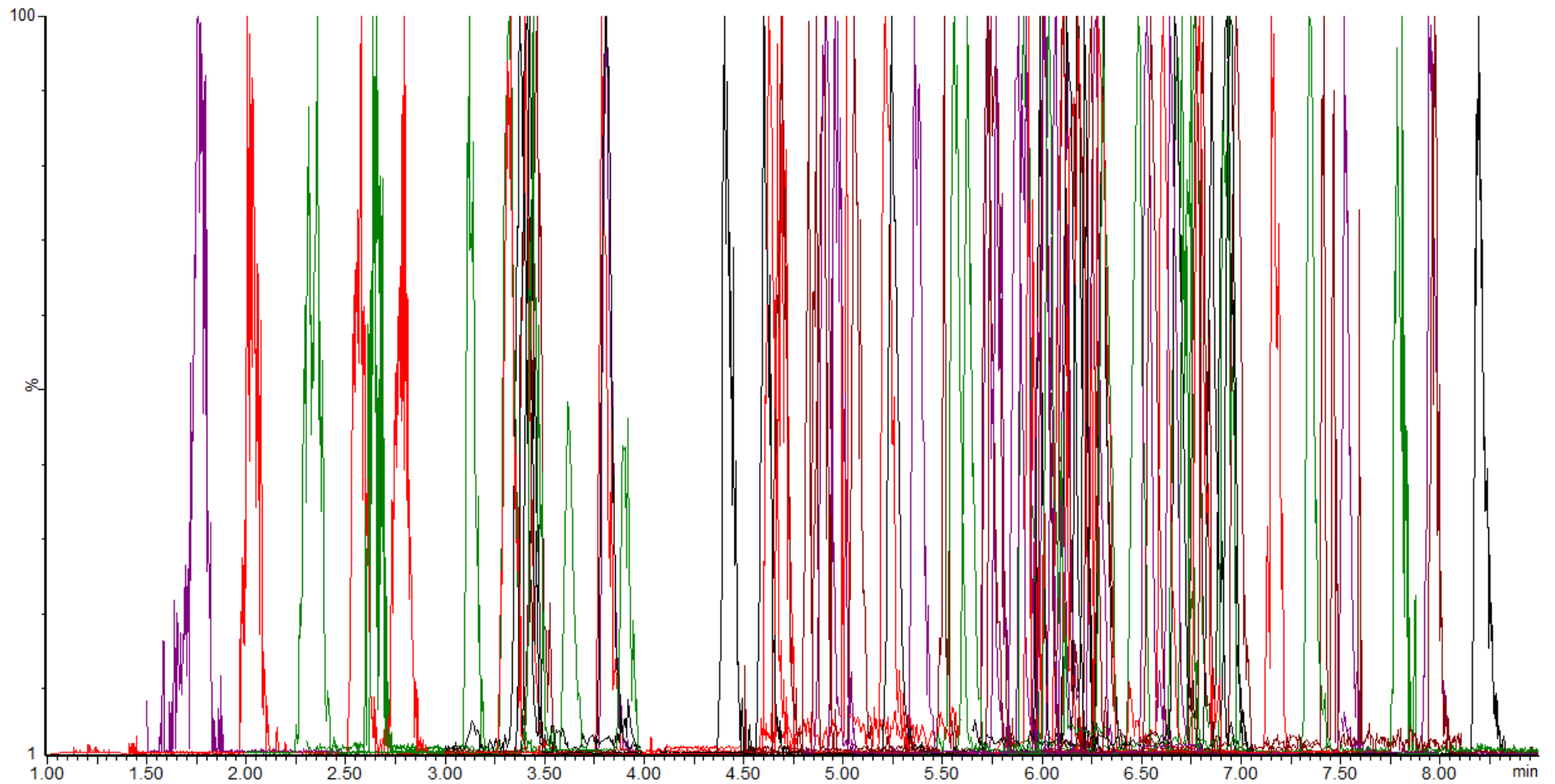


Figura 15 - Cromatograma obtido por UHPLC-MS/MS para uma solução analítica ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ), preparada no extrato “branco” da matriz solo, obtido pelo método descrito no item 3.10.5, contendo os agrotóxicos e medicamentos veterinários avaliados.

Análises como esta, quando a resolução dos cromatogramas não é adequada, podem ser um problema para a Cromatografia Líquida com detectores tradicionais, como por exemplo, detector ultravioleta (UV) ou até mesmo detector de arranjo de diodos (DAD), os quais não são seletivos suficientes quando as diferenças espectrais são pequenas, prejudicando a quantificação (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005; PICÓ *et al.*, 2004). No entanto, a combinação da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com a Espectrometria de Massas em Série pode contornar estes problemas de separação cromatográfica, pois agrega às vantagens da Cromatografia, como a alta seletividade e eficiência de separação, as vantagens da Espectrometria de Massas em série, como a informação estrutural e seletividade (VÉKEY, 2001). O emprego do modo de aquisição SEM com as transições apresentadas na Tabela 16 permite a quantificação dos analíticos, mesmo quando os picos cromatográficos estão sobrepostos.

#### **4.3 Avaliação dos métodos de extração**

A avaliação dos ensaios de extração realizados neste estudo foi realizada utilizando amostras “branco” de solo, fortificadas na concentração  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  e cada ensaio foi realizado em triplicata. Após a fortificação, as amostras foram mantidas em repouso por 1 hora antes de realizar o procedimento de extração (PRESTES *et al.*, 2012).

Com base na literatura, diferentes técnicas de extração foram utilizadas como, por exemplo, ultrassom (LESEUER *et al.*, 2008, PRESTES *et al.*, 2012), agitação mecânica (KVICALOVÁ *et al.* 2012; PRESTES *et al.*, 2012) e QuEChERS (DONG, 2009; MEI, 2011; PADILLA-SANCHEZ, 2010; RASHID, 2010), a fim de verificar qual o melhor procedimento de extração dos compostos da amostra de solo e limpeza do extrato, conforme as especificações do item 3.10.

A acetonitrila foi utilizada como solvente de extração em todos os ensaios (ultrassom, agitação mecânica e método QuEChERS), pois esta proporciona a extração de uma ampla faixa de compostos com diferentes polaridades e, quando acidificada, permite recuperações satisfatórias de agrotóxicos que geralmente apresentam problemas de estabilidade. Vale destacar que a acetonitrila não é

classificada como um agente carcinogênico e não é persistente no meio ambiente e, sua baixa volatilidade diminui a exposição do analista (ANASTASSIADES *et al.*, 2003). Além disso, é mais adequada para trabalhar com cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série, que acetona ou acetato de etila (PRESTES *et al.*, 2009).

A partir destes ensaios foram avaliados quais dos métodos de extração apresentaram os melhores valores de recuperações para os compostos em estudo.

#### 4.3.1 Avaliação do método utilizando ultrassom

Inicialmente, realizou-se os ensaios utilizando apenas acetonitrila com diferentes tempos de exposição da amostra ao ultrassom, conforme descrito no item 3.9.1. Os resultados destes ensaios estão identificados pela letra A na Figura 16. Em seguida, estes ensaios foram repetidos adicionando uma quantidade de água purificada, a fim de hidratar a amostra antes da adição de acetonitrila e estes resultados podem ser visualizados na Figura 16 e, estão identificados pela letra B.

Como pode-se observar, os resultados dos ensaios estão apresentados em termos de recuperação dos analitos.

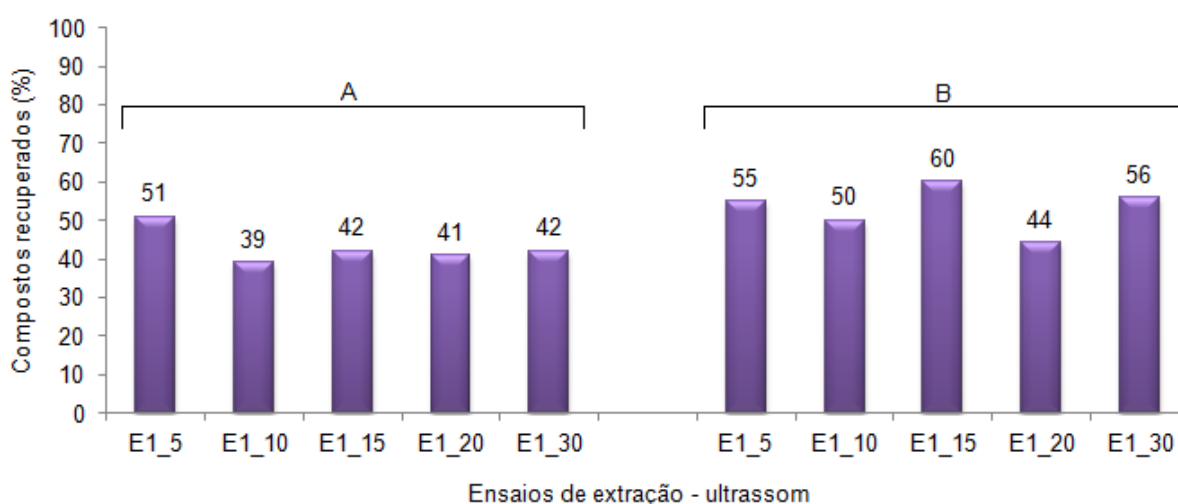


Figura 16 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD  $\leq$  20% obtidos para os ensaios (E1) de extração utilizando ultrassom (A: sem a adição de água e B: com a adição de água).

Nos dois casos, foi utilizado o sulfato de magnésio com o objetivo de garantir a ausência de água nos primeiros ensaios (A) e de reduzir o volume de fase aquosa nos últimos ensaios (B), facilitando a migração dos analíticos polares para a fase orgânica.

Avaliando os resultados obtidos pela extração dos compostos utilizando ultrassom é possível verificar que os resultados não foram satisfatórios, uma vez que a porcentagem de compostos que apresentaram recuperações na faixa de 70 e 120% e  $RSD \leq 20\%$  não ultrapassou 60%. Ainda é possível observar que os ensaios que utilizaram uma etapa de hidratação da amostra, antes da adição de acetonitrila apresentaram um aumento do número de compostos que recuperaram na faixa esperada, sendo que o ensaio que apresentou o maior percentual de compostos recuperados (60%) foi utilizando o tempo de ultrassom de 15 min.

#### 4.3.2 Avaliação dos ensaios de extração utilizando agitação mecânica

Os ensaios de extração utilizando agitação mecânica seguiram os mesmos objetivos dos ensaios que fizeram uso de ultrassom. Avaliou-se os diferentes tempos de agitação da amostra e a influência da adição de água à amostra antes da adição de acetonitrila, conforme descrito no item 3.9.2. Sulfato de magnésio também foi utilizado para a remoção de água do sistema.

Os resultados de recuperação dos ensaios realizados com agitação mecânica estão apresentados na Figura 17, sendo que a letra A identifica os ensaios realizados sem a adição de água e a letra B identifica os ensaios com a adição da mesma.

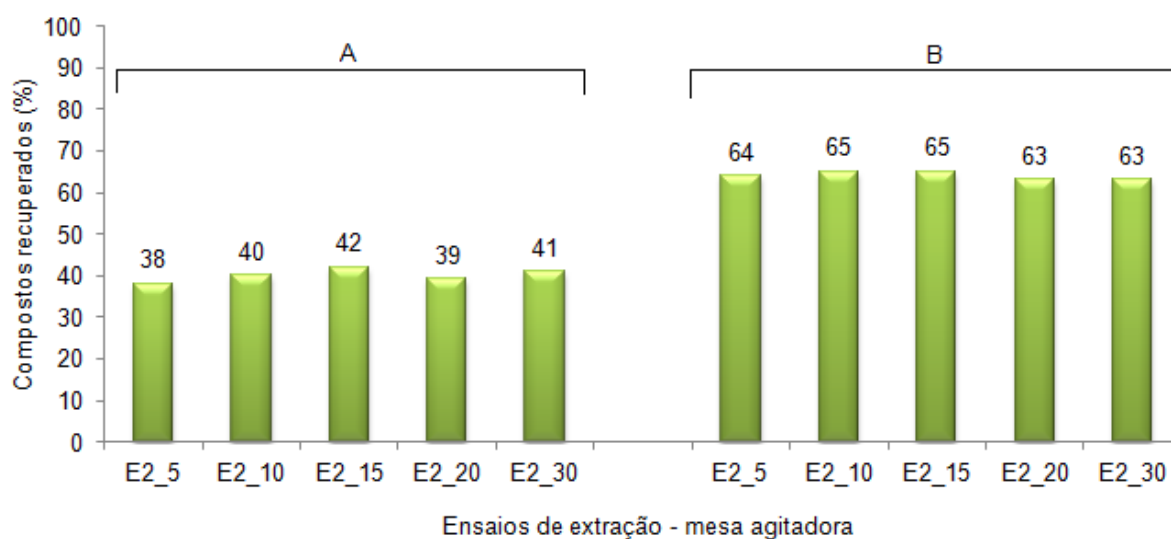


Figura 17 - Percentual de compostos que apresentaram recuperações médias entre 70 e 120% e RSD  $\leq$  20% obtidos para os ensaios (E2) de extração utilizando agitação mecânica, sendo A sem adição de água e B com adição de água.

Analisando a Figura 17, observou-se que a os ensaios realizados utilizando agitação mecânica e acetonitrila não apresentaram bons resultados, sendo que a porcentagem de compostos, que apresentaram recuperação entre 70 e 120%, ficou em torno de 40%. Além disso, pode-se observar um aumento considerável no número de compostos recuperados com a utilização de água antes da adição de acetonitrila na etapa de extração, sendo que estes ensaios permitiram que em torno de 65% dos compostos apresentassem recuperações na faixa esperada.

#### 4.3.3 Avaliação dos ensaios de extração utilizando o método QuEChERS

Os ensaios iniciais utilizando o método QuEChERS foram baseados nos procedimentos descritos na Figura 3 (QuEChERS original; QuEChERS citrato; QuEChERS acetato e QuEChERS modificado) e descritos nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, identificados como E3\_A, E4\_A, E5\_A e E6\_A. Na sequência, com o objetivo de avaliar a necessidade das etapas de limpeza dos extratos em cada ensaio realizado, os mesmos testes foram repetidos, excluindo-se esta etapa do procedimento, conforme descrito nos ensaios E3\_B, E4\_B, E5\_B e E6\_B das mesmas Tabelas. Os resultados destes testes iniciais estão demonstrados na Figura 18.

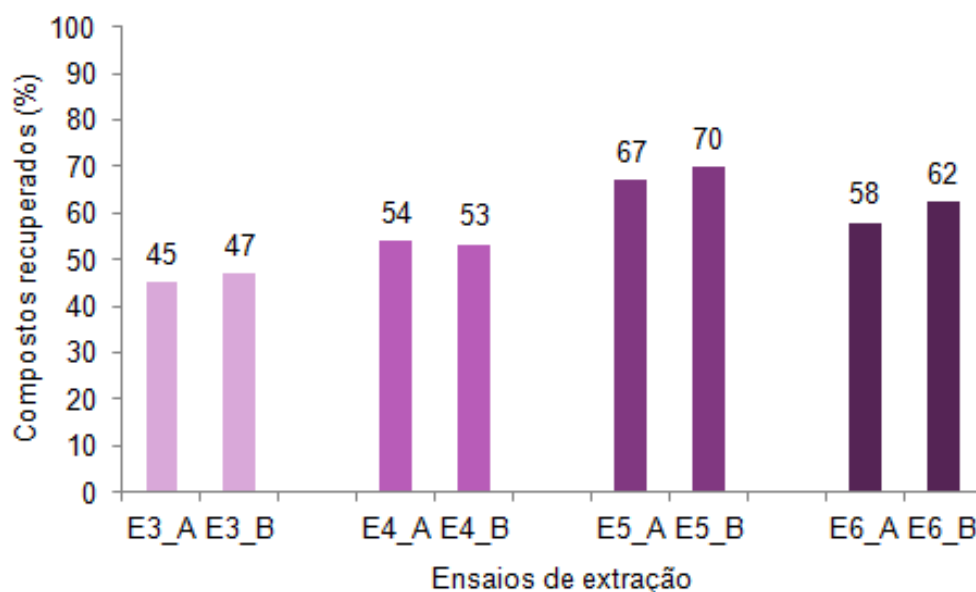


Figura 18 - Resultados em porcentagem do número de compostos com recuperação entre 70 e 120% e RSD  $\leq$  20% nos ensaios iniciais utilizando o método QuEChERS original (E3), QuEChERS citrato (E4), QuEChERS acetato (E5) e QuEChERS modificado (E6), sendo que A representa os ensaios utilizando etapa de limpeza e B sem a utilização de limpeza dos extratos.

Observando a Figura 18, é possível verificar que em todos os pares de ensaio realizados, não houve grandes variações no percentual de compostos recuperados e que dos 4 tipos de ensaios realizados, 3 deles apresentaram melhores resultados nos procedimentos que não realizaram a etapa de limpeza dos extratos, sendo eles, E3\_B, E5\_B e E6\_B. Com isso, pode-se dizer que o processo de preparo da amostra utilizando os adsorventes dispersivos não apresentaram influência significativa na purificação dos extratos e recuperações dos analitos avaliados. O sorvente PSA retém as interferências da matriz por possuir uma estrutura bidentada que apresenta um elevado efeito quelante, devido à presença dos grupos amino primário e secundário. Como resultado, a retenção de ácidos graxos livres, açúcares, alguns pigmentos de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2012). Por outro lado, C18 é um sorvente de fase reversa que é efetivo na remoção de amido e açúcar de algumas amostras (KOESUKWIWAT, 2008). Estes tipos de coextrativos não devem estar presentes nos extratos de solo e, portanto, o processo de limpeza não aumentou os valores de recuperação.

Com base nestes resultados, conclui-se que a etapa de limpeza dos extratos não se faz necessária, podendo ser eliminada do processo e diminuindo o tempo de realização do procedimento, uma vez que diminui o tempo de pesagem dos sais e adsorventes e o tempo de agitação e centrifugação da amostra.

Além disso, vale destacar que os melhores resultados foram obtidos utilizando o método “QUEChERS acetato” e “QUEChERS modificado”, com valores de porcentagem de compostos que recuperaram entre 70 e 120% em torno de 70 e 60%, respectivamente.

De posse destes resultados iniciais, foram realizados novos ensaios sem a utilização da etapa de limpeza dos extratos e avaliou-se a adição de água ao solo, antes de ser acrescentada a acetonitrila na etapa de extração, conforme os ensaios E3\_C, E4\_C, E5\_C e E6\_C, descritos nas Tabelas 11, 12, 13 e 14. A Figura 19 apresenta os resultados dos ensaios com a adição de água (C) e a fim de comparação, apresenta novamente os resultados dos ensaios que não utilizam água (B).

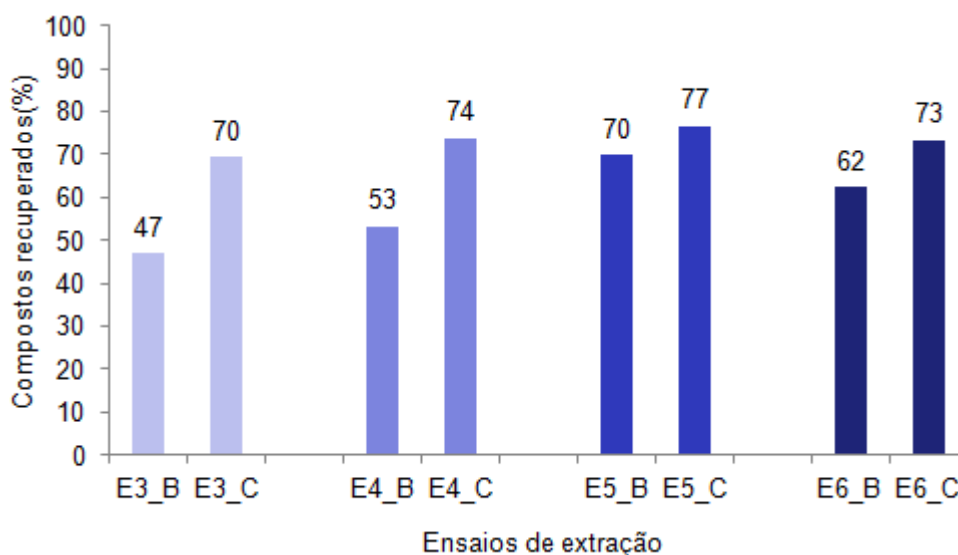


Figura 19 - Percentual de compostos que apresentaram faixas de recuperação de 70-120% e RSD  $\leq$  20% nos ensaios realizados sem a utilização de água (B) e com a adição de água (C), com o procedimento realizado sem a etapa de limpeza dos extratos, sendo método QuEChERS original (E3), QuEChERS citrato (E4), QuEChERS acetato (E5) e QuEChERS modificado (E6).

A adição de água às amostras antes da etapa de extração é utilizada para enfraquecer as interações dos analitos com a matriz e garantir a partição adequada em amostras secas (BRAGANÇA, 2012).

Com base nos resultados apresentados na Figura 19, observa-se que nos ensaios onde ocorreu a hidratação da amostra, o número de compostos que apresentaram valores satisfatórios de recuperação, foi maior que nos ensaios onde não houve a adição de água às amostras, chegando a 77% dos compostos recuperados na faixa entre 70 e 120% utilizando o método “QuEChERS acetato”.

A utilização de  $MgSO_4$  tem a finalidade de melhorar a recuperação de pesticidas polares (ANDERSSON & PALSHEDEN, 1991) e reter água do sistema. Além de reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, tendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra durante as etapas de extração/partição, favorecendo a extração, especialmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES, 2003).

Após estes testes iniciais, onde ficou definido que os melhores ensaios foram obtidos sem a etapa de limpeza dos extratos e adicionando água às amostras antes da etapa de extração, realizou-se novos ensaios utilizando duas técnicas de extração no mesmo procedimento de preparo da amostra.

Foram testados os diferentes métodos QuEChERS incluindo uma etapa de ultrassom de 15 min (ensaios E3\_D, E4\_D, E5\_D e E6\_D) e utilizando agitação mecânica por 15 min (ensaios E3\_E, E4\_E, E5\_E e E6\_E), conforme descrito nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, sendo que o tempo de 15 minutos foi escolhido por ter apresentado os melhores resultados de recuperação nos ensaios E1 e E2.

Na Figura 20 estão apresentados os resultados dos ensaios descritos anteriormente e, para fins de comparação, também estão apresentados novamente os ensaios realizados com a adição de água e sem etapa de limpeza dos extratos que foram realizados utilizando agitação em vórtex por apenas 1 min, demonstrados pela letra C.



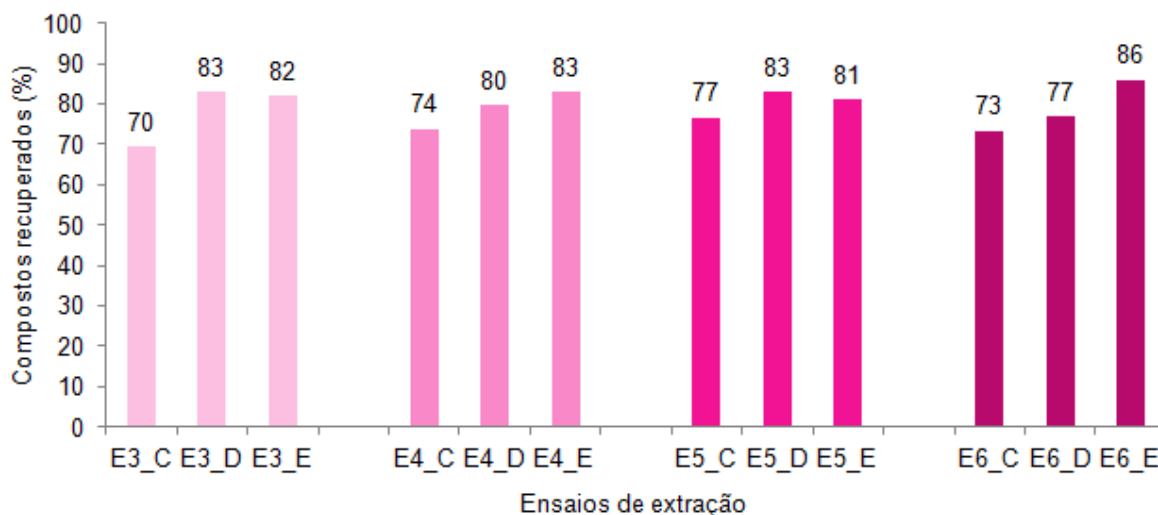


Figura 20 - Resultados do percentual de compostos recuperados na faixa de 70 e 120% e RSD  $\leq$  20% utilizando os diferentes métodos QuEChERS (3: original; 4: citrato; 5: acetato; 6: modificado) com adição de água e sem etapa de limpeza dos extratos, sendo C: agitação em vórtex por 1 min, D: ultrassom por 15 min e E: agitação mecânica por 15 min.

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram um aumento do número de compostos recuperados na faixa de 70 a 120% com a utilização de agitação mecânica e ultrassom por 15 minutos em todos os diferentes métodos QuEChERS utilizados. Além disso, vale ressaltar que o ensaio E6\_E (baseado no método “QuEChERS modificado e 15 minutos de agitação mecânica) apresentou o maior percentual de compostos que apresentaram recuperações satisfatórias, com 86% e portanto foi o ensaio escolhido para a realização da validação.

A Figura 21 apresenta os dados apresentados de uma maneira diferente, ou seja, agrupados de acordo com o método QuEChERS utilizado, sendo que 1 representa os ensaios baseados no método “QuEChERS original”, na sequência descrita na Tabela 11, 2 representa os ensaios baseados no método “QuEChERS citrato”, descritos na Tabela 12, 3 representa os ensaios utilizando “QuEChERS acetado”, descritos na Tabela 13 e 4 representa os ensaios utilizando o método “QuEChERS modificado”, conforme descrito na Tabela 14.

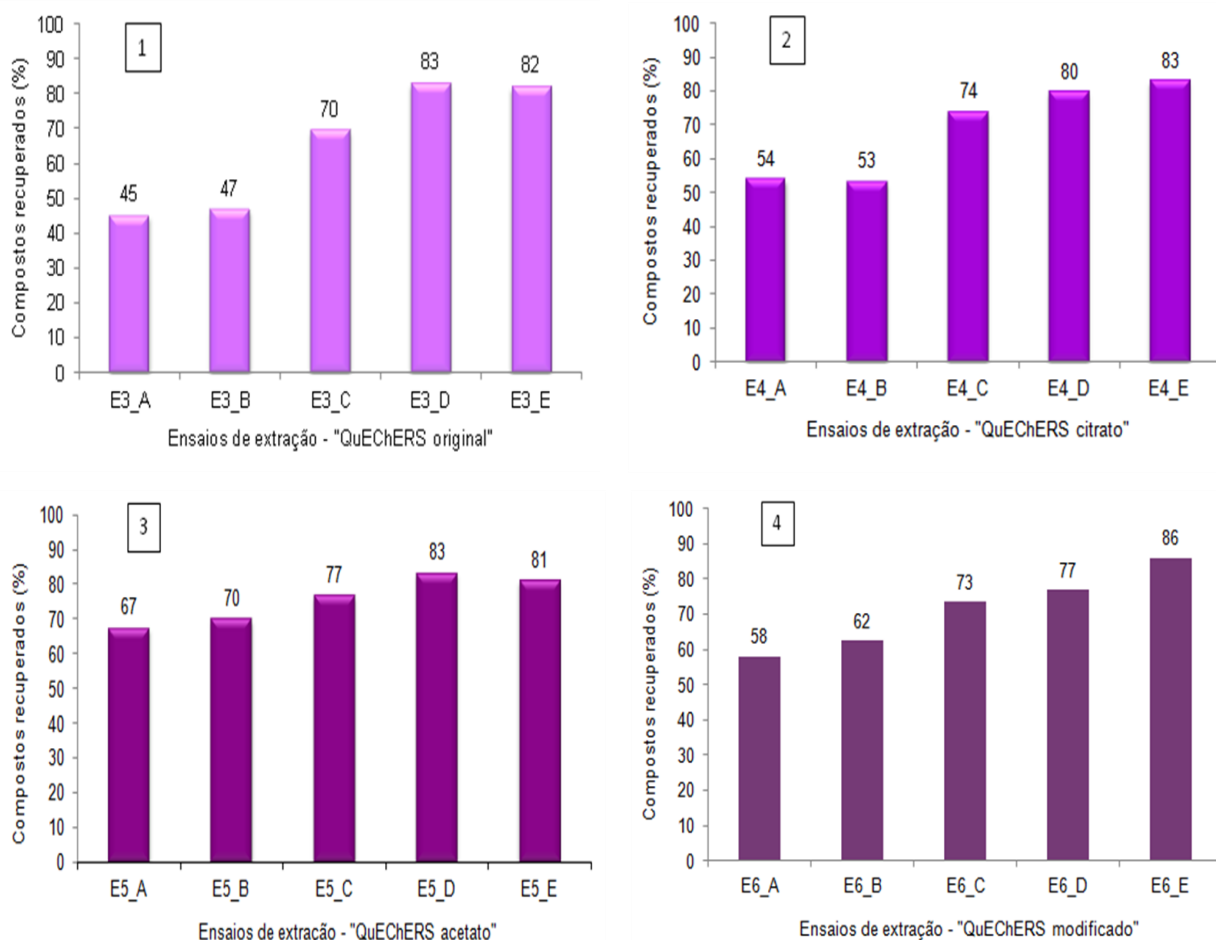


Figura 21 - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios baseados no método QuEChERS original (1), QuEChERS citrato (2), QuEChERS acetato (3) e QuEChERS modificado (4), realizados conforme descritos nas Tabelas 11, 12, 13 e 14, respectivamente.

De acordo com os resultados apresentados, as melhores condições empregadas foram: procedimento baseado no método "QuEChERS modificado", com adição de água purificada à amostra, seguido de extração com acetonitrila acidificada com ácido acético, com agitação mecânica por 15 min, utilizando sulfato de magnésio e acetato de sódio na etapa de partição e sem limpeza dos extratos. Um fluxograma com as condições selecionadas está apresentado na Figura 22.

#### 4.4 Validação do Método QuEChERS modificado para a análise de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários

A validação do método QuEChERS foi realizada utilizando UHPLC-MS/MS seguindo o procedimento descrito na Figura 22 na qual foram avaliados os agrotóxicos e medicamentos veterinários listados na Tabela 8.

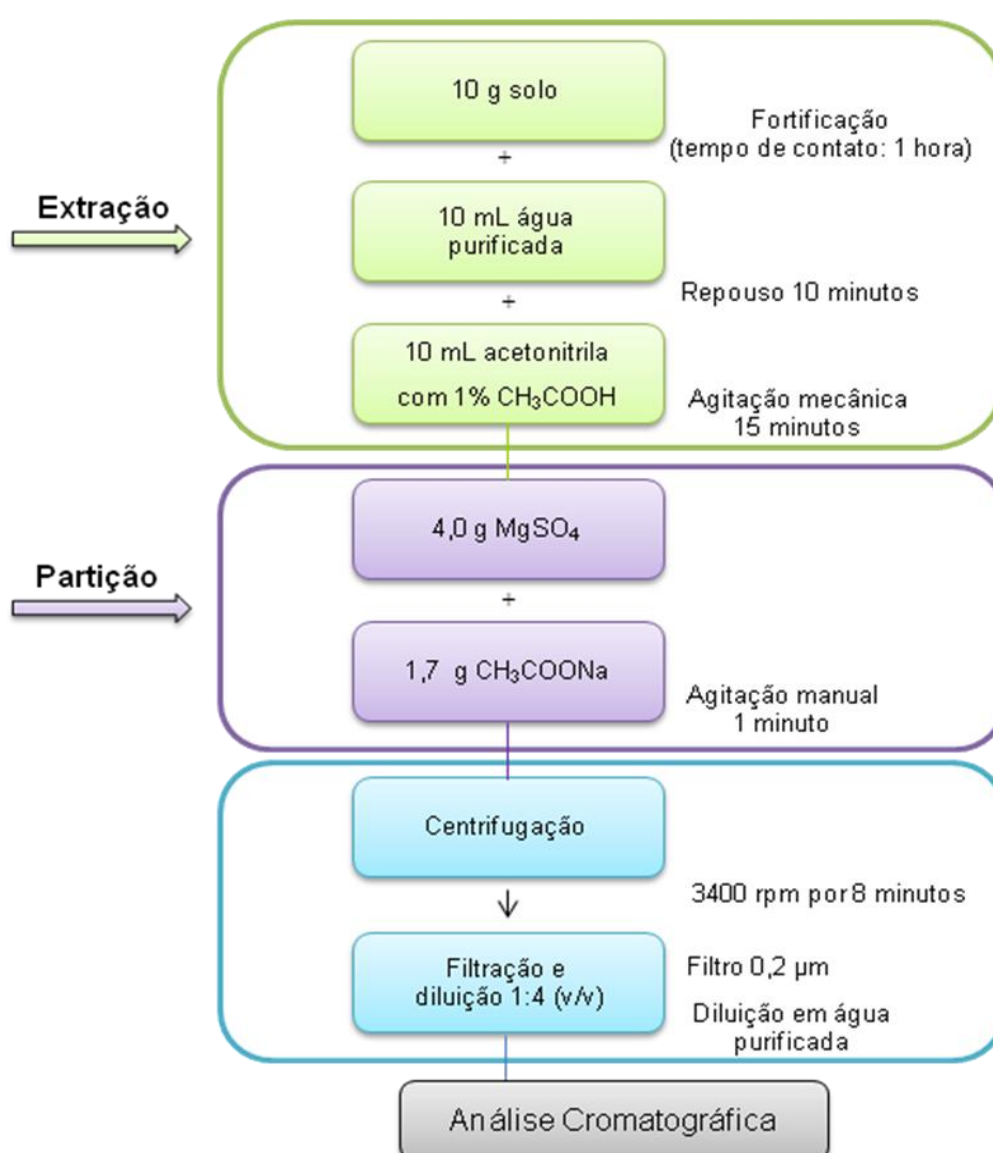


Figura 22 - Representação do método QuEChERS modificado utilizado para extração dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras solo.

Todas as soluções analíticas empregadas neste estudo foram preparadas em acetonitrila e no extrato branco da matriz solo. Deste modo, foi possível avaliar o efeito da presença do extrato da matriz na determinação dos valores de LOD e LOQ, tanto do instrumento quanto do método, da linearidade das curvas analíticas (faixa linear, equação da curva e coeficiente de determinação), uma vez que o efeito matriz pode influenciar nos resultados. Além disso, vale ressaltar que os níveis de fortificação na matriz 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , correspondem no solvente a 2,0; 5,0; 10,0 e 20,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , devido à diluição do extrato (1:4) em água. Sendo assim, a validação do método QuEChERS desenvolvido foi realizada segundo os parâmetros descritos a seguir;

#### 4.4.1 Seletividade

A partir dos resultados das análises, é possível afirmar que não existem interferentes com mesmos íons de quantificação e confirmação no tempo de retenção dos analitos avaliados na amostra de solo “branco” garantindo, assim, a seletividade do método desenvolvido.

A partir da análise dos solventes e reagentes, sem a presença da amostra de solo também verificou-se a ausência de contaminantes que poderiam interferir na análise cromatográfica.

#### 4.4.2 Avaliação do efeito matriz em UHPLC-MS/MS

O aumento ou a supressão de sinal analítico (também chamados de efeito matriz) são conhecidos por serem problemáticos no que diz respeito à análise de resíduos de agrotóxicos por LC-MS/MS (HAJSLOVÁ; ZROSTLÍKOVÁ, 2003).

Existem diversos fatores que podem afetar a ionização, a identificação e, conseqüentemente, o processo de quantificação. Portanto, é de fundamental importância a escolha adequada do processo de preparo da amostra e otimização das condições de análise.

O efeito matriz é mais significativo quando as concentrações dos analitos são mais baixas ou quando a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta.

Logo, quando é realizada a análise dos extratos, apenas uma pequena quantidade insignificante do analito é adsorvida, pois a proporção de componentes da matriz/analito é muito alta e os interferentes são preferencialmente adsorvidos (PINHO *et al.*, 2009). Segundo Krueve e colaboradores (2008), o efeito matriz é mais acentuado no método QuEChERS, uma vez que a supressão de ionização é maior para muitos agrotóxicos, apesar de este ser um método mais econômico em termos de tempo, trabalho e solventes, além de apresentar uma maior recuperação para muitos compostos.

Os resultados obtidos para a avaliação do efeito matriz, realizada a partir da comparação entre as áreas dos analíticos da solução analítica ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparada no solvente e no extrato da matriz, através da Equação 1, estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS, a partir de soluções analíticas ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz avaliada.

(continua)			
Compostos	Efeito Matriz (%)	Compostos	Efeito Matriz (%)
2,4-D	85,6	Diazinona	4,2
Atrazina	1,7	Diclofluanida	68,1
Azinfós metílico	-80,4	Difenoconazole	0,6
Azoxistrobina	-3,9	Dimetoato	132,5
Bentazona	-10,6	Epoxiconazole	-8,2
Bispiribaque-sódico	-19,3	Fenarimol	-16,5
Bitertanol	27,6	Fempropatrina	287,3
Boscalida	-45,3	Fempropimorfe	87,6
Bromuconazole	3,8	Fentiona	14,3
Buprofezina	60,1	Fipronil	-18,2
Carbaril	20,7	Fluquiconazole	-14,5
Carbendazina	-16,7	Fluroxipir	0,4
Carbofurano	-40,3	Flutolanil	21,3
Carbofurano 3-OH	19,0	Imazalil	-14,0
Cloranfenicol	8,5	Imidacloprido	16,3
Clorprofam	21,0	Iprovalicarbe	-10,6
Clorpirifós etílico	-19,0	Linuron deuterado	-12,0
Clorpirifós metílico	267,4	Linurom	9,9
Clomazone	-17,2	Malationa	-41,5
Clorimuron etílico	11,9	Mecarbam	86,9
Cianazina	0,3	Mepronil	3,6

Tabela 17 - Avaliação do efeito matriz percentual dos agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados por UHPLC-MS/MS, a partir de soluções analíticas ( $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) preparadas em acetonitrila e no extrato da matriz avaliada.

		(conclusão)	
Compostos	Efeito Matriz (%)	Compostos	Efeito Matriz (%)
Metalaxil	-3,4	Quinoxifeno	-13,0
Metaconazole	-13,6	Robenidina	6,4
Metiocarbe sulfona	48,5	Salbutamol	-19,8
Metiocarbe sulfóxido	-13,0	Salinomicina	-61,8
Metsulfurom metílico	16,0	Simazina	-6,7
Mevinfós	100,7	Sulfadimetoxina	3,2
Monesina	-22,0	Sulfametazina	16,0
Monocrotofós	-16,7	Sulfatiazol	-7,0
Monolinurom	-24,7	Tebuconazole	21,7
Miclobutanil	-7,4	Terbutilazina	-16,0
Paraoxon etílico	38,9	Tetraconazole	-17,1
Pirimicarbe	18,0	Tiacloprido	-11,8
Pirimifós metílico	-10,0	Tiametoxam	-18,5
Profenofós	-12,6	Tiodicarbe	-23,9
Propargito	32,0	Tolcofós metílico	7,1
Propiconazole	-6,3	Triadimefom	-34,6
Propizamida	15,0	Triadimenol	-94,3
Propoxur	9,6	Triazofós	-4,1
Piraclostrobina	-2,0	Triclorfom	10,2
Pirazofós	1,7	Trifloxistrobina	-3,4
Piridaben	12,0	Triflumizole	-20,0
Piridafentiona	-3,4	Trimetoprima	-17,4
Piridato	87,5	Vamidationa	12,2
Pirimetanil	0,4		

Através dos resultados apresentados na Tabela 17 é possível observar que para a maioria dos compostos, o efeito matriz não foi significativo, pois apresentaram variação inferior a 20% (FERRER *et al.*, 2011). No entanto, para vários compostos, como por exemplo, buprofezina, mecarbam, mevinfós e piridato, o efeito matriz foi bastante evidente, demonstrando que a presença de coextrativos é bastante pronunciada na matriz estudada. Sendo assim, vale ressaltar que é de extrema importância que para a determinação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários na matriz solo por UHPLC-MS/MS, as soluções analíticas sejam preparadas no extrato da matriz.

#### 4.4.3 Curva analítica e faixa linear

Através das injeções das soluções analíticas preparadas tanto em acetonitrila como no extrato da matriz, nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foi possível determinar a faixa de trabalho de cada agrotóxico e medicamento veterinário estudado, assim como os valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e os modelos de calibração e equações das curvas analíticas, conforme apresentados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Alguns compostos não apresentaram coeficientes de determinação maior ou igual a 0,99 com o modelo linear e, portanto, optou-se pela utilização do modelo quadrático a fim de torná-lo aceitável para a quantificação.

Vale destacar que a estabilidade do instrumento foi comprovada através da utilização do padrão interno trifenilfosfato na verificação da repetibilidade do sinal analítico do sistema cromatográfico em todas as injeções realizadas.

Baseado nos resultados obtidos pode-se concluir que a maioria dos compostos avaliados apresentou valores de coeficiente de determinação ( $r^2$ ) superiores a 0,99 e, portanto, os modelos lineares e quadráticos são satisfatórios.

Como é difícil adequar a otimização do método analítico para todos os analitos em uma análise multirresíduo, para alguns compostos o valor de  $r^2$  ficou entre 0,98 e 0,99 quando preparados em solvente, como é o caso do bitertanol, fempropatrina, fentiona, malationa e metiocarbe sulfona e quando preparados no extrato da matriz como é o caso do carbaril, clorprofam, clorpirifós etílico, fempropatrina, fentiona e pirimicarbe. Além disso, os compostos azinfós metílico, diclofluanida, tiodicarbe e triadimenol apresentaram valores de  $r^2$  inferior a 0,97 quando preparados no extrato da matriz e ainda os dois últimos apresentaram sinal analítico apenas nas concentrações a partir de 10,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e, por isso não serão utilizados nos demais parâmetros de validação do método.

Tabela 18 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila.

(continua)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
2,4-D	5,0 – 50	0,9912	linear	$y = 42,5918 x - 36,1548$
Atrazina	0,5 – 50	0,9948	linear	$y = 2080,67 x - 390,348$
Azinfós metílico	10 – 50	0,9923	quadrática	$y = 0,0635823 x^2 + 1,05261 x + 3,85217$
Azoxistrobina	0,5 – 50	0,9916	linear	$y = 281,782 x - 111,994$
Bentazona	5,0 – 50	0,9877	quadrática	$y = 0,361118 x^2 + 17,9649 x - 4,37538$
Bispiribaque sódico	2,0 – 50	0,9924	quadrática	$y = 0,809163 x^2 + 107,977 x - 36,2616$
Bitertanol	5,0 – 50	0,9842	quadrática	$y = 0,0412184 x^2 + 26,132 x - 28,2568$
Boscalida	1,0 – 50	0,9902	linear	$y = 288,194 x - 41,5342$
Bromuconazole	1,0 – 50	0,9913	linear	$y = 595,5 x - 346,283$
Buprofezina	0,5 – 50	0,9911	linear	$y = 773,375 x - 114,548$
Carbaril	1,0 – 50	0,9927	linear	$y = 224,694 x - 3,38371$
Carbendazina	1,0 – 50	0,9911	linear	$y = 286,71 x - 104,135$
Carbofurano	0,5 – 50	0,9913	linear	$y = 617,201 x + 16,5364$
Carbofurano 3-OH	1,0 – 50	0,9905	quadrática	$y = - 2,11655 x^2 + 162,587 x - 38,9168$
Cloranfenicol	0,5 – 50	0,9927	linear	$y = 37,9549 x - 2,25946$
Clorprofam	5,0 – 50	0,9928	quadrática	$y = 0,478789 x^2 + 66,1192 x + 12,4199$
Clorpirifós etílico	5,0 – 50	0,9924	quadrática	$y = 0,350337 x^2 + 15,0239 x + 8,25507$
Clorpirifós metílico	2,0 – 50	0,9907	linear	$y = 57,1136 x - 24,0301$
Clomazone	0,5 – 50	0,9913	linear	$y = 451,521 x - 119,875$
Clorimuron etílico	5,0 – 50	0,9921	quadrática	$y = 0,555718 x^2 + 5,44215 x - 4,65908$
Cianazina	0,5 – 50	0,9960	linear	$y = 754,302 x - 242,601$
Diazinona	0,5 – 50	0,9952	linear	$y = 3483,94 x - 502,383$
Diclofluanida	5,0 – 50	0,9894	quadrática	$y = 0,711613 x^2 + 28,1719 x - 15,7685$



Tabela 18 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila.

(continuação)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Difenoconazole	0,5 – 50	0,9913	linear	$y = 418,354 x - 146,292$
Dimetoato	0,5 – 50	0,9900	quadrática	$y = - 1,45372 x^2 + 270,187 x - 91,397$
Epoxiconazole	0,5 – 50	0,9930	linear	$y = 352,659 x - 96,5863$
Fenarimol	1,0 – 50	0,9904	linear	$y = 273,754 x - 113,805$
Fempropatrina	5,0 – 50	0,9803	quadrática	$y = 0,313423 x^2 + 21,0462 x + 12,6317$
Fempropimorfe	0,5 – 50	0,9914	linear	$y = 2082,53 x - 659,359$
Fentiona	2,0 – 50	0,9876	quadrática	$y = - 0,289457 x^2 + 105,738 x + 40,2112$
Fipronil	1,0 – 50	0,9909	linear	$y = 122,273 x - 43,0398$
Fluquiconazole	2,0 – 50	0,9917	linear	$y = 244,556 x - 94,8892$
Fluroxipir	2,0 – 50	0,9907	linear	$y = 70,6367 x - 39,9981$
Flutolanil	1,0 – 50	0,9901	quadrática	$y = - 0,528173 x^2 + 222,144 x + 68,1056$
Imazalil	0,5 – 50	0,9926	linear	$y = 697,426 x - 198,671$
Imidacloprido	2,0 – 50	0,9925	quadrática	$y = - 0,866775 x^2 + 89,2496 x + 30,7535$
Iprovalicarbe	2,0 – 50	0,9904	linear	$y = 207,051 x - 184,49$
Linuron deuterado (PC)	2,0 – 50	0,9901	linear	$y = 112,427 x - 31,254$
Linurom	0,5 – 50	0,9915	linear	$y = 255,561 x + 124,914$
Malationa	2,0 – 50	0,9879	quadrática	$y = 0,0632233 x^2 + 51,3256 x - 27,3516$
Mecarbam	1,0 – 50	0,9901	quadrática	$y = 3,19425 x^2 + 49,798 x + 61,1311$
Mepronil	0,5 – 50	0,9916	linear	$y = 2556,04 x - 171,365$
Metalaxil	0,5 – 50	0,9919	linear	$y = 769,493 x - 142,434$
Metaconazole	1,0 – 50	0,9931	linear	$y = 361,952 x - 141,945$
Metiocarbe sulfona	2,0 – 50	0,9885	quadrática	$y = 0,147093 x^2 + 90,7183 x + 17,7901$
Metiocarbe sulfóxido	0,5 – 50	0,9904	linear	$y = 509,118 x - 218,529$

Tabela 18 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila.

(continuação)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Metsulfurom metílico	1,0 – 50	0,9901	linear	$y = 120,089 x - 54,0729$
Mevinfós	2,0 – 50	0,9905	linear	$y = 260,954 x - 14,6617$
Monesina	0,5 – 50	0,9929	linear	$y = 2408,46 x + 148,809$
Monocrotofós	0,5 – 50	0,9901	linear	$y = 410,26 x - 122,181$
Monolinurom	1,0 – 50	0,9907	linear	$y = 339,503 x - 102,152$
Miclobutanil	1,0 – 50	0,9900	linear	$y = 492,822 x - 248,887$
Paraoxon etílico	5,0 – 50	0,9912	quadrática	$y = 0,16164 x^2 + 30,5774 x - 21,8763$
Pirimicarbe	0,5 – 50	0,9941	linear	$y = 1654,07 x + 39,7042$
Pirimifós metílico	0,5 – 50	0,9927	linear	$y = 2713,77 x - 143,671$
Profenofós	2,0 – 50	0,9907	linear	$y = 86,6587 x - 60,425$
Propargito	0,5 – 50	0,9908	linear	$y = 25,2185 x + 0,676246$
Propiconazole	0,5 – 50	0,9905	linear	$y = 1392,71 x - 429,155$
Propizamida	0,5 – 50	0,9908	linear	$y = 301,526 x - 86,4284$
Propoxur	0,5 – 50	0,9935	linear	$y = 324,474 x + 38,873$
Piraclostrobina	1,0 – 50	0,9956	linear	$y = 180,181 x - 58,4385$
Pirazofós	0,5 – 50	0,9912	linear	$y = 1447,22 x - 397,831$
Piridaben	5,0 – 50	0,9933	quadrática	$y = 0,277581 x^2 + 41,0992 x - 32,9665$
Piridafentiona	1,0 – 50	0,9941	linear	$y = 456,645 x - 106,65$
Piridato	2,0 – 50	0,9930	quadrática	$y = -0,265771 x^2 + 69,6505 x + 9,75795$
Pirimetanil	0,5 – 50	0,9963	linear	$y = 2251,91 x - 390,941$
Quinoxifeno	0,5 – 50	0,9958	linear	$y = 784,989 x - 190,667$
Robenidina	0,5 – 50	0,9911	linear	$y = 1291,26 x - 124,606$
Salbutamol	0,5 – 50	0,9902	linear	$y = 228,266 x - 97,5608$

Tabela 18 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções analíticas preparadas em acetonitrila.

(conclusão)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Salinomicina	0,5 – 50	0,9925	linear	$y = 5043,09 x + 543,063$
Simazina	1,0 – 50	0,9902	quadrática	$y = - 1,3584 x^2 + 553,235 x - 87,8367$
Sulfadimetoxina	0,5 – 50	0,9940	linear	$y = 627,204 x - 134,21$
Sulfametazina	2,0 – 50	0,9910	linear	$y = 139,185 x - 83,0432$
Sulfatiazol	2,0 – 50	0,9911	linear	$y = 173,748 x - 73,8524$
Tebuconazole	0,5 – 50	0,9904	linear	$y = 615,162 x - 244,416$
Terbutilazina	0,5 – 50	0,9926	linear	$y = 1802,28 x - 430,901$
Tetraconazole	0,5 – 50	0,9933	linear	$y = 1031,77 x - 251,09$
Tiacloprido	0,5 – 50	0,9926	linear	$y = 882,674 x + 84,8053$
Tiametoxam	2,0 – 50	0,9921	linear	$y = 46,1346 x - 15,5646$
Tiodicarbe	10 – 50	0,9906	quadrática	$y = 0,276171 x^2 + 6,00623 x + 3,9888$
Tolcofós metílico	1,0 – 50	0,9911	linear	$y = 306,47 x + 53,1867$
Triadimefom	2,0 – 50	0,9903	linear	$y = 294,91 x - 100,893$
Triadimenol	5,0 – 50	0,9648	quadrática	$y = 0,243853 x^2 + 23,2088 x + 10,9498$
Triazofós	0,5 – 50	0,9930	linear	$y = 853,029 x - 188,183$
Triclorfom	0,5 – 50	0,9918	linear	$y = 380,725 x - 107,931$
Trifloxistrobina	1,0 – 50	0,9903	linear	$y = 264,381 x + 38,217$
Triflumizole	0,5 – 50	0,9935	linear	$y = 848,544 x - 210,454$
Trimetoprima	2,0 – 50	0,9929	linear	$y = 648,004 x - 226,698$
Vamidationa	2,0 – 50	0,9919	linear	$y = 346,631 x - 119,709$

PC: padrão de controle

Tabela 19 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções preparadas no extrato da matriz.

(continua)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
2,4-D	5,0 – 50	0,9951	quadrática	$y = 0,62228 x^2 + 11,6605 x + 3,00237$
Atrazina	0,5 – 50	0,9988	linear	$y = 1925,28 x - 417,071$
Azinfós metílico	5,0 – 50	0,9320	linear	$y = 4,37375 x - 10,4086$
Azoxistrobina	0,5 – 50	0,9954	linear	$y = 293,254 x - 30,0931$
Bentazona	2,0 – 50	0,9977	quadrática	$y = 0,467086 x^2 + 26,6384 x + 3,62701$
Bispiribaque sódico	2,0 – 50	0,9915	quadrática	$y = 0,934856 x^2 + 89,7997 x - 74,6955$
Bitertanol	2,0 – 50	0,9807	quadrática	$y = - 0,203369 x^2 + 40,1226 x - 14,5007$
Boscalida	0,5 – 50	0,9865	linear	$y = 222,595 x - 47,7091$
Bromuconazole	0,5 – 50	0,9953	linear	$y = 589,808 x - 254,648$
Buprofezina	0,5 – 50	0,9953	linear	$y = 1161,04 x - 257,86$
Carbaril	0,5 – 50	0,9874	quadrática	$y = - 1,09982 x^2 + 275,06 x - 52,815$
Carbendazina	0,5 – 50	0,9915	linear	$y = 325,902 x - 135,515$
Carbofurano	0,5 – 50	0,9900	linear	$y = 728,227 x - 103,838$
Carbofurano 3-OH	1,0 – 50	0,9962	quadrática	$y = 0,937294 x^2 + 11,599 x + 4,61874$
Cloranfenicol	0,5 – 50	0,9911	linear	$y = 41,0759 x - 4,55316$
Clorprofam	5,0 – 50	0,9845	quadrática	$y = - 0,359332 x^2 + 95,3005 x - 110,191$
Clorpirifós etílico	5,0 – 50	0,9835	quadrática	$y = 0,0566428 x^2 + 23,0447 x - 29,5033$
Clorpirifós metílico	2,0 – 50	0,9905	quadrática	$y = - 0,394983 x^2 + 109,062 x - 50,3202$
Clomazone	0,5 – 50	0,9915	linear	$y = 479,88 x - 33,4832$
Clorimuron etílico	5,0 – 50	0,9918	quadrática	$y = 0,511485 x^2 + 3,73914 x + 12,4447$
Cianazina	0,5 – 50	0,9933	linear	$y = 727,361 x - 183,719$
Diazinona	0,5 – 50	0,9937	linear	$y = 3308,4 x - 267,836$
Diclofluanida	5,0 – 50	0,9570	quadrática	$y = - 0,329857 x^2 + 47,9355 x + 4,72459$

Tabela 19 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções preparadas no extrato da matriz.

(continuação)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Difenoconazole	0,5 – 50	0,9921	linear	$y = 382,41 x - 63,7509$
Dimetoato	0,5 – 50	0,9910	linear	$y = 485,099 x + 19,7163$
Epoxiconazole	1,0 – 50	0,9926	linear	$y = 395,609 x - 177,951$
Fenarimol	1,0 – 50	0,9955	linear	$y = 257,757 x - 202,137$
Fempropatrina	5,0 – 50	0,9849	quadrática	$y = - 0,190696 x^2 + 31,8007 x + 24,2992$
Fempropimorfe	0,5 – 50	0,9932	linear	$y = 3111 x - 48,5014$
Fentiona	2,0 – 50	0,9812	quadrática	$y = - 1,58553 x^2 + 190,654 x - 106,116$
Fipronil	0,5 – 50	0,9912	linear	$y = 130,86 x - 60,0922$
Fluquiconazole	1,0 – 50	0,9939	linear	$y = 216,032 x - 67,1677$
Fluroxipir	2,0 – 50	0,9903	linear	$y = 74,3484 x - 23,6595$
Flutolanil	1,0 – 50	0,9946	linear	$y = 227,128 x - 15,0485$
Imazalil	0,5 – 50	0,9917	linear	$y = 670,779 x - 88,8249$
Imidacloprido	1,0 – 50	0,9927	quadrática	$y = 0,355694 x^2 + 50,6974 x + 15,3856$
Iprovalicarbe	2,0 – 50	0,9907	quadrática	$y = 2,04678 x^2 + 128,242 x - 138,83$
Linuron deuterado (PC)	1,0 – 50	0,9914	linear	$y = 110,998 x - 28,7987$
Linurom	0,5 – 50	0,9912	linear	$y = 246,265 x + 38,5441$
Malationa	2,0 – 50	0,9907	quadrática	$y = 0,303268 x^2 + 48,3489 x - 26,2102$
Mecarbam	2,0 – 50	0,9918	linear	$y = 136,04 x + 1,47963$
Mepronil	0,5 – 50	0,9921	linear	$y = 2474,6 x - 65,2988$
Metalaxil	0,5 – 50	0,9926	linear	$y = 775,357 x - 153,141$
Metaconazole	1,0 – 50	0,9917	linear	$y = 401,156 x - 165,041$
Metiocarbe sulfona	0,5 – 50	0,9914	linear	$y = 540,873 x - 63,0594$
Metiocarbe sulfóxido	0,5 – 50	0,9907	linear	$y = 682,051 x - 315,788$

Tabela 19 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções preparadas no extrato da matriz.

(continuação)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Metsulfurom metílico	2,0 – 50	0,9907	linear	$y = 176,228 x - 159,553$
Mevinfós	1,0 – 50	0,9912	linear	$y = 288,478 x - 52,4615$
Monesina	0,5 – 50	0,9900	linear	$y = 1929,05 x - 173,926$
Monocrotofós	1,0 – 50	0,9915	linear	$y = 410,401 x - 181,644$
Monolinurom	0,5 – 50	0,9902	linear	$y = 312,336 x - 95,1107$
Miclobutanil	0,5 – 50	0,9912	linear	$y = 473,202 x - 154,917$
Paraoxon etílico	0,5 – 50	0,9919	linear	$y = 946,444 x - 270,775$
Pirimicarbe	1,0 – 50	0,9823	quadrática	$y = - 3,45277 x^2 + 1409,13 x - 126,628$
Pirimifós metílico	0,5 – 50	0,9910	linear	$y = 2729,59 x - 442,795$
Profenofós	2,0 – 50	0,9901	linear	$y = 102,094 x - 48,9863$
Propargito	0,5 – 50	0,9939	linear	$y = 54,0616 x - 7,34924$
Propiconazole	0,5 – 50	0,9909	linear	$y = 1421,34 x - 450,537$
Propizamida	2,0 – 50	0,9904	linear	$y = 336,496 x - 186,526$
Propoxur	0,5 – 50	0,9976	quadrática	$y = 3,78737 x^2 + 252,576 x - 46,6543$
Piraclostrobina	2,0 – 50	0,9948	quadrática	$y = - 1,11771 x^2 + 204,731 x - 112,084$
Pirazofós	0,5 – 50	0,9926	linear	$y = 1575,83 x - 576,432$
Piridaben	1,0 – 50	0,9910	quadrática	$y = 0,159674 x^2 + 71,9958 x - 39,4352$
Piridafentiona	0,5 – 50	0,9900	linear	$y = 404,444 x - 80,8734$
Piridato	2,0 – 50	0,9910	linear	$y = 211,752 x - 17,3302$
Pirimetanil	0,5 – 50	0,9966	linear	$y = 2146,55 x - 327,109$
Quinoxifeno	0,5 – 50	0,9912	linear	$y = 887,895 x - 129,817$
Robenidina	0,5 – 50	0,9925	linear	$y = 1345,74 x + 106,377$
Salbutamol	2,0 – 50	0,9903	linear	$y = 195,029 x - 127,793$

Tabela 19 - Valores da faixa de trabalho, coeficiente de determinação ( $r^2$ ), modelo e equação das curvas analíticas, obtidos para os agrotóxicos e medicamentos veterinários analisados a partir das soluções preparadas no extrato da matriz.

(conclusão)

Composto	Faixa de trabalho ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Coeficiente de determinação ( $r^2$ )	Modelo	Equação
Salinomicina	2,0 – 50	0,9928	linear	$y = 1861,69 x - 168,576$
Simazina	0,5 – 50	0,9905	linear	$y = 411,347 x - 21,5264$
Sulfadimetoxina	0,5 – 50	0,9950	linear	$y = 596,889 x - 91,8302$
Sulfametazina	2,0 – 50	0,9902	linear	$y = 98,2167 x - 69,6361$
Sulfatiazol	2,0 – 50	0,9912	linear	$y = 168,154 x - 80,2939$
Tebuconazole	0,5 – 50	0,9909	linear	$y = 656,882 x - 182,319$
Terbutilazina	0,5 – 50	0,9925	linear	$y = 1318,22 x - 227,539$
Tetraconazole	0,5 – 50	0,9908	linear	$y = 1066,13 x - 227,739$
Tiacloprido	0,5 – 50	0,9903	linear	$y = 819,558 x + 74,5986$
Tiametoxam	2,0 – 50	0,99050	linear	$y = 35,0397 x + 3,83301$
Tiodicarbe	10 – 50	0,9705	linear	$y = 13,4571 x - 32,2394$
Tolcofós metílico	2,0 – 50	0,9918	quadrática	$y = -0,166704 x^2 + 305,51 x - 99,7113$
Triadimefom	2,0 – 50	0,9905	quadrática	$y = 1,48897 x^2 + 212,887 x - 94,8261$
Triadimenol	10 – 50	0,9549	quadrática	$y = 0,495746 x^2 + 9,56304 x - 32,856$
Triazofós	0,5 – 50	0,9919	linear	$y = 901,994 x - 196,712$
Triclorfom	0,5 – 50	0,9908	linear	$y = 441,688 x - 43,6572$
Trifloxistrobina	0,5 – 50	0,9904	linear	$y = 252,743 x - 50,0951$
Triflumizole	0,5 – 50	0,9915	linear	$y = 902,529 x - 51,5966$
Trimetoprima	2,0 – 50	0,9905	linear	$y = 439,005 x + 98,6527$
Vamidationa	2,0 – 50	0,9902	linear	$y = 198,505 x - 49,0372$

PC: padrão de controle

## 4.4.4 Determinação dos valores de LOD e LOQ, do instrumento e do método

A determinação dos valores de limites de detecção e quantificação, tanto para o instrumento quanto para o método foi realizada conforme descrito no item 3.10.4.

O  $LOQ_i$  variou de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o  $LOD_i$ , determinado como sendo 3,33 vezes menor que o  $LOQ_i$  variou de 0,15 a 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O  $LOQ_m$ , obtido como sendo o menor nível de fortificação, foi de 10 ou 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e o  $LOD_m$ , a concentração 3,33 vezes menor que este valor, ou seja, 3,0 ou 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , conforme apresentados na Tabela 20.

Não existe uma legislação específica com valores de limites máximos de resíduos permitidos (LMR) para estes compostos em solo, mas os valores determinados estão de acordo com os níveis de concentração encontrados na literatura.

Tabela 20 - Valores dos limites de detecção e quantificação do instrumento e do método.

Composto	(continua)			
	$LOD_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$LOQ_i$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$LOD_m$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$LOQ_m$ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
2,4-D	1,5	5,0	7,5	25
Atrazina	0,15	0,5	3,0	10
Azoxistrobina	0,15	0,5	3,0	10
Bentazona	0,6	2,0	3,0	10
Bispiribaque sódico	0,6	2,0	3,0	10
Bitertanol	0,6	2,0	7,5	25
Boscalida	0,15	0,5	7,5	25
Bromuconazole	0,15	0,5	7,5	25
Buprofezina	0,15	0,5	3,0	10
Carbaril	0,15	0,5	3,0	10
Carbendazina	0,15	0,5	7,5	25
Carbofurano	0,15	0,5	7,5	25
Carbofurano 3-OH	0,3	1,0	7,5	25
Cloranfenicol	0,15	0,5	3,0	10
Clorprofam	1,5	5,0	3,0	10
Clorpirifós etílico	1,5	5,0	3,0	10
Clorpirifós metílico	0,6	2,0	7,5	25
Clomazone	0,15	0,5	7,5	25
Clorimuron etílico	1,5	10,0	3,0	10
Cianazina	0,15	0,5	7,5	25



Tabela 20 - Valores dos limites de detecção e quantificação do instrumento e do método.

Composto	(continuação)			
	LOD <sub>i</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sub>i</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD <sub>m</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	LOQ <sub>m</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Diazinona	0,15	0,5	3,0	10
Difenoconazole	0,15	0,5	7,5	25
Dimetoato	0,15	0,5	7,5	25
Epoxiconazole	0,3	1,0	3,0	10
Fenarimol	0,3	1,0	3,0	10
Fempropatrina	1,5	5,0	3,0	10
Fempropimorfe	0,15	0,5	7,5	25
Fentiona	0,6	2,0	7,5	25
Fipronil	0,15	0,5	3,0	10
Fluquiconazole	0,3	1,0	3,0	10
Fluroxipir	0,6	2,0	7,5	25
Flutolanil	0,3	1,0	7,5	25
Imazalil	0,15	0,5	3,0	10
Imidacloprido	0,3	1,0	7,5	25
Iprovalicarbe	0,6	2,0	3,0	10
Linuron - deuterado	0,3	1,0	7,5	25
Linurom	0,15	0,5	7,5	25
Malationa	0,6	2,0	7,5	25
Mecarbam	0,6	2,0	7,5	25
Mepronil	0,15	0,5	3,0	10
Metalaxil	0,15	0,5	3,0	10
Metaconazole	0,3	1,0	3,0	10
Metiocarbe sulfona	0,15	0,5	3,0	10
Metiocarbe sulfóxido	0,15	0,5	7,5	25
Metsulfurom-metílico	0,6	2,0	3,0	10
Mevinfós	0,3	1,0	7,5	25
Monesina	0,15	0,5	3,0	10
Monocrotofós	0,3	1,0	3,0	10
Monolinurom	0,15	0,5	7,5	25
Miclobutanil	0,15	0,5	7,5	25
Paraoxon-etílico	0,15	0,5	3,0	10
Pirimicarbe	0,3	1,0	7,5	25
Pirimifós-metílico	0,15	0,5	3,0	10
Profenofós	0,6	2,0	7,5	25
Propargito	0,15	0,5	7,5	25
Propiconazole	0,15	0,5	7,5	25
Propizamida	0,6	2,0	3,0	10
Propoxur	0,15	0,5	7,5	25

Tabela 20 - Valores dos limites de detecção e quantificação do instrumento e do método.

Composto	LOD <sub>i</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ <sub>i</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD <sub>m</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	(conclusão)
				LOQ <sub>m</sub> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Piraclostrobina	0,6	2,0	3,0	10
Pirazofós	0,15	0,5	7,5	25
Piridaben	0,3	1,0	3,0	10
Piridafentiona	0,15	0,5	3,0	10
Piridato	0,6	2,0	3,0	10
Pirimetanil	0,15	0,5	3,0	10
Quinoxifeno	0,15	0,5	7,5	25
Robenidina	0,15	0,5	7,5	25
Salbutamol	0,6	2,0	7,5	25
Salinomicina	0,6	2,0	3,0	10
Simazina	0,15	0,5	3,0	10
Sulfadimetoxina	0,15	0,5	3,0	10
Sulfametazina	0,6	2,0	7,5	25
Sulfatiazol	0,6	2,0	7,5	25
Tebuconazole	0,15	0,5	3,0	10
Terbutilazina	0,15	0,5	3,0	10
Tetraconazole	0,15	0,5	3,0	10
Tiacloprido	0,15	0,5	3,0	10
Tiametoxam	0,6	2,0	7,5	25
Tolcofós metílico	0,6	2,0	3,0	10
Triadimefom	0,6	2,0	3,0	10
Triazofós	0,15	0,5	3,0	10
Triclorfom	0,15	0,5	7,5	25
Trifloxistrobina	0,15	0,5	3,0	10
Triflumizole	0,15	0,5	7,5	25
Trimetoprima	0,6	2,0	7,5	25
Vamidationa	0,6	2,0	7,5	25

#### 4.4.5 Ensaio de fortificação para avaliação da exatidão do método

Com o objetivo de avaliar a exatidão do método, foram realizados ensaios de fortificação, em três níveis de concentração 10, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , utilizando o método QuEChERS otimizado. Para os compostos que não se verificou confiabilidade suficiente para a quantificação no nível mais baixo, foi empregado um nível de fortificação maior, na concentração de 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

As recuperações foram calculadas conforme o item 3.10.5 e os resultados podem ser visualizados na Tabela 21.

Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de validação de métodos cromatográficos, na qual as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2011).

Tabela 21 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

(continua)

Compostos	Níveis de fortificação							
	10 µg kg <sup>-1</sup>		25 µg kg <sup>-1</sup>		50 µg kg <sup>-1</sup>		100 µg kg <sup>-1</sup>	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
2,4-D	n.q.	n.q.	92,0	11,5	70,7	15,3	75,9	15,6
Atrazina	90,6	7,5	-	-	88,5	10,2	90,1	7,6
Azoxistrobina	76,3	30,2	-	-	89,7	17,5	97,5	18,7
Bentazona	108,6	32,7	-	-	96,2	12,6	99,5	15,5
Bispiribaque sódico	77,3	17,4	-	-	83,4	18,4	106,4	25,4
Bitertanol	n.q.	n.q.	96,5	136,4	15,4	44,3	99,2	18,6
Boscalida	n.q.	n.q.	101,3	19,5	106,2	18,5	73,0	19,8
Bromuconazole	n.q.	n.q.	77,5	17,9	76,5	16,8	79,5	18,4
Buprofezina	92,8	17,1	-	-	83,0	9,5	85,6	8,9
Carbaril	82,3	11,7	-	-	100,3	8,3	88,2	15,5
Carbendazina	n.q.	n.q.	71,2	12,2	84,6	19,4	75,5	15,0
Carbofurano	n.q.	n.q.	78,9	12,2	111,9	12,6	75,1	12,2
Carbofurano 3-OH	n.q.	n.q.	74,1	20,0	123,4	5,2	86,4	17,7
Cianazina	88,2	14,4	-	-	87,2	7,5	88,1	5,2
Clomazone	78,7	16,1	-	-	88,0	9,4	85,5	9,0
Cloranfenicol	115,9	12,2	-	-	90,2	19,4	104,3	14,8
Clorimuron etílico	n.q.	n.q.	172,9	18,2	100,7	29,3	21,7	92,5
Clorpirifós etílico	n.q.	n.q.	99,1	27,3	117,2	22,5	90,7	15,3
Clorpirifós metílico	72,1	18,4	-	-	119,6	21,2	111,3	11,1
Clorprofam	n.q.	n.q.	93,0	12,1	82,2	14,3	77,6	17,4
Diazinona	90,2	14,3	-	-	90,0	4,8	90,6	6,1
Difenoconazole	n.q.	n.q.	107,0	19,8	97,4	12,2	100,4	17,8

Tabela 21 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

Compostos	(continuação)							
	Níveis de fortificação							
	10 µg kg <sup>-1</sup>		25 µg kg <sup>-1</sup>		50 µg kg <sup>-1</sup>		100 µg kg <sup>-1</sup>	
Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Dimetoato	n.q.	n.q.	74,4	15,1	115,8	12,9	118,7	10,9
Epoxiconazole	93,4	19,2	-	-	73,1	10,4	91,4	15,6
Fempropatrina	102,8	90,8	-	-	107,7	72,5	110,1	16,8
Fempropimorfe	79,0	10,3	-	-	85,0	9,1	86,1	9,9
Fenarimol	n.q.	n.q.	83,2	18,6	77,3	12,1	94,8	17,9
Fentiona	n.q.	n.q.	107,1	19,6	66,9	46,6	98,7	16,5
Fipronil	90,1	14,7	-	-	87,3	9,5	83,1	14,5
Fluquiconazole	80,9	11,8	-	-	106,4	12,5	86,6	19,9
Fluroxipir	n.q.	n.q.	35,9	39,3	70,5	19,0	71,8	7,6
Flutolanil	n.q.	n.q.	70,9	11,7	70,7	3,5	85,2	13,2
Imazalil	94,1	13,6	-	-	76,2	14,7	80,2	15,1
Imidacloprido	n.q.	n.q.	70,7	20,6	73,1	19,0	85,7	20,1
Iprovalicarbe	103,1	18,9	-	-	103,9	19,6	118,2	17,9
Linurom	n.q.	n.q.	85,2	186	111,4	16,2	78,7	16,8
Linuron deuterado	n.q.	n.q.	90,1	13,0	100,6	13,4	92,3	12,9
Malationa	n.q.	n.q.	88,9	77,4	99,2	17,7	69,4	17,4
Mecarbam	n.q.	n.q.	70,8	7,7	91,1	14,9	83,0	18,4
Mepronil	80,7	18,5	-	-	102,0	8,0	90,5	10,7
Metaconazole	72,9	17,3	-	-	71,1	12,4	84,2	17,1
Metalaxil	77,6	17,5	-	-	98,5	13,3	91,2	7,3
Metiocarbe sulfona	95,6	14,8	-	-	93,5	8,9	91,6	6,2
Metiocarbe sulfóxido	n.q.	n.q.	70,1	6,9	113,9	10,9	82,1	8,5
Metsulfurom metílico	100,3	13,8	-	-	70,9	4,2	88,7	19,4
Mevinfós	n.q.	n.q.	72,9	9,6	113,9	18,2	73,8	15,1
Miclobutanil	78,8	16,0	-	-	84,4	11,7	84,4	12,4
Monesina	88,3	11,4	-	-	120,2	8,0	90,3	3,9
Monocrotofós	n.q.	n.q.	72,3	9,3	101,9	8,2	102,9	16,4
Monolinurom	n.q.	n.q.	76,6	7,4	90,5	13,3	99,9	9,9
Paraoxon-etílico	88,8	12,6	-	-	87,9	15,5	72,7	19,8
Piraclostrobina	n.q.	n.q.	82,6	13,9	111,7	19,6	117,3	13,0

Tabela 21 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

Compostos	(continuação)							
	Níveis de fortificação							
	10 µg kg <sup>-1</sup>		25 µg kg <sup>-1</sup>		50 µg kg <sup>-1</sup>		100 µg kg <sup>-1</sup>	
Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Pirazofós	106,2	10,4	-	-	92,3	18,2	90,2	11,0
Piridaben	n.q.	n.q.	75,6	18,0	106,5	24,6	84,9	25,0
Piridafentiona	n.q.	n.q.	82,4	17,9	105,5	17,5	104,3	19,0
Piridato	n.q.	n.q.	86,9	20,6	114,3	11,0	72,2	14,3
Pirimetanil	84,4	11,9	-	-	82,1	4,3	79,4	6,7
Pirimicarbe	n.q.	n.q.	110,8	9,9	154,6	7,0	79,3	10,2
Pirimifós metílico	85,3	13,5	-	-	86,1	11,4	85,4	7,1
Profenofós	n.q.	n.q.	73,2	17,8	108,7	19,6	112,5	16,9
Propargito	78,1	20,5	-	-	212,6	10,5	117,4	6,3
Propiconazole	77,3	12,5	-	-	85,8	10,4	91,1	10,8
Propizamida	90,7	14,8	-	-	101,5	19,5	90,5	19,0
Propoxur	78,2	13,3	-	-	116,1	16,8	73,9	16,4
Quinoxifeno	n.q.	n.q.	109,1	4,9	117,1	10,5	71,5	8,6
Robenidina	n.q.	n.q.	81,9	14,5	107,3	13,1	90,0	5,6
Salbutamol	n.q.	n.q.	23,4	17,5	16,7	18,7	13,6	44,5
Salinomicina	87,9	13,3	-	-	120,6	3,7	74,7	8,6
Simazina	91,7	15,3	-	-	106,9	12,3	85,0	10,6
Sulfadimetoxina	95,8	7,4	-	-	88,3	6,7	79,1	5,9
Sulfametazina	n.q.	n.q.	84,4	17,8	100,2	17,3	75,2	18,3
Sulfatiazol	n.q.	n.q.	71,3	13,9	70,6	8,2	71,3	18,7
Tebuconazole	86,8	16,5	-	-	84,4	11,3	88,4	11,3
Terbutilazina	93,7	10,2	-	-	118,5	16,4	78,7	9,8
Tetraconazole	90,8	18,2	-	-	89,6	8,9	90,4	16,7
Tiacloprido	93,6	12,8	-	-	110,3	8,6	96,6	4,4
Tiametoxam	n.q.	n.q.	107,8	18,8	109,8	25,4	105,6	7,5
Tolcofós metílico	76,4	15,3	-	-	105,8	15,7	91,0	14,1
Triadimefom	105,1	18,9	-	-	77,5	5,8	96,0	14,3
Triazofós	87,3	20,0	-	-	87,6	17,6	92,6	7,6
Triclorfom	n.q.	n.q.	68,8	2,9	103,2	6,8	89,5	15,0
Trifloxistrobina	79,8	13,7	-	-	109,7	20,0	104,4	14,0

Tabela 21 - Percentuais de recuperação e RSD para a repetibilidade do método de extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

Compostos	(conclusão)							
	Níveis de fortificação							
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$		25 $\mu\text{g kg}^{-1}$		50 $\mu\text{g kg}^{-1}$		100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	
Triflumizole	n.q.	n.q.	79,2	18,5	86,1	9,7	85,7	7,5
Trimetoprima	n.q.	n.q.	43,6	14,6	65,8	3,1	65,1	21,1
Vamidationa	n.q.	n.q.	87,4	9,1	199,9	10,6	74,7	15,4

nq: não quantificado

Analisando a Tabela 21, observou-se que 88% dos agrotóxicos avaliados na matriz solo apresentaram percentuais de recuperação entre 70-120% com RSD  $\leq$  20%. Os compostos bitertanol, clorimuron etílico, fempropatrina, fentiona, fluroxipir, piridaben, pirimicarbe, propargito e vamidationa não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, uma vez que apresentaram valores médios de recuperação fora da faixa aceitável para a análise de resíduos (70-120%) e/ou valores de RSD  $>$  20%. Dos nove medicamentos veterinários analisados, os compostos salbutamol e trimetoprima não apresentaram percentuais de recuperação e RSD considerados satisfatórios. A baixa recuperação destes compostos pode ser explicada pelas propriedades físico-químicas que dificultam a extração dos mesmos em métodos multirresíduos. Avaliando algumas propriedades de cada um desses compostos, é importante destacar que bitertanol, fempropatrina, fentiona, piridaben e propargito apresentam baixa solubilidade em água e, portanto, tendem a apresentar uma maior capacidade de retenção no solo. Os resultados de recuperação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários estão ilustrados nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

O composto linuron deuterado, utilizado como padrão de controle, apresentou eficácia na extração, com valores de recuperação entre 90 e 100% nos três níveis de fortificação propostos, demonstrando, desse modo, que o procedimento de extração não apresentou alterações drásticas.

Vale ressaltar que alguns compostos apresentaram confiabilidade suficiente para serem quantificados no nível 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e, para estes, foram considerados os

níveis 10, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Porém, para os compostos que não foram quantificados com confiabilidade no nível 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , foram considerados os níveis 25, 50 e 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

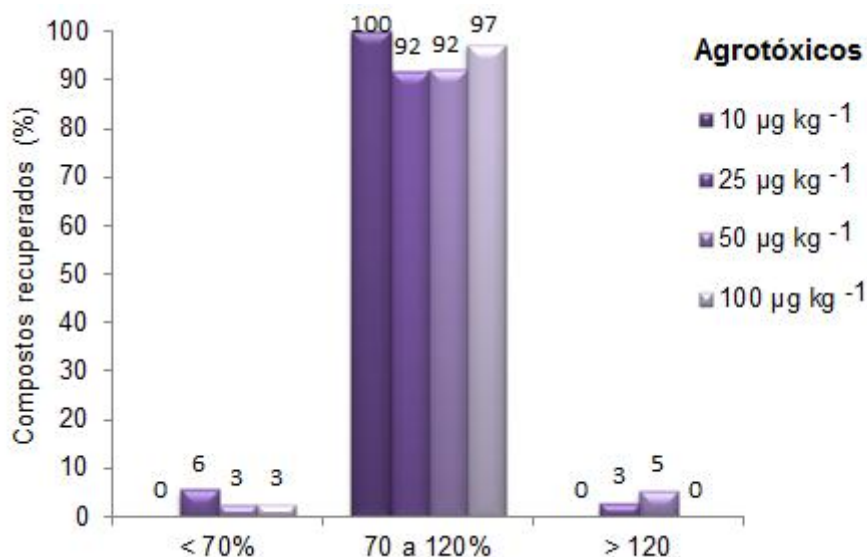


Figura 23 - Percentual de agrotóxicos em solo, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS desenvolvido.

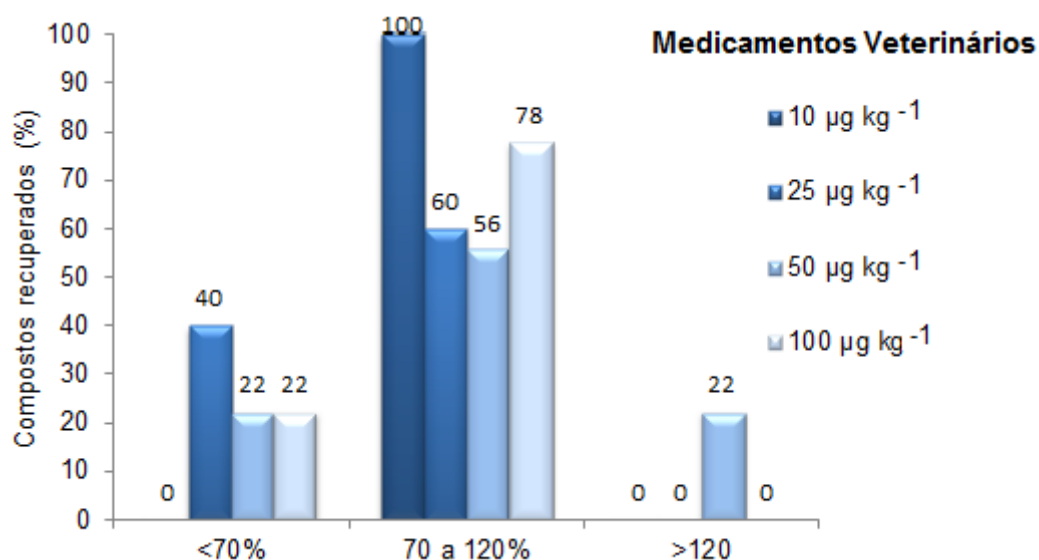


Figura 24 - Percentual de medicamentos veterinários em solo, que apresentaram faixas de recuperação de <70%, entre 70 e 120% e >120%, após ensaios de fortificação e recuperação, extraídos com método QuEChERS desenvolvido.

## 4.4.6 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão do método desenvolvido foi avaliada em função da repetibilidade e da precisão intermediária.

A repetibilidade do método foi avaliada a partir de 7 extrações de cada nível de fortificação proposto, sendo realizada uma injeção de cada extrato. Os valores detalhados de  $RSD_r$  estão apresentados juntamente com os resultados de recuperação na Tabela 22.

A precisão intermediária do método foi avaliada utilizando dias de análise diferentes e o nível de fortificação  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Os resultados de recuperação e RSD para a precisão intermediária estão apresentados na Tabela 22.

Os resultados para o estudo da repetibilidade e precisão intermediária dos agrotóxicos e medicamentos veterinários nas amostras de solo, em termos de RSD, para a grande maioria dos compostos ficaram abaixo de 20%. Para matrizes ambientais e de alimentos, a precisão é dependente da matriz da amostra, da concentração do analito e da técnica de análise, podendo variar entre 2% e mais de 20% (SANCO, 2010).

Tabela 22 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (n=7).

(continua)

Compostos	Nível de fortificação	
	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec (%)	$RSD_{pi}$ (%)
2,4-D	70,4	18,0
Atrazina	85,4	9,4
Azoxistrobina	81,3	16,6
Bentazona	73,1	19,2
Bispiribaque sódico	72,4	20,4
Bitertanol	87,3	22,6
Boscalida	75,0	12,5
Bromuconazole	77,3	17,4
Buprofezina	80,8	11,0
Carbaril	86,7	10,8
Carbendazina	70,0	16,5
Carbofurano	72,4	18,3
Carbofurano 3-OH	80,5	12,8



Tabela 22 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de 50 µg kg<sup>-1</sup> (n=7).

(continuação)

Compostos	Nível de fortificação	
	50 µg kg <sup>-1</sup>	
	Rec (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Cianazina	109,8	18,0
Clomazone	79,2	17,8
Cloranfenicol	78,0	17,0
Clorimuron etílico	87,1	20,4
Clorpirifós etílico	82,2	12,8
Clorpirifós metílico	71,0	16,3
Clorprofam	90,1	16,2
Diazinona	91,1	10,9
Difenoconazole	86,7	13,9
Dimetoato	125,9	17,8
Epoxiconazole	84,9	20,6
Fempropatrina	92,1	40,0
Fempropimorfe	73,5	19,8
Fenarimol	78,6	11,4
Fentiona	77,4	25,8
Fipronil	84,1	20,3
Fluquiconazole	73,7	19,1
Fluroxipir	71,0	27,5
Flutolanil	88,0	13,7
Imazalil	71,0	11,5
Imidacloprido	66,7	32,6
Iprovalicarbe	112,3	18,8
Linurom	75,4	17,7
Linuron deuterado	70,9	18,3
Malationa	68,0	12,5
Mecarbam	84,4	23,4
Mepronil	82,6	11,5
Metaconazole	84,1	10,0
Metalaxil	77,2	21,9
Metiocarbe sulfona	89,6	9,8
Metiocarbe sulfóxido	72,0	17,5
Metsulfurom metílico	74,0	16,8
Mevinfós	72,5	20,5
Miclobutanil	83,7	8,6
Monesina	91,5	10,9
Monocrotofós	86,8	17,8
Monolinurom	88,6	15,2
Paraoxon etílico	76,5	23,8
Piraclostrobina	78,9	25,9

Tabela 22 - Percentuais de recuperação e RSD para a precisão intermediária do método QuEChERS modificado, no nível de fortificação de  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (n=7).

Compostos	(conclusão)	
	Nível de fortificação	
	$50 \mu\text{g kg}^{-1}$	
	Rec (%)	$\text{RSD}_{\text{pi}}$ (%)
Pirazofós	81,3	13,4
Piridaben	90,4	19,0
Piridafentiona	114,0	17,5
Piridato	85,5	8,6
Pirimetanil	90,7	9,9
Pirimicarbe	72,4	11,8
Pirimifós metílico	97,9	14,8
Profenofós	83,4	14,8
Propargito	73,2	8,2
Propiconazole	78,4	16,8
Propizamida	76,8	19,9
Propoxur	78,2	7,3
Quinoxifeno	70,0	15,9
Robenidina	85,3	7,7
Salbutamol	8,6	27,5
Salinomicina	69,6	5,7
Simazina	80,1	18,5
Sulfadimetoxina	83,8	12,0
Sulfametazina	67,9	19,5
Sulfatiazol	68,8	17,8
Tebuconazole	71,3	12,7
Terbutilazina	82,6	18,7
Tetraconazole	85,0	17,1
Tiacloprido	95,2	9,9
Tiametoxam	74,8	35,9
Tolcofós metílico	86,8	29,8
Triadimefom	75,7	15,6
Triazofós	84,4	21,8
Triclorfom	90,5	13,3
Trifloxistrobina	91,2	18,6
Triflumizole	76,4	14,6
Trimetoprima	48,6	18,1
Vamidationa	71,8	17,8

A repetibilidade do instrumento foi avaliada através da injeção da solução analítica  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada no extrato da matriz em replicata (n = 7). Observando os resultados, apresentados na Tabela 23, percebe-se que o valor percentual de

RSD foi inferior a 20% para a maioria dos agrotóxicos e medicamentos veterinários, comprovando assim, a repetibilidade das injeções.

Tabela 23 - Percentuais de RSD para a repetibilidade do instrumento para a solução analítica 20 µg L<sup>-1</sup> preparada no extrato da matriz.

(continua)

Compostos	RSD (%)	Compostos	RSD (%)
2,4-D	15,0	Imazalil	3,2
Atrazina	4,6	Imidacloprido	5,4
Azoxistrobina	15,7	Iprovalicarbe	14,4
Bentazona	16,6	Linurom	17,2
Bispiribaque sódico	14,5	Linuron deuterado	12,3
Bitertanol	7,0	Malationa	10,9
Boscalida	16,0	Mecarbam	19,8
Bromuconazole	13,9	Mepronil	12,5
Buprofezina	4,7	Metaconazole	19,2
Carbaril	18,2	Metalaxil	14,7
Carbendazina	18,5	Metiocarbe sulfona	12,2
Carbofurano	15,5	Metiocarbe sulfóxido	16,5
Carbofurano 3-OH	18,6	Metsulfurom metílico	2,6
Cianizina	9,5	Mevinfós	3,3
Clomazone	13,8	Miclobutanil	10,7
Cloranfenicol	13,3	Monesina	7,4
Clorimuron etílico	11,7	Monocrotofós	18,0
Clorpirifós etílico	13,5	Monolinurom	8,3
Clorpirifós metílico	5,4	Paraoxon etílico	11,0
Clorprofam	10,3	Piraclostrobina	13,4
Diazinona	10,5	Pirazofós	7,6
Difenoconazole	16,7	Piridaben	19,6
Dimetoato	1,6	Piridafentiona	5,7
Epoconazole	15,8	Piridato	15,1
Fempropatrina	12,8	Pirimetanil	3,4
Fempropimorfe	5,2	Pirimicarbe	6,0
Fenarimol	4,0	Pirimifós metílico	8,8
Fentiona	19,7	Profenofós	17,7
Fipronil	13,2	Propargito	17,0
Fluquiconazole	7,7	Propiconazole	9,8
Fluroxipir	17,5	Propizamida	17,2
Flutolanil	18,9	Propoxur	15,5

Tabela 23 - Percentuais de RSD para a repetibilidade do instrumento para a solução analítica  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  preparada no extrato da matriz.

(conclusão)			
Compostos	RSD (%)	Compostos	RSD (%)
Quinoxifeno	17,8	Tiacloprido	12,0
Robenidina	13,4	Tiametoxam	17,0
Salbutamol	0,9	Tolcofós metílico	14,9
Salinomicina	19,8	Triadimefom	14,7
Simazina	18,0	Triazofós	7,7
Sulfadimetoxina	0,7	Triclorfom	7,9
Sulfametazina	4,3	Trifenilfosfoato	14,7
Sulfatiazol	15,5	Trifloxistrobina	12,3
Tebuconazole	20,0	Triflumizole	4,3
Terbutilazina	7,4	Trimetoprima	18,9
Tetraconazole	11,0	Vamidationa	16,0

#### 4.5 Aplicação do método

O método desenvolvido foi aplicado para a determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em 14 amostras de solo coletadas na cidade de Santa Maria-RS. Do total de amostras analisadas, seis delas apresentaram resíduos de agrotóxicos, sendo que quatro apresentaram resíduos de carbendazina em concentração acima de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ , duas apresentaram resíduos de tebuconazole em concentração acima de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  e uma apresentou resíduo de epoxiconazole em concentração acima de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

## 5 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram comparadas diferentes técnicas de extração de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo. Para a extração foram avaliados procedimentos baseados no método QuEChERS, ultrassom e agitação mecânica e, ainda, a combinação destas técnicas.

O método de extração otimizado utilizando QuEChERS e agitação mecânica apresenta algumas vantagens com relação a outros métodos de extração, pois é um procedimento simples, barato e ambientalmente correto, uma vez que utiliza pouca quantidade de solvente orgânico e a exposição do analista a este solvente é baixa.

Além disso, a eliminação da limpeza dos extratos resulta em um menor número de etapas analíticas, diminuindo a probabilidade de erros no processo, além de um menor consumo de reagentes e, conseqüentemente, de menor custo. Apesar da adição de uma etapa de agitação mecânica ao método, este tempo adicional é compensado pela ausência da etapa de limpeza dos extratos, pois a mesa agitadora permite que diversas amostras sejam extraídas ao mesmo tempo. Além disso, é um equipamento de baixo custo e fácil manuseio. Sendo assim, o método de preparo da amostra desenvolvido pode ser aplicado na análise de rotina de qualquer laboratório, devido à simplicidade de operação, para investigar a presença multirresíduo de agrotóxicos e medicamentos veterinários simultaneamente em amostras de solo.

O método proposto para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo empregando extração por QuEChERS modificado combinado com agitação mecânica e quantificação por UHPLC-MS/MS demonstrou ser eficiente, apresentando resultados de recuperação satisfatórios entre 70 e 120% para a grande maioria dos compostos, com valores de RSD menores que 20%, comprovando a confiabilidade do método.

O efeito matriz, avaliado através da comparação entre as curvas analíticas preparadas em solvente e no extrato da matriz, foi pronunciado em alguns casos, demonstrando aumento da intensidade do sinal quando preparados no extrato da matriz e, evidenciando a importância da quantificação das amostras utilizando curvas analíticas preparadas no extrato “branco” da matriz.

A maioria dos compostos apresentou uma faixa linear adequada com valores de coeficiente de determinação maiores que 0,99. Os valores de LOD do método

variaram entre 3,0 e 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , enquanto os valores de LOQ do método entre 10 e 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

As condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos agrotóxicos e medicamentos veterinários por UHPLC-MS/MS permitiram a confirmação e quantificação dos compostos de forma adequada. A utilização de UHPLC-MS/MS proporcionou além de detectabilidade, seletividade satisfatória e alta sensibilidade.

Vale salientar que dos 76 agrotóxicos estudados, nove não foram quantificados com segurança nos níveis de fortificação avaliados, sendo eles, bitertanol, clorimuron etílico, fempropatrina, fentiona, fluroxipir, piridaben, pirimicarbe, propargito e vamidationa. Além disso, dos nove medicamentos veterinários avaliados, os compostos salbutamol e trimetoprima não apresentaram percentuais de recuperação e RSD considerados satisfatórios.

Amostras reais de solo foram utilizadas para a verificação da aplicabilidade do método validado para a extração de agrotóxicos e medicamentos veterinários, sendo que o método mostrou-se bastante eficiente, uma vez que das 14 amostras analisadas, 6 apresentaram resíduos de agrotóxicos (carbendazina, epoxiconazole e tebuconazole) e, além disso, não foi observada a ocorrência de interferências. A contaminação do meio ambiente provocada pela presença de agrotóxicos e medicamentos veterinários é uma realidade e, por isso, é de extrema importância o desenvolvimento de métodos analíticos adequados para a determinação destes compostos no solo.

É importante destacar que este trabalho contribui no sentido do desenvolvimento de métodos analíticos validados empregando técnicas modernas de extração, e também devido à existência de poucos trabalhos científicos publicados até o momento sobre a extração simultânea de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo.

Portanto, os objetivos traçados para este trabalho foram alcançados com sucesso, uma vez que o método mostrou-se eficiente para a análise simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em amostras de solo, podendo ser usado como uma técnica de rotina em laboratórios de análises visto que, para maioria dos compostos analisados, os parâmetros de validação encontraram-se dentro dos limites exigidos para validação de métodos cromatográficos.

## **DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS**

As atividades laboratoriais produzem resíduos que devem ser gerenciados corretamente, a fim de minimizar os danos ao meio ambiente.

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram gerados resíduos sólidos e líquidos. Os resíduos sólidos foram armazenados em sacos plásticos brancos e identificados. Já os resíduos líquidos foram acondicionados separadamente em bombonas plásticas, devidamente identificadas de acordo com sua classificação: resíduos halogenados, resíduos não halogenados e resíduos de álcool e acetona. Todos estes resíduos foram encaminhados ao almoxarifado do Departamento de Química da UFSM, para posterior tratamento e descarte adequado por uma empresa terceirizada capacitada para este serviço.





## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ⇒ Ampliação do escopo de agrotóxicos e medicamentos veterinários a serem analisados;
- ⇒ Otimizar os parâmetros cromatográficos para os compostos para os quais não foi possível determinar uma faixa linear de trabalho;
- ⇒ Desenvolvimento de um método cromatográfico para determinação de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em solo utilizando a técnica de Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas para compostos não passíveis de análise por UHPLC-MS/MS;
- ⇒ Avaliar a aplicação deste método em outras amostras ambientais como, por exemplo, outros tipos de solo, sedimento e lodo.
- ⇒ Avaliar o impacto dos resíduos dos compostos estudados em pequenos organismos e micro-organismos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A.; MOHAMED, A.; ABDULAMIR, A. S.; ABAS, H. A. A review on supercritical fluid extraction as new analytical method. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, p. 345-353, 2008.

ALLAIRE, S. E.; ROULIER, S.; CESSNA, A. J. Quantifying preferential flow in soils: A review of different techniques. **Journal of Hydrology**, v. 378, p. 179–204, 2009.

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 136p., 2009.

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

AMADORI, M. F.; CORDEIRO, G. A.; REBOUÇAS, C. C.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T.; ABATE, G. Extraction method for the determination of atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in agricultural soil using factorial design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 483-491, 2013.

AMELUNG, W.; NIKOLAKIS, A.; LAABS, V. Multiresidue determination of pesticides in acid-clay soils from Thailand. **Journal of AOAC International**, p. 1659-1669, 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 439 p. 2007.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v.339, p. 365-367, 1991.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em março de 2013.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de junho de 2003. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em novembro de 2012.

APCEL. Asia-Pacific Centre for Environmental Law. Soil quality: maximum allowable limits of pesticide residue in the soil – TCVN 5941, 1995. Disponível em: <sunsite.nus.edu.sg/apcel>. Acesso em junho de 2013.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2a ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.

BANGUI, Q.; BINBIN, Y.; YONG, Z.; XINGCHEN, L. Residual Analysis of Organochlorine Pesticides in Soil by Gas Chromatograph–Electron Capture Detector (GC–ECD) and Gas Chromatograph–Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry (GC–NCI–MS). **Environmental Forensics**, v. 10, p. 331-335, 2009.

BANJOO, D. R.; NELSON, P. K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 9-18, 2005.

BAO, Y.; ZHOU, Q.; GUAN, L.; WANG, Y. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures. **Waste Management**, v. 29, p. 1416-1423, 2009.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. 215 p.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2. ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BARKER, S. A. Application of matrix solid-phase dispersion in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 63, p. 880, 2000.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 115, p. 885, 2000.

BOXALL, A. B. A.; KOLPIN, D. W.; HALLING-SØRENSEN, B. H.; TOLLS, J. Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? **Environmental Science Technological**, v. 287A, 2003

BOXALL, A. B. A.; JOHNSON, P.; SMITH, E. J.; SINCLAIR, C. J.; STUTT, E.; LEVY, L. S. J. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants **Agriculture Food Chemistry**, v. 54, p. 2288, 2006.

BRAGANÇA, I.; PLÁCIDO, A.; PAÍGA, P.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 281-289, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica: Fármacos em produtos para alimentação e

medicamentos veterinários. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. Brasília: Mapa/ACS, 2011b. 72p.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7802/1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 jan 2002. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Decreto/2002/D4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm)>. Acesso em abril de 2013.

BRONDI, S. H. G.; DE MACEDO, A. N.; VICENTE, G. H. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography– Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 18–22, 2011.

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

CAHILL, J. D.; FURLONG, E. T.; BURKHARDT, M. R.; KOLPIN, D.; ANDERSON, L. G. J. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1, p. 171, 2004.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; CERQUEIRA, M. B.; TOMASINI, D.; FURLONG, E. B.; FAGUNDES, C.; PRIMEL, E. G. Evaluation of a Modified QuEChERS Extraction of Multiple Classes of Pesticides from a Rice Paddy soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11918-11926, 2011.

CAMEL, V. Supercritical fluid extraction as a useful method for pesticides determination. **Journal of Chromatography A**, v. 26, p. 99-111, 1998.

CAMEL, V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, p. 229-248, 2000.

CAPANEMA, L. X. L.; VELASCO, L. O. M.; SOUZA, J. O. B.; NOGUTI, M. B. Panorama da Indústria Farmacêutica Veterinária. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 157-174, 2007.

CAPELO, J. L.; MOTA, A. M. Ultrasonication for Analytical Chemistry. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, p. 193-201, 2005.

CAPEL, P. D. Organic chemical concepts. In: ALLEEY, W. M. (Ed.). **Regional ground-water quality**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. P. 155-180.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; REVILLA-RUIZ, P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, p. 1-17, 2005.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1a Parte. 98 p.

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

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/Informa%C3%A7%C3%B5es-B%C3%A1sicas/2-Defini%C3%A7%C3%A3o>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatorios/tabela\\_valores\\_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf). Acesso em janeiro de 2013.

CHASIN, A. M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L. M. R.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADOR, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n.1, p.1-6, 1998.

CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.

CHEN, L.; LI X. S.; WANG, Z. Q.; PAN, C. P.; JIN, R. C. Residue dynamics of procymidone in leek sand soil in greenhouses by smoke generator application. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 73-77, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CHITESCU, C. L.; OOSTERINK, E.; JONG, J.; STOLKER, A. A. M. Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. **Talanta**, v. 88, p. 653-662, 2012.

CHROMEDIA, 2013. Chromatography knowledge base. Disponível em: <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=thcseDsHqnOxmOIIcCvB&subNav=oibelDsHqnOxmOIIcCvBG>>. Acessado em julho de 2013.

CODEX ALIMENTARIUS, METHOD VALIDATION, JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME, Codex on Methods of Analysis and Sampling, Budapeste, 2010.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**, 2a ed, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2009, cap: 8 e 9.

CONCHA-GRAÑA, E.; BARRIADA-PEREIRA, M.; TURNES-CAROU, M .I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; RODRÍGUEZ, D. P. Microwave Extraction of Organochlorine Pesticides from Soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375 , p. 1225-1228, 2003.

CONNOR, S.; AGA, D.S. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. **TrAC. Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 456-465, 2007.

CORREIA, M.; DELERUE-MATOS, C.; ALVES, A. Development of a SPME-GC-ECD methodology for selected pesticides in must and wine samples. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 647-651, 2001.

CORREIA-SÁ, L.; FERNANDES, V. C.; CARVALHO, M.; CALHAU, C.; DOMINGUES, V.; DELERUE-MATOS, C. Optimization of QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in soils with diverse organic matter. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 1521-1530, 2012.

DEMOLINER, A. **Otimização e validação de metodologia analítica empregando SPE e LC-ESI-MS/MS para a determinação de multiclasses de agrotóxicos e metabólitos em água de superfície e abastecimento público**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Química) – FURG, Rio Grande, RS.

DENOBILO, M., NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina e doxitetraclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 209, 2004.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; DE ALDA, J. L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 340, 2003

DISERENS, J. M. Rapid Determination of Nineteen Chlorophenols in Wood, Paper, Cardboard, Fruits, and Fruit Juices by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of AOAC International**, v.84, p. 853-860, 2001.

DIEZ, C.; BARRADO, E.; MARINERO, P.; SANZ, M. Orthogonal array optimization of a multiresidue method for cereal herbicides in soils. **Journal of Chromatography A**, v.1180, p.10-13, 2008.

DOLLIVER, H.; KUMAR, K.; GUPTA, S. Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil, **Journal of Environmental Quality**, v. 36, n. 4, p. 1224, 2007.

DONG, F.; LIU, X.; CHEN, W.; LI, J.; QIN, D.; ZHENG, Y. Determination of metaflumizone residues in cabbage and soil using ultra-performance liquid chromatography/ESI-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3692-3697, 2009.

DROZDZYNSKI, D.; KOWALSKA, J. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 394, p. 2241-2247, 2009.

ĐUROVIĆ, R.; ĐORĐEVIĆ, T.; ŠANTRIĆ, LJ.; GAŠIĆ, S.; IGNJATOVIĆ, LJ. Headspace Solid Phase Microextraction Method for Determination of Triazine and Organophosphorus Pesticides in Soil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 45, p. 626-632, 2010.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA PESQUISA AGROPECUÁRIA), Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 3 ed. 353 p. Brasília, DF, 2013.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). Disponível em <<http://www.fao.org>>. Acesso em abril de 2013.

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

FEDOTOV, P. S.; BAUER, C.; POPP, P.; WENNRICH, R.; Dynamic extraction in rotating coiled columns, a new approach to direct recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 305-309, 2004.

FENOLL, J.; HELLIN, P.; MARTINEZ, C.M.; FLORES, P. Multiresidue analysis of pesticides in soil by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 92, p. 1566-1575, 2009.

FERNANDEZ-ALBA, A. R. *Chromatographic - Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*, Elsevier, Amsterdam, 2005.

FERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, M.; LLOMPART, M.; LAMAS, J.P.; LORES, M.; GARCÍA-JARES, C.; CELA, R.; DAGNAC, T. Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1188, p. 154-163, 2008.

FERNANDEZ-ALVAREZ, M.; LAMAS, J.P.; GARCIA-CHAO, M.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M.; LORES, M.; DAGNAC, T. Monitoring of pesticide residues in dairy cattle farms from NW Spain. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 1864-1875, 2010.

FERRER, C.; LOZANO, A.; AGUERA, A.; GIRON, A. J.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7634-7639, 2011.



FDA (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Disponível em <<http://www.fda.gov>>. Acesso em março de 2013.

FRIGGI, C. A. **Determinação multiclasse de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em carnes empregando LC-MS/MS**. 2012. 151 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

FVO (FOOD AND VETERINARY OFFICE). Disponível em <<http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>>. Acesso em março de 2013.

FUENTES, E; BAEZ, M.; LABRA, R. J. Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1169, p. 40-46, 2007.

GIERGIELEWICZ-MOZAJSKA, H.; DABROWSKI, L.; NAMIESNIK, J. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples—some aspects of theory and practice. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, p. 149-165, 2001.

GOMES, M. A. F.; CERDEIRA, A. L.; SPADOTTO, C. A. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/html). Acesso em junho de 2013.

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

GROSS, J. H. **Mass spectrometry**. A textbook. 1a ed., Editora Springer, Heidelberg, Alemanha, 2004.

HAJSLOVÁ, J.; HOLADOVA, K.; KOCOUREK, V.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; CUHRA, P.; KEMPNY, M.; Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 283-295, 1998.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLÍKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analyses of pesticides residues in food and biotic matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

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

HAVENS, K.E.; BIERMAN, V.J.; FLAIG, E.G.; HANLON, C.; JAMES, R.T.; JONES, B.L.; SMITH, V. Historical trends in the Lake Okeechobee Ecosystem: VI. Synthesis. Arch. Hydrobiol. (Suppl.), v. 107, p. 101-111, 1995.

HAWTHORNE, S. B.; GRABANSKI, C. B.; MARTIN, E.; MILLER, D. J.; Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and

subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 421-433, 2000.

HERBERT, P.; MORAIS, S.; PAÍGA, P.; ALVES, A.; SANTOS, L. Development and Validation of a Novel Method for the Analysis of Chlorinated Pesticides in Soils Using Microwave-Assisted Extraction–Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 810-816, 2006.

HERCEGOVÁ, A.; DÖMÖTÖROVÁ, M.; MATISOVÁ, E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 54-73, 2007.

HILDEBRANDT, A.; LACORTE, S.; BARCELÓ, D. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 1459-1468, 2007.

HO, Y. B.; ZAKARIA, M. P.; LATIF, P. A.; SAARI, N. Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil and manure compost by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1262, p. 160-168, 2012.

HOLSTEGE, D. M.; SCHARBERG, D.L.; TOR, E. R.; HART, L. C.; GALEY, F. D. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, v. 77, p. 1263-1274, 1994.

HYOTYLAINEN, T.; TUUTIJARVI, T.; KUOSMANEN, K.; RIEKKOLA, M. L. Determination of pesticide residues in red wines with microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, p. 732-736, 2002.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, v. 2, p. 96, 1998

IGLESIAS, A. H., Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas, **Waters Technologies do Brasil**, Barueri, SP, 2013.

International Conference on Harmonization (ICH); Validation of analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL) **DOQ-CGCRE-008**: Orientação sobre validação de métodos analíticos. Brasília, 2011. 19p.

JAKUBOWSKA, N.; POLKOWSKA, Z.; NAMIESNIK, J.; PRZYJAZNY, A. Analytical Applications of Membrane Extraction for Biomedical and Environmental Liquid Sample Preparation. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 217-235, 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p. 996-1012, 2009.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia, Campinas, SP, UNICAMP, Cap. XI, p. 273-398, 2006.

JARVIS, N. J. A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: principles, controlling factors and consequences for water quality. **European Journal of Soil Science**. v.58, p. 523–546, 2007.

KAH, M.; BEULKE, S.; BROWN, C. Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4487-4492, 2007.

KAY, P.; BLACKWELL, P.A.; BOXALL, A.B.A. A lysimeter experiment to investigate the leaching of veterinary antibiotics through a clay soil and comparison with field data. **Environmental Pollution**. v. 134, p. 333-341, 2005.

KEMMERICH, M. **Determinação mutirresíduo de agrotóxicos em pimentão utilizando método quechers modificado e UHPLC - MS/MS**. 2013. 122 p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFSM, Santa Maria, RS.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008.

KENNY D. J.; WORTHINGTON, K. R.; HOYES, J. B. Scanwave: a new approach to enhancing spectral data on a tandem quadrupole mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 21, p. 1061-1069, 2010.

KINNEY, C. A.; FURLONG, E. T.; KOLPIN, D. W.; BURKHARDT, M. R.; ZAUGG, S. D.; WERNER, S. L.; BOSSIO, J. P.; BENOTTI, M. J. Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. **Environmental Science Technology**, v. 42, p. 1863-1870. 2008.

KOESUKWIWAT, U.; SANGUANKAEW, K.; LEEPIPATPIBOON, N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 10-20, 2008.

KRUBE, A.; KUNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 58-66, 2008.

KVÍCALOVÁ, M.; DOUBRAVOVÁ, P.; JOBÁNEK, R.; JOKESOVÁ, M.; OCENÁSKOVÁ, V.; SUSSENBKOVÁ, H.; SVOBODOVÁ. Application of different extraction methods for the determination of selected pesticide residues in sediments. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 89, p. 21-26, 2012.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. **Chemosphere**, v. 41, p. 1441-1449, 2000.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 1663-1683, 2007.

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

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

LAVORENTI, A. **Remobilização e transporte de resíduos ligados de pesticidas ao solo**. In: **Simpósio sobre dinâmica de defensivos agrícolas no solo**, 2002, Piracicaba. Apostila. Piracicaba: ESALQ, P. 70-78. 2002.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1021-1036, 2011.

LEHOTAY, S.J; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MASTOVSKA, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2548-2560, 2010.

LEHOTAY, S. J.; HIEMSTRA, M.; BODEGRAVEN, P.; KOK, A. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 88, p. 595, 2005a.

LEHOTAY, S. J. Determination of Pesticide Residues in Nonfatty Foods by Percritical Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Collaborative Study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 85, p. 1148-1166, 2002.

LEONARD, R. A. Movement of pesticides into surface Waters. In: CHENG, H. H. (Ed). Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling. **Soil Science Society of America**, Madison, Wisconsin, USA, p. 303-349. (Book Series, 2), 1990.

LEPSCH, I. F. **Formação e Conservação dos Solos**. São Paulo, SP, Oficina de Textos, 178 p. 2002.

LESUEUR, C.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas

chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, p. 284-293, 2008.

LEVIGARD, Y. **A interpretação dos profissionais de saúde acerca das queixas do nervodo no meio rural: uma aproximação ao problema das intoxicações por agrotóxicos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), ENSP, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

LING, Y. C.; TENG, H. C. Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in mussels. **Journal of Chromatography A**, v. 790, p. 153-160, 1997.

LIU, X.; XU, J.; LI, Y.; DONG, F.; LI, J.; SONG, W.; ZHENG, Y. Rapid residue analysis of four triazolopyrimidine herbicides in soil, water, and wheat by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2539-2547, 2011.

LUQUE-GARCÍA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching?. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 41 - 47, 2003.

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

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, **Química Nova**, v. 32, No. 1, p. 214-222, 2009

MARAZUELA, M. D.; BOGIALLI, S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 645, p. 5-17, 2009.

MARTÍN, S. H.; PINTO, C. G.; PAVÓN, S. L. P.; CORDERO, B. M. Determination of trihalomethanes in soil matrices by simplified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and fast gas chromatography with electron capture detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4883-4889, 2010.

MARTINEZ-PARREFIO, M.; LLORCA-PORCEL, J.; VALOR, I. Analysis of 51 persistent organic pollutants in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3620-3629, 2008.

MARTINEZ VIDAL, J.L.; PADILLA SANCHEZ, J.A.; PLAZA-BOLANOS, P.; GARRIDO FRENICH, A.; ROMERO-GONZALEZ, R. Use of pressurized liquid extraction for the simultaneous analysis of 28 polar and 94 non-polar pesticides in agricultural soils by GC/QqQ-MS/MS and UPLC/QqQ-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 93, p. 1715-1731, 2010.

MEI, M.; DU, Z. X.; CEN, Y. QuEChERS-Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Determination of Five Currently Used Herbicides - **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, p. 1659-1664, 2011.

MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 234, 2007.

MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. 2ª Ed., Editora Genesis, Porto Alegre, RS, 290 p., 2004.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.; COZZOLINO, S.; CASORIA, P.; GAUDIO, L. Effects of sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L.). **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 65, p. 163-168, 1997.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; COZZOLINO, S.; CASORIA, P.; BRAMBILLA, G.; GAUDIO, L.; Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants. **Chemosphere**, v. 37, 2957-2961, 1998.

MONTIGNY, C.; LESPE, G.; POTIN-GAUTIER, M.; Matrix effects and selectivity of the detector in the determination of butyl- and phenyltins by gas chromatography-flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 819, p. 221-230, 1998.

MÜLLER, K.; MAGESAN, G.N.; BOLAN, N. S. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 120, p. 93-116, 2007.

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856, 2002.

NISHINA, T.; KIEN, C. N.; NOI, N. V.; NGOC, H. M.; KIM, C. S.; TANAKA, S.; IWASAKI, K. Pesticide residues in soils, sediments, and vegetables in the Red River Delta, northern Vietnam. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.169, p. 285 – 297, 2010.

NÚÑEZ, L.; TADEO, J. L.; GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; TURIEL, E. Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1214, p. 178-182, 2008.

NÚÑEZ, O.; AYALA, H. G.; MARTINS, C. P. B.; LUCCHI, P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1228, p. 298-323, 2012.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGENTI, A. M. Biologia de plantas daninhas. In: OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, p. 1-36, 2011.

OZCAN, S.; TOR, A.; AYDIN, M. E. Application of miniaturized ultrasonic extraction to the analysis of organochlorine pesticides in soil. **Analytica Chimica Acta**, v. 640, p. 52-57, 2009

PADILLA-SÁNCHEZ, J. A.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GARRIDO-FRENICH, A.; VIDAL, J. L. M. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5724-5731, 2010.

PAPADAKIS, E. N.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Rapid method for the determination of 16 organochlorine pesticides in sesame seeds by microwave assisted extraction and analysis of extracts by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 6-11, 2006.

PARK, J-H.; MAMUN, M. I. R.; CHOI, J-H.; EL-ATI, A. M. A.; ASSAYED, M. E.; CHOI, W. J.; YOON, K. S.; HAN, S.-S.; KIM, H. K.; PARK, B. J.; KIM, K. S.; KIM, S. D.; CHOI, G. H.; SHIM, J.- H. Development of a multiresidue method for the determination of multiclass pesticides in soil using GC. **Biomedical Chromatography**, v. 24, p. 893-901, 2009.

PATERSON, S.; MacKAY, D.; TAM, D.; SHIU, W. Y. Uptake of organic chemicals by plants: a review of processes, correlations and model. **Chemosphere**, v. 21, p. 297-331, 1990.

PAREJA, L.; NIELL, S.; ASTEGGIANTE, L. G.; ROEHRS, R.; PIZZUTTI, I. R.; GARCIA, C.; HEIZEN, H.; CESIO, V. Development of methods for multiresidue analysis of rice post-emergence herbicides in loam soil and their possible applications to soils of different composition. **Journal of AOAC International**, v. 93, p. 425-431, 2010.

PEREIRA, L. A.; JARDIM, I. C. S. F.; FOSTIER, A. H.; RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, v. 35, p. 159-169, 2012.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G. Environmental and Food Applications of LC-tandem Mass Spectrometry in Pesticide-Residue Analysis: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 45-85, 2004.

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

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 313 p. 1994.

PINHO, G. P.; NEVESII, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 92-98, 2009.

PINTO, C. G.; LAESPADA, M. E.; MARTIN, S. H.; FERREIRA, A. M.; PAVÓN, J. L.; CORDERO, B. M. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, p. 385, 2010

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

PRESTES, O. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. 130p. Tese de Doutorado (Doutorado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo da amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, p. 51-64, 2011

PRESTES, O. D.; PADILLA-SÁNCHEZ, J. A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GRIO, S. L.; GARRIDO-FRENICH, A.; MARTÍNEZ-VIDAL, J. L. Comparison of several extraction procedures for the determination of biopesticides in soil samples by ultrahigh pressure LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 861-868, 2012.

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

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

QUINETE, N. S. **Extração de Poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica, RJ: comparação de métodos**. 2005, 135 f. Dissertação (mestrado em química) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

RADOSEVICH, S.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology: implications for management**. 2ª edição. New York, EUA: John Wiley & Sons, 1997. 589 p.

RAMASUBRAMANIAN, T.; PARAMASIVAM, M.; JAYANTHI, R. Rapid and Sensitive Analytical Method for Simultaneous Determination of Imidacloprid and Thiamethoxam Residues in Soils of Sugarcane Ecosystem by Reversed-Phase HPLC. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 223, p. 6045-6050, 2012.

RAMOS, M. A.; BORGES, J. H.; PÉREZ, L. M. R.; DELGADO, M. A. R. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 2307-2319, 2010.



RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U. A. TH. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 3-29, 2002.

RASHID, A.; NAWAZ, S.; BARKER, H.; AHMAD, I.; ASHRA, M. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2933-2939, 2010.

RATH, S.; PEREIRA, L. A.; JARDIM, I. C. S. F.; FOSTIER, A. H. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solo, **Química Nova**, v. 35, p. 159-169, 2012.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos usados na Produção Animal Brasileira, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

REICHENBERGER, S.; AMELUNG, W.; LAABS, V.; PINTO, A.; TOTSCHE, K. U.; ZECH, W. Pesticide displacement along preferential flow pathways in a Brazilian Oxisol. **Geoderma**, v. 110, n. 1-2, p.63-86, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; DE SOUZA, A. G.; APON, B. M. Development of a Supercritical Fluid Extraction Method for Simultaneous Determination of Organophosphorus, Organohalogen, Organonitrogen and Pyrethroids Pesticides in Fruit and Vegetables and Its Comparison With a Conventional Method by GC-ECD and GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1038-1047, 2005.

ROGATSKY, E.; STEIN, S. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n.11, p. 1757-1759, 2005.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E., OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B., HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

SALVADOR, M.; FRENICH, A. G.; GONZÁLEZ, F. J. E.; VIDAL, M. Determination of Organophosphorus Pesticides in Vegetables by GC with Pulsed Flame-Photometric Detection, and Confirmation by MS. **Chromatographia**, v. 64, p. 667-672, 2006.

SALVIA, M. V.; VULLIET, E.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; OLIVÉ, C. C. Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 122-133, 2012.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; TADEO, J.L. Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography-mass spectrometry detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 526, p. 1445-1450, 2004.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; MARTÍN, G.; TADEO, J. L. Determination of Pesticide Residues by GC-MS Using Analyte Protectants to Counteract the Matrix Effect. **Analytical Science**, v. 21, p. 1291-1296, 2005.

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), **Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis**, 3ª Edição, Documento N° SANCO/10476/2003, 5 de Fevereiro 2004, Bruxelas, Bélgica. 2010

SANCO (EUROPEAN COMMISSION), **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed**, Document N° SANCO/12495/2011, 01 de janeiro de 2012, Bruxelas, Bélgica, 2012

SANTALAD, A.; ZHOU, L.; SHANG, F.; FITZPATRICK, D.; BURAKHAM, R., SRIJARANAI, S.; GLENNON, J. D.; LUONG, J. H. T. Micellar electrokinetic chromatography with amperometric detection and off-line solid-phase extraction for analysis of carbamate insecticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 5288-5297, 2010.

SANTOS, J. S. **Remediação de solos contaminados com agrotóxicos pelo tratamento com radiação gama**. 2009. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear). USP, São Paulo, SP.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, 2006.

SCHNOOR, T. K.; LEKBERG, Y.; ROSENDAHL, S.; OLSSON, P. A. Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal fungal communities in seminatural grassland. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 211-220, 2011.

SCORZA JÚNIOR, R. P., RIGITANO, R. L. O., FRANCO, A. A., **Comportamento ambiental de dois inseticidas em um solo de Mato Grosso do Sul: experimentação e modelagem matemática**, 2010. 36 p.: il. color.; 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-0456; 57).

SCORZA, J. R. P. **Critérios essenciais na escolha de um agrotóxico: eficiência e comportamento ambiental**. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/agrotoxicos/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/agrotoxicos/index.htm)>. Acesso em maio de 2013

SHI, C.; GUI, W.; CHEN, J. ZHU, G. Determination of Oxadiargyl Residues in Environmental Samples and Rice Samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, p. 236-239, 2010.

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

SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola). Disponível em: <http://www.sindag.com.br/>. Acesso em junho de 2013.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acesso em julho de 2013.

SINITOX (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS), 2010. Disponível em <[http://www.fiocruz.br/sinitox\\_novo](http://www.fiocruz.br/sinitox_novo)>. Acesso em abril 2013.

SINGH, S. B.; FOSTER, G. D.; KHAN, S. U. Microwave-Assisted Extraction for the Simultaneous Determination of Thiamethoxam, Imidacloprid, and Carbendazim Residues in Fresh and Cooked Vegetable Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 105-109, 2004.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de agrotóxicos, **Embrapa Meio Ambiente**. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_39\\_210200792814.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html). Acesso em maio de 2013.

STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R. GC-MS: Mas de un Analizador de Masas, para que? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 25, 2010.

STOLKER, A.M.; BRINKMAN, U.A.Th. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 15-53, 2005.

STRECK, E. V.; KÄMPF, N.; KLAMT, E.; SCHNEIDER, P.; NASCIMENTO, P. C.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S.; DALMOLIN, R. S. D. Solos do Rio Grande do Sul. 2. Ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

SUSLICK, K. S.; DIDENKO, Y.; FANG, M. M.; HYEON, T.; KOLBECK, K. J.; MCNAMARA III, W. B.; MDLELENI, M. M.; WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions Of The Royal Society A**, v. 357, n. 1751, p. 335-353, 1999.

TADEO, J. L.; PEREZ, R. A.; ALBERO, B.; GARCIA-VALCARCEL, A. I.; SANCHEZ-BRUNETE, C. , Review of Sample Preparation Techniques for the Analysis of Pesticide Residues in Soil. **Journal of AOAC International**, v. 95, p. 1258-1271, 2012.

TOR, A.; AYDIN, M. E.; OZCAN, S. Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides in soil. **Analytica Chimica Acta**, v. 559, p. 173-180, 2006

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p. 491-509, 2010.

VALSAMAKI, V. I.; BOTI, V. I.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. **Analytica Chimica Acta**, v. 195, p. 573, 2006.

VICH; *Environmental impact assessments (EIAs) for veterinary medical products (VMPS): Phase I*, 2000; [http://www.vichsec.org/pdf/2000/GI06\\_st7.pdf](http://www.vichsec.org/pdf/2000/GI06_st7.pdf). Acesso em junho 2013.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, p. 211-222, 2007.

WANG, X.; ZHAO, X.; LIU, X.; LI, Y.; FU, L.; HU, J.; HUANG, C. Homogeneous liquid–liquid extraction combined with gas chromatography–electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p. 162-169, 2008.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M.; CURYŁO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 39, p. 703-717, 2004.

WATERS (CORPORATION). 2013a. **UHPLC - Why All the Hype?** Disponível em: <<http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=10067386>>. Acesso em julho 2013.

WATERS (CORPORATION). 2013b. **BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology**. Disponível em: <<http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134618172>>. Acesso em julho 2013.

WATERS, W. X. **TQ MS Operator's Overview and Maintenance Guide**, Revision C, 2010.

WONG, F.; BIDDLEMAN, T. F. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as non-exhaustive extractant for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in muck soil. **Environmental pollution**, v. 158, p. 1303-1310, 2010.

XIN-LI, X.; SHI-HUA, Q. I.; YUAN, Z.; DAN, Y.; ODHIAMBO, J. O. Organochlorine pesticides (OCPs) in soils along the eastern slope of the Tibetan Plateau. **Pedosphere**, v. 20, p. 607-615, 2010.

YANG, X. B.; YING, G. G. KOOKANA, R. S. Rapid multiresidue determination for currently used pesticides in agricultural drainage waters and soils using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 45, p. 152-161, 2010.

ZHAO, R.; WANG, X.; FU, S.; YUAN, J.; JIANG, T.; XU, X. A Novel Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Exact Determination of Organochlorine Pesticides in Environmental Soil Samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 1584-1589, 2006.



## **APÊNDICE A**

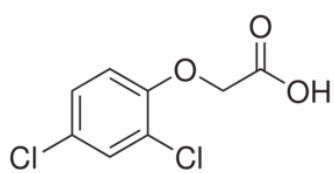
**Fórmulas estruturais dos compostos estudados**



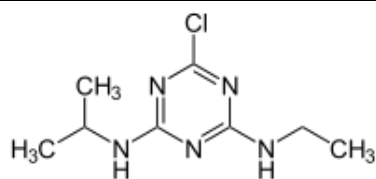


Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

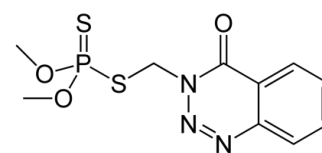
(continua)



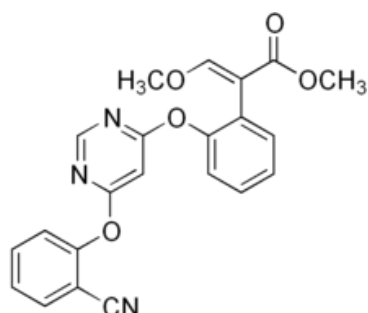
2,4 - D



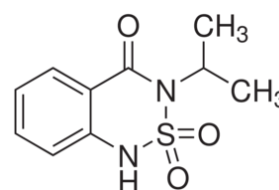
Atrazina



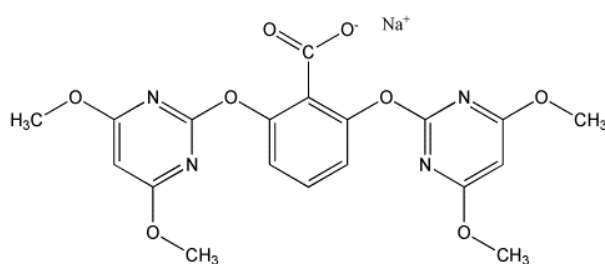
Azinós metílico



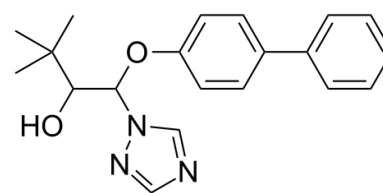
Azoxistrobina



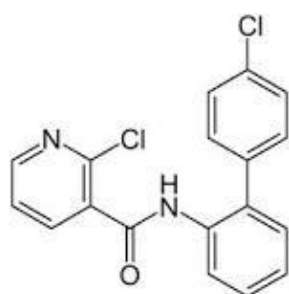
Bentazona



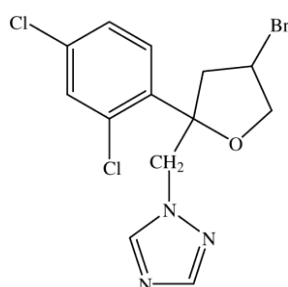
Bispiribaque-sódico



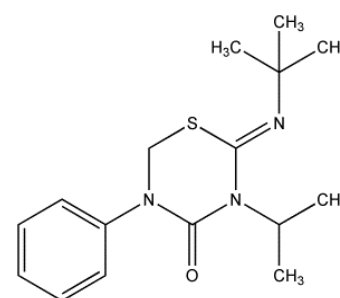
Bitertanol



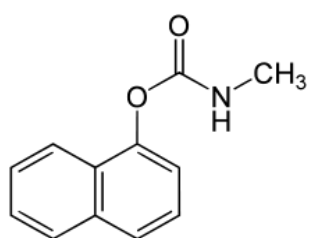
Boscalida



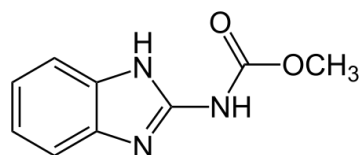
Bromuconazole



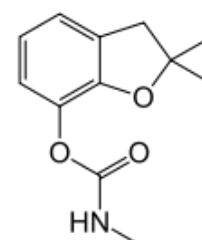
Buprofezina



Carbaril

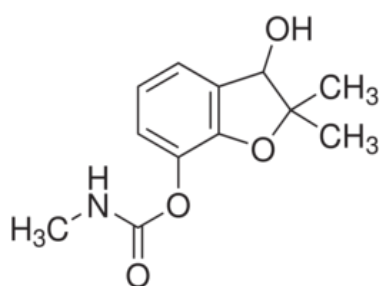


Carbendazina

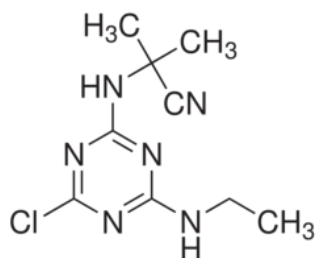


Carbofurano

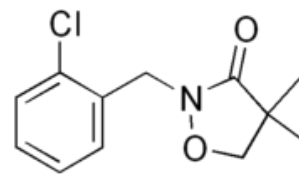
Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

*(continuação)*

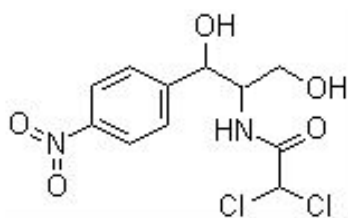
Carbofurano-3-OH



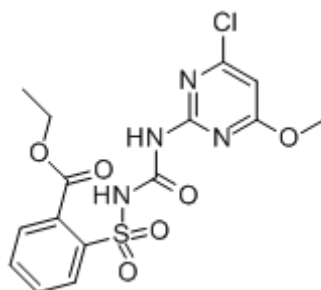
Cianazina



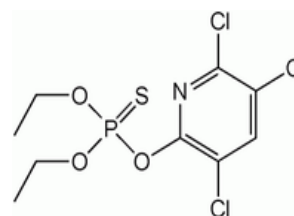
Clomazone



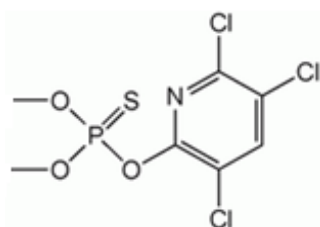
Cloranfenicol



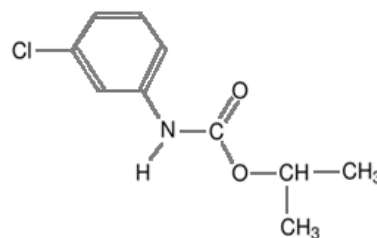
Clorimuron etílico



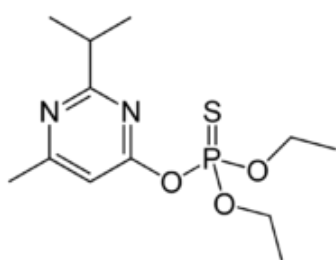
Clorpirifós etílico



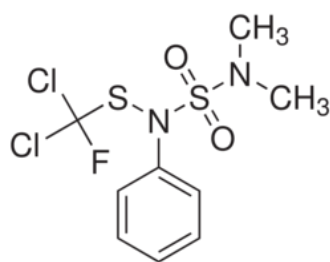
Clorpirifós metílico



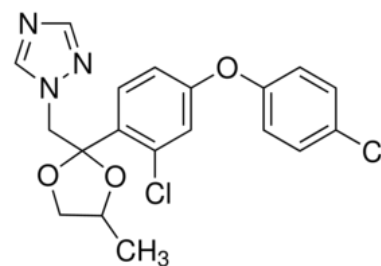
Clorprofam



Diazinona



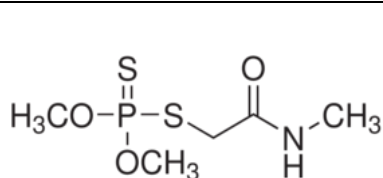
Diclofluanida



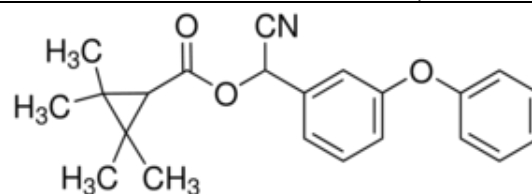
Difenoconazole

Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

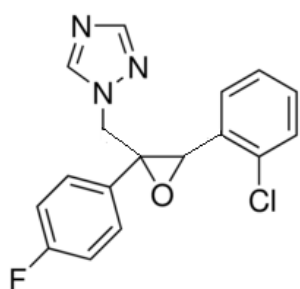
(continuação)



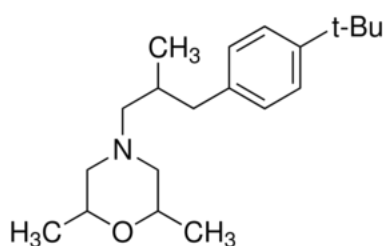
Dimetoato



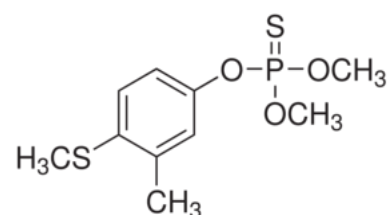
Fempropatrina



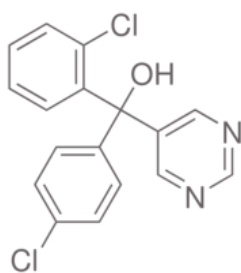
Epoxiconazole



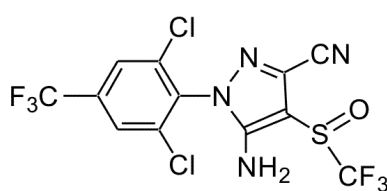
Fempropimorfe



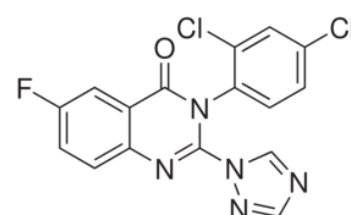
Fentiona



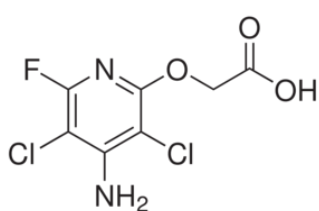
Fenarimol



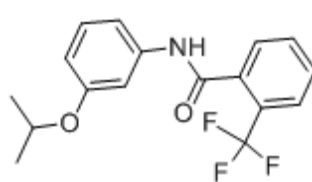
Fipronil



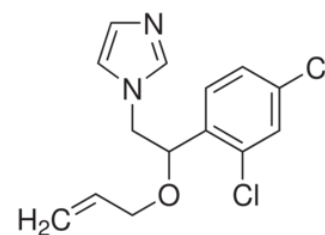
Fluquiconazole



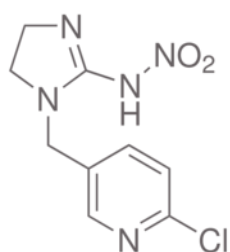
Fluroxipir



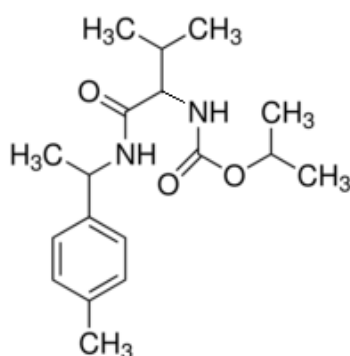
Flutolanil



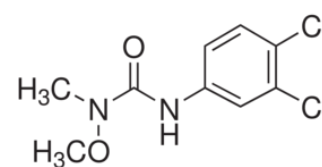
Imazalil



Imidacloprido

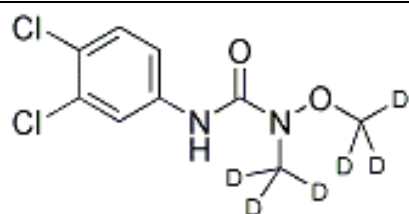


Iprovalicarbe

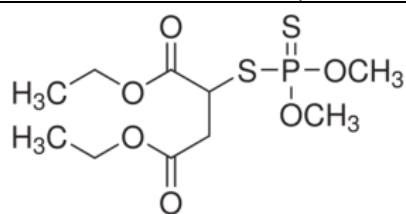


Linuron

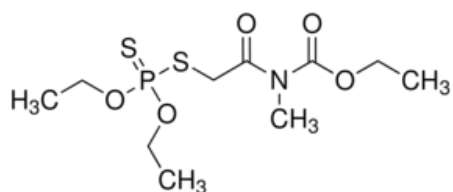
Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

*(continuação)*

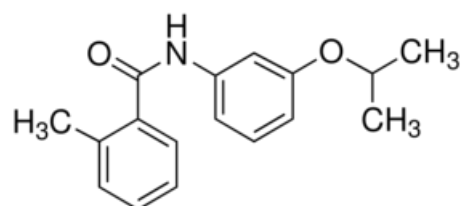
Linuron deuterado



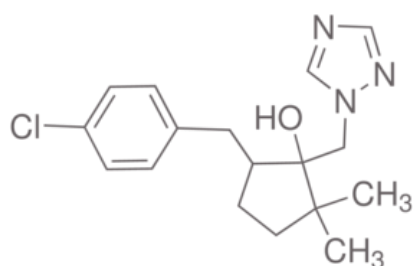
Malationa



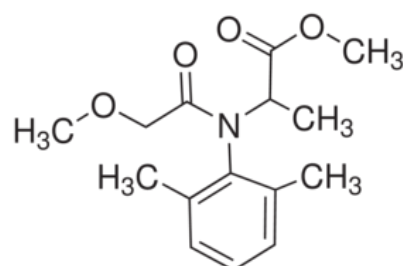
Mecarbam



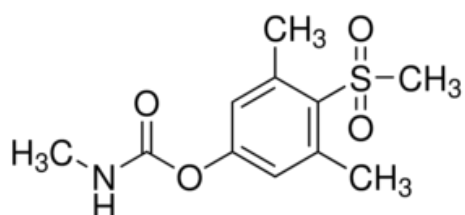
Mepronil



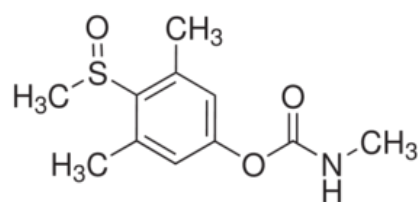
Metaconazole



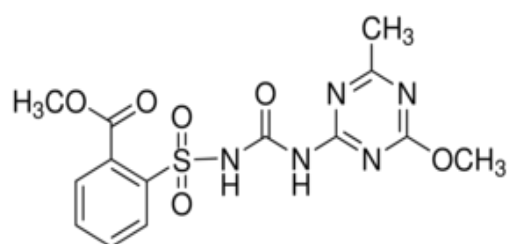
Metalaxil



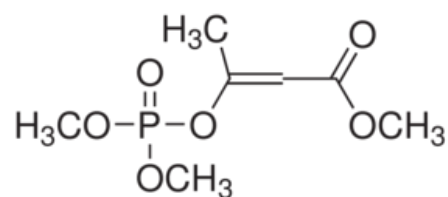
Meticarbe sulfona



Meticarbe sulfóxido



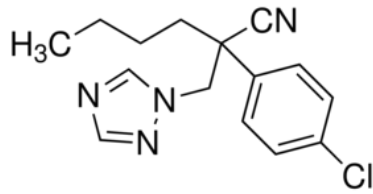
Metsulfurom metílico



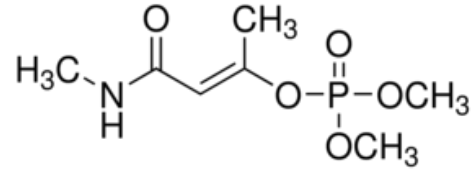
Mevinfós

Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

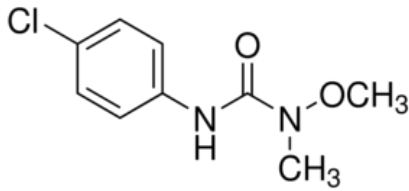
(continuação)



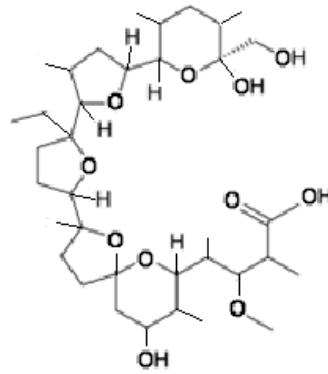
Miclobutanil



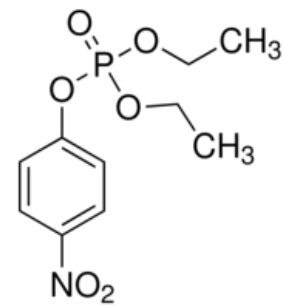
Monocrotofós



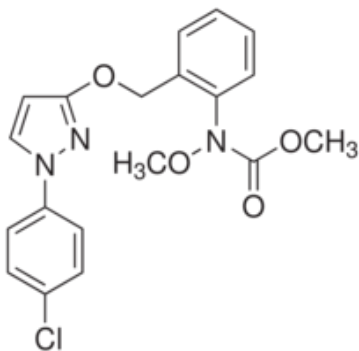
Monolinurom



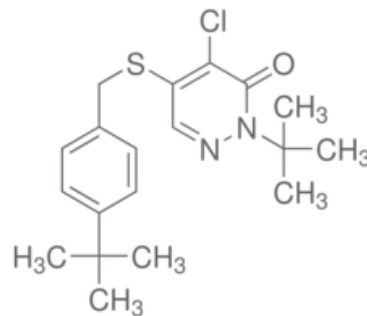
Monesina



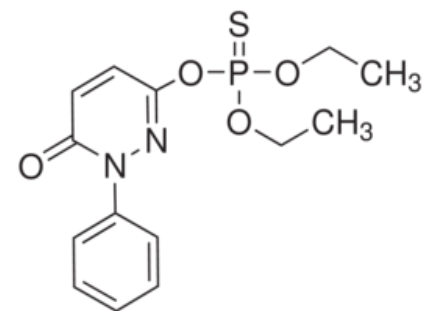
Paraoxon etílico



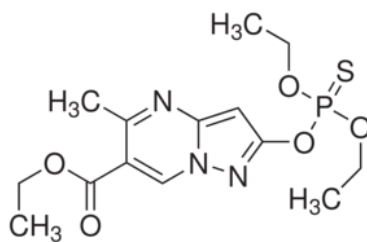
Piraclostrobina



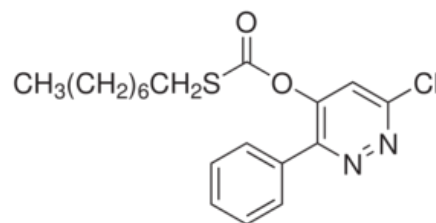
Piridaben



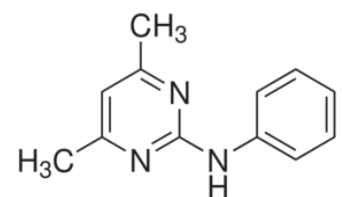
Piridafentiona



Pirazofós

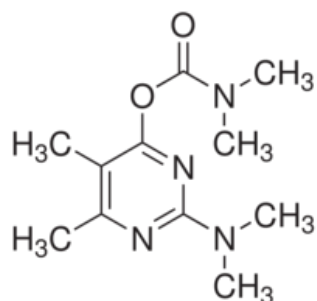


Piridato

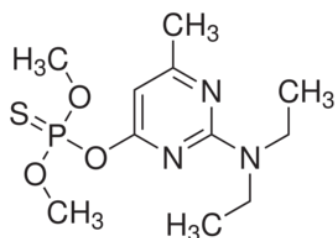


Pirimetanil

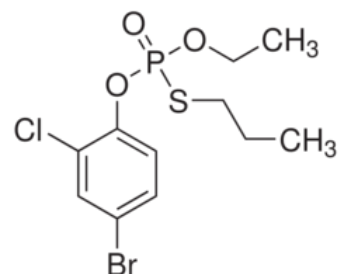
Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.

*(continuação)*

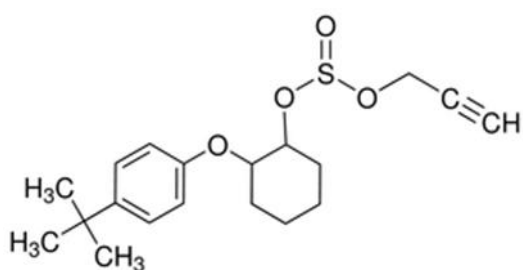
Pirimicarbe



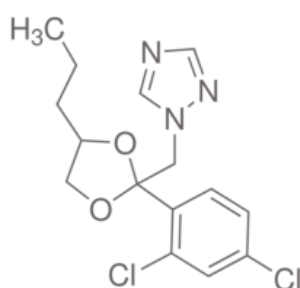
Pirimifós metílico



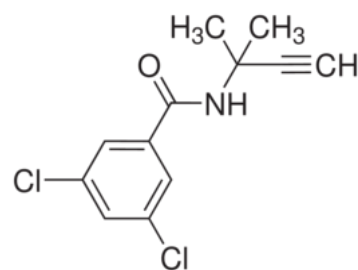
Profenofós



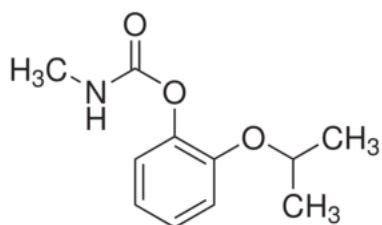
Propargito



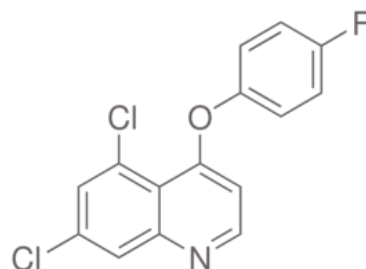
Propiconazole



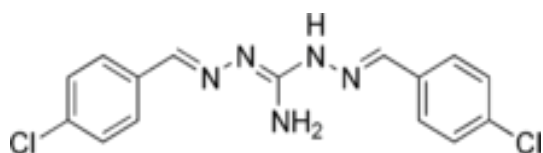
Propizamida



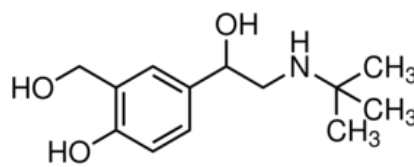
Propoxur



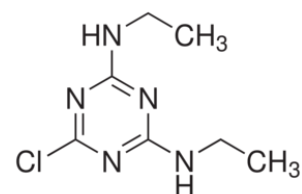
Quinoxifeno



Robenidina



Salbutamol

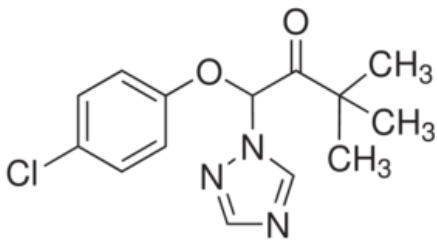


Simazina

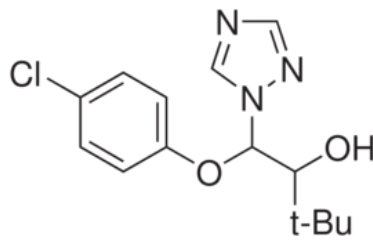
Tabela 24 - Fórmulas estruturais dos compostos estudados.



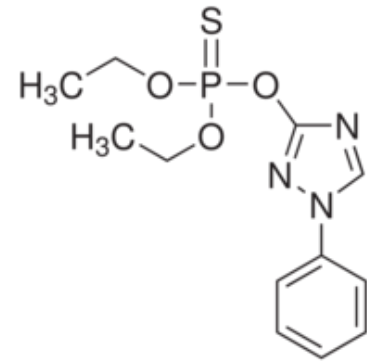
(conclusão)



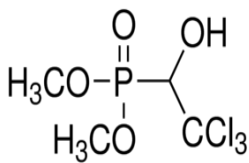
Triadimefom



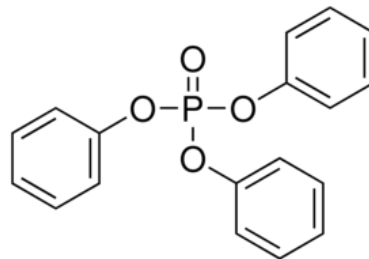
Triadimenol



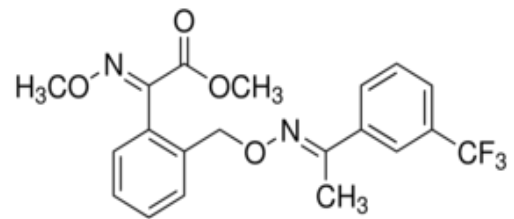
Triazofós



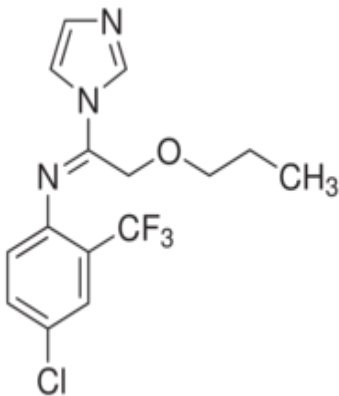
Triclorfom



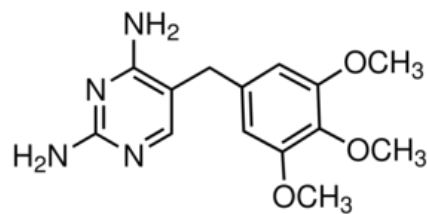
Trifenilfosfato



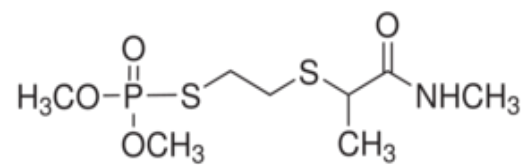
Trifloxistrobina



Triflumizole



Trimetoprima



Vamidação

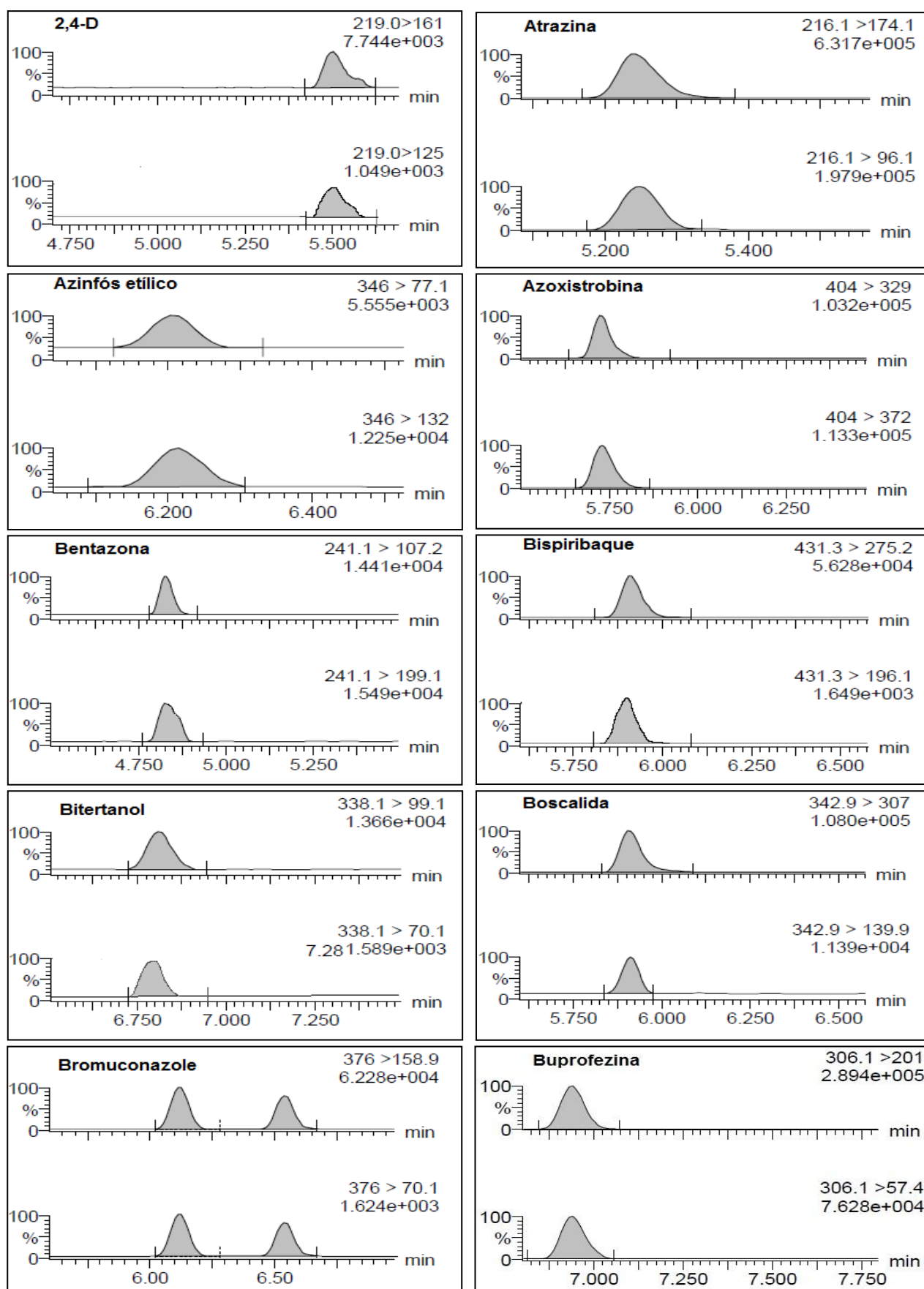


## **APÊNDICE B**

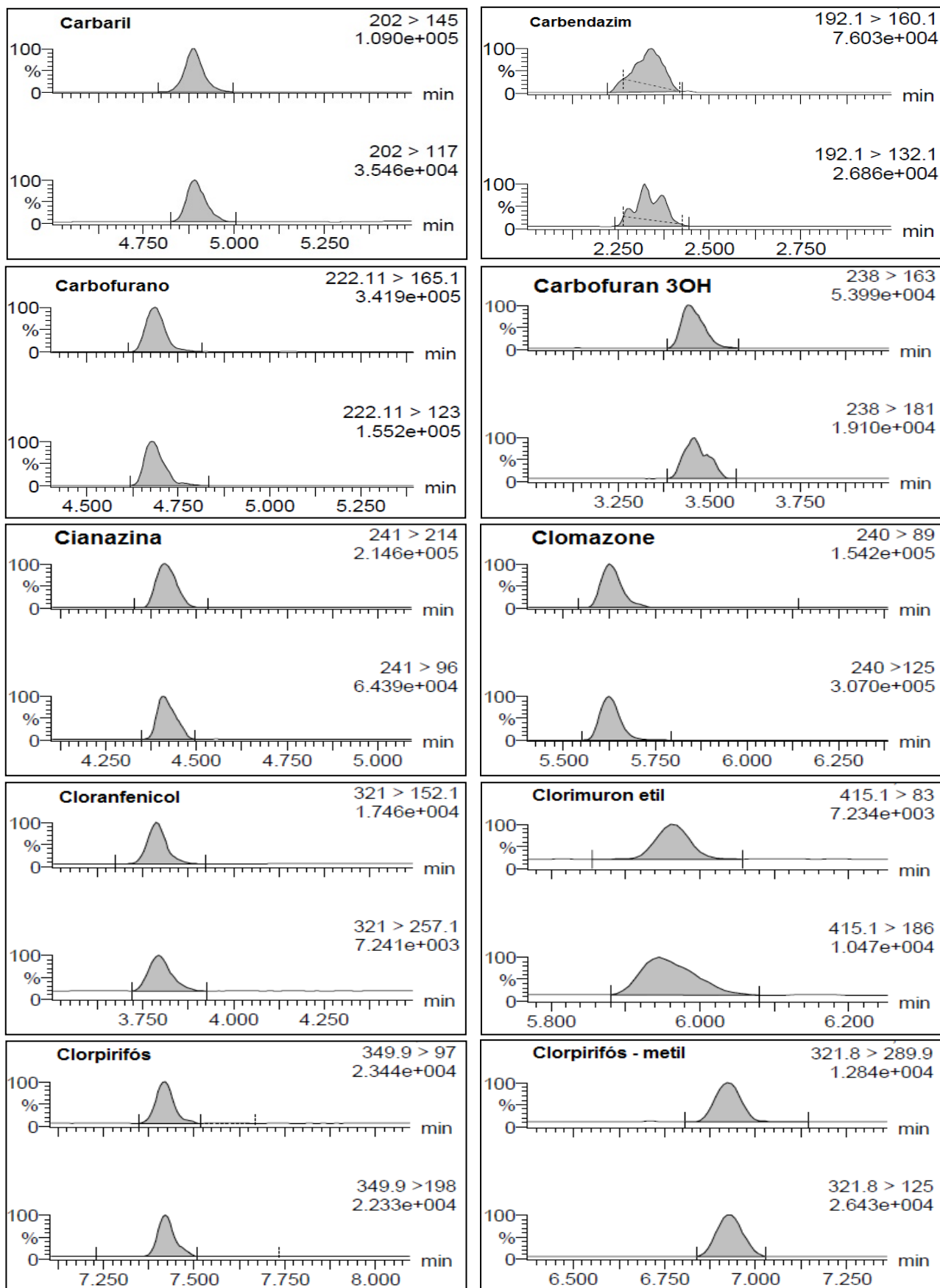
**Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato “branco” de solo, na concentração 20 µg L<sup>-1</sup> dos compostos estudados**



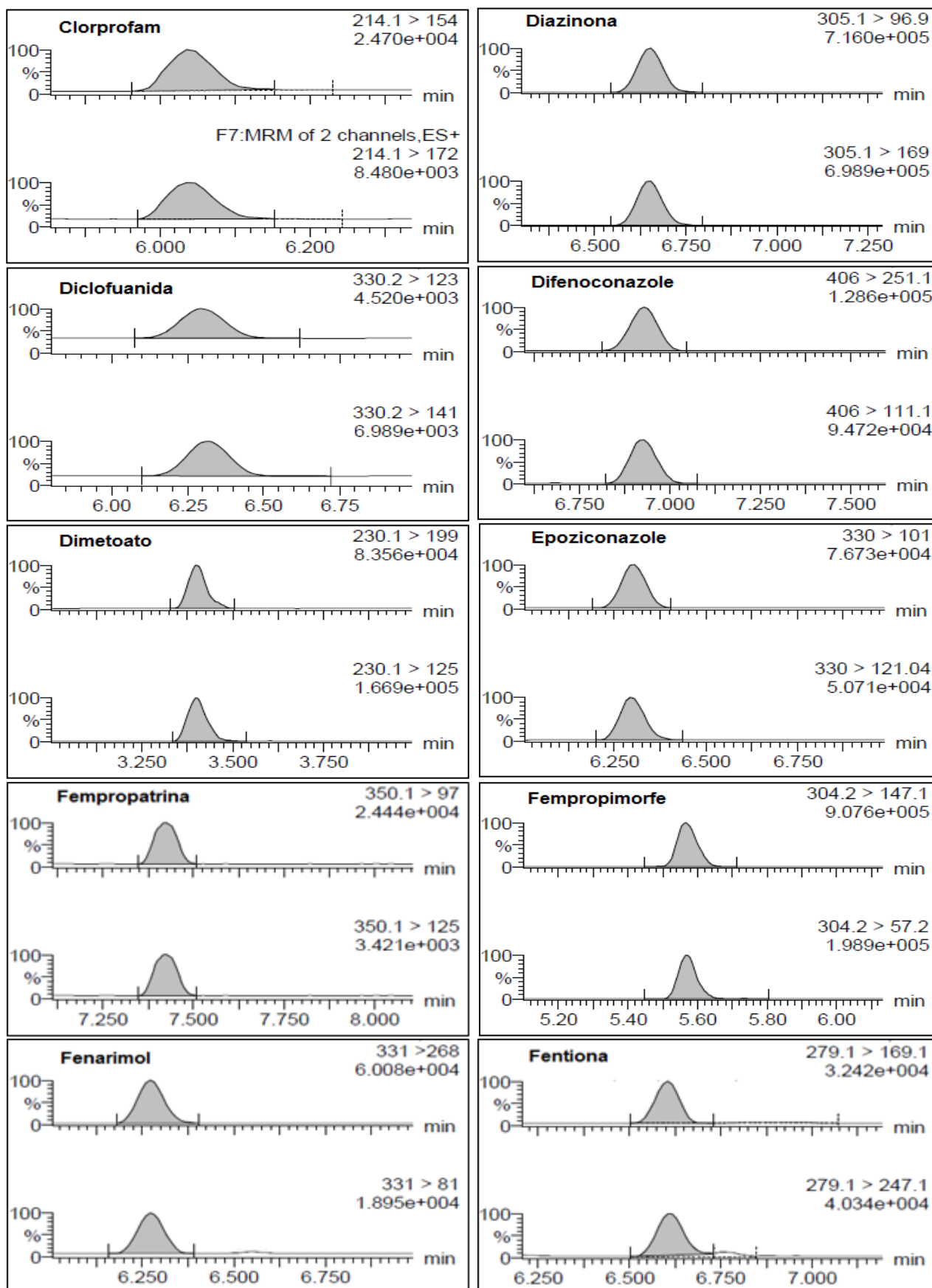
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ .



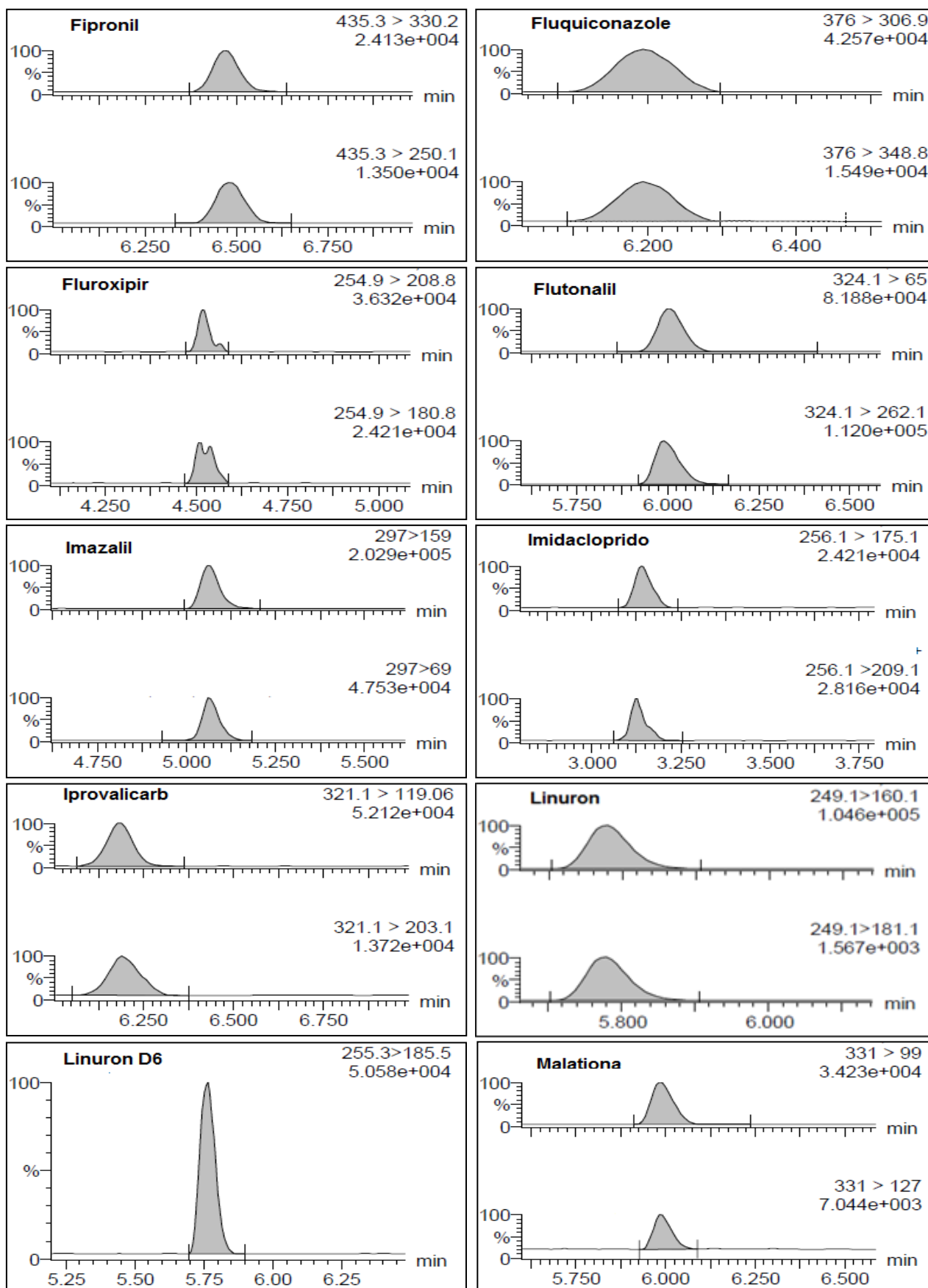
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (continuação).



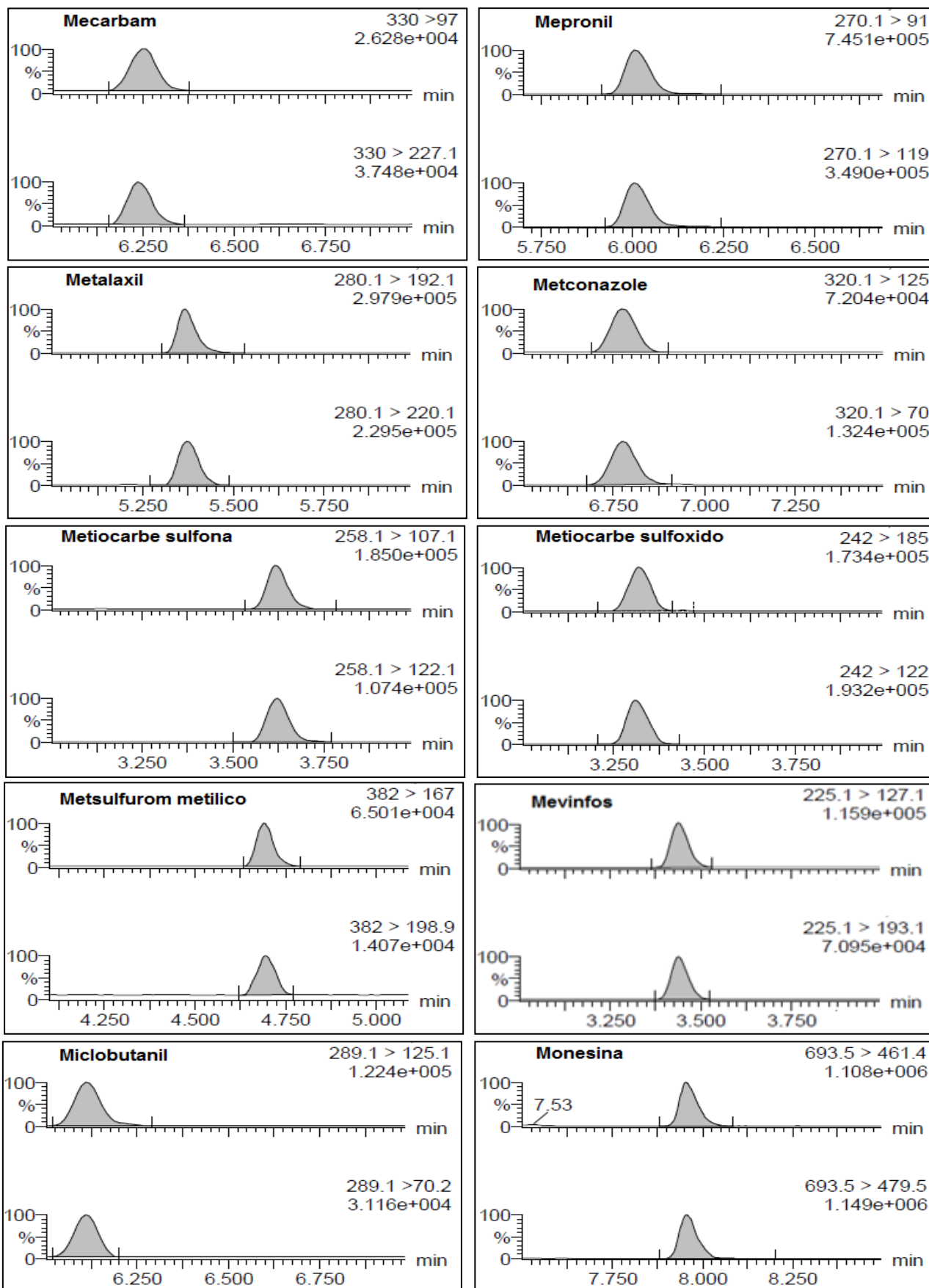
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração 20 µg L<sup>-1</sup> (continuação).



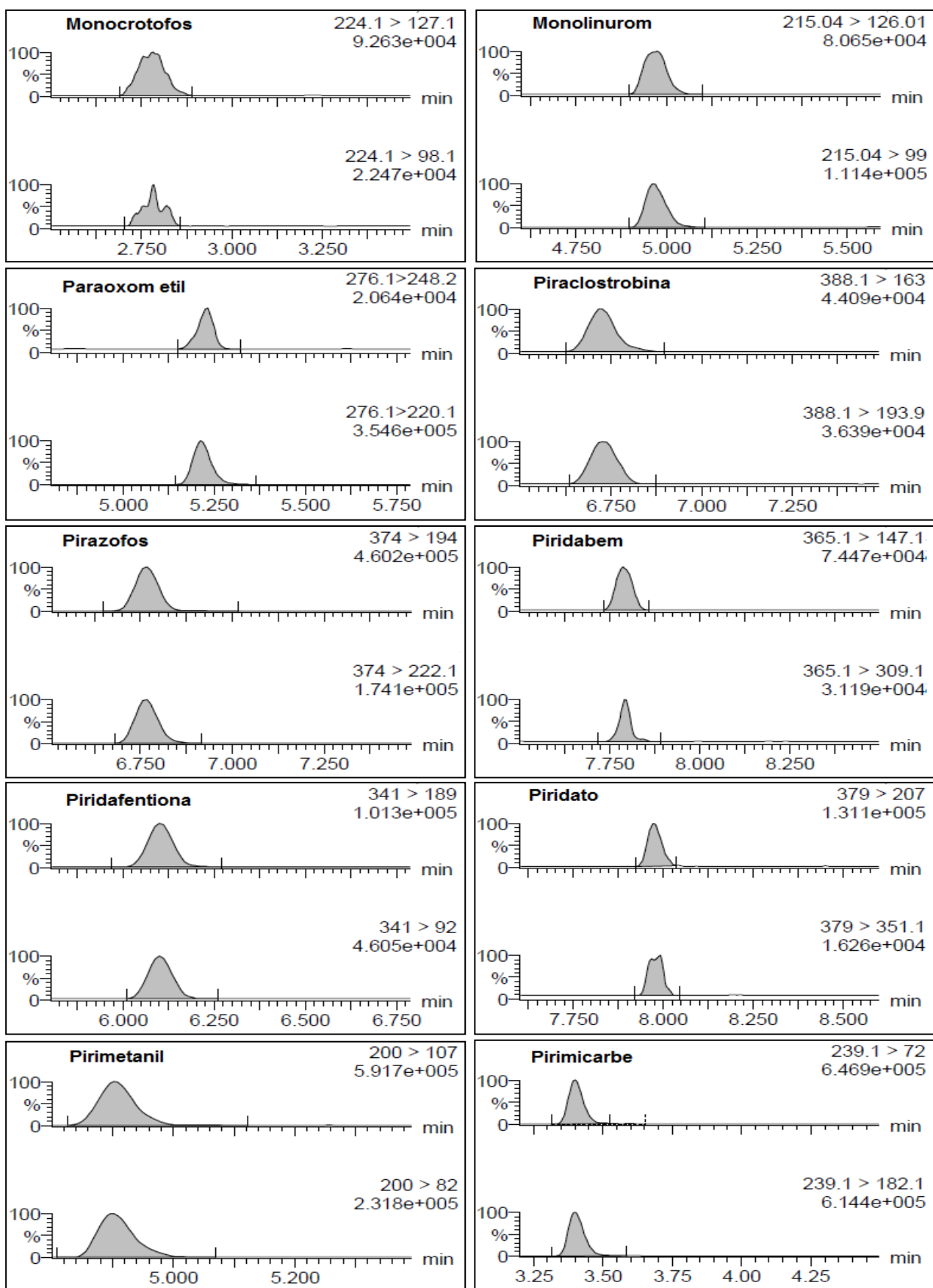
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (continuação).



APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração 20 µg L<sup>-1</sup> (continuação).

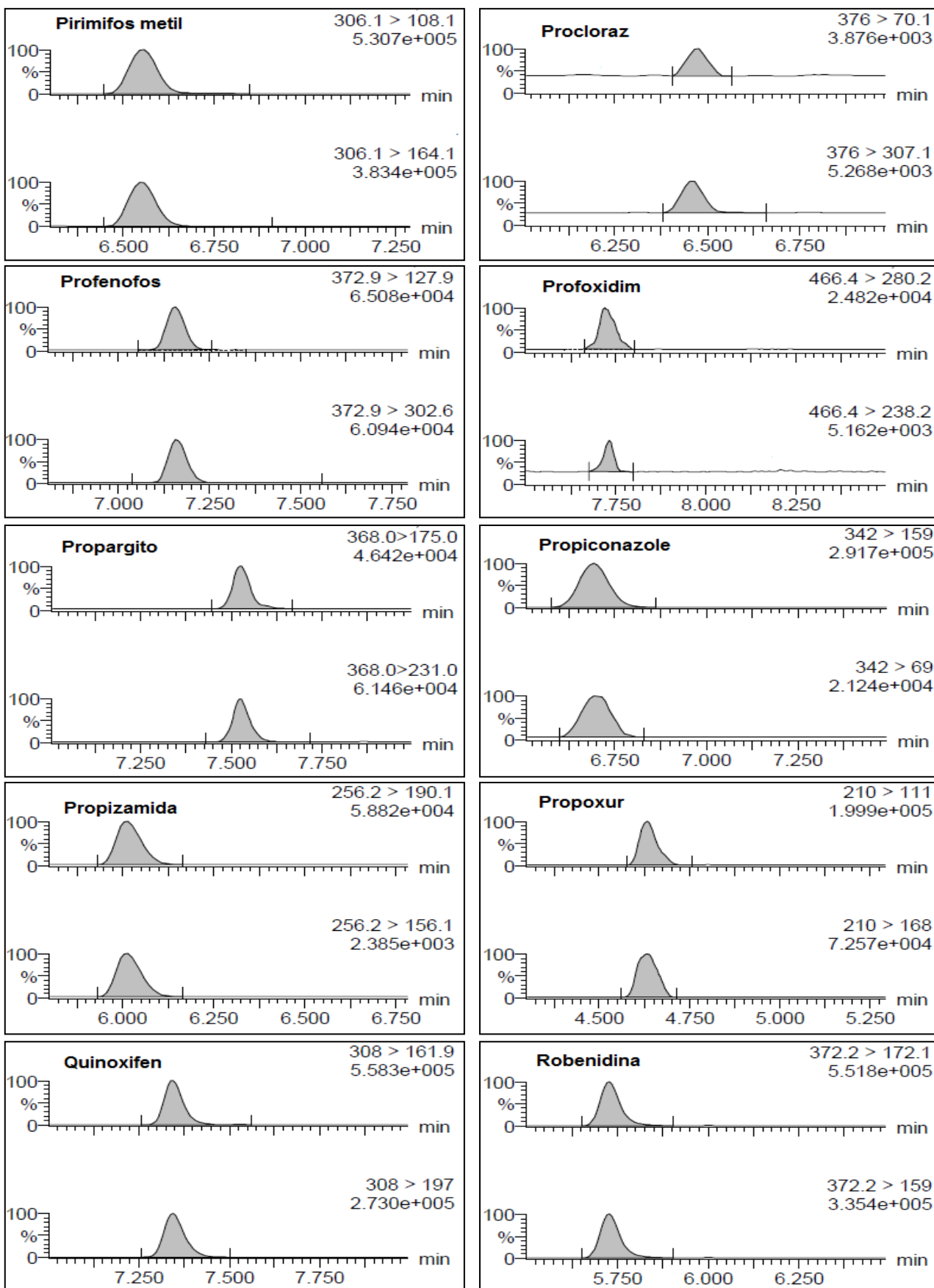


APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato “branco” de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (continuação).

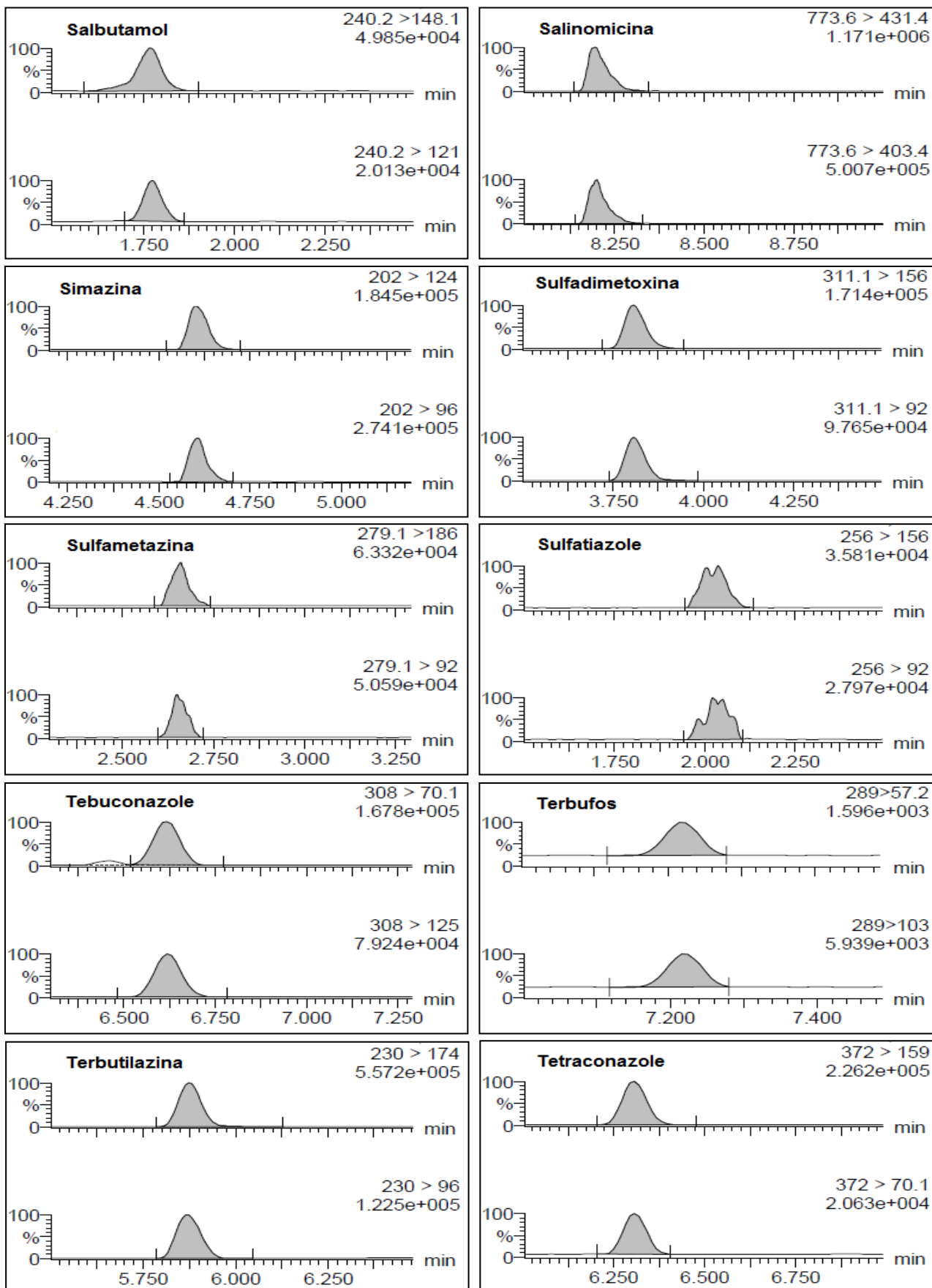




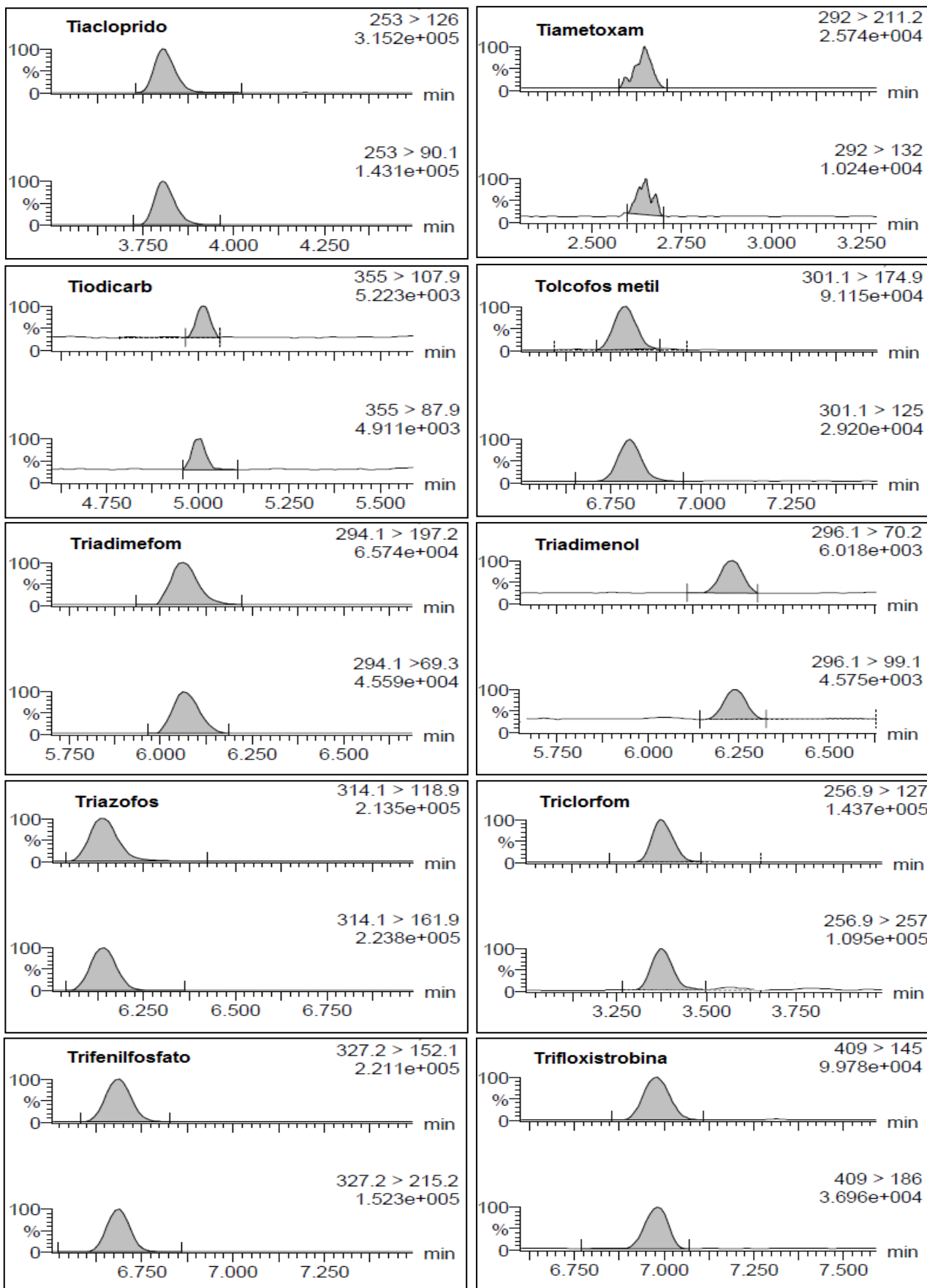
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração 20 µg L<sup>-1</sup> (continuação).



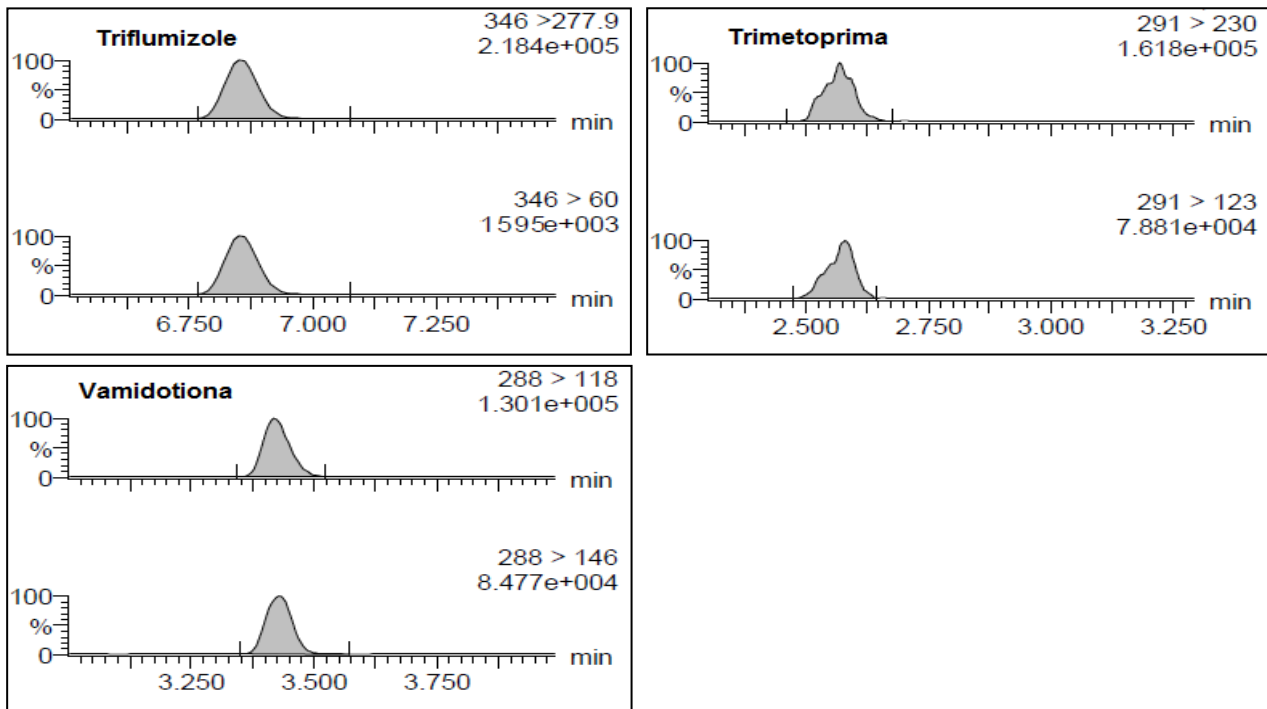
APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato “branco” de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (continuação).



APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato "branco" de solo, na concentração 20 µg L<sup>-1</sup> (continuação).



APÊNDICE B - Cromatogramas UHPLC-MS/MS, no modo SRM, a partir de uma solução preparada no extrato “branco” de solo, na concentração  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (conclusão).



## **ANEXO A**

**Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo**



## ANEXO A - Valores orientadores para solo e água subterrânea no Estado de São Paulo

## VALORES ORIENTADORES PARA SOLO E ÁGUA SUBTERRÂNEA NO ESTADO DE SÃO PAULO

Substância	CAS Nº	Referência de qualidade	Solo (mg.kg <sup>-1</sup> de peso seco) <sup>(1)</sup>				Água Subterrânea (µg.L <sup>-1</sup> )
			Prevenção	Intervenção			Intervenção
				Agrícola APMax	Residencial	Industrial	
<b>Inorgânicos</b>							
Alumínio	7429-90-5	-	-	-	-	-	200
Antimônio	7440-36-0	<0,5	2	5	10	25	5
Arsênio	7440-38-2	3,5	15	35	55	150	10
Bário	7440-39-3	75	150	300	500	750	700
Boro	7440-42-8	-	-	-	-	-	500
Cádmio	7440-48-4	<0,5	1,3	3	8	20	5
Chumbo	7440-43-9	17	72	180	300	900	10
Cobalto	7439-92-1	13	25	35	65	90	5
Cobre	7440-50-8	35	60	200	400	600	2.000
Cromo	7440-47-3	40	75	150	300	400	50
Ferro	7439-89-6	-	-	-	-	-	300
Manganês	7439-96-5	-	-	-	-	-	400
Mercúrio	7439-97-6	0,05	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	7439-98-7	<4	30	50	100	120	70
Níquel	7440-02-0	13	30	70	100	130	20
Nitrato (como N)	797-55-08	-	-	-	-	-	10.000
Prata	7440-22-4	0,25	2	25	50	100	50
Selênio	7782-49-2	0,25	5	-	-	-	10
Vanádio	7440-62-2	275	-	-	-	-	-
Zinco	7440-66-6	60	300	450	1000	2000	5.000
<b>Hidrocarbonetos aromáticos voláteis</b>							
Benzeno	71-43-2	na	0,03	0,06	0,08	0,15	5
Estireno	100-42-5	na	0,2	15	35	80	20
Etilbenzeno	100-41-4	na	6,2	35	40	95	300
Tolueno	108-88-3	na	0,14	30	30	75	700
Xilenos	1330-20-7	na	0,13	25	30	70	500
<b>Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos <sup>(2)</sup></b>							
Antraceno	120-12-7	na	0,039	-	-	-	-
Benzo(a)antraceno	56-55-3	na	0,025	9	20	65	1,75
Benzo(k)fluoranteno	207-06-9	na	0,38	-	-	-	-
Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	na	0,57	-	-	-	-
Benzo(a)pireno	50-32-8	na	0,052	0,4	1,5	3,5	0,7
Criseno	218-01-9	na	8,1	-	-	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	53-70-3	na	0,08	0,15	0,6	1,3	0,18
Fenantreno	85-01-8	na	3,3	15	40	95	140
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	193-39-5	na	0,031	2	25	130	0,17
Naftaleno	91-20-3	na	0,12	30	60	90	140
<b>Benzenos clorados <sup>(2)</sup></b>							
Clorobenzeno (Mono)	108-90-7	na	0,41	40	45	120	700
1,2-Diclorobenzeno	95-50-1	na	0,73	150	200	400	1.000
1,3-Diclorobenzeno	541-73-1	na	0,39	-	-	-	-
1,4-Diclorobenzeno	106-46-7	na	0,39	50	70	150	300
1,2,3-Triclorobenzeno	87-61-6	na	0,01	5	15	35	(a)
1,2,4-Triclorobenzeno	120-82-1	na	0,011	7	20	40	(a)
1,3,5-Triclorobenzeno	108-70-3	na	0,5	-	-	-	(a)
1,2,3,4-Tetraclorobenzeno	634-66-2	na	0,16	-	-	-	-
1,2,3,5-Tetraclorobenzeno	634-90-2	na	0,0065	-	-	-	-
1,2,4,5-Tetraclorobenzeno	95-94-3	na	0,01	-	-	-	-
Hexaclorobenzeno	118-74-1	na	0,003 <sup>(3)</sup>	0,005	0,1	1	1
<b>Etanos clorados</b>							
1,1-Dicloroetano	75-34-2	na	-	8,5	20	25	280
1,2-Dicloroetano	107-06-2	na	0,075	0,15	0,25	0,50	10
1,1,1-Tricloroetano	71-55-6	na	-	11	11	25	280
<b>Etenos clorados</b>							
Cloreto de vinila	75-01-4	na	0,003	0,005	0,003	0,008	5

1,1-Dicloroetano	75-35-4	na	-	5	3	8	30
1,2-Dicloroetano - cis	156-59-2	na	-	1,5	2,5	4	(b)
1,2-Dicloroetano - trans	156-60-5	na	-	4	8	11	(b)
Tricloroetano - TCE	79-01-6	na	0,0078	7	7	22	70
Tetracloroetano - PCE	127-18-4	na	0,054	4	5	13	40
<b>Metanos clorados</b>							
Cloreto de Metileno	75-09-2	na	0,018	4,5	9	15	20
Clorofórmio	67-66-3	na	1,75	3,5	5	8,5	200
Tetracloroeto de carbono	56-23-5	na	0,17	0,5	0,7	1,3	2
<b>Fenóis clorados</b>							
2-Clorofenol (o)	95-57-8	na	0,055	0,5	1,5	2	10,5
2,4-Diclorofenol	120-83-2	na	0,031	1,5	4	6	10,5
3,4-Diclorofenol	95-77-2	na	0,051	1	3	6	10,5
2,4,5-Triclorofenol	95-95-4	na	0,11	-	-	-	10,5
2,4,6-Triclorofenol	88-06-2	na	1,5	3	10	20	200
2,3,4,5-Tetraclorofenol	4901-51-3	na	0,092	7	25	50	10,5
2,3,4,6-Tetraclorofenol	58-90-2	na	0,011	1	3,5	7,5	10,5
Pentaclorofenol (PCP)	87-86-5	na	0,16	0,35	1,3	3	9
<b>Fenóis não clorados</b>							
Cresóis		na	0,16	6	14	19	175
Fenol	108-95-2	na	0,20	5	10	15	140
<b>Ésteres ftálicos</b>							
Dietilxil ftalato (DEHP)	117-81-7	na	0,6	1,2	4	10	8
Dimetil ftalato	131-11-3	na	0,25	0,5	1,6	3	14
Di-n-butil ftalato	84-74-2	na	0,7	-	-	-	-
<b>Pesticidas organoclorados</b>							
Aldrin <sup>(2)</sup>	309-00-2	na	0,0015 <sup>(3)</sup>	0,003	0,01	0,03	(d)
Dieldrin <sup>(2)</sup>	60-57-1	na	0,043 <sup>(3)</sup>	0,2	0,6	1,3	(d)
Endrin	72-20-8	na	0,001 <sup>(3)</sup>	0,4	1,5	2,5	0,6
DDT <sup>(2)</sup>	50-29-3	na	0,010 <sup>(3)</sup>	0,55	2	5	(c)
DDD <sup>(2)</sup>	72-54-8	na	0,013	0,8	3	7	(c)
DDE <sup>(2)</sup>	72-55-9	na	0,021	0,3	1	3	(c)
HCH beta	319-85-7	na	0,011	0,03	0,1	5	0,07
HCH – gama (Lindano)	58-89-9	na	0,001	0,02	0,07	1,5	2
<b>PCBs</b>							
total		na	0,0003 <sup>(3)</sup>	0,01	0,03	0,12	3,5

(1) - Procedimentos analíticos devem seguir SW-846, com metodologias de extração de inorgânicos 3050b ou 3051 ou procedimento equivalente.

(2) - Para avaliação de risco, deverá ser utilizada a abordagem de unidade toxicológica por grupo de substâncias.

(3) - Substância banida pela Convenção de Estocolmo, ratificada pelo Decreto Legislativo n° 204, de 07-05-2004, sem permissão de novos aportes no solo.

na - não se aplica para substâncias orgânicas.

(a) somatória para triclorobenzenos = 20 µg.L<sup>-1</sup>.

(b) somatória para 1,2 dicloroetenos; = 50 µg.L<sup>-1</sup>.

(c) somatória para DDT-DDD-DDE = 2 µg.L<sup>-1</sup>.

(d) somatória para Aldrin e Dieldrin = 0,03 µg.L<sup>-1</sup>.

Fonte: CETESB, 2005