



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

**ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM  
FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR HPLC-DAD E GC-ECD  
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS  
EM ÁGUAS E DA DEGRADAÇÃO A CAMPO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Márcia Helena Scherer Kurz**

**Santa Maria - RS, Brasil**

**2007**

**ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM  
FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR HPLC-DAD E GC-ECD  
PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS  
EM ÁGUAS E DA DEGRADAÇÃO A CAMPO**

**por**

**Márcia Helena Scherer Kurz**

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: Renato Zanella

Santa Maria – RS, Brasil

**2007**

**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

**ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE  
SÓLIDA E ANÁLISE POR HPLC-DAD E GC-ECD PARA A  
DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS  
E DA DEGRADAÇÃO A CAMPO**

elaborada por  
**Márcia Helena Scherer Kurz**

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

**Comissão Examinadora**

---

**Prof. Dr. Renato Zanella**  
(Orientador – Presidente)

---

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

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Dickow Cardoso** (UCPel)

---

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

---

**Prof. Dr. Ubiratan Flores da Silva** (UPF)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2007

Ao meu esposo Fábio, que é também meu amigo, pai da minha filha, meu companheiro de todas as horas, meu colega de trabalho. Obrigada pelo apoio, carinho, compreensão, força, cobrança e incentivo. Amor, Te Amo.

À minha filha Helena, minha paixão, que enche minha vida de alegria, de satisfação, de paz, de serenidade, de orgulho e de amor. Também Te Amo Muito, Muito.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Renato Zanella pela orientação profissional, pelo seu apoio, incentivo e compreensão em todos os momentos; que, mesmo muito atarefado sempre tem um tempinho para sanar as dúvidas dos seus alunos. E pela amizade cultivada no decorrer desses quase 7 anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha Bohrer Adaime pela participação e sugestões no exame de qualificação e na defesa da tese. Principalmente pela minha iniciação no universo da Química Analítica e da Cromatografia, e pela sua amizade e carinho inigualáveis. À ti, minha gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel pela sua valiosa participação no exame de qualificação e na defesa da tese. Pelos seus ensinamentos desde quando ingressei no LARP; pelas suas muitas idéias e críticas, sempre construtivas. E também pela amizade, apoio, companheirismo e os momentos de descontração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmem Dickow Cardoso pela sua participação na defesa da tese, suas sugestões e questionamentos. Valeu também pelo reencontro depois de muitos anos.

Aos Prof<sup>os</sup>. Dr<sup>s</sup>. Horacio Heinzen e Ubiratan Flores da Silva que se dispuseram a participar dos exames de qualificação e da defesa da tese, respectivamente. Obrigada pelas sugestões que muito contribuíram para o trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luis de Oliveira Machado, nosso colaborador nas pesquisas, responsável pelas muitas coletas de água dos experimentos e sempre pronto a auxiliar e sanar as nossas dúvidas “agrônômicas”.

Aos meus colegas do LARP com os quais convivi durante todos esses anos, especialmente aos também amigos Caroline, Samile, Fábio, Osmar e Rafael. A lembrança do convívio diário e dos bons (e também maus) momentos que passamos juntos ficarão na memória por muitos e muitos anos.

À minha amiga eficiente, inteligente e bem-humorada Márcia Botega pelos seus muitos préstimos e sua boa vontade. Sentirei saudades das muitas horas de convívio, descontração e bons papos, e também de dividir os trabalhos e os estresses.

À secretária do CCNE Sandra Botega, companhia sempre muito prazerosa desde os tempos da minha iniciação científica.

À minha grande amiga Emilene Mendes Becker, que compartilhou comigo muitas angústias, aflições, dúvidas, alegrias e realizações. Muito sucesso para nós.

Aos meus pais e irmãos que se preocupam e torcem por mim sempre.

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

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

Aos funcionários do PPGQ, Ademir e Valéria, pela atenção dispensada.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Agradeço à Deus por guiar meus passos e por me conceder mais esta bênção.

Ando devagar porque já tive pressa  
e levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei...

É preciso amor pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
compreender a marcha ir tocando em frente  
como um velho boiadeiro  
levando a boiada eu vou tocando os dias  
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou

(...)

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora  
Um dia a gente chega no outro vai embora  
cada um de nós compõe a sua história  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
e ser feliz

(...)

Ando devagar porque já tive pressa  
levo esse sorriso porque já chorei demais  
cada um de nós compõe a sua história  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
de ser feliz

*Composição: Almir Sater e Renato Teixeira*

---

## RESUMO

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

### **ESTUDO DE MÉTODOS EMPREGANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E ANÁLISE POR HPLC-DAD E GC-ECD PARA A DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS EM ÁGUAS E DA DEGRADAÇÃO A CAMPO**

AUTORA: MÁRCIA HELENA SCHERER KURZ

ORIENTADOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2007

O cultivo de arroz irrigado gera um grande impacto ao meio ambiente, tanto em quantidade como na qualidade das águas. Neste trabalho foi desenvolvida e validada metodologia para determinação, em águas, de resíduos dos herbicidas imazetapir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico e do inseticida fipronil, incluindo seus principais metabólitos: desulfinil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona. Os herbicidas foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjo de Diodos (HPLC-DAD), utilizando-se fase móvel de acetonitrila:água (55:45, v/v) e fase estacionária Phenomenex C18. Fipronil e seus metabólitos foram determinados por Cromatografia Gasosa com Detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD) utilizando-se coluna apolar DB-5. Para pré-concentração das amostras utilizou-se Extração em Fase Sólida (SPE) com cartuchos C18 de 500 mg. Os herbicidas foram eluídos com uma mistura de diclorometano:metanol (65:35, v/v) e fipronil e seus metabólitos com uma mistura de hexano:isopropanol (3:1, v/v). Os parâmetros de validação do método incluem curva analítica e linearidade, limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), precisão (em termos de repetitividade e precisão intermediária) e exatidão (recuperação). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de  $r^2$  maiores que 0,9949. Os LOQs para o método, considerando a etapa de pré-concentração de 200 vezes, foram de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para os herbicidas, de  $0,0125 \mu\text{g L}^{-1}$  para fipronil e de  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$  para seus metabólitos. As recuperações ficaram entre 90,8 e 114,2%, com RSDs menores que 13,4% para os herbicidas e recuperações entre 81,3 e 112,3% com RSDs menores que 14,2% para fipronil e metabólitos. A metodologia foi aplicada em estudo de degradação em lavouras de arroz irrigado, onde foram aplicados os pesticidas individuais, nas safras de 2004/05 e 2005/06. Foram encontrados resíduos de imazetapir até no máximo 28 dias e do bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico até 35 dias após aplicação dos produtos. Também foi possível observar a rápida degradação do inseticida fipronil e conseqüente formação e também degradação dos seus metabólitos. Dos metabólitos, o desulfinil fipronil foi o que apresentou as maiores concentrações durante o estudo. O método mostrou-se adequado à análise dos pesticidas em águas e todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

Palavras-chave: GC-ECD; HPLC-DAD; pesticidas; águas; arroz irrigado



## ABSTRACT

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

### **STUDY OF METHODS USING SOLID-PHASE EXTRACTION AND ANALYSIS FOR HPLC-DAD AND GC-ECD FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE RESIDUES IN WATERS AND OF FIELD DEGRADATION**

AUTHOR: MÁRCIA HELENA SCHERER KURZ

ADVISOR: PROF. DR. RENATO ZANELLA

Date and Place: February 26, 2007, Santa Maria

The culture of irrigated rice generates a great impact to the environment, both in the amount and the quality of waters. In this study, a methodology was developed and validated for the determination, in waters, of residues of the herbicides imazethapyr, bispyribac-sodium and pyrazosulfurom ethyl and of the fipronil insecticide, including its main metabolites: desulfynil, sulfide and sulfone. The herbicides were determined by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC-DAD), using a mobile phase of acetonitrile:water (55:45, v/v) and a stationary phase of Phenomenex C18. Fipronil and its metabolites were determined by Gas Chromatography with Electron Capture Detection (GC-ECD) using a DB-5 apolar column. For the pre-concentration of the samples, a solid phase extraction (SPE) with C18 cartridges of 500 mg was used. The herbicides were eluted with dichloromethane:methanol (65: 35, v/v) and fipronil and its metabolites were eluted with hexan:isopropanol (3:1, v/v). The parameters of validation of the method include analytical curve, linearity, limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ), precision in terms of repetitivity and intermediate precision and accuracy (recovery). All the analytical curves presented  $r^2$  values  $>$  that 0.9949. The LOQs for the method, considering the 200-fold pre-concentration step, were 0.5, 0.0125 and 0.005  $\mu\text{g L}^{-1}$  for herbicides, fipronil and its metabolites, respectively. The recoveries were between 90.8 and 114.2%, with RSDs lower than 13.4% for the herbicides, and between 81.3 and 112.3 %, with RSDs lower than 14.2% for fipronil and metabolites. The methodology was applied in a degradation study in irrigated rice farming, in which the individual pesticides had been applied in the harvests of 2004/05 and 2005/06. Residues of imazethapyr were found up to 28 days after its application, and those of bispyribac-sodium and pyrazosulfurom ethyl were found after up to 35 days. Also it was possible to observe the fast degradation of the fipronil insecticide and the consequent formation and degradation of its metabolites. Of the metabolites, fipronil desulfynil presented the greatest concentrations during the study. The method proved to be adequate for the analysis of pesticides in waters and all the validation parameters were within the limits suggested for validation of chromatographic methods.

*Keywords:* GC-ECD, HPLC-DAD, pesticides, water, irrigated rice

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Produção de arroz por estado brasileiro, nos anos 2001-2003 .....	10
FIGURA 2 - Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por pesticidas (Fonte: Beyruth & Tomita, 2003).....	16
FIGURA 3- Classificação do potencial de poluição segundo o método de Goss (Fonte: Brito <i>et al.</i> , 2001).....	17
FIGURA 4 - Rota de degradação de fipronil em água e solo (adaptado de Fenet <i>et al.</i> , 2001) .....	29
FIGURA 5 - Número total de publicações envolvendo SPE: (a) Fonte: Fritz; Machka, 2000; (b) Fonte: ISI Web of Science .....	34
FIGURA 6 - Número de publicações envolvendo SPE de acordo com o tipo de amostra (Fonte: Fritz; Macka, 2000) .....	35
FIGURA 7 - Número de publicações envolvendo SPE de acordo com a categoria do analito (Fonte: Fritz; Macka, 2000).....	35
FIGURA 8 - Etapas de operação do sistema de preparo de amostra por SPE.....	38
FIGURA 9 - Sistema SPE utilizado para a pré-concentração dos pesticidas em amostras de água.....	63
FIGURA 10 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ .....	69
FIGURA 11 - Curva de van Deemter para o herbicida imazetapir.....	77

FIGURA 12 - Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por DAD para os herbicidas: (A) imazetapir, (B) bispiribaque-sódico e (C) pirazossulfurom etílico.....	78
FIGURA 13 - Cromatograma típico de uma solução analítica contendo 1,0 mg L <sup>-1</sup> dos herbicidas imazetapir (t <sub>R</sub> 5,6 min), bispiribaque-sódico (t <sub>R</sub> 9,5 min), e pirazossulfurom metílico (t <sub>R</sub> 11,6 min).....	80
FIGURA 14 - Curva de van Deemter para o metabólito fipronil sulfeto.....	81
FIGURA 15 - Cromatograma de uma solução analítica contendo fipronil e metabólitos na concentração individual de 0,1 mg L <sup>-1</sup> ; identificação dos picos: desulfinil fipronil (t <sub>R</sub> 8,16 min), fipronil sulfeto (t <sub>R</sub> 9,23 min), fipronil (t <sub>R</sub> 9,39 min) e fipronil sulfona (t <sub>R</sub> 10,84min).....	82
FIGURA 16 - Gráfico demonstrando o volume de <i>breakthrough</i> para os três herbicidas.....	889
FIGURA 17 - Cromatogramas: (A) amostra fortificada com a mistura dos herbicidas no nível de 2,5 µg L <sup>-1</sup> e (B) de uma amostra “branco” de água de superfície.....	97
FIGURA 18 - Cromatogramas: (A) amostra fortificada com fipronil e metabólitos no limite de quantificação do método (B) de uma amostra “branco” de água de superfície.....	98
FIGURA 19 - Cromatogramas: (A) de uma solução analítica contendo fipronil e metabólitos na concentração de 0,1 mg L <sup>-1</sup> e (B) uma amostra de água de lavoura coletada 3 dias após aplicação de fipronil na dose recomendada.....	102
FIGURA 20 - Cromatogramas de amostras de água de lavoura contendo os herbicidas, coletada aos 3 dias após aplicação do dobro da dose recomendada de (A) Vezir (imazetapir), (B) Nominee (bispiribaque-sódico) e (C) Sirius (pirazossulfurom etílico).....	102
FIGURA 21 - Perfil da degradação dos herbicidas na safra 2004-2005.....	103
FIGURA 22 - Perfil da degradação dos herbicidas: imazetapir, nas formulações Only e Vezir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico, para duas diferentes doses, na safra 2005-2006.....	103

FIGURA 23 - Perfil da degradação para fipronil e metabólitos na safra 2004-2005, para duas diferentes doses .....	105
FIGURA 24 - Perfil da degradação para fipronil e metabólitos na safra 2005-2006, para três diferentes doses .....	106

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estimativa do consumo total de água para irrigação do arroz no Rio Grande do Sul (Fonte: Zaffaroni, 1999; Oliveira, 2006).....	14
TABELA 2 - Percentagem de consumo de agrotóxicos em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004 (Fonte: SINDAG, 2004).....	14
TABELA 3 - Variação na dose dos pesticidas aplicados, ocorrida no século XX (Fonte: Barbosa, 2004) .....	15
TABELA 4 – Critérios propostos pelo Método de Goss para avaliar o potencial de poluição de águas superficiais .....	15
TABELA 5 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo (Fonte: Tomlin, 2003; Vencill, 2002).....	19
TABELA 6 - Pesticidas com limites máximos de resíduos estabelecidos pela legislação brasileira e americana para água potável.....	24
TABELA 7 - Comparação entre os cartuchos SPE C18, SDVB e Strata-X (Fonte: Phenomenex, 2006) .....	37
TABELA 8 - Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas em águas.....	45
TABELA 9 - Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados .....	58
TABELA 10 - Programas (P) de temperatura do forno da coluna, utilizados na otimização da separação cromatográfica.....	61
TABELA 11 - Volume de amostra e concentração dos analitos utilizados para obtenção do volume de breakthrough.....	65
TABELA 12 - Pesticidas aplicados nos experimentos de degradação realizados na safra 2004-2005 .....	72
TABELA 13 - Pesticidas aplicados nos experimentos de degradação realizados na safra 2005-2006 .....	73

TABELA 14 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos herbicidas.....	79
TABELA 15 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos herbicidas, empregando uma solução analítica na concentração de 1,0 mg L <sup>-1</sup> e condições cromatográficas descritas no item 4.2.2.....	83
TABELA 16 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de fipronil e metabólitos, empregando uma solução analítica na concentração de 0,1 mg L <sup>-1</sup> e condições cromatográficas descritas no item 4.3.3.....	83
TABELA 17 - Recuperações obtidas para os herbicidas, utilizando-se diferentes cartuchos de fase estacionária e diferentes solventes de eluição.....	85
TABELA 18 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição .....	87
TABELA 19 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes valores de pH.....	87
TABELA 20 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes de amostra .....	88
TABELA 21 - Recuperações obtidas para fipronil e metabólitos utilizando-se diferentes volumes de amostras.....	90
TABELA 22 - Recuperações obtidas para fipronil e metabólitos utilizando-se diferentes valores de pH, diferentes solventes de eluição e diferentes volumes do solvente de eluição .....	90
TABELA 23. Resultados obtidos para calibração dos herbicidas.....	93
TABELA 24 - Resultados obtidos para a calibração de fipronil e metabólitos.....	93
TABELA 25 - Valores obtidos no teste de linearidade para os herbicidas .....	96
TABELA 26 - Valores obtidos no teste de linearidade para fipronil e metabólitos.....	96
TABELA 27 - Valores de LOD e LOQ para os herbicidas .....	96
TABELA 28 - Valores de LOD e LOQ para fipronil e metabólitos.....	96
TABELA 29 - Recuperação, RSD <sub>r</sub> e RSD <sub>pi</sub> do método para os herbicidas .....	100
TABELA 30 - Recuperação, RSD <sub>r</sub> e RSD <sub>pi</sub> do método para fipronil e metabólitos..	101
TABELA 31 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2004-2005 .....	108
TABELA 32 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2005-2006 .....	109
TABELA 33 - Cinética de degradação para fipronil e metabólitos, na safra 2004-2005 .....	111

TABELA 34 - Cinética de degradação para fipronil e metabólitos, na safra 2005-2006	
.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  - fator de separação

$\mu$  - velocidade linear ótima

$\lambda$  – comprimento de onda

ACN - acetonitrila

AHAS – Ácido acetohidróxido

ALS – Acetolactato sintetase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

APTAS – Alto Potencial de Transporte Associado ao Sedimento

APTDA – Alto Potencial de Transporte Dissolvido em Água

BPTAS – Baixo Potencial de Transporte Associado ao Sedimento

BPTDA – Baixo Potencial de Transporte Dissolvido em Água

$C_0$  – concentração inicial

C18 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano

C8 – sílica modificada com hidrocarboneto linear C8, octilsilano

CAS – *Chemical Abstracts Service*

CL<sub>50</sub> – dose letal (via respiratória)

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

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

DB-5 – 5% fenil metil silicone

DCM - diclorometano

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

d.i. – diâmetro interno

DL<sub>50</sub> – dose letal (via oral ou dérmica)



DT<sub>50</sub> – meia-vida

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

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

EPC – Controle Eletrônico de Fluxo, do inglês *Electronic Pneumatic Control*

eqa – equivalente ácido

ESI – Ionização por Eletrospray, do inglês *ElectroSpray Ionization*

FE – fase estacionária

FM – fase móvel

<sup>19</sup>F NMR – Ressonância Magnética Nuclear com <sup>19</sup>F, do inglês *<sup>19</sup>Fluorine Nuclear Magnetic Resonance*

FPD – Detector Fotométrico de Chama, do inglês *Flame Photometric Detector*

GABA – ácido gama aminobutírico, do inglês *γ-aminobutyric acid*

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês *Gas Chromatography*

h - horas

ha – hectare

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

ICH – International Conference on Harmonisation

IMIs – imidazolinonas

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

ISO – International Standard Organisation

ITD – *Ion Trap Detector*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

k – Constante de reação

k = fator de retenção

K<sub>ow</sub> – Coeficiente de partição octanol-água

K<sub>oc</sub> – Coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo

L – comprimento da coluna cromatográfica

LC – Cromatografia Líquida, do inglês *Liquid Chromatography*

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

LMR – Limite Máximo de Resíduos

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

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

MCPA – 4-Cloro-2-methyl-phenoxyacetic acid

- MeOH - metanol
- MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*
- MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*
- n – Número de medidas
- N - eficiência
- NCI – Ionização química no modo negativo, do inglês *Negative Chemical Ionization*
- NPD – Detector Nitrogênio-Fósforo, do inglês *Nitrogen-Phosphorus Detector*
- ODS – Octadecilsilano
- PC – produto comercial
- PD – plantio direto
- pK<sub>a</sub> – potencial de dissociação ácida
- PG – pré-germinado
- PS2 – polímero de poliestireno
- PS-DVB – copolímero de estireno divinilbenzeno
- PTFE - politetrafluoretileno
- R – Recuperação
- r<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação
- RP – fase reversa, do inglês, *Reversed Phase*
- Rs - resolução
- RSD – Desvio Padrão Relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*
- RSD<sub>r</sub> – Desvio Padrão Relativo para Repetitividade
- RSD<sub>pi</sub> – Desvio Padrão Relativo para Precisão Intermediária
- s – estimativa do desvio padrão absoluto
- SA - sulfonamida
- SDVB – Estireno divinilbenzeno
- SIM – Monitoramento do Íon Selecionado, do inglês *Selected Ion Monitoring*
- SPE – Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*
- SPME – Micro Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*
- SUs – sulfoniluréias
- s<sub>r</sub> = desvio padrão dos resíduos
- t - tempo
- t<sub>1/2</sub> – tempo de meia-vida
- t<sub>M</sub> – tempo de retenção do analito não retido

$t_R$  – tempo de retenção

$t'_R$  – tempo de retenção ajustado

TLC – Cromatografia em Camada delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

UV – ultravioleta

USGS – *United States Geological Survey*

VOCs – Compostos Orgânicos Voláteis, do inglês *Volatile Organic Compounds*

v/v – volume por volume

$W_b$  – largura do pico na base

$w_h$  – largura do pico a meia altura

$x_i$  – valores individuais

$x_m$  – média de medidas em réplicas

## **LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES**

ANEXO A – Distribuição  $t$

ANEXO B – Dados climáticos referentes ao período de cultivo de arroz irrigado, nos dois anos de estudo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 O uso da água.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 O cultivo de arroz irrigado.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Arroz.....</b>	<b>7</b>
2.3.1 Origens e expansão.....	7
2.3.2 Composição do arroz.....	8
2.3.3 Importância econômica do arroz.....	9
<b>2.4 Pesticidas.....</b>	<b>11</b>
2.4.1 Produção e uso de pesticidas .....	12
2.4.2 O impacto no meio ambiente – a poluição por pesticidas.....	14
2.4.3 Avaliação do potencial de risco de poluição ambiental.....	16
2.4.4 Contaminação da água por pesticidas – monitoramento ambiental.....	19
2.4.1.1 Bispiribaque-sódico.....	21
2.4.1.2 Sulfoniluréias e imidazolinonas .....	212
2.4.1.3 Fipronil e metabólitos.....	12
2.4.5 A legislação e o uso de pesticidas .....	23
2.4.6 Pesticidas selecionados neste estudo .....	25
2.4.6.1 Bispiribaque-sódico.....	25
2.4.6.2 Fipronil e metabólitos.....	26
2.4.6.3 Imazetapir.....	30

2.4.6.4 Pirazossulfurom etílico.....	12
<b>2.5 Técnicas de extração e pré-concentração para determinação de pesticidas em águas.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6 Métodos para determinação de resíduos de pesticidas em águas.....</b>	<b>40</b>
2.6.1 Bispiribaque-sódico.....	42
2.6.2 Imidazolinonas e sulfoniluréias.....	42
2.6.3 Fipronil e metabólitos.....	43
<b>2.7 Parâmetros cromatográficos.....</b>	<b>49</b>
2.7.1 Fator de retenção (k) .....	49
2.7.2 Resolução (Rs) .....	49
2.7.3 Fator de separação ( $\alpha$ ) .....	50
2.7.4 Curva de van Deemter.....	51
<b>2.8 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas em água.....</b>	<b>51</b>
2.8.1 Curva analítica .....	52
2.8.2 Linearidade.....	53
2.8.3 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	54
2.8.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	54
2.8.5 Exatidão (recuperação).....	55
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Instrumentação.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 Gases Utilizados.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Reagentes, solventes e materiais .....</b>	<b>57</b>
<b>3.4 Padrões analíticos dos pesticidas estudados .....</b>	<b>58</b>
<b>3.5 Otimização do sistema HPLC-DAD para determinação dos herbicidas .....</b>	<b>59</b>
3.5.1 Escolha da fase móvel e da vazão.....	59
3.5.2 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida .....	59
3.5.3 Ajuste do pH da fase móvel.....	59

<b>3.6 Otimização do sistema GC-ECD para determinação de fipronil e metabólitos</b>	<b>60</b>
3.6.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura.....	60
3.6.2 Estudo da vazão ótima do gás de arraste .....	62
3.6.3 Sistema de injeção e de detecção .....	62
<b>3.7 Avaliação da separação cromatográfica</b> .....	<b>62</b>
<b>3.8 Sistema SPE para a pré-concentração dos pesticidas</b> .....	<b>63</b>
3.8.1 Sorventes avaliados.....	64
3.8.2 Volume da amostra.....	64
3.8.3 Ajuste do pH da amostra .....	65
3.8.4 Escolha do solvente de eluição.....	66
3.8.5 Amostras de água e amostras branco .....	66
<b>3.9 Validação do método para amostras aquosas</b> .....	<b>67</b>
3.9.1 Curva analítica .....	67
3.9.2 Linearidade.....	68
3.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação .....	68
3.9.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	69
3.9.5 Exatidão (recuperação) .....	70
<b>3.10 Aplicação do método</b> .....	<b>71</b>
3.10.1 Estudo de degradação em lavouras de arroz irrigado .....	71
3.10.1.1 Cinética de degradação e tempos de meia-vida .....	74
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>4.1 Avaliação do potencial de risco de poluição ambiental pelos pesticidas em estudo</b> .....	<b>76</b>
<b>4.2 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por HPLC-DAD</b> .....	<b>76</b>
4.2.1 Escolha da fase móvel e da vazão.....	76
4.2.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida .....	78

<b>4.3. Condições cromatográficas otimizadas para análise de fipronil e metabólitos por GC-ECD .....</b>	<b>80</b>
4.3.1. Coluna cromatográfica e programação de temperatura.....	80
4.3.2. Escolha da vazão ótima do gás de arraste.....	81
4.3.3 Sistema de injeção e de detecção .....	81
<b>4.4 Avaliação da separação cromatográfica.....</b>	<b>83</b>
<b>4.5 Estudo da extração em fase sólida dos pesticidas em estudo .....</b>	<b>84</b>
4.5.1 Procedimento experimental otimizado .....	91
4.5.1.1 Procedimento experimental otimizado para análise dos herbicidas.....	92
4.6.1 Procedimento experimental otimizado para análise de fipronil e metabólitos..	93
<b>4.6 Validação dos métodos em amostras aquosas.....</b>	<b>93</b>
4.6.1 Curva analítica .....	93
4.6.2 Linearidade.....	94
4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação .....	96
4.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária) .....	98
4.6.5 Recuperação dos analitos .....	99
<b>4.7. Aplicação do método .....</b>	<b>101</b>
4.7.1 Estudo de degradação em lavouras de arroz irrigado.....	101
4.7.1.1 Cinética de degradação e tempos de meia-vida .....	108
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>133</b>
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DO PRESENTE TRABALHO.....</b>	<b>117</b>



# 1 INTRODUÇÃO

O homem, de modo geral, ainda não se conscientizou da importância em preservar as fontes de água. Uma preocupação tão antiga quanto o Império Romano. Naquela época havia uma lei que obrigava o povo a cuidar bem das nascentes e dos canais, condenando severamente os que colocassem em risco as reservas de água ou desviassem seus cursos. De lá para cá, a população mundial cresceu muito e também as fontes poluidoras. Há 2000 anos a população era apenas 3% do que é hoje; a partir de 1950 o consumo mundial triplicou e o consumo médio por habitante foi ampliado em 50%, mas a quantidade de água disponível é a mesma. Apesar disso, o homem continua praticando atos que contribuem para reduzir o volume e a qualidade da água no planeta.

Os pesticidas são compostos indispensáveis para a agricultura por possibilitarem a produção de grande quantidade de alimentos, necessários para atender a demanda que é cada vez maior. A população mundial atual gira em torno de 6,2 bilhões de pessoas e as estimativas apontam que em 2050 a população humana deverá ultrapassar os 11 bilhões, e conseqüentemente será necessário produzir pelo menos o dobro de alimentos que produzimos hoje. (BARBOSA, 2004) Ao mesmo tempo esses compostos podem se tornar um problema ambiental, pois o uso indiscriminado resulta na ocorrência destes no meio ambiente e contribui para degradar a qualidade da água, e também de saúde pública, uma vez que a grande maioria deles são tóxicos podendo acumular-se no organismo de animais e do ser humano e estão associados a muitas doenças.

Este fato foi comprovado por um estudo realizado pela National Geographic em 2006, no qual um indivíduo foi submetido a exames de sangue para investigar a presença de 320 substâncias químicas que poderia ter ingerido juntamente com alimentos e bebidas, com o ar atmosférico e através de produtos que entram em contato com a pele. A análise por GC-MS revelou que o sangue continha traços de várias substâncias hoje proibidas ou de uso restrito, entre elas o 2,2 bis(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT) - sob a forma de 1,1-dichloro-2,2-bis-p-clorofenil eteno (DDE), um subproduto da degradação do DDT - e outros pesticidas, como o

clordano e o heptaclor, usados contra cupim; bifenilas policloradas; substâncias tóxicas como compostos de chumbo e mercúrio e dioxinas; ingredientes de plástico como os ftalatos, entre outros (NATIONAL GEOGRAPHIC, 2006).

Considerando o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de pesticidas para atender a demanda mundial crescente de alimentos e a consequente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver e validar um método empregando SPE e HPLC-DAD para determinar resíduos dos herbicidas imazetapir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico em águas; (ii) desenvolver e validar um método empregando SPE e GC-ECD para determinar resíduos do inseticida fipronil e de seus metabólitos desulfinil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona em águas e (iii) realizar um estudo de acompanhamento da degradação destes pesticidas em lavoura de arroz irrigado para avaliar o seu comportamento nesse tipo de amostra.

Estes compostos são bastante usados no cultivo de arroz irrigado, uma importante atividade agrícola do Sul do Brasil, podendo vir a contaminar os mananciais hídricos. Por isso, o desenvolvimento de métodos que possam ser utilizados para o monitoramento destes compostos no meio ambiente é de suma importância.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O uso da água

De acordo com estimativas das Nações Unidas, no mundo todo, 1 bilhão de pessoas carecem de água potável e entre 2 a 7 bilhões de pessoas serão afetadas pela sua falta até 2050 (ROCHA *et al.*, 2004). A cada dia, cerca de seis mil crianças morrem de doenças originárias da água (ILLMAN, 2006). Estudos mostram que ocorre até 75% de redução na ocorrência de doenças após investimentos na purificação da água (WORLD WIDE WATER FOUNDATION, 2006).

Todas as formas de vida existentes na terra dependem da água. No entanto, 97% da água do mundo é água do mar, imprópria para consumo e para a maioria dos usos agrícolas. Nas geleiras e calotas polares estão presos 1% de toda a água doce do mundo. Lagos e rios e águas subterrâneas são as principais fontes de água potável, e constituem, em seu conjunto, apenas 2% do suprimento total de água (BAIRD, 2002). Apesar de o Brasil ser detentor de aproximadamente 17% das águas doces do planeta (6,2 bilhões de m<sup>3</sup>), a maior parte dessa água (70%) está na bacia Amazônica, onde vivem somente 7% da população (ROCHA *et al.*, 2004).

A agricultura irrigada visando à prática da produção de alimentos é a que mais contribui para o redirecionamento das águas de seus percursos naturais. A irrigação usa aproximadamente 70% do total das águas retiradas do sistema global de rios, lagos e mananciais subterrâneos. Os 30% restantes são utilizados para outros fins (industrial, geração de energia, recreação) (BOLETIM INFORMATIVO DA CORI, 2000; NUNES, 2002).

A prática da irrigação se constitui no maior usuário de águas no país, utilizando metade de toda a água doce disponível (NUNES, 2002). O Estado do Rio Grande do Sul (RS) demanda 34% do total da água usada para esse fim no Brasil (REBOUÇAS, 2002). Estima-se que o consumo total de água por lavouras de arroz situe-se entre 7 a 10 mil m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> para toda a safra (NOLDIN, 2003). Considerando-se

que uma pessoa consome 150 L de água por dia, ou 55 m<sup>3</sup> por ano (SAMAE, 2006), o consumo de 1 hectare (ha) de arroz equivale ao de cerca de 150 pessoas.

## 2.2 O cultivo de arroz irrigado

O cultivo de arroz pode ser realizado no sistema irrigado, cujas lavouras concentram-se em sua grande maioria no Sul do País, ou no sistema de terras altas (ou de sequeiro), que é mais utilizado no cerrado brasileiro.

O cultivo de arroz irrigado pode ser realizado em 4 diferentes sistemas, os quais diferenciam-se, basicamente, quanto à forma de preparo do solo, aos métodos de semeadura e ao manejo inicial da água e dividem-se em: sistema convencional, cultivo mínimo, plantio direto, pré-germinado, mix e transplante de mudas.

Atualmente, no RS predomina o sistema de cultivo mínimo (61,1% da área), seguido dos sistemas convencional (21,9%), pré-germinado + mix (11,3%) e plantio direto (5,7%) (OLIVEIRA, 2006). Já em Santa Catarina (SC), o sistema pré-germinado é a única forma de cultivo de arroz irrigado utilizado (SOSBAI, 2003).

O cultivo mínimo é o sistema no qual se utiliza menor mobilização do solo, comparado ao convencional. O preparo do solo pode ser realizado tanto no verão como no final do inverno e a semeadura é realizada diretamente sobre a cobertura vegetal previamente dessecada, sem revolvimento do solo, o que diminui a incidência de plantas daninhas (SOSBAI, 2003).

O sistema pré-germinado caracteriza-se pelo uso de sementes pré-germinadas em solo previamente inundado. Esse sistema tem-se mostrado mais eficaz no manejo da água, tendo em vista a boa distribuição da água e um maior planejamento no sistema de irrigação e drenagem. A manutenção da lâmina de água após a semeadura pode provocar a morte das sementes pré-germinadas por falta de oxigênio, reduzindo a população das plântulas de arroz (SOSBAI, 2003). Para evitar esse problema, recomenda-se a drenagem dos quadros até o estabelecimento das plântulas. Entretanto, com esta prática, os nutrientes, colóides em suspensão e os herbicidas aplicados são liberados junto com a água para o meio ambiente. Portanto, no sistema pré-germinado, a drenagem da área após a semeadura pode desencadear grave problema ambiental, ao mesmo tempo que pode causar perdas

dos nutrientes e/ou de herbicidas que estão presentes na água de irrigação que é liberada (MACHADO, 2003).

A irrigação da lavoura de arroz está intimamente relacionada ao sistema de cultivo adotado. A adoção de um ou de outro sistema irá determinar diferenças na época de início e fim da irrigação, manejo e consumo da água e no preparo do solo.

Para suprir a necessidade de água durante o ciclo para os cultivos convencional, mínimo e plantio direto, recomenda-se a utilização de vazões contínuas de 1,5 a 2,0 L s<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup>, num período médio de irrigação de 80-100 dias. No sistema pré-germinado, apesar do período de irrigação ser proporcionalmente maior, normalmente ocorre um menor consumo de água. Para a manutenção da lâmina, vazões em torno de 1,0 L s<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> são suficientes, devido a menor percolação da água no solo nesse sistema de cultivo. A Tabela 1 compara o consumo total de água entre os diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado no RS.

**Tabela 1 - Estimativa do consumo total de água para irrigação do arroz no Rio Grande do Sul**

Sistema de cultivo	Área (ha)	Área (%)	Consumo (1000 m <sup>3</sup> ha <sup>-1</sup> )	Consumo (1000 m <sup>3</sup> )	Consumo (%)
Convencional, cultivo mínimo e plantio direto	909735	88,7	17,28	14610240	94
Pré-germinado	113638	11,1	8,90	929967	6
Total	1023373		-	15540207	100

Fonte: ZAFFARONI, 1999; OLIVEIRA, 2006

No entanto, o manejo da água é de fundamental importância para o sucesso na produção de arroz irrigado. A água, além de influir no aspecto físico das plantas, interfere na disponibilidade dos nutrientes, na população e espécies de plantas daninhas presentes e na incidência de algumas pragas e doenças. A quantidade de água exigida para o cultivo de arroz é o somatório da água necessária para saturar o solo, formar uma lâmina, compensar a evapotranspiração e repor as perdas por percolação vertical, as perdas laterais e dos canais de irrigação.

Do total da água utilizada em 1 ha para produção de arroz, no sistema convencional, 40 a 50% é usado na evapotranspiração do cultivo e os restantes 50 a 60% retornam ao ciclo hidrológico, de forma mais lenta, através da percolação e fluxo sub-superficial, ou de forma mais rápida, através da água de drenagem (ZAFFARONI, 1999). A principal fonte de captação de água para irrigação da lavoura de arroz irrigado no Rio Grande do Sul é por açude e/ou barragem, os quais irrigaram na safra 2004/05, 47,2% da área total; outras fontes são via rio/riacho/arroio (32,4%), lagoa (19,8%), poços (0,2%) e demais (0,4%) (OLIVEIRA, 2006).

O cultivo do arroz irrigado, no qual a água é de fundamental importância, geralmente é realizado próximo a mananciais, fato que proporciona maior risco de contaminação da água pelos pesticidas. Estes riscos são maiores nas lavouras de arroz irrigado devido às características do sistema de cultivo, uma vez que a área permanece inundada durante grande parte do ciclo da cultura e, em alguns sistemas, é realizada a aplicação dos produtos diretamente sobre a lâmina de água. Essa realidade, associada a outros fatores como carência de estudos mais detalhados sobre a ocorrência de resíduos nas águas e os possíveis impactos no ambiente e ao manejo inadequado das lavouras por parte dos segmentos de produção, fazem com que a sociedade veja a orizicultura como sendo um dos principais vilões ambientais da atualidade em algumas regiões de SC e do RS (NOLDIN, 2003).

O fenômeno de escassez dos recursos hídricos, que está ocorrendo a nível mundial, e o uso de uma grande quantidade de água, que depois é parcialmente retornada às fontes naturais, com resíduos deixados pelo cultivo, faz com que o cultivo de arroz irrigado gere um grande impacto ao meio ambiente, tanto em quantidade como na qualidade das águas.

Buscando equilibrar as necessidades para o abastecimento das populações e para a atividade produtiva e, ainda, minimizar as conseqüências sociais da seca, estratégias de racionalização e de racionamento são estabelecidas. Esta situação gera um nítido conflito entre os usuários e os usos da água. A solução para este tipo de conflito está na gestão deste recurso, que inicia-se pela racionalização de consumo, acrescida do estabelecimento de estratégias de reuso, tanto nas práticas agrícolas quanto nas atividades cotidianas residenciais, comerciais e industriais.

## 2.3 Arroz

### 2.3.1 Origens e expansão

O arroz freqüenta a mesa de 2/3 da população mundial, constituindo-se no principal alimento em vários países. É o segundo cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o trigo. O seu cultivo é tão antigo quanto a própria civilização: teve início na Ásia, há mais de 7 mil anos. A origem deste alimento é de uma planta silvestre de algumas regiões da Índia e da zona tropical da Austrália e foi posteriormente levado para a Europa e norte da África. A introdução do arroz na América teria ocorrido através do sul dos Estados Unidos em 1647. No entanto, esse fato é contestado por autores brasileiros que apontam o Brasil como o primeiro país a cultivá-lo no continente americano, após este cereal ter vegetado espontaneamente em época anterior ao descobrimento (ANGLADETTE, 1969; GRIST, 1975).

No Brasil, a orizicultura iniciou em meados do século XVIII. Em 1587, lavouras arrozeiras já ocupavam terras da Bahia; em 1745, o cultivo teve início no Maranhão; em 1772 no Pará e em 1750, em Pernambuco. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada, era notada acentuadamente em meados do Século 18. A primeira lavoura empresarial, já irrigada, surgiu em Pelotas (RS), em 1904. Desta época até a metade do Século 19, o país foi grande exportador de arroz; posteriormente, passou a importá-lo (ANGLADETTE, 1969; GRIST, 1975).

Na verdade o arroz que havia aqui era de espécies do tipo selvagem, que não eram muito valorizadas pelos indígenas. Somente o arroz polido, vindo com o colonizador português, realmente conquistaria um lugar cativo na mesa de todos os brasileiros, na sua mistura inigualável com o feijão (ANGLADETTE, 1969; GRIST, 1975).

### 2.3.2 Composição do arroz

O arroz é uma gramínea do gênero *Oryza*, que se divide em duas espécies, *Oriza sativa*, muito comum nas zonas tropicais e temperadas, e *Oryza glaberrima*, originário da África ocidental (GRIST, 1975).

O grão de arroz pode ser dividido em casca, farelo e grão.

A casca representa o maior volume entre os subprodutos obtidos durante o beneficiamento do arroz, chegando, em média, a 22%. Sua utilização é bastante variada, sendo a principal a produção de energia. É usada na alimentação de fornalhas de secadores e das autoclaves da própria indústria arroseira, propiciando temperaturas de até 1000 °C. Durante a sua queima, a casca produz muita cinza, mas sua fumaça é pouco poluente, pois praticamente não possui enxofre. Devido à grande quantidade de sílica encontrada, cerca de 95% do total de cinzas, a casca de arroz pode ser utilizada na fabricação de sabões abrasivos. Também pode ser empregada na fabricação de lixas e no polimento de gemas de pedras semipreciosas (GRIST, 1975).

O farelo representa cerca de 8% do beneficiamento do arroz, possui um teor de proteínas entre 11,3 e 14,9%, o que explica o seu alto valor nutritivo (GRIST, 1975).

O elevado teor de gordura presente no arroz é o seu principal componente econômico. Uma vez processado, até 15% dos sub-produtos do processamento do farelo de arroz pode ser de óleo cru comestível, além de outros produtos para a indústria cosmética e farmacêutica. O óleo extraído a partir do farelo passa por uma série de processos até chegar à condição de óleo refinado, o qual se destina à alimentação. O óleo de arroz possui boas qualidades nutricionais, sendo formado principalmente por triglicerídeos e pequenas quantidades de fosfolipídeos, glicolipídeos e graxas. É recomendado na elaboração de diversos pratos, pois tem uma menor porcentagem de ácidos saturados (somente 20% da sua composição), destacando-se os ácidos oléico, linoléico e palmítico (GRIST, 1975).

O grão propriamente dito é formado basicamente pelo endosperma amiláceo, que é a parte mais consumida do cereal, representando cerca de 70% deste (GRIST, 1975).



### 2.3.3 Importância econômica do arroz

*Ronald Cantrell, diretor geral do Instituto Internacional de Pesquisas sobre Arroz*, disse o seguinte a respeito da cultura do arroz: “nenhuma outra atividade econômica alimenta tantas pessoas, sustenta tantas famílias, é tão crucial para o desenvolvimento de tantas nações e apresenta mais impacto sobre o nosso meio ambiente. A produção de arroz alimenta quase a metade do planeta todos os dias, fornece a maior parte da renda principal para milhões de habitações rurais pobres, pode derrubar governos e cobre 11% da terra arável do planeta” (EMBRAPA, 2003).

Cultivado e consumido em todos os continentes, o arroz destaca-se pela produção e área de cultivo, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto social.

O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É considerado o cultivo alimentar de maior importância em muitos países em desenvolvimento, principalmente na Ásia e Oceania, onde vivem 70% da população total dos países em desenvolvimento e cerca de dois terços da população subnutrida mundial. É alimento básico para cerca de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender ao dobro desta população.

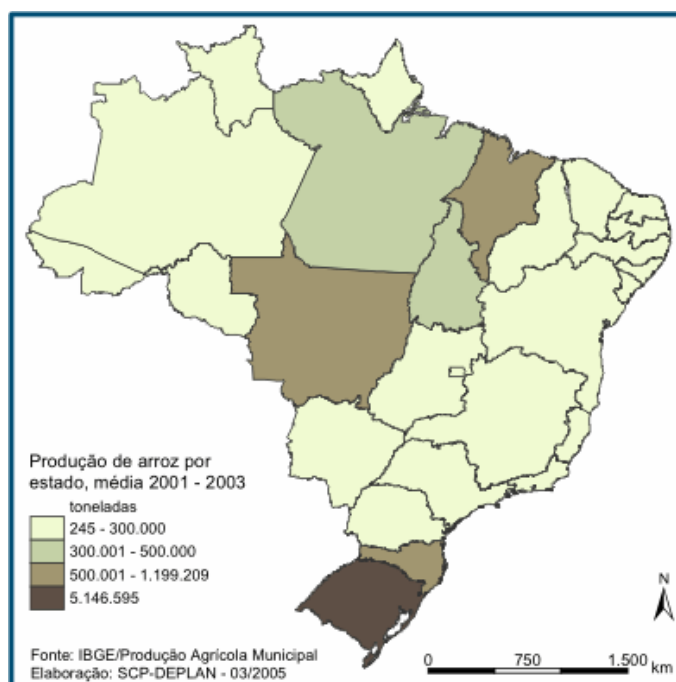
O arroz é um dos alimentos com melhor balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária ao homem, e sendo uma cultura extremamente versátil, que se adapta a diferentes condições de solo e clima, é considerada a espécie que apresenta maior potencial para o combate à fome no mundo.

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (EMBRAPA, 2003). A China é o maior produtor mundial, contribuindo com 30,7% do total produzido, seguida pela Índia com 20,4% (FAO, 2004b). Aproximadamente 90% de todo o arroz do mundo é cultivado e consumido na Ásia. A América Latina ocupa o segundo lugar em produção e o terceiro em consumo (EMBRAPA, 2003).

A cultura do arroz, especialmente do irrigado, tem grande importância social e econômica no Brasil. O Brasil está na 10<sup>a</sup> posição dos países maiores produtores, contribui com 1,8% de todo o arroz produzido no mundo e é responsável por 50% da produção da América Latina (FAO, 2004a). No Brasil, na safra 2005/06, foram

cultivados 2,97 milhões de ha de arroz (9,7% da área total cultivada no Brasil) com uma produção total de 11,5 milhões de toneladas (CONAB, 2006).

No Brasil, o arroz ocupa o terceiro lugar em área, terceiro em produção e quarto em valor de produção (IBGE, 2005). Sempre presente na mesa do brasileiro, o arroz tem um consumo anual entre 45 a 50 kg, o terceiro mais elevado na América Latina. O Brasil tem uma cultura arroseira que visa o abastecimento do mercado interno. O Brasil é o maior importador dentro da América Latina e Caribe (FAO, 2004b). O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro e é o responsável pelas pequenas exportações. Outros grandes produtores são os estados de Mato Grosso, Santa Catarina, Maranhão, Pará, Tocantins e Goiás (IBGE, 2005). A produção de arroz por estado brasileiro está demonstrada na Figura 1.



**Figura 1 - Produção de arroz por estado brasileiro, nos anos 2001-2003**

Dos 1,3 milhões de ha com arroz irrigado, cultivados anualmente no Brasil, 1 milhão estão localizados no RS onde a produção desse cereal é uma atividade de grande importância sócio-econômica. Nesse estado, a produção de arroz é praticada sob clima subtropical em grandes fazendas (média de 200 ha) completamente mecanizadas (OLIVEIRA, 2006; FAO, 2004b).

No estado do RS, a área cultivada com arroz foi de 1,0 milhão de ha, para a safra 2004/05. A produção do RS representa mais de 58% da produção brasileira de arroz. Os patamares de produtividade de arroz irrigado são elevados, tendo atingido na safra 2004/05, um valor médio de  $6,0 \text{ t ha}^{-1}$  (CONAB, 2006; OLIVEIRA, 2006), produtividade semelhante às obtidas em países tradicionais no cultivo de arroz irrigado como EUA (Estados Unidos da América), Austrália e Japão. No entanto, essa alta produtividade está associada ao intenso uso de agroquímicos, tanto de adubos quanto de pesticidas.

## 2.4 Pesticidas

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pragas, que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. O uso de compostos químicos no controle de pragas data do período clássico da Grécia e Roma. O mais antigo registro de uso de pesticida é atribuído aos sumérios que, em 2500 a. C., utilizavam enxofre para combater insetos (BARBOSA, 2004).

Os pesticidas são compostos químicos especialmente empregados pelo homem para destruir, repelir ou mitigar pragas (insetos, ácaros, nematódeos, roedores e outras formas de vida animal, fungos, plantas daninhas terrestres e aquáticas). Têm também função preventiva contra as pragas. Além disso, funcionam como desfolhantes e dessecantes, ou ainda como reguladores do crescimento de vegetais (LARINI, 1999; WARE, 1994).

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com a formulação, emprego, modo de ação e estrutura química. A principal classificação dos pesticidas é quanto ao seu emprego: inseticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, moluscicidas, raticidas, entre outros (LARINI, 1999; EXTOWNET, 2006; WARE, 1994).

A agricultura é de longe a maior usuária de pesticidas. De fato, a capacidade atual dos países desenvolvidos de produzir e colher grandes quantidades de alimentos em áreas relativamente pequenas com participação reduzida de trabalho humano tem sido possível graças ao uso de pesticidas. Mesmo com o uso extensivo de pesticidas, cerca de 1/3 do total das plantações do mundo é destruído por pragas

ou ervas daninhas durante o crescimento, a colheita e o armazenamento (BAIRD, 2002).

Estes compostos são sintetizados 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 que se espera controlar, como também outros seres do ambiente. Dados toxicológicos relacionados à nocividade de uma substância para um organismo são coletados mais facilmente determinando-se sua toxicidade aguda, que é o início rápido de sintomas que se seguem à absorção de uma dose da substância. No entanto, na toxicologia ambiental, as exposições crônicas são mais relevantes uma vez que levam em conta a exposição a doses individuais relativamente baixas de um produto químico tóxico presente no ar que respiramos, na água que bebemos ou nos alimentos que comemos (BAIRD, 2002).

Os seres humanos não estão isentos desta contaminação e os pesticidas acumulam-se no organismo em tecidos lipídicos, fígado, rins, cérebro e coração. Como um agravante, muitos dos alimentos que fazem parte da dieta humana sofrem enriquecimento em relação à concentração inicial de pesticidas, como o leite, peixes de água doce ou salgada, crustáceos e vegetais (BAIRD, 2002). Diversos estudos associam a exposição aos pesticidas comuns a inúmeras doenças, de asma a câncer, com destaque de maior risco para alguns grupos de pessoas como agricultores, as de fraca imunologia, idosos e crianças, as quais consomem uma grande quantidade de alimentos comparativamente ao seu peso. Um estudo de 2003 revela que a exposição aos pesticidas por crianças no primeiro ano de vida aumenta os riscos de doenças respiratórias, como a asma, em até 4 vezes (VIDA INTEGRAL, 2006).

#### 2.4.1 Produção e uso de pesticidas

O valor do mercado mundial para pesticidas foi estimado em US \$32 bilhões em 2000, correspondendo a comercialização de mais de 3000 ingredientes ativos.

As vendas totais de pesticidas variam muito com a categoria, sendo que os herbicidas representam 48%, os inseticidas 28%, os fungicidas 19% e os outros produtos 5% (BARBOSA, 2004). Desde o final dos anos 60, os herbicidas têm sido mais amplamente usados na América do Norte, com vendas que excedem atualmente os US\$ 4 bilhões por ano (BAIRD, 2002).

O consumo de pesticidas varia de acordo com a região do mundo. Em 1999, as vendas por região foram assim distribuídas: Ásia 22,8%, América Latina 12,5%, América do Norte 28,6%, Oeste da Europa 25,2% e restante do mundo 10,9%. Na América do Sul, o Brasil e a Argentina são os mercados que mais têm crescido nos últimos anos (BARBOSA, 2004).

No Brasil, a introdução de pesticidas organossintéticos teve início em 1943, quando chegaram as primeiras amostras do inseticida DDT (SPADOTTO *et al.*, 2004). Em 1998, o consumo no Brasil foi de cerca de 307 mil toneladas de produtos comerciais, formulados com cerca de 250 ingredientes ativos. No período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78% enquanto que o aumento no consumo de agrotóxicos foi de 700%, no mesmo período (SPADOTTO *et al.*, 2004). A partir de 1994, as vendas de pesticidas no Brasil vêm crescendo continuamente, tendo ultrapassado os US\$ 2 bilhões, correspondendo a 6% do mercado mundial (BARBOSA, 2004).

Estas substâncias têm sido mais usadas nas regiões sudeste (38,9% em 1998), sul (31,2%) e centro-oeste (22,8%), sendo que o Rio Grande do Sul utiliza 12% do total (SPADOTTO *et al.*, 2004). A cultura de arroz irrigado está em 9º lugar dentre as culturas que mais utilizam agrotóxicos no Brasil, como mostra a Tabela 2. A nível mundial, as vendas de agrotóxicos por cultura são aproximadamente: hortaliças 23,6%, arroz 13%, milho 10,6%, soja 11,3%, algodão 9,6%, outros cereais 14,3% e outras culturas 17,6% (BARBOSA, 2004).

Herbicidas e inseticidas são os agroquímicos mais largamente utilizados nas lavouras de arroz irrigado. Estima-se, atualmente, que a quase totalidade das lavouras de arroz irrigado recebem pelo menos uma aplicação de herbicidas (91,4% da área total) e a maioria delas também recebe pelo menos uma aplicação de inseticidas (49,6%) (NOLDIN, 2003; OLIVEIRA, 2006).

**Tabela 2 – Percentagem de consumo de agrotóxicos em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004**

Cultura agrícola	Participação (%)
Soja	50
Algodão	10
Milho	7
Cana-de-açúcar	7
Tratamento de sementes	4
Citros	3
Trigo	3
Café	3
Arroz	2
Demais	11
<b>Total</b>	<b>100</b>

Fonte: SINDAG, 2004

#### 2.4.2 O impacto no meio ambiente – a poluição por pesticidas

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

Os pesticidas podem alcançar os corpos de água diretamente em aplicações para controle de plantas aquáticas e mosquitos, ou indiretamente pela drenagem de terras agrícolas, permeação através do solo, em resíduos de produção de pesticidas e resíduos municipais (fungicidas e bactericidas) (BIZIUK *et al.*, 1996). Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e aviões, na

forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir as águas superficiais.

Os avanços ocorridos no século XX tiveram reflexo direto na indústria de pesticidas, que vem desenvolvendo produtos cada vez mais eficazes, mais seletivos e, em geral, menos agressivos ao meio ambiente. Essa evolução pode ser percebida nos dados apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 – Variação geral na dose dos pesticidas aplicados, ocorrida no século XX**

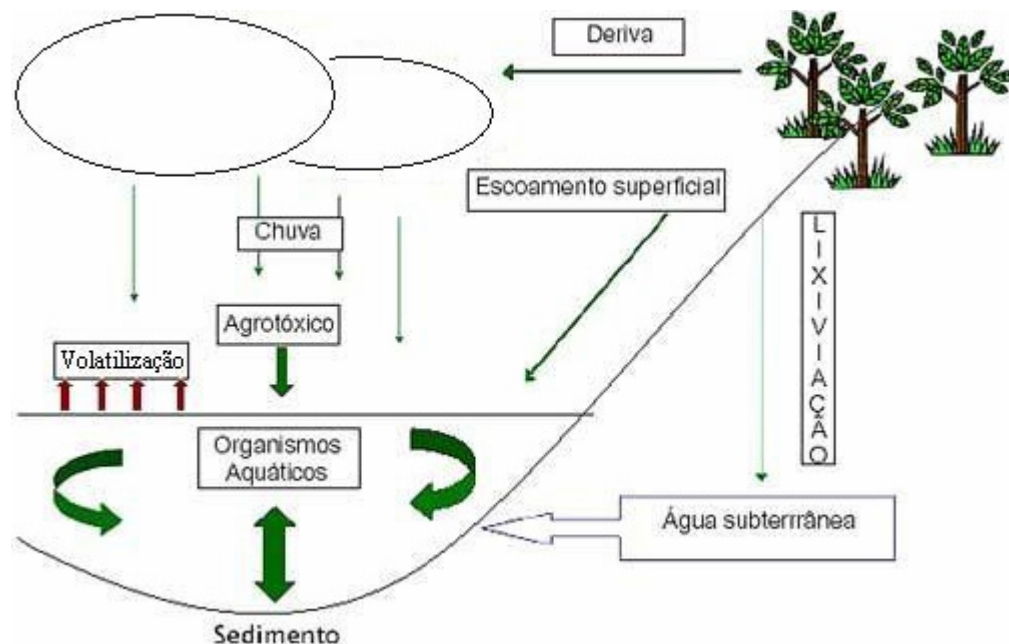
Década	Produto	Dose (g ha <sup>-1</sup> )
1900	Metaborato de sódio	1900000 – 5000000
1910	Clorato de sódio	22000 – 600000
1930	2-metil-4,6-dinitrofenol	11000
1940	Ácido (4-cloro-2-metilfenóxi) acético	1000 – 2000
1960	Trifluralina	500 – 1000
1980	Fluazifope de butila	250
1980	Sulfoniluréias	2 - 25

Fonte: BARBOSA, 2004

Esse aumento de eficácia dos compostos é de grande importância, pois a quantidade de produtos químicos lançados no meio ambiente pode ser reduzida. O que não significa, necessariamente, que o impacto ambiental seja menor, pois deve-se levar em conta também a ecotoxicidade destes compostos e o seu impacto em organismos não-alvo.

No entanto, o uso indiscriminado dos pesticidas tem feito com que sejam detectados resíduos destes no meio ambiente, em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas incluindo aquelas mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e zonas polares (BAIRD, 2002). Estima-se que aproximadamente 700 mil toneladas de pesticidas sejam lançadas, anualmente, no meio ambiente (BARBOSA, 2004).

Depois da aplicação de um pesticida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento, como mostra a Figura 2. O destino dos pesticidas no meio ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações destes processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental dos pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar estes processos (SPADOTTO *et al.*, 2004).



**Figura 2 - Diagrama esquemático das vias de poluição ambiental por pesticidas (Adaptado de BEYRUTH; TOMITA, 2003).**

#### 2.4.3 Avaliação do potencial de risco de poluição ambiental

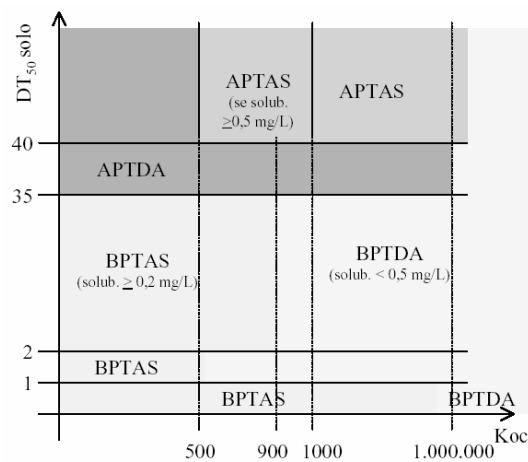
O risco de contaminação ambiental depende em grande parte da estrutura molecular e das propriedades físico-químicas dos compostos (ALISTER & KOGAN, 2006). Assim, é possível avaliar teoricamente se um determinado composto



apresenta algum risco potencial de poluição das águas. A primeira etapa da avaliação deve ser um levantamento sobre o uso de pesticidas na região do estudo, considerando as características ambientais e propriedades físico-químicas dos princípios ativos usados (DORES & DE-LAMONICA-FREIRA, 2001).

A avaliação da contaminação de águas superficiais por pesticidas pode ser realizada através do Método de Goss (DORES & DE-LAMONICA-FREIRE, 2001). PRIMEL *et al.* (2005) utilizaram o método de Goss para estimar a poluição de águas de superfície, localizadas na região central do RS, por herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado.

Os critérios propostos por esse método para avaliar o potencial de poluição de águas superficiais por pesticidas estão expostos na Figura 3 e na Tabela 4.



**Figura 3- Classificação do potencial de poluição segundo o método de Goss (BRITO *et al.*, 2001)**

As substâncias que não se enquadram em nenhum dos critérios acima são consideradas como tendo potencial médio para poluírem águas superficiais.

**Tabela 4 – Critérios propostos pelo Método de Goss para avaliar o potencial de poluição de águas superficiais**

	APTAS		BPTAS				APTDA		BPTDA		
	≥ 40	≥ 40	< 1	≤ 40	≤ 2	≤ 4	> 35 d		≥ 1000000	≤ 1	< 35
DT <sub>50</sub> (dias)											
K <sub>oc</sub> (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	= 1000	≥ 500		≤ 500	≤ 500	≤ 900	< 100000	≤ 700		≤ 100	
S <sub>água</sub> (mg L <sup>-1</sup> )		= 0,5		≥ 0,5		≥ 2	≥ 1	10 a 100			< 0,5

A Tabela 5 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo, as quais serão empregadas para avaliar o potencial de poluir águas superficiais via Método de Goss.

**Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo**

Pesticida	$K_{oc}$ ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Meia vida no solo (dias)	Solubilidade em água ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Bispiribaque-sódico	1323*	< 10	73300 (25 °C)
Fipronil	803*	45-530	2,4 (20 °C)
Imazetapir	10**	30-90	1400 (25 °C)
Pirazossulfurom etílico	154	< 15	9,76 (20 °C)

\*valor médio; \*\*estimativa

Fonte: TOMLIN, 2003; VENCILL, 2002

#### 2.4.4 Contaminação da água por pesticidas – monitoramento ambiental

A análise de pesticidas em amostras ambientais tem atraído a atenção devido ao amplo uso de tais compostos, bem como seu impacto ambiental. Esse uso prolongado pode levar a retenção nas culturas e no solo, donde, por processos de escoamento ou lixiviação, eles podem passar para águas de superfície ou de profundidade. Esse processo, juntamente com o transporte pelo vento, pó ou chuva, entre outros, faz com que os pesticidas e seus produtos de degradação necessitem ser monitorados, não apenas nas áreas onde são aplicados, mas também em áreas mais ou menos próximas (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2002; HATRÍK & TEKEL, 1996).

A poluição de águas de superfície da Grécia por 91 compostos tóxicos, incluindo 35 compostos orgânicos voláteis (VOCs, do inglês *volatile organic compounds*), 8 inseticidas organoclorados, 16 inseticidas organofosforados, nitrogenados e sulfurados, 14 herbicidas, 14 metais e 3 organoestânicos, foi avaliada utilizando-se, respectivamente, *Purge and Trap*-GC-MS (do inglês *Gas*

*Chromatography-Mass Spectrometry*), GC-ECD (do inglês *Gas Chromatography - Electron Capture Detector*), GC-NPD (do inglês *Gas Chromatography - Nitrogen Phosphorus Detector*), HPLC-DAD (do inglês *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector*), Espectrofotometria de Absorção Atômica Eletrotérmica e Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado. As concentrações de VOCs e inseticidas detectadas nas águas de superfície apresentaram valores máximos entre 1,71 e 0,158  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Já as concentrações de herbicidas e metais variaram de níveis moderados e foram elevadas em um número limitado de casos, devido a intensas aplicações agrícolas ou eventos meteorológicos (LEKKAS *et al.*, 2004).

Dois métodos *on-line* utilizando SPE-LC-ESI-MS/MS (do inglês *Solid Phase Extraction - Liquid Chromatography - ElectroSpray Ionization - Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*) foram desenvolvidos para a rápida determinação e confirmação de 18 pesticidas polares (aniônicos, catiônicos e neutros) e 9 produtos de transformação em 147 amostras de água (61 de superfície e 86 de profundidade) da costa mediterrânea da Espanha. A maioria dos compostos analisados foram detectados pelo menos uma vez e alguns deles, principalmente simazina e alguns produtos de transformação foram detectados em mais de 60% das amostras. A maior parte das concentrações maiores que 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  correspondem ao herbicida bromacil e aos produtos de transformação das triazinas. Os autores concluem que, por isso, é interessante o estudo dos produtos de transformação/degradação dos pesticidas e a conseqüente inclusão destes em programas de monitoramento (MARÍN *et al.*, 2006).

A presença de nutrientes, pesticidas (organoclorados, permetrinas e triazinas) e metais pesados (Cr, Cu, Cd, Ni e Pb) foi investigada em amostras de água, sedimentos e peixes do parque natural Aiguamolls de l'Empord Natural Park, localizado na Espanha. As concentrações em amostras de água variaram de 0,5 a 86,2  $\text{ng L}^{-1}$  para os organoclorados; de 3,3 a 307  $\text{ng L}^{-1}$  para permetrina e de 40 a 1300  $\text{ng L}^{-1}$  para as triazinas. Os pesticidas mais detectados foram lindano, heptacloro epóxido, permetrina e atrazina. O estudo conclui que as mais significantes fontes de contaminação são a partir da entrada de pesticidas e nutrientes nas águas de superfície e sedimentos como resultado da intensa atividade agrícola nos arredores do parque (SALVADÓ *et al.*, 2006).

A seguir são descritos alguns trabalhos que avaliam a poluição das águas pelos compostos incluídos nesse estudo.

#### 2.4.4.1 Bispiribaque-sódico

Para bispiribaque-sódico não existe nenhum trabalho descrito na literatura.

#### 2.4.4.2 Sulfoniluréias e imidazolinonas

A natureza polar dos compostos dessa classe e sua relativamente alta solubilidade em água explicam porque eles apresentam potencial para poluição das águas (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Devido as suas baixas doses de aplicação e baixa quantidade de uso total, espera-se que as concentrações desses compostos sejam baixas nas fontes de água. Detecções de sulfoniluréias e imidazolinonas em águas ambientais têm sido raras e as poucas detecções encontradas têm sido a concentrações da ordem de nanogramas por litro (BATTAGLIN *et al.*, 2000).

BATTAGLIN *et al.* (2000) estudaram a ocorrência de herbicidas da classe das sulfoniluréias, imidazolinonas, incluindo o imazetapir e sulfonamida em 212 amostras provenientes de rios, reservatórios e poços dos EUA. Pelo menos um dos compostos foi detectado em 83% das amostras, todas com concentração maior que  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ . Imazetapir foi o composto mais frequentemente detectado (71% das amostras), em concentrações que variaram de  $0,031$  a  $0,689 \mu\text{g L}^{-1}$ .

SILVA *et al.* (2005) avaliaram o impacto de pesticidas utilizados no cultivo de arroz, no ambiente aquático dos lagos localizados no “Esteros del Ibera”, na Argentina, através de modelos integrados e de trabalho de campo e de laboratório. O modelo usado avalia a distribuição dos pesticidas entre os vários compartimentos ambientais (ar, água, solo, sedimentos, sólidos em suspensão e peixes). Segundo esse modelo, pirazossulfurom etílico se distribui entre a água e o solo, a maior parte

no ambiente aquático. Segundo os autores, a produção de arroz pode afetar as comunidades aquáticas e, indiretamente, a população local, uma vez que as águas contendo pesticidas são descartadas através dos canais de drenagem ou diretamente nos corpos d'água.

#### 2.4.4.3 Fipronil e metabólitos

HARMAN-FETCHO *et al.* (2005) avaliaram a ocorrência de pesticidas em canais do Sul da Flórida durante um período de alta atividade agrícola, nos anos de 2002 a 2004. Fizeram parte do estudo os pesticidas mais usados naquela região, entre eles o fipronil. Das 88 amostras analisadas, fipronil esteve presente em 7 (6%), em concentrações que variaram de 0,6 a 8,6 ng L<sup>-1</sup>.

A contaminação por fipronil e seus metabólitos em águas de superfície e de sedimento do rio Mermentau, na Louisiana (EUA), em áreas próximas a lavouras de arroz, foi avaliada pelo National Water Quality Assessment Program, da United States Geological Survey (USGS). As concentrações máximas de fipronil encontradas na água foram 5,29 e 5,19 µg L<sup>-1</sup>, no final do mês de março e metade de abril, respectivamente. O metabólito detectado em maior concentração (1,13 µg L<sup>-1</sup>) foi o desulfenil fipronil, no mesmo período que a mais alta concentração do fipronil. Isto indica que a decomposição fotocatalítica do fipronil é rápida. O produto de degradação aeróbica fipronil sulfona tem um comportamento similar, com as concentrações máximas (0,202 e 0,205 µg L<sup>-1</sup>) ocorrendo em março e abril. A mais alta concentração do fipronil sulfeto foi 0,214 µg L<sup>-1</sup>, num período posterior à concentração máxima do fipronil, o que é consistente com o processo de degradação uma vez que esse metabólito é um produto de redução mais frequentemente detectado no solo (DEMCHECK & SKROBIALOWSKI, 2003).

#### 2.4.5 A legislação e o uso de pesticidas

Devido ao fato dos mananciais de água serem fontes de água potável, muitas agências ambientais têm imposto legislações rigorosas a respeito da qualidade dessas águas. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 357, de março de 2005 estabelece níveis de qualidade para águas ambientais, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar o uso das águas doce, salgada e salobra (BRASIL, 2005). Já a Portaria nº 518 de março de 2004, do Ministério da Saúde, estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004). A Tabela 6 apresenta os pesticidas com Limites Máximos de Resíduos (LMR) estabelecidos pela Portaria 518 e alguns que estão presentes na Resolução 357. Observa-se que, de maneira geral, os limites estabelecidos pela Resolução do CONAMA são menores que os estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde, os quais são em geral bastante altos. Nenhum dos compostos estudados neste trabalho possui limites na legislação brasileira.

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA estabeleceu, em 2001, os padrões aceitáveis para água potável, com indicação do nível abaixo do qual não há risco para a saúde do consumidor e também do mais alto nível que é permitido (EUA, 2001). A Tabela 6 apresenta os limites para alguns dos compostos orgânicos estabelecidos pela norma.

Já a União Européia estabelece limites mais rígidos para água potável, onde é permitida uma concentração máxima de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para pesticidas individuais e  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para a soma de pesticidas, incluindo produtos de transformação tóxicos (EEC DRINKING WATER DIRECTIVE, 1980). Para águas de superfície, o limite máximo permitido é da ordem de 1 a  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (SLOBODNÍK *et al.*, 1997).

**Tabela 6 - Pesticidas com Valores Máximos Permitidos (VMP) estabelecidos pela legislação brasileira e americana para água potável**

Herbicida	VMP ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	Portaria 518	Resolução 357	EPA/EUA
Alacloro	20	20	2
Aldrin e dieldrin	0,03	0,005	-
Atrazina	2	2	3
Bentazona	300	-	-
Carbaril	-	0,02	-
Clordano (isômeros)	0,2	0,04	2
2,4-D	30	4	70
DDT (isômeros)	2	0,002	-
Endosulfan	20	0,056	-
Endrin	0,6	0,004	2
Glifosato	500	65	700
Heptacloro e heptacloro epóxido	0,03	0,01	0,6
Hexaclorobenzeno	1	0,0065	1
Lindano	2	0,02	0,2
Malation	-	0,1	-
Metolacloro	10	10	-
Metoxicloro	20	0,03	40
Molinate	6	-	-
Paration	-	0,04	-
Pendimetalina	20	-	-
Pentaclorofenol	9	0,009	1
Permetrina	20	-	-
Propanil	20	-	-
Simazina	2	2	4
Trifluralina	20	0,2	-



#### 2.4.6 Pesticidas selecionados neste estudo

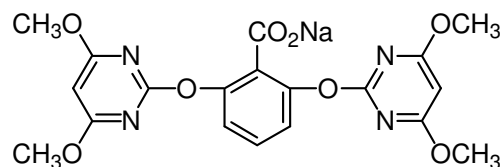
Dentre os principais pesticidas empregados em larga escala na orizicultura brasileira, optou-se por desenvolver métodos para determinar resíduos dos herbicidas imazetapir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom-etílico, e o inseticida fipronil. Além disso, também foram estudados os principais metabólitos do fipronil: desulfinil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona.

A escolha dos compostos baseou-se, principalmente, no emprego intensivo destes no cultivo do arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul. Segundo informações de pesquisadores, os herbicidas mais utilizados nas lavouras de arroz irrigado no RS são os seguintes (em ordem decrescente de maior frequência de uso): clomazona, quincloraque, propanil, glifosato, imazetapir, metsulfurom metílico, pirazossulfurom etílico, bispiribaque-sódico, cialofope-butílico e profoxidim, e os inseticidas carbofuran e fipronil.

Outro fator determinante para a escolha foi o fato de haver pouca literatura disponível sobre estes compostos, não havendo, até o momento, nenhum método disponível para determinação de bispiribaque-sódico em águas.

As propriedades físico-químicas dos compostos abaixo apresentadas foram obtidas no The e-Pesticide Manual (TOMLIN, 2003), no Guia de Herbicidas (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998) e na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (ANVISA, 2006).

##### 2.4.6.1 Bispiribaque-sódico

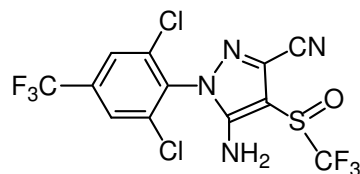


- ◆ Grupo químico: ácido pirimidiniloxibenzóico
- ◆ Nome químico (IUPAC): 2,6-bis(4,6-dimetoxipirimidin-2-loxi)benzoato de sódio
- ◆ Classe: herbicida
- ◆ Fórmula molecular:  $C_{19}H_{17}N_4NaO_8$

- ◆ Número no *Chemical Abstracts Service* (CAS): 125401-92-5
- ◆ Massa molar: 452,4 g mol<sup>-1</sup>
- ◆ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ◆ pKa: 3,05
- ◆ K<sub>ow</sub> log P = -1,03 (23 °C)
- ◆ Dose letal: 3524 mg kg<sup>-1</sup> (oral/ratos); para codornas, DL<sub>50</sub> > 2250 e CL<sub>50</sub> > 5620 mg kg<sup>-1</sup>; CL<sub>50</sub> para trutas (96 h) > 100 mg L<sup>-1</sup>; para Daphnia, CL<sub>50</sub> (48 h) > 100 mg L<sup>-1</sup>, para abelhas, DL<sub>50</sub> (oral) > 200 µg por abelha e CL<sub>50</sub> (contato) > 7000 mg L<sup>-1</sup> de *spray*.
- ◆ Solubilidade em água: 73,3 g L<sup>-1</sup> (25 °C)
- ◆ Nome comercial Nominee®

O herbicida bispiribaque-sódico é registrado no Brasil para a cultura do arroz irrigado. É indicado para o controle em pós-emergência de gramíneas, ciperáceas e algumas dicotiledôneas. É seletivo, de absorção foliar, de translocação sistêmica e atua por inibir a enzima acetolactato sintetase (ALS), chave no processo de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998).

#### 2.4.6.2 Fipronil e metabólitos



- ◆ Grupo químico: pirazóis
- ◆ Nome químico (IUPAC): 5-amino-1-(2,6-dicloro- $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-p-tolil)-4-trifluorometilsulfinilpirazole-3-carbonitrila
- ◆ Classe: inseticida, também formicida e cupinicida
- ◆ Fórmula molecular: C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>OS
- ◆ Número no CAS: 120068-37-3
- ◆ Massa molar: 437,2 g mol<sup>-1</sup>

- ◆ Ponto de ebulição: 200-201 °C
- ◆ Classe toxicológica: II, altamente tóxico
- ◆  $K_{ow}$  log P = 4,0
- ◆ Dose letal: 95 mg kg<sup>-1</sup> (oral/ratos); para patos, DL<sub>50</sub> > 2000 e CL<sub>50</sub> > 5000 mg kg<sup>-1</sup>; DL<sub>50</sub> para coelhos = 354 mg kg<sup>-1</sup>; CL<sub>50</sub> para trutas = 248 µg L<sup>-1</sup>; para carpas européias = 430 µg L<sup>-1</sup> e para Daphnia = 0,19 mg L<sup>-1</sup>; é altamente tóxico para abelhas, por contato direto ou ingestão.
- ◆ Solubilidade em água: 1,9 mg L<sup>-1</sup> (pH 5), 2,4 mg L<sup>-1</sup> (pH 9) a 20 °C
- ◆ Nomes comerciais: Klap<sup>®</sup>, Regent<sup>®</sup>, Standak<sup>®</sup>

O pesticida fipronil é um inseticida de contato, descoberto e desenvolvido por Rhône-Poulenc entre 1985 e 1987 e colocado no mercado em 1993. É aplicado no solo em culturas de batata, cana-de-açúcar e milho, em folhas nas culturas de algodão, arroz, cana-de-açúcar, milho e soja, em sementes de arroz, cevada, soja e feijão e na água para irrigação de arroz. Fipronil é altamente efetivo, de amplo espectro com recomendações de uso agrícola, saneante, não agrícola e preservante de madeira, no controle de pulgas e carrapatos em animais e domesticamente contra baratas e formigas. Pode ser aplicado desde doses muito baixas até muito altas para controle efetivo das pestes (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006). Ele é efetivo contra insetos resistentes ou tolerantes a outras famílias de inseticidas como os organofosforados, piretróides, carbamatos e ciclodienos (RAVETON *et al.*, 2006). É principalmente usado contra os insetos do solo e no cultivo de arroz irrigado é aplicado para controle da bicheira-da-raiz (ANVISA, 2006).

Atualmente, há uma grande preocupação com a toxicidade do fipronil, principalmente com respeito a abelhas (HASSANI *et al.*, 2005). Estudos realizados com abelhas alimentadas com pólen contaminado concluíram que fipronil na concentração de 0,1 µg kg<sup>-1</sup> pode causar envenenamento (GODOY, 2007). Nos EUA, o Estado da Flórida aconselha não usar fipronil na proximidade de apiários; os criadores de caranguejos de Louisiana observaram, entre 1999 e 2002, a mortalidade elevada destes crustáceos depois que plantações de arroz da região foram tratadas com essa substância; e, no estado de Nova York estão proibidos os pulverizadores de fipronil contra parasitas de animais domésticos. Na França, foi movido um processo contra a Basf, que produz o Regent<sup>®</sup> cujo princípio ativo é o

fipronil, e, desde o dia 23 de fevereiro de 2007 o uso desse inseticida está proibido. Ainda na França, uma Comissão de Estudo da Toxicidade de Produtos Fitossanitários concluiu, no dia 29 de janeiro, que “o fipronil não deveria ser autorizado, em vistas das enormes preocupações que provoca em relação ao meio ambiente e às espécies selvagens” (GODOY, 2007). No Brasil, já estão sendo feitos estudos a campo com o objetivo de substituir o fipronil por outro inseticida.

O fipronil é uma molécula extremamente ativa e um potente disruptor do sistema nervoso central dos insetos via os canais de cloreto regulados pelo ácido gama aminobutírico (GABA, do inglês, *γ-aminobutyric acid*). Em doses suficientes, fipronil causa excessiva excitação neural, várias paralisias e morte do inseto. Apesar do fato que o canal GABA é importante na transmissão neural tanto nos animais vertebrados quanto invertebrados, e que fipronil se liga no receptor GABA também dos vertebrados, essa ligação é menos forte do que nos insetos, o que lhe confere certa seletividade (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006).

O fipronil sofre lenta degradação em água e sedimentos em condições anaeróbicas, com tempo de meia-vida variando entre 116 e 130 dias. É estável à hidrólise em pH moderadamente ácido a neutro. Em condições aeróbicas degrada-se lentamente mediante oxidação, redução e hidrólise. Quando exposto a luz, o composto sofre fotodegradação e sua meia-vida é de 3,6 h em água e 34 dias em solo argiloso.

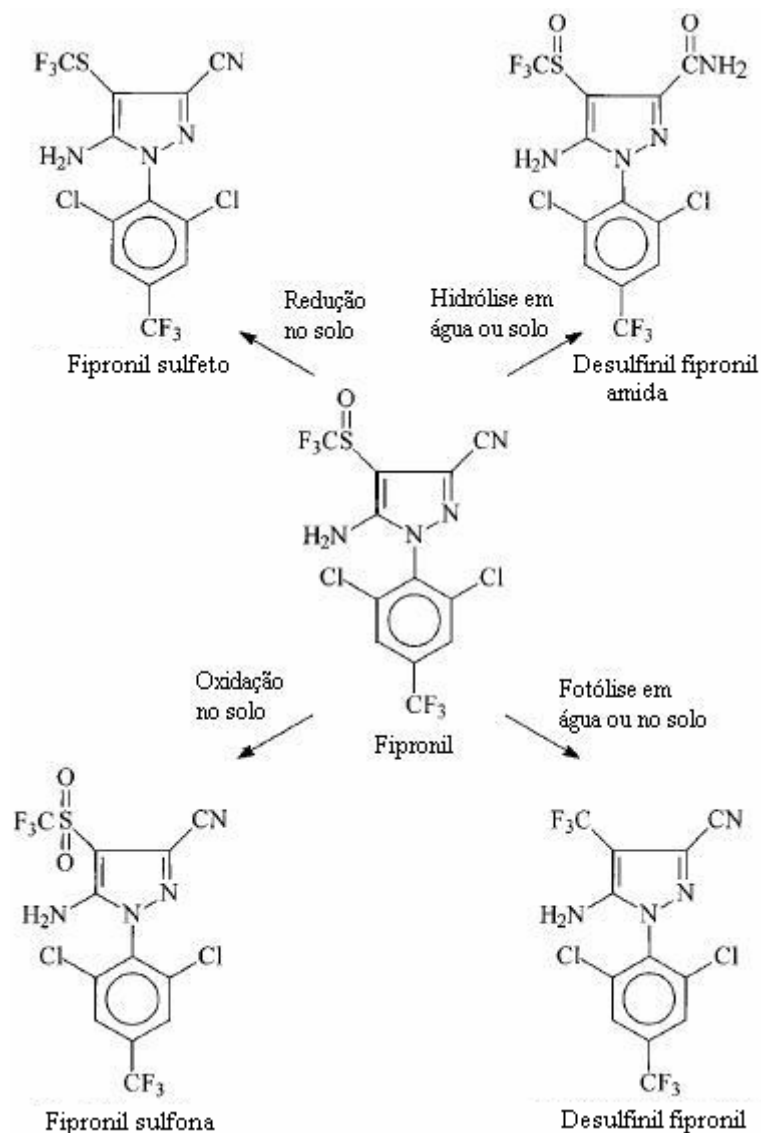
Estudos de campo e de laboratório em diferentes tipos de solo, sob condições ambiente, levaram ao estabelecimento das rotas de degradação do fipronil em água e solo. O composto pode ser metabolizado via redução ao sulfeto, via oxidação à sulfona, e via hidrólise à amida. Em presença de luz solar, ele é fotodegradado formando o desulfenil fipronil (FENET *et al.*, 2001). A rota de degradação do fipronil e os respectivos metabólitos gerados, estabelecida por Rhône-Poulenc, está ilustrada na Figura 4.

Os metabólitos sulfeto, sulfona e desulfenil também atuam no receptor GABA e são biologicamente ativos, enquanto que fipronil amida não tem nenhuma reação no sítio receptor GABA e não é considerado ser um metabólito ativo (FENET *et al.*, 2001). Por esse motivo, esse metabólito não foi incluído nesse estudo.

Estudos de laboratório mostram fotólise direta e indireta, volatilização e hidrólise como contribuintes para a degradação de fipronil no campo (NGIM & CROSBY, 2001). A fotodegradação do fipronil, realizada em laboratório utilizando-se

lâmpadas UV, permitiu a elucidação dos caminhos de degradação do fipronil. Ela mostrou que o desulfínil é o principal metabólito, o qual é posteriormente fotodegradado em outros subprodutos. Quantidades menores da sulfona são formadas via oxidação, a qual ocorre também na ausência de luz UV (NGIM, 2000).

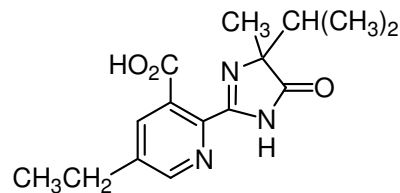
Os resíduos de fipronil tendem a permanecer na camada superior do solo e exibem baixo potencial de lixiviação para águas de profundidade. Em ambientes aquáticos, os resíduos de fipronil rapidamente se movem da água para o sedimento.



**Figura 4 - Rota de degradação de fipronil em água e solo (adaptado de FENET, 2001)**

Os produtos de degradação do fipronil são altamente tóxicos para invertebrados. O desulfinil fipronil é extremamente estável e mais tóxico que fipronil, assim como fipronil sulfona é 6,6 vezes mais tóxico, e fipronil sulfeto é 1,9 vezes mais tóxico para invertebrados aquáticos que fipronil. Estudos metabólicos mostram que há um potencial de bioacumulação do desulfinil em tecidos gordurosos (PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006; DEMCHECK & SKROBIALOWSKI, 2003; CONNELLY, 2001).

#### 2.4.6.3 Imazetapir



- ◆ Grupo químico: imidazolinona
- ◆ Nome químico (IUPAC): (*RS*)-5-etil-2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-1*H*-imidazol-2-il) ácido nicotínico
- ◆ Classe: herbicida
- ◆ Fórmula molecular: C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>
- ◆ Número no CAS: 81335-77-5
- ◆ Massa molar: 289,3 g mol<sup>-1</sup>
- ◆ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ◆ pKa<sub>1</sub> = 2,1; pKa<sub>2</sub> = 3,9
- ◆ K<sub>ow</sub> log P = 1,04 (pH 5), 1,49 (pH 7), 1,20 (pH 9), todos a 25 °C
- ◆ Dose letal: > 5000 mg kg<sup>-1</sup> (oral/ratos); para patos e codornas DL<sub>50</sub> > 2150 mg kg<sup>-1</sup>; DL<sub>50</sub> para coelhos > 2000 mg kg<sup>-1</sup>; CL<sub>50</sub> para trutas = 340 mg L<sup>-1</sup>; para Daphnia, CL<sub>50</sub> (48 h) < 1000 mg L<sup>-1</sup>, para abelhas DL<sub>50</sub> > 0,1 mg por abelha.
- ◆ Solubilidade em água: 1,4 g L<sup>-1</sup> (25 °C)
- ◆ Nomes comerciais: Pivot<sup>®</sup>, Vezir<sup>®</sup>, Only<sup>®</sup>

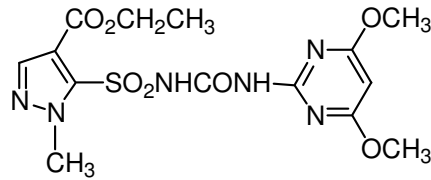
O herbicida imazetapir é registrado no Brasil para o controle em pós-emergência precoce de mono e dicotiledôneas na cultura da soja e em pré e pós-emergência das plantas infestantes na cultura do arroz. Os produtos Pivot<sup>®</sup> e Vezir<sup>®</sup> são indicados como herbicidas para uso na cultura da soja. O produto comercial Only<sup>®</sup>, composto de uma mistura dos herbicidas imazetapir (75%) e imazapique (25%) é indicado para uso em pré e pós-emergência no cultivo de arroz irrigado, principalmente para controle do arroz vermelho. Essa mistura é apenas aplicada no sistema Clearfield<sup>®</sup>, que utiliza cultivares de arroz tolerantes aos herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, de tal forma que o herbicida inibe o crescimento das plantas daninhas e não destrói as plantas de arroz. Esta tolerância é resultado de uma mutação de um nucleotídeo simples no gene do ácido acetohidróxido (AHAS), alterando o sítio de ligação do herbicida na enzima.

O imazetapir possui absorção radicular e foliar e atua por inibir a síntese do ácido acetohidróxido ou da acetolactato sintetase (ALS), enzimas comuns no processo de biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

As imidazolinonas são uma classe de pesticidas relativamente nova, o primeiro apareceu no mercado em 1981, e o mais recente em 1988 (WARE, 1994). Apesar disso, o imazetapir esteve na 7<sup>a</sup> posição dos herbicidas mais usados nos EUA, nos anos 90 (SHORT & COLBORN, 1999). Eles possuem atividade foliar e no solo. Os primeiros sintomas da atividade herbicida se manifestam na interrupção do crescimento que ocorre dentro de 48 horas após a aplicação.

Herbicidas dessa classe são caracterizados por seus efeitos a baixas doses de aplicação, amplo espectro de atuação no controle de plantas daninhas e alta persistência no solo. O imazetapir não lixivia através do solo, é fraca a moderadamente adsorvido, não é perdido por volatilização a partir do solo e não é significativamente degradado pelos microorganismos do solo (EXTOXNET, 2006). A persistência destes compostos no solo é afetada por fatores como umidade, pH, matéria orgânica e tipo de solo. Estes fatores determinam a disponibilidade do herbicida na solução do solo e então sua degradação, principalmente devido a atividade microbiana e também devido à hidrólise e decomposição (ALISTER & KOGAN, 2005). Esta alta persistência no solo pode levar a interferência destes compostos em outras culturas que venham a ser cultivadas, as quais sejam sensíveis aos herbicidas dessa classe.

#### 2.4.6.4 Pirazossulfurom etílico



- ◆ Grupo químico: sulfoniluréias
- ◆ Nome químico (IUPAC): 5-(4,6-dimetoxipirimidin-2-ilcarbamoilsulfamoil)-1-metilpirazole-4-carboxilato
- ◆ Classe: herbicida
- ◆ Fórmula molecular:  $C_{14}H_{18}N_6O_7S$
- ◆ Número no CAS: 93697-74-6
- ◆ Massa molar:  $414,4 \text{ g mol}^{-1}$
- ◆ Classe toxicológica: III, medianamente tóxico
- ◆ pKa: 3,7
- ◆  $K_{ow} \log P = 3,16$
- ◆ Dose letal:  $> 5000 \text{ mg kg}^{-1}$  (oral/ratos); para patos  $DL_{50} = 292 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $DL_{50}$  (aguda/oral) para codornas  $> 2250 \text{ mg kg}^{-1}$ ;  $CL_{50}$  para trutas  $> 180 \text{ mg L}^{-1}$ ; para carpas  $> 30 \text{ mg L}^{-1}$ , para abelhas  $DL_{50} > 100 \mu\text{g}$  por abelha.
- ◆ Solubilidade em água:  $9,76 \text{ mg L}^{-1}$  ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ )
- ◆ Nomes comerciais: Sirius<sup>®</sup>

Os herbicidas da classe das sulfoniluréias foram introduzidos no mercado em 1982, pela DuPont (AYANO *et al.*, 2004). O pirazossulfurom-etílico é um herbicida sistêmico, seletivo, indicado apenas para aplicação em pré ou pós-emergência na cultura de arroz irrigado, destinado principalmente ao controle de ciperáceas. É absorvido principalmente pelo sistema radicular e também atua por inibir a catálise da chave enzimática ALS na biossíntese de aminoácidos (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998). Herbicidas da classe das sulfoniluréias têm sido estimados serem 100 vezes mais tóxicos para as plantas que qualquer outro herbicida em uso antes de 1982 (SHORT & COLBORN, 1999). No entanto, a enzima ALS sobre a qual eles atuam não está presente nos animais. Por isso, são considerados de baixa toxicidade para mamíferos, pássaros, peixes, anfíbios e outros animais.

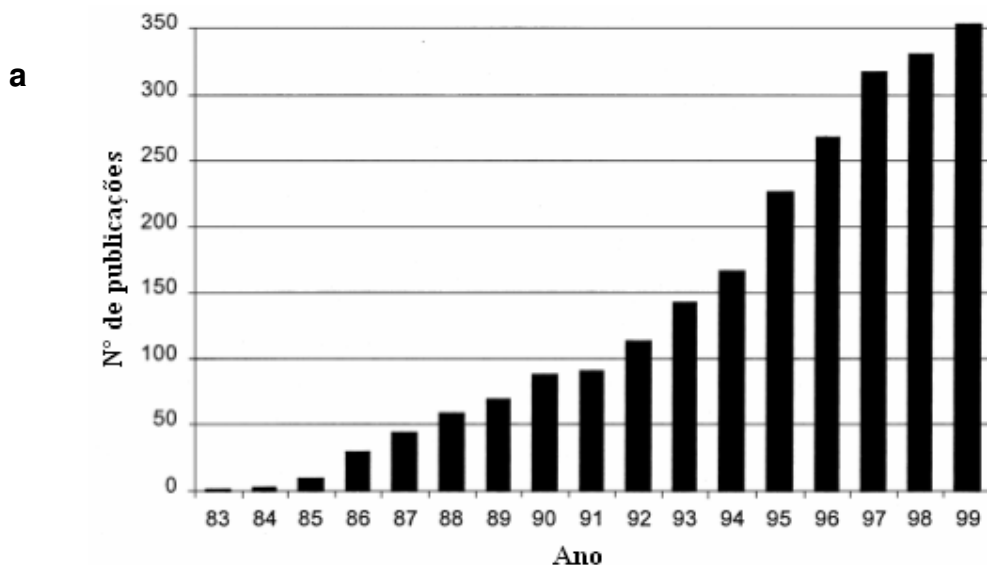


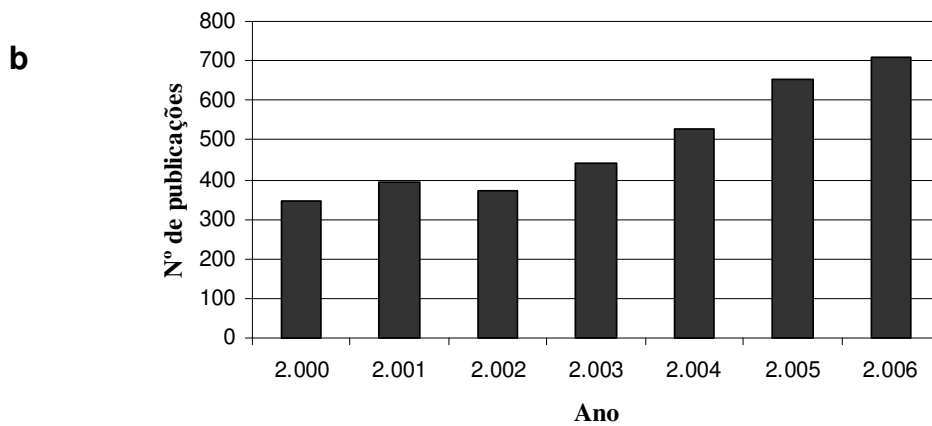
## 2.5 Técnicas de extração e pré-concentração para determinação de pesticidas em águas

Análises ambientais frequentemente envolvem analitos em uma ampla variedade de matrizes, incluindo ar, águas e amostras de solo poluídas. Procedimentos apropriados para o preparo das amostras são necessários para chegar a resultados analíticos confiáveis (MAJORS, 2001a).

Embora muitas das técnicas instrumentais cromatográficas tenham evoluído e de a automação ser bastante utilizada, o preparo da amostra é ainda considerado lento, laborioso e eventualmente um entrave no processo laboratorial (MAJORS, 2003).

A SPE (Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*), na sua forma moderna, tem mais de 25 anos. Ela tem se tornado uma das mais comuns técnicas de concentração e *clean-up* da amostra usada pelos químicos analíticos. Através dos anos, o uso da SPE tem crescido (Figura 5) devido ao fato de que essa técnica atende as necessidades dos analistas em relação aos procedimentos de preparo da amostra, apresentando-se simples, relativamente barata, com boa recuperação dos analitos e adequada seletividade, reduzido uso de solventes orgânicos e capacidade de automação (MAJORS, 2001b).





**Figura 5 - Número total de publicações envolvendo SPE: (a) Fonte: FRITZ & MACKA, 2000; (b) Fonte: ISI Web of Science**

Cartuchos para SPE têm sido desenvolvidos por várias décadas. Os primeiros cartuchos foram utilizados em 1978, cartuchos com formato de seringa em 1979 e como pré-coluna para acoplamento *on-line* com cromatografia líquida em 1980 (HENNION, 1999). Durante os últimos anos tem crescido o seu desenvolvimento, com melhorias no formato, automação e a introdução de novos sorventes com capacidade de melhorar a extração de analitos polares (PICHON, 2000).

Desde a introdução dos cartuchos SPE comerciais, os analistas têm substituído a LLE (Extração Líquido-Líquido, do inglês, *Liquid Liquid Extraction*) pela SPE, pelo fato de que esta produz melhores resultados com menos complicações. Essa técnica tem provado ser a melhor opção para determinação de pesticidas em águas (WELLS, 2000a), como demonstram o grande número de publicações na área, representados nas Figuras 6 e 7.

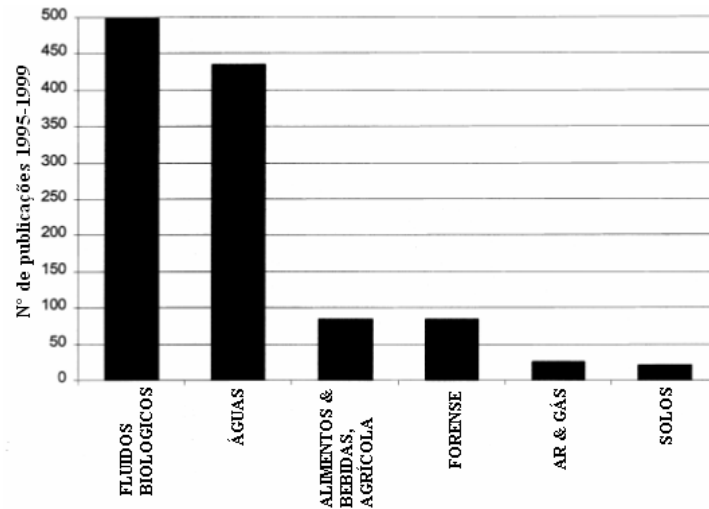


Figura 6 - Número de publicações envolvendo SPE de acordo com o tipo de amostra (FRITZ; MACKA, 2000)

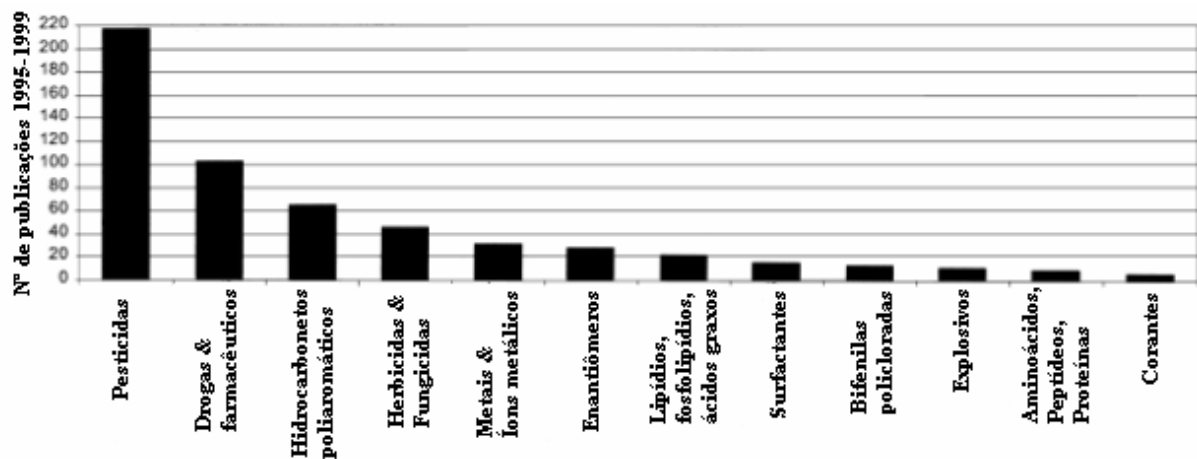


Figura 7 - Número de publicações envolvendo SPE de acordo com a categoria do analito (FRITZ; MACKA, 2000)

No período de 2000 a 2006, a partir de uma revisão efetuada no ISI Web of Science, foram encontradas 1150 citações envolvendo SPE e amostras de água, e 375 citações envolvendo SPE e pesticidas.

A crescente popularidade da SPE está ligada ao uso de uma variedade de sorventes sólidos como resinas poliméricas, grupos C8 (octilsilano), C18 (octadecilsilano), amino ou ciano ligados ao suporte de sílica ou ao carbono grafitizado ou alumina (BARCELÓ, 1991). Todos os materiais SPE clássicos estão

em uso nos dias de hoje e suas novas modificações têm melhorado as propriedades da SPE. Novos materiais à base de carbono têm tornado-se interessantes sorventes devido as suas propriedades específicas e alta estabilidade (LISKA, 2000).

Copolímeros de estireno-divinilbenzeno (PS-DVB) têm sido usados com sucesso em métodos *screening* para determinação de uma ampla variedade de poluentes prioritários (LISKA, 2000). A extração utilizando resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio de forças de van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero estireno-divinilbenzeno, tais como Amberlite XAD-2, XAD-4 e polímeros acrilatos (XAD-7 e XAD-8) (JUNKER-BUCHHEIT & WITZENBACHER, 1996).

As mais recentes fases para SPE são os materiais poliméricos mistos tais como os cartuchos Oasis®, Strata-X® e Nexus®. Strata-X® é um polímero de estireno divinilbenzeno com superfície modificada. As propriedades dessa superfície permitem vários mecanismos de retenção, incluindo interações hidrofóbicas, ligações hidrogênio e  $\pi$ - $\pi$ , proporcionando seletividade para compostos ácidos, neutros e básicos. Já os cartuchos Oasis® HLB são sorventes de fase reversa possuindo balanço hidrofílico-lipofílico, proporcionado pela presença de dois monômeros, o hidrofílico *N*-vinilpirrolidona e o lipofílico divinilbenzeno. Possui maior retenção para analitos polares, maior resistência a valores extremos de pH e uma capacidade de retenção relativa 3 vezes maior que os sorventes tradicionais à base de sílica como o C18 (HUG *et al.*, 2003; WATERS, 2006; CARABIAS-MARTINEZ *et al.*, 2002).

No entanto, o sorvente mais popular para extração de pesticidas em água é o grupo octadecil ligado a sílica. O principal mecanismo de retenção é a partição, devido as interações apolares entre as ligações C-H do grupo C18 e C-H do analito (JUNKER-BUCHHEIT & WITZENBACHER, 1996). Estas fases são muito resistentes à pressão e são disponíveis em várias granulometrias, tipicamente de 3 a 200  $\mu$ m, além disso, têm boa reprodutibilidade na retenção. Sua principal desvantagem é sua pobre estabilidade em meios muito ácidos ou básicos, o que limita seu uso na razão de pH entre 2 e 8 (BARCELÓ & HENNION, 1997).

A Tabela 7 apresenta uma comparação das principais características dos cartuchos comerciais contendo C18, SDVB e Strata-X como material de recheio.

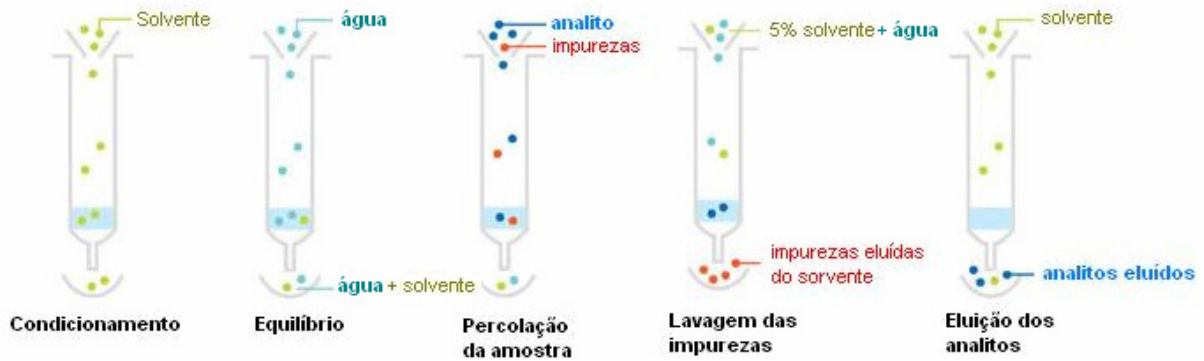
**Tabela 7 - Comparação entre os cartuchos SPE C18, SDVB e Strata-X**

Aspecto	Cartucho		
	C18	SDVB	Strata-X
Química de superfície	Partículas de sílica funcionalizadas com C18	Polímero altamente entrecruzado	Polímero de SDVB com superfície modificada
Tipo de interação	Hidrofóbico	Hidrofóbico e aromático	Hidrofóbico, ligação H e aromático
Características de doação de H	Não	Não	Superfície fracamente ácida, mostra uma forte interação com compostos básicos
Resistência ao descondicionamento	Não	Não	Sim, pode secar sem impacto negativo na retenção
Capacidade de retenção do analito	1-5% da massa de sorvente	10-15% da massa de sorvente	10-15% da massa de sorvente
Versatilidade	Extração de compostos hidrofóbicos	Extração de compostos hidrofóbicos	Maior retenção para analitos polares, além de extrair compostos hidrofóbicos

Fonte: PHENOMENEX, 2006

A SPE pode ser descrita como sendo um processo cromatográfico simplificado, com o sorvente atuando como fase estacionária. A fase móvel é a água da amostra aquosa durante a etapa de extração ou o solvente orgânico durante a etapa de dessorção (eluição). Altos fatores de enriquecimento são obtidos quando os analitos são fortemente retidos pelo sorvente na presença de água e quando eles têm baixa retenção com o solvente orgânico usado para dessorção.

Para a realização da SPE, utilizando-se por exemplo C18, são necessárias quatro etapas, as quais estão demonstradas na Figura 8. Elas devem ser otimizadas de forma a obter-se uma recuperação máxima.



**Figura 8 - Etapas de operação do sistema de preparo de amostra por SPE**

#### A. Condicionamento do sorvente

Cada sorvente de SPE requer o seu condicionamento com o objetivo de se ativar ou se preparar para reter o analito. No caso dos materiais a base de sílica quimicamente modificada, o preparo da coluna para receber a amostra é feito pela ativação ou umedecimento com um solvente conveniente, e por condicionamento com água. A limpeza prévia com solvente orgânico serve também para remover contaminação indesejável que possa estar presente no cartucho. O condicionamento efetivo, ou seja, a preparação do sorvente para as mesmas condições da amostra é realizado com água ou solução tampão. Essa etapa é um pré-requisito para a adsorção reprodutível do analito.

## B. Retenção dos pesticidas

A amostra é percolada através do cartucho de extração condicionado. Nessa etapa, o composto se distribui entre a amostra líquida e a superfície do sorvente, por simples adsorção à superfície ou através da penetração na superfície, e um equilíbrio é estabelecido (SIMPSON & WELLS, 2000; WELLS, 2000b).

Em cromatografia de fase reversa é bem conhecido que compostos hidrofóbicos são bem retidos com água como fase móvel. A escolha do sorvente é guiada pela natureza aquosa das amostras, pelo volume necessário para se conseguir a detecção desejada, e a natureza dos pesticidas. Água não deve eluir os pesticidas de interesse. Melhores sorventes são então os de fase reversa (principalmente sílicas alquil modificadas, copolímeros apolares e sorventes à base de carbono) para pesticidas neutros e trocadores iônicos para compostos ionizados. Nesse processo, os analitos de interesse concentram-se no sorvente e frequentemente são adsorvidos junto com outros componentes da matriz da amostra.

## C. Limpeza do cartucho de SPE

Antes da eluição, alguns destes componentes interferentes da matriz podem ser removidos da superfície do sorvente pela aplicação de um solvente de lavagem. Cada passo de lavagem envolve outra distribuição entre o analito e as espécies co-retidas, o sorvente e o líquido que passa através dele. Pode-se controlar cada passo selecionando-se cuidadosamente as condições de lavagem, eluição e carregamento da amostra. Pode ser usada uma mistura simples de tampão com água ou contendo uma pequena quantidade de solvente orgânico. (SIMPSON & WELLS, 2000; WELLS, 2000b)

## D. Eluição dos analitos adsorvidos

Na última etapa da SPE, os analitos de interesse são desorvidos com um pequeno volume de solvente adequado. Essa etapa é realizada com maior sucesso utilizando-se um solvente que tenha a maior força eluotrópica para o sorvente que está sendo usado, ao mesmo tempo minimizando o volume de solvente de eluição e maximizando o efeito de concentração da SPE. No entanto, outros fatores como a compatibilidade do solvente com a instrumentação analítica usada para a determinação final, ou o desejo de se reduzir posteriores manuseios da amostra tais

como a troca de solvente, podem também ditar a seleção do solvente (SIMPSON & WELLS, 2000; WELLS, 2000b). O solvente deve ser seletivo o bastante para que a interação entre o analito e o sorvente seja enfraquecida e a distribuição do analito através do eluente ocorra. Portanto, para que haja uma excelente escolha do solvente é necessário conhecer as características químicas do analito e informações suficientes no que se refere à estrutura, solubilidade, polaridade, entre outras propriedades.

Para sorventes de fase reversa, a série eluotrópica é bem conhecida para solventes orgânicos e o poder de eluição diminui dentro da série hexano, THF, acetato de etila, diclorometano, acetona, acetonitrila e metanol. Um solvente apolar, forte, como o hexano pode não efetuar a eluição totalmente se existir uma camada de água adsorvida na superfície do sorvente. Solventes polares ou capazes de ligação hidrogênio com a água adsorvida podem ser mais efetivos. Por isso, metanol ou acetonitrila são normalmente preferidos devido a sua miscibilidade com água. Misturas de solventes miscíveis podem também ser usadas para se adquirir um balanço hidrofílico-hidrofóbico (BARCELÓ & HENNION, 1997; SIMPSON & WELLS, 2000).

A vazão de eluição deve ser baixa e o volume mínimo é cerca de 2 vezes o do sorvente, isto é, de 2 a 5 mL para cartuchos de 500 mg. Quanto menor o volume de dessorção, maior o fator de pré-concentração. A dessorção é mais eficiente se for feita com 2 ou 3 alíquotas de 1 mL ao invés de uma alíquota única com 2 ou 3 mL. Quando a análise será realizada por GC, pode-se eluir os analitos com um solvente adequado ao GC, ou realizar a dessorção com um solvente miscível em água, evaporar até secagem e redissolver no solvente adequado ao GC (BARCELÓ & HENNION, 1997).

## **2.6 Métodos para determinação de resíduos de pesticidas em águas**

A determinação de pesticidas é um formidável desafio considerando as baixíssimas concentrações dos analitos, sua diversidade e diferentes propriedades físicas e químicas, em presença de altas concentrações de compostos interferentes (BIZIUK *et al.*, 1996).



O alto padrão de pureza da água potável, imposto pelas agências regulamentadoras internacionais, requer o desenvolvimento de métodos analíticos de sensibilidade, seletividade, exatidão e precisão elevadas para determinações quantitativas de pesticidas compatíveis com os crescentes níveis de exigência (BALINOVA, 1996).

A determinação de resíduos de pesticidas em amostras biológicas e ambientais, desde meados de 1950, baseou-se, primeiramente, na GC e em outras técnicas afins como a Cromatografia em Camada Delgada (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*). Já o uso da HPLC em determinações de resíduos de pesticidas é de ocorrência mais recente.

Os métodos tradicionais para determinação de resíduos de pesticidas em amostras de água envolvem extração líquido-líquido com um solvente orgânico seguido pela análise direta por GC com detectores específicos (NPD, ECD, FPD, do inglês *Flame Photometric Detector*), alcançando-se boa seletividade e excelente detectabilidade (ZAUGG *et al.*, 1995; GEERDINK *et al.*, 2002).

Atualmente, há um aumento no desenvolvimento e uso de pesticidas de caráter mais polar, considerados mais facilmente degradáveis, em substituição aos pesticidas menos polares, que sofrem maior acumulação (SÁNCHEZ-MARTÍN *et al.*, 1996). Estes compostos que, atualmente, representam 15-20% dos pesticidas, não são diretamente analisáveis por GC, devido a sua baixa volatilidade e instabilidade térmica. Conseqüentemente há uma necessidade maior em se desenvolver métodos utilizando HPLC para determinação destes compostos mais polares bem como seus metabólitos (AYANO *et al.*, 2004; GEERDINK *et al.*, 2002).

A detecção feita na região do ultravioleta (UV) em um único comprimento de onda ou em vários comprimentos de onda utilizando Detecção por Arranjo de Diodos (DAD) é comumente empregada em HPLC, assim como as Detecções por Captura de Elétrons e Espectrometria de Massas são bastante utilizadas em GC. Os limites de detecção alcançados em HPLC são a níveis de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e são normalmente comparáveis aos obtidos por GC-MS, os quais são, geralmente, maiores que os obtidos por GC-ECD (WELLS, 2000b).

Publicações mostram que há uma tendência em se utilizar, na determinação de resíduos de pesticidas em águas, técnicas sofisticadas como GC-MS e LC-MS (PLANAS *et al.*, 2006; BECEIRO-GONZÁLEZ *et al.*, 2007; BARCELÓ & PETROVIC, 2007).

No entanto, os fatores mais importantes na escolha da técnica para análise de pesticidas são o comportamento do analito no sistema cromatográfico, a necessidade de derivatização do analito e o trabalho necessário para isso, a preferência pessoal do analista, a disponibilidade da técnica no laboratório e o propósito geral da análise (LISKA & SLOBODNÍK, 1996).

A seguir, são descritas as publicações encontradas no ISI Web of Science sobre a determinação dos compostos em estudo ou de compostos relacionados.

### 2.6.1 Bispiribaque-sódico

Na revisão efetuada não foi encontrada nenhuma referência sobre a determinação desse composto em nenhum tipo de amostra. Sobre o piriminobaque-metílico, o outro herbicida que pertence à mesma classe ácido pirimidiniloxibenzóico do bispiribaque-sódico existe uma única referência que utiliza SFE (Extração por Fluido Supercrítico, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*) e GC-MS para determinação desse composto em vegetais (YOSHII *et al.*, 1999).

### 2.6.2 Imidazolinonas e sulfoniluréias

Compostos pertencentes à essas 2 classes de herbicidas normalmente são determinados juntos, utilizando-se o mesmo método. Então, a revisão bibliográfica a respeito destes herbicidas foi feita em conjunto.

Apesar de sua baixa toxicidade para mamíferos e outros animais, para muitos herbicidas da classe das sulfoniluréias e imidazolinonas, uma concentração de 100 ng L<sup>-1</sup> em águas tem sido proposta como tóxica para plantas não-alvo. Então, métodos analíticos devem ser capazes de detectar estes compostos em concentrações menores que 100 ng L<sup>-1</sup> em amostras de águas ambientais (FURLONG *et al.*, 2000).

As técnicas analíticas aplicadas à determinação destes compostos têm sido variadas. Herbicidas sulfoniluréias têm sido analisados por HPLC com detecção na

região do UV ou por DAD (BEZEMER & RUTAN, 2001; CHAO *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003; ZHU *et al.*, 2002), HPLC com detecção MS ou MS/MS (RODRIGUEZ & ORESCAN, 1998; SEITZ *et al.*, 2006), Cromatografia em Camada Delgada (MISZCZYK & PYKA, 2006; ZHANG *et al.*, 2003), imunoenaios (DEGELMANN *et al.*, 2004; MIYAKE *et al.*, 2003), Eletroforese Capilar (HICKES & WATROUS, 2000) e, se derivatizados, por GC (BERRADA *et al.*, 2001).

Metodologias analíticas que têm sido aplicadas para a análise de imidazolinonas geralmente incluem também a determinação de imazetapir. Herbicidas dessa classe podem ser determinados em amostras de água por HPLC-UV (LAGANA *et al.*, 1998), LC-MS (RODRIGUEZ & ORESCAN, 1998; BATTAGLIN *et al.*, 2000; D'ASCENZO *et al.*, 1998) ou LC-MS/MS (STOUT *et al.*, 1998), eletroforese capilar (CAVALIER *et al.*, 2000), imunoenaios (LEE & DURST, 1996; STEINHEIMER & SCOGGIN, 1998) e, se os compostos forem metilados, por GC com detecção por MS (ANISUZZAMAN *et al.*, 2000).

Existem poucas publicações sobre análise de pirazossulfurom etílico. Elas incluem a análise deste composto em amostras de solo por SFE e HPLC-UV (KANG *et al.*, 2006); em amostras de água de lavoura de arroz por imunoenaios (MIYAKE *et al.*, 2003); em águas por Cromatografia Líquida-Termo Responsiva (não utiliza solvente orgânico na fase móvel) com uma fase estacionária de poli(N-isopropilacrilamida) (AYANO *et al.*, 2005); em águas e alimentos com extração por imunoafinidade e determinação por HPLC-DAD e LC-MS/MS (DEGELMANN *et al.*, 2006); em arroz por HPLC-DAD (AKIYAMA *et al.*, 2002) e em águas por SPE e LC-MS (AYANO, 2004). Não existe nenhuma bibliografia para sua determinação utilizando-se SPE com C18 e HPLC-DAD.

### 2.6.3 Fipronil e metabólitos

A maioria das publicações sobre fipronil descreve o metabolismo, degradação ou dinâmica desse inseticida no meio ambiente (água, solo, vegetais) e incluem o método de determinação, utilizando GC, mas não objetivam o desenvolvimento de método propriamente dito, incluindo os parâmetros de validação.

A dissipação do fipronil em um ambiente aquático foi avaliada através do fipronil marcado com  $^{14}\text{C}$  (AAJOUND *et al.*, 2003); o destino de fipronil e seus metabólitos sob condições tropicais foi estudado no solo e na vegetação (FENET *et al.*, 2001); a degradação em solos foi estudada em condições de campo e de laboratório (YING & KOOKANA, 2002); a fotodegradação de fipronil foi estudada em solução a baixas intensidades de luz (luz solar ou lâmpada UV) (RAVETON *et al.*, 2006); sua degradação abiótica foi estudada em solução aquosa e na superfície de 3 solos (BOBÉ *et al.*, 1998); a dinâmica de fipronil em um ecossistema solo-vegetais foi pesquisada (PEI *et al.*, 2004). Estes artigos fazem uso ou de GC-ECD ou de GC-MS para a determinação de fipronil e/ou seus metabólitos. A elucidação dos caminhos de fotodegradação do fipronil foi realizada utilizando GC-MS, HPLC-UV/Vis, LC-MS e  $^{19}\text{F}$  NMR ( $^{19}\text{Fluorine Nuclear Magnetic Resonance}$ ) (NGIM *et al.*, 2000).

Métodos desenvolvidos incluem SPME (Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*) e GC-MS para determinação de fipronil em amostras de água, solo e de urina (VÍLCHEZ *et al.*, 2001); MSPD (Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*) e GC-NPD para determinação de fipronil em abelhas (MORZICKA, 2002); LLE ou Líquido-Sólido e GC-ECD para determinação de fipronil e seus metabólitos em amostras de água e sementes, respectivamente (SCHLENK *et al.*, 2001); SPE ou líquido-sólido, detecção por GC-NPD e confirmação por GC-MS para determinação de fipronil e metabólitos em água e solo de lavouras de arroz (NGIM & CROSBY, 2001); e a determinação de fipronil e metabólitos em água usando-se SPE e GC-MS (MADSEN *et al.*, 2003). Não existe nenhuma referência publicada atualmente para a determinação de fipronil e seus metabólitos em águas utilizando SPE e GC-ECD.

A Tabela 8 apresenta a revisão bibliográfica realizada sobre a determinação de resíduos de pesticidas em águas.

**Tabela 8 - Revisão bibliográfica sobre análise de pesticidas em águas**

Finalidade	Preparo da amostra	Determinação	Resultados	Referência
Determinação de 12 sulfoniluréias (SUs), 3 imidazolinonas (IMIs), incluindo imazetapir) e 1 sulfonamida (SA) em 196 amostras de água de superfície e profundidade	2 cartuchos em série. Um contendo resina aniônica, que removeu grande parte do carbono orgânico e reteve as IMIs, e outro de SDVB que reteve os outros compostos	LC-MS, <i>fullscan</i> , ESI, com fase móvel de acetonitrila e tampão ácido fórmico-formiato de amônio	As recuperações variaram de 56 a 86% (70% para imazetapir), para água pura e de 46 a 163% (50% para imazetapir) para água de superfície. Os LODs foram da ordem de 10 ng L <sup>-1</sup>	Furlong <i>et al.</i> , 2000
Avaliação da contaminação de águas por pesticidas de diferentes classes, entre eles o fipronil	SPE utilizando cartuchos de SDVB altamente entrecruzado (ENV+). Pré-concentração de 1L e eluição com DCM e acetona:acetonitrila (3:1)	GC-ITDMS, modo <i>(fullscan)</i> e GC-MS quadrupolo para se obter maior sensibilidade para os compostos halogenados	Recuperações maiores que 80% para a maioria dos compostos; para fipronil a recuperação foi de 79 ± 15%. Os LODs ficaram entre 0,2 (para fipronil) e 1,8 ng L <sup>-1</sup> .	Harman-Fetcho <i>et al.</i> , 2005
Comparação de performance de métodos, empregando LC-DAD ou LC-MS, para detecção simultânea de fenil- e sulfoniluréias em amostras de água natural	da SPE com diferentes sorventes: 2 cartuchos poliméricos (Oasis® HLB ou Lichrolut® EM) ou C18. Pré-concentração de 500 mL de água e eluição com acetonitrila	LC-DAD a 245 nm, com FMI ACN-tampão fosfato. LC-MS modo <i>fullscan</i> (ionização positiva) e quantificação por SIM, com FM ACN:formiato de amônio	Oasis foi escolhido o melhor sorvente. Os 2 métodos mostraram-se adequados, permitindo a determinação dos herbicidas a concentrações < 0,1 µg L <sup>-1</sup> . O método por LC-DAD foi mais afetado por interferências.	Carabias-Martínez <i>et al.</i> , 2004

Desenvolvimento de método adequado para a determinação de 41 pesticidas e metabólitos em águas naturais, a níveis de $\mu\text{g}$ ou $\text{ng L}^{-1}$	SPE com cartuchos C18 500 mg, 1000 mL de amostra, eluição com 3 mL de hexano:isopropanol (3:1)	GC-MS operado no modo SIM para seletiva e confirmação dos pesticidas	As recuperações variaram de 34 a 202% em água pura; 26 a 141% para água de superfície e de 33 a 132% em água de profundidade. Os LODs ficaram entre 0,001 e 0,018 $\mu\text{g L}^{-1}$	Zaugg <i>et al.</i> , 1995
Método simultâneo para determinação de herbicidas ácidos, neutros e seus produtos de transformação em canais de drenagem e lagoas que recebem água de irrigação de lavouras de arroz	SPE <i>on line</i> com copolímero de SDVB, amostras de 5 a 50 mL e eluição por gradiente usando ACN e solução tampão de formiato de amônio-ácido fórmico 5 $\text{mmol L}^{-1}$ a pH 3,0	Detecção por acoplamento <i>on line</i> LC-DAD-APCI-MS. Alguns compostos não puderam ser detectados por ambos os detectores.	As recuperações foram > que 76%, com RSDs < que 10%. LODs variaram de 0,1 a 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ . Bentazone, seu produto de degradação e MCPA foram persistentes no ambiente.	Santos <i>et al.</i> , 2000
Investigação da presença de resíduos dos pesticidas simazina, hexazinona, 2,4-D, picloram e carbendazim em águas de superfície do Chile, nos anos de 2001 e 2003	SPE com 500 mg de C18, 500 mL de amostra e eluição com 3 mL de acetonitrila	HPLC-DAD com RP, usando FM ACN:acetato de amônio 1 $\text{mmol L}^{-1}$ (1:3) e detecção a 220 nm para simazina, hexazinona e carbendazim e ACN:ácido acético 17 $\text{mmol L}^{-1}$ (1:1), 230 nm para 2,4-D e picloram	As recuperações ficaram entre 88 e 99%, com RSD < 20% e LOD de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os pesticidas. Todos os pesticidas analisados foram detectados nas amostras de água, em concentrações que variaram de 0,2 a 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Palma <i>et al.</i> , 2004

Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de 16 herbicidas sulfoniluréias, imidazolinonas (incluindo imazetapir) e sulfonamida em água de superfície	SPE em cartuchos de SDVB, amostras de 250 mL de água e eluição com 10 mL de metanol; <i>clean-up</i> com cartuchos de troca aniônica adaptados no topo de cartuchos de alumina	Sistema de HPLC interfaceado com um MS quadrupolo, modo de ionização positiva. Os compostos foram separados em coluna C8, com gradiente de FM de ACN:0,15% ácido acético em água	As recuperações para água de rio, lago, torneira, lagoa, córrego e pântano, variaram de 70 a 114%, com RSDs < 13%. Para imazapir, imazetapir e imazaquin as recuperações foram < 80%. O LOQ foi de 0,1 µg L <sup>-1</sup> para todos os compostos	Rodriguez; Orescan, 1998
Determinação de 5 sulfoniluréias (incluindo pirazossulfurom) e 3 uréias em amostras de água pura, potável e de rio	SPE com 3 tipos de cartuchos: polímero de poliestireno (PS2), C18 e polímero de <i>N</i> -vinilpirrolidona (Oasis®). Usou-se 500 mL de amostra e eluição com metanol (Oasis) ou acetonitrila (demais)	LC-ESI-MS, modo de ionização positivo, com coluna C18 e gradiente de fase móvel de ácido acético 0,15% e acetonitrila.	De maneira geral, melhores recuperações foram obtidas com cartuchos Oasis. Para pirazossulfurom, elas ficaram entre 45,2 e 75,8% com PS2; 9,1 e 98,5% para C18 e 86,4 e 112,9% para Oasis®, nos 3 tipos de água. Os LOQs variaram de 0,6 a 65,9 ng L <sup>-1</sup>	Ayano <i>et al.</i> , 2004.
Desenvolvimento de método para determinação simultânea de 3 herbicidas amplamente usados (atrazina, terbutrina e	SPE com 4 diferentes cartuchos: 3 poliméricos (Oasis® HLB, Oasis® MCX e LiChrolut® EN) e 1 à base de sílica (C18). Usou-se 250 mL de	HPLC-DAD, com coluna ODS2, gradiente de fase móvel de acetonitrila-tampão fosfato 0,005 mol L <sup>-1</sup> e leitura nos comprimentos de onda de	Os melhores resultados foram obtidos com o cartucho polimérico LiChrolut® EN devido as características polares dos metabólitos. As recuperações variaram de 69	Carabias-Martínez <i>et al.</i> , 2002

clorotoluron) e 7 de seus mais comuns produtos de degradação em águas de rios e poços	amostra e eluição com metanol e acetonitrila	210, 220, 230 e 245 nm.	a 109% e os LODs de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ . Foi detectada a presença de 3 dos compostos analisados.
Determinação de resíduos de pesticidas de diferentes classes (organoclorados, organofosforados, triazinas, benzimidazóis, acetamidas, feniluréias e outros) em águas de 40 poços da Espanha	O procedimento de SPE usando C18 foi otimizado em relação ao modo de eluição, solvente e volume de eluição, volume de <i>breakthrough</i> , concentração, bem como o procedimento de <i>clean-up</i> em colunas de florisil	Os compostos foram analisados por HPLC ou GC. O sistema HPLC–DAD utilizou coluna ODS-2, gradiente de fase móvel ACN:água e detecção a 220 e 245 nm. O sistema GC é equipado com ECD e NPD, e coluna de FE 50% fenilmetilpolisiloxano	Melhores resultados foram obtidos com 300 mL de amostra, 4 mL de MeOH para eluição e 30 mL de n-hexano-DCM (1:1) para o <i>clean-up</i> em florisil. Os LOQs variaram de 3 a 1240 $\text{ng L}^{-1}$ . Todos os compostos foram detectados, em concentrações entre 0,01 e 7,8 $\mu\text{g L}^{-1}$
Determinação de fipronil e 4 metabólitos (desulfinil, sulfeto, sulfona e desulfinil amida) em amostras de água e validação do método	SPE com C18 (500 mg), volume de amostra de 1000 mL, eluição com 3 mL da mistura hexano:isopropanol (3:1)	GC-MS, modo SIM	As recuperações em água pura variaram de 85,2 a 115%, em água de profundidade de 80,1 a 108% e em água de superfície, de 93,2 a 191% para todos os compostos. Os LOQs ficaram entre 4 e 9 $\mu\text{g L}^{-1}$



## 2.7 Parâmetros cromatográficos

A seguir estão descritos os parâmetros cromatográficos empregados para avaliar a separação de analitos por cromatografia.

### 2.7.1 Fator de retenção (k)

O fator de retenção é determinado pela razão entre a fração de tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e a fração em que percorrem a coluna na fase móvel, de acordo com a Equação (1) (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 1993):

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

Onde:

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

$t_M$  = tempo de retenção de um analito não retido;

$t'_R$  = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 1993).

### 2.7.2 Resolução (Rs)

A resolução refere-se à separação de dois picos adjacentes e pode ser obtida pela Equação (2) (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 1993): A resolução é calculada a

artir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da soma das larguras de suas respectivas bases ou largura a meia altura.

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

Onde:

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

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

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

Quando  $R_s = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de sobreposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de  $R_s$  indicam melhor separação:  $R_s = 1,25$  é suficiente para fins quantitativos e com  $R_s > 1,5$  tem-se 100% de separação para picos gaussianos (COLLINS V, 2006; LANÇAS, 1993).

### 2.7.3 Fator de separação ( $\alpha$ )

O fator de separação está relacionado com a separação de dois picos adjacentes, sendo calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a Equação (3):

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

O fator de retenção ( $k$ ) mede a seletividade de um sistema cromatográfico e, portanto, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação ( $\alpha$ ).

Se  $\alpha = 1$ , indica que não há diferença termodinâmica entre os dois componentes de um dado sistema e eles não podem ser separados. Contudo,  $\alpha > 1$  não necessariamente indica que os dois picos estão totalmente separados, pois podem ser largos e estarem sobrepostos. Em conseqüência disto, um valor elevado

de  $\alpha$  só implica em boa separação se os picos forem estreitos (COLLINS *et al.*, 2006).

#### 2.7.4 Curva de van Deemter

A curva de van Deemter é indicada, na caracterização cromatográfica de uma coluna, para determinar a vazão que se deve trabalhar a fim de obter a máxima eficiência (N) da coluna. Essa se relaciona com a velocidade linear ótima ( $\mu$ ), na qual a altura equivalente a um prato (H) terá um valor mínimo e, portanto o valor de eficiência será máximo. As equações para cálculo de N, H e  $\mu$  são apresentadas a seguir (equações 4, 5 e 6, respectivamente), onde L representa o comprimento da coluna cromatográfica (MELOAN, 1996):

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

## 2.8 Validação de métodos cromatográficos para a determinação de pesticidas em água

O desenvolvimento de um método analítico envolve processo de avaliação que estime sua eficiência. É fundamental dispor-se de meios e critérios objetivos para demonstrar que o método que se está executando conduz a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (INMETRO, 2003). Essa avaliação normalmente é realizada através do processo de validação. A validação deve

garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

A validação também faz parte de qualquer documentação submetida às agências governamentais de regulamentação. Órgãos como ICH (do inglês, *International Conference on Harmonisation*), IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO (do inglês, *International Standard Organisation*), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia) e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (ZANELLA *et al.*, 2003; PRIMEL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A validação de um método que emprega técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planejados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (LANÇAS, 2004).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separações (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004). Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a validação dos métodos analíticos foram: curva analítica, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão (repetibilidade e reprodutibilidade).

### 2.8.1 Curva analítica

A calibração é um dos estágios mais importantes na análise química. Sem um bom procedimento de calibração, a precisão e a exatidão podem ser comprometidas (ZANELLA *et al.*, 2003; PIMENTEL & NETO, 1996).

Na maioria dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 2003). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (NETO *et al.*, 2002). Dentro da faixa linear de trabalho há uma relação linear entre a resposta do sinal (detector) e o valor (concentração) do composto em estudo (INMETRO, 2003). A equação de regressão linear (Equação 5) que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (5)$$

onde:

y = resposta medida (área do pico);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0

### 2.8.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003).

A regressão linear deve ter alto coeficiente de determinação ( $r^2 > 0,999$ ) (PIMENTEL & NETO, 1996), ou de correlação ( $r > 0,99$ ) (BRASIL, 2003) ou  $> 0,9$  (INMETRO, 2003).

### 2.8.3 Limite de detecção (LOD) e limite 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) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente, quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, nas condições experimentais estabelecidas. Estes limites são estabelecidos por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração (BRASIL,2003; FRANCOTTE *et al.*, 1996).

### 2.8.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e pode ser expressa por meio da repetitividade e da precisão intermediária. (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003)

A precisão é geralmente expressa como desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (RSD) e é dependente da concentração do analito, devendo ser determinada para um diferente número de concentrações. (INMETRO, 2003)

A **repetitividade** é o grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, como: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear, ou seja, três concentrações, (baixa, média e alta), com três réplicas cada. (BRASIL, 2003)

A **precisão intermediária** refere-se à precisão avaliada sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais condições a variar, tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável para usar (INMETRO, 2003).

Recomenda-se, para o cálculo da precisão intermediária, um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes. (BRASIL, 2003)

#### 2.8.5 Exatidão (recuperação)

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). Na análise de compostos orgânicos, a exatidão é avaliada por processos de recuperação, uma vez que, normalmente, não existem materiais de referência certificados.

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas deste. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra (INMETRO, 2003).

A recuperação (R) geralmente é dependente da concentração, por isso deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para as amostras.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Instrumentação

A instrumentação utilizada no desenvolvimento do método está descrita a seguir:

- ◆ Cromatógrafo a líquido Varian (Palo Alto, CA, USA), composto por bomba modelo 9010 com sistema de eluição isocrática; Detector por Arranjo de Diodos (DAD) ProStar 335; sistema de aquisição de dados Star Workstation 6.0 e coluna analítica Synergi 4  $\mu$  Fusion RP-80 (250  $\times$  4,6 mm de d.i.; 4  $\mu$ m) e pré-coluna do mesmo material (4  $\times$  3 mm), ambas da firma Phenomenex (Torrance, CA, USA);
- ◆ Cromatógrafo a gás HP 6890 (Palo Alto, CA, USA) equipado com: amostrador automático Série HP 6890; injetor *split/splitless* com Controle Pneumático Eletrônico (EPC); Detector por Captura de Elétrons, isótopo  $^{63}\text{Ni}$ ; sistema de aquisição de dados através da HP *Chemstation* versão B.02.05 e coluna capilar DB-5 (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25  $\mu$ m de espessura do filme, J & W Scientific<sup>®</sup>, (Foster City, CA, EUA);
- ◆ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, SP, Brasil);
- ◆ *Manifold* para SPE Varian (Palo Alto, CA, USA) para a pré-concentração simultânea de 20 amostras;
- ◆ Ultra-som Bandelin Sonorex RK 510 (Mörfelden-Walldorf, Alemanha);
- ◆ pHmetro modelo pH 500 Series Cole Parmer equipado com eletrodo de vidro combinado (Vernon Hills, Illinois, EUA);
- ◆ Balança analítica de precisão modelo AG 245 Mettler Toledo (Greifensee, Suíça);
- ◆ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);



- ◆ Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> Direct-Q UV3 Millipore (Bedford, MA, USA)
- ◆ Sistema de filtração em membrana Advantec com membranas HA em ésteres de celulose de 0,45 µm e 47 mm.

### 3.2 Gases Utilizados

- ◆ Gás de arraste: Hélio 99,999% de pureza (White Martins e Air Products, Brasil);
- ◆ Gás *make up* do detector ECD: Nitrogênio 99,999% de pureza (Air Products, Brasil);
- ◆ Gás usado para evaporação dos extratos: Nitrogênio 99,99% de pureza (Air Products, Brasil).

### 3.3 Reagentes, solventes e materiais

- n-Hexano, acetona, acetonitrila, diclorometano e metanol grau resíduo - Nanograde<sup>®</sup> (Mallinckrodt, EUA);
- Extran<sup>®</sup> neutro e alcalino (Merck, Brasil);
- Acetona p.a. (Belga, Brasil);
- Água destilada e deionizada;
- Água purificada em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (resistividade 18,2 MΩ cm);
- Álcool isopropílico p.a. (Merck, Brasil);
- Ácido fórmico p.a. 98-100% (Merck, Brasil)
- Ácido fosfórico p.a. 85% (Merck, Brasil)
- Cartuchos para SPE Strata C18-E, 500 mg/3 mL e Strata-X 200 mg/6 mL (Phenomenex, EUA).

### 3.4 Padrões analíticos dos pesticidas estudados

A Tabela 9 apresenta os fornecedores e o grau de pureza dos padrões analíticos utilizados nesse trabalho.

**Tabela 9 - Informações dos padrões analíticos sólidos utilizados**

Pesticida	Fornecedores	Grau de pureza (%)
Bispiribaque-sódico	Dr. Ehrenstorfer	99,0
Fipronil	Dr. Ehrenstorfer	96,5
Fipronil sulfeto	AccuStandard	99,6
Fipronil sulfona	AccuStandard	100,0
Desulfinil fipronil	AccuStandard	98,0
Imazetapir	Dr. Ehrenstorfer	97,8
Pirazossulfurom etílico	Dr. Ehrenstorfer	97,5

As soluções analíticas estoque, na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> dos herbicidas foram preparadas individualmente através da dissolução em metanol e armazenadas em frascos âmbar a temperatura de -18 °C. A solução analítica estoque de fipronil 1000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em acetona. Os padrões dos metabólitos do fipronil foram adquiridos na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>, dissolvidos em acetona.

A partir das soluções estoque 1000 mg L<sup>-1</sup>, foram feitas soluções padrões na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> para os herbicidas e fipronil. A partir das soluções de 100 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas as soluções de trabalho, utilizadas para a construção das curvas analíticas. As soluções de trabalho para HPLC foram preparadas em acetonitrila e as de GC foram preparadas em acetona.

### 3.5 Otimização do sistema HPLC-DAD para determinação dos herbicidas

#### 3.5.1 Escolha da fase móvel e da vazão

Para a escolha da composição da fase móvel para a separação cromatográfica testaram-se as seguintes composições: metanol:água (65:35, v/v), acetonitrila:água (55:45, v/v) e metanol:acetonitrila:água (24:30:46, v/v). A composição da fase móvel foi ajustada nas proporções indicadas e após a mesma permaneceu por 15 min no ultrassom para retirada dos gases dissolvidos.

A escolha da vazão ótima foi feita com base na curva de van Deemter, testando-se as vazões de 0,6; 0,7, 0,8; 0,9, 1,0 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>, e também gradiente de vazão iniciando em 0,8 mL min<sup>-1</sup> até 5 min, após 1,2 mL min<sup>-1</sup> até o final.

#### 3.5.2 Escolha do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos pela injeção da mistura dos pesticidas no cromatógrafo a líquido acoplado a um detector por arranjo de diodos. A partir do espectro, determinou-se o comprimento de onda máximo de cada herbicida. O espectro do padrão foi utilizado para confirmar a identidade dos picos nas amostras.

#### 3.5.3 Ajuste do pH da fase móvel

Em HPLC de fase reversa, quanto mais hidrofóbico o analito, mais ele é retido. Quando o analito se torna ionizado, fica menos hidrofóbico, e sua retenção diminui. Por isso, para garantir uma maior interação dos herbicidas em estudo com a

fase estacionária utilizada é necessária a acidificação da fase móvel. Para esse fim, foram testados o ácido fórmico e o ácido fosfórico, com ajustes de pH em 4,0; 3,0 e 2,0.

### **3.6 Otimização do sistema GC-ECD para determinação de fipronil e metabólitos**

Em procedimentos analíticos onde se empregam técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia a gás, deve-se seguir alguns parâmetros importantes a fim de se obter maior eficiência, sensibilidade e seletividade na separação dos compostos.

#### **3.6.1 Coluna cromatográfica e programação de temperatura**

Para a separação do inseticida fipronil e metabólitos foi empregada coluna capilar DB-5, a qual foi submetida a várias rampas de aquecimento do forno da coluna para se escolher a mais adequada, as quais estão demonstradas na Tabela 10. Para estes testes foi utilizada uma solução analítica contendo  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de cada composto e vazão do gás de arraste de  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , a qual corresponde a uma pressão inicial de 11,6 psi.

**Tabela 10 - Programas (P) de temperatura do forno da coluna utilizados na otimização da separação cromatográfica**

Programa	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C min <sup>-1</sup> )	Manutenção da temperatura (min)	Tempo total (min)
P1*	Inicial	80	-	1	23,0
	1	200	15	0	
	2	270	5	0	
P2*	Inicial	80	-	1	19,5
	1	200	20	0	
	2	250	4	0	
P3*	Inicial	80	-	1	19,0
	1	230	15	0	
	2	270	5	0	
P4**	Inicial	80	-	1	23,0
	1	200	15	0	
	2	270	5	0	
P5**	Inicial	80	-	1	17,5
	1	200	15	0	
	2	270	5	0	
P6**	Inicial	80	-	1	17,5
	1	210	20	0	
	2	250	4	0	
P7*	Inicial	80	-	1	19,5
	1	215	20	0	
	2	250	3	0	
P8**	Inicial	50	-	0,5	16,0
	1	215	25	0	
	2	250	4	0	
P9*	Inicial	80	-	1	20,0
	1	215	20	0	
	2	240	2	0	
P10*	Inicial	80	-	1	24,0
	1	215	25	0	
	2	250	2	0	
P11**	Inicial	80	-	1	24,0
	1	215	25	0	
	2	250	2	0	
P12*	Inicial	80	-	1	20,5
	1	215	25	0	
	2	300	6	0	
P13*	Inicial	80	-	1	18,0
	1	215	25	0	
	2	250	3	0	
P14*	Inicial	50	-	1	16
	1	250	20	5	
P15*	Inicial	50	-	1	21
	1	250	10	0	

\*vazão constante; \*\*pressão constante

### 3.6.2 Estudo da vazão ótima do gás de arraste

Para selecionar a melhor vazão do gás de arraste a ser empregada na separação cromatográfica dos compostos em estudo, injetou-se 1  $\mu\text{L}$  da solução contendo 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  de fipronil e metabólitos. Utilizando-se o programa de temperatura que proporcionou melhores resultados (P13\*), foram testadas vazões que variaram de 0,8 a 1,6  $\text{mL min}^{-1}$ . A vazão ótima foi determinada através da construção da curva de van Deemter, conforme descrito no item 2.7.4, para os pesticidas em estudo.

### 3.6.3 Sistema de injeção e de detecção

Foram testadas as temperaturas de 250 e 280  $^{\circ}\text{C}$  para o injetor e 300 e 310  $^{\circ}\text{C}$  para o detector ECD. Para o detector, utilizou-se  $\text{N}_2$  como gás *make-up*, nas vazões recomendadas pelo fabricante.

A injeção foi efetuada com um injetor automático. Adotou-se um volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$  no modo *splitless*, com abertura do *split* em 3 min a 10  $\text{mL min}^{-1}$ .

## 3.7 Avaliação da separação cromatográfica

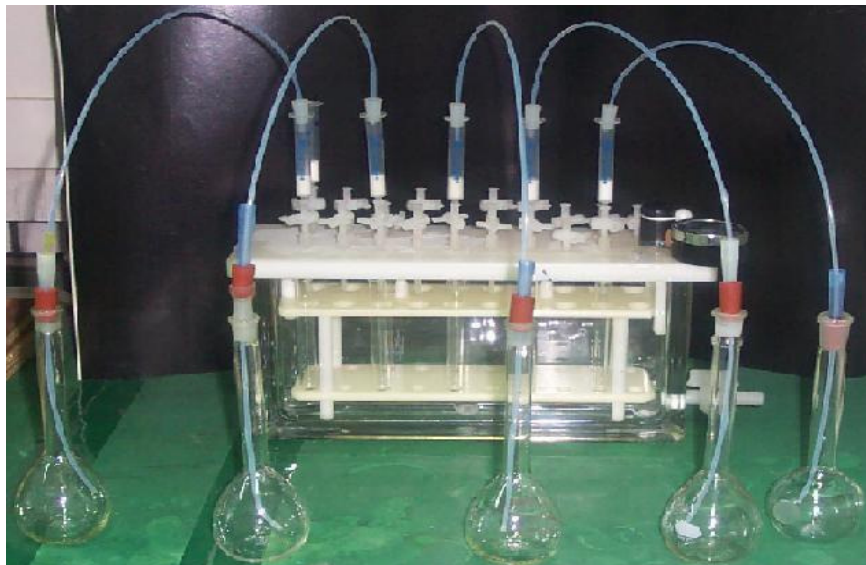
Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica dos compostos em estudo foram: fator de retenção ( $k$ ), resolução ( $R_s$ ) e fator de separação ( $\alpha$ ). Estes parâmetros foram calculados utilizando-se as equações definidas nos itens 2.7.1, 2.7.2 e 2.7.3. Para fipronil e metabólitos, utilizou-se uma mistura na concentração de 0,1  $\text{mg L}^{-1}$  e para os herbicidas utilizou-se uma mistura na concentração de 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Para determinar o tempo de saída do analito não retido ( $t_M$ ) foram analisados vapores de diclorometano na forma de *headspace*, para

GC-ECD e, para HPLC, o tempo de retenção do analito não retido foi tomado como o tempo de saída do metanol.

### 3.8 Sistema SPE para a pré-concentração dos pesticidas

A Figura 9 apresenta o sistema *manifold* utilizado para a pré-concentração de amostras de água em cartuchos para SPE.

O sistema empregado é composto por uma caixa de vácuo com espaço para trabalhar, simultaneamente, com 20 cartuchos para SPE. Esse sistema é conveniente quando é necessário pré-concentrar um número considerável de amostras. As amostras, colocadas em balões volumétricos, foram transferidas para os cartuchos SPE através de tubulações de politetrafluoretileno (PTFE). A transferência ocorre por sucção em função do vácuo, controlado para cada cartucho através das torneiras e válvula, que é aplicado no sistema. Adotou-se uma vazão da ordem de  $5 \text{ mL min}^{-1}$  para a pré-concentração das amostras.



**Figura 9 - Sistema SPE utilizado para a pré-concentração dos pesticidas em amostras de água**

### 3.8.1 Sorventes avaliados

Para a pré-concentração dos herbicidas, foram testados 2 diferentes sorventes, sendo eles octadecilsilano (C18) contendo 500 mg de fase em tubos de 3 mL e tamanho médio das partículas de 55  $\mu\text{m}$  e uma polimérica denominada Strata-X® (polímero de estireno-divinilbenzeno com superfície modificada), contendo 200 mg de fase em tubos de 6 mL e tamanho médio das partículas de 33  $\mu\text{m}$ . Já para a pré-concentração de fipronil e metabólitos utilizou-se apenas os cartuchos contendo 500 mg de C18.

### 3.8.2 Volume da amostra

O volume de amostra foi escolhido em função do volume de *breakthrough*, o qual ocorre quando os pesticidas não são fortemente retidos pelo sorvente ou quando a capacidade do sorvente é excedida. Essa última situação é difícil de ocorrer, uma vez que, em análises ambientais, as concentrações reais são da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  (BARCELÓ & HENNION, 1997). Para um dado sorvente do tipo fase reversa, o volume de *breakthrough* é função da hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada (SIMPSON & WELLS, 2000).

Uma das formas de se avaliar o volume de *breakthrough* consiste em se pré-concentrar amostras de água de volumes crescentes, cada um contendo a mesma quantidade do analito, e então medir as áreas ou alturas dos picos eluídos. Quando o volume de amostra aumenta, a concentração do analito diminui, de tal forma que a quantidade de analito pré-concentrada permanece constante e as áreas dos picos também deveriam ser constantes. Quando o *breakthrough* ocorre, a quantidade extraída é reduzida, e a área do pico diminui.

Foram estudados volumes variando de 50 até 500 mL, contendo a mesma massa de cada um dos analitos. A Tabela 11 mostra os volumes e as concentrações de cada analito que foram estudados para se chegar ao volume de *breakthrough*



para os herbicidas e para fipronil e metabólitos. Para os herbicidas utilizou-se uma massa de 0,1 µg, e para fipronil e metabólitos utilizou-se uma massa de 0,0025 µg.

**Tabela 11 - Volume de amostra e concentração dos analitos utilizados para obtenção do volume de *breakthrough***

Volume (mL)	Concentração (µg L <sup>-1</sup> )	
	Herbicidas	Fipronil e metabólitos
50	2,000	0,0500
100	1,000	0,0250
150	0,666	0,0166
200	0,500	0,0125
250	0,400	0,0100
300	0,333	0,0083
500	0,200	0,0050

### 3.8.3 Ajuste do pH da amostra

Compostos ionizáveis apenas são retidos em sílica modificada com C18 se estiverem na sua forma neutra, de tal forma que o pH da amostra é um parâmetro importante, especialmente para a extração de pesticidas fracamente ácidos ou básicos. Uma solução aquosa de um ácido orgânico está 99% não ionizada quando o pH da amostra está duas unidades logarítmicas abaixo do pK<sub>a</sub> (BARCELÓ & HENNION, 1997; SIMPSON & WELLS, 2000).

Na pré-concentração dos herbicidas, foram testados os valores de pH da amostra ajustados em 2,0; 3,0 e amostra sem ajuste de pH (em torno de 6,0). Para a pré-concentração de fipronil e metabólitos, foram testados pH 3,0 e amostra sem ajuste de pH (pH 6,0). O pH da amostra foi ajustado com uma solução de água:ácido fosfórico 1:1 (v/v).

#### 3.8.4 Escolha do solvente de eluição

Para a eluição dos cartuchos contendo os extratos dos herbicidas foram testadas as seguintes composições: M1 = diclorometano:metanol (65:35, v/v), M2 = diclorometano:metanol (80:20, v/v), M3 = diclorometano:acetonitrila (50:50, v/v), além de metanol e acetonitrila puros.

Para a eluição dos cartuchos contendo extratos de fipronil e metabólitos foram testados como solvente acetato de etila e a mistura de *n*-hexano:isopropanol (3:1, v/v).

Também foram testados volumes de eluição de 1 e 2 mL.

#### 3.8.5 Amostras de água e amostras branco

Para a etapa de otimização do sistema SPE utilizou-se amostras de água Milli-Q.

As amostras provenientes do experimento de degradação em lavoura de arroz caracterizam-se por conter alta quantidade de sólidos em suspensão e matéria orgânica dissolvida, tais como ácidos húmicos e fúlvicos, sendo propensas a apresentar interferências na análise cromatográfica.

Por isso, na etapa de validação do método, utilizou-se amostras de amostras de água de superfície, coletadas em um açude localizado no Campus da UFSM, em uma região supostamente livre de contaminação por pesticidas. Foram feitas extrações utilizando-se essas amostras para avaliar a presença de interferentes, analisando-se tanto por HPLC quanto por GC.

Os interferentes podem ser gerados pelo material do sorvente, dos cartuchos que contêm os sorventes, pelos solventes de eluição ou até da própria água, mesmo a purificada (Milli-Q). Essa interferência é maior principalmente para sorventes a base de sílica, quando empregam-se soluções ácidas (BARCELÓ; HENNION, 1997).

O armazenamento das amostras, necessário devido ao grande número de amostras coletadas por dia, foi feito diretamente nos cartuchos de SPE. As amostras

foram recebidas no laboratório, filtradas em membrana HA em ésteres de celulose 0,45 µm, extraídas, e os cartuchos, envoltos em papel alumínio, foram armazenados em freezer a -18 °C.

### 3.9 Validação do método para amostras aquosas

Definidas as melhores condições para a separação dos pesticidas, tanto por GC quanto por HPLC, foi feita a validação dos métodos. Existem muitas citações na literatura apresentando procedimentos para validação de métodos (PRIMEL, 2003; GONÇALVES, 2003; MARTINS, 2004; SHABIR, 2003; TAVERNIERS *et al.*, 2004; BRITO *et al.*, 2003; WOOD, 1999; van ZONEN *et al.*, 1999). Esse trabalho foi validado seguindo principalmente os procedimentos recomendados no Brasil para validação de métodos e envolvem os parâmetros descritos a seguir (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003; GARP, 1999; CAUSON, 1997).

#### 3.9.1 Curva analítica

A curva analítica para os herbicidas foi construída na faixa de concentração de 0,01 a 5,0 mg L<sup>-1</sup>, contendo no máximo 7 pontos. Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila. Cada solução foi injetada em triplicata e o gráfico da área x concentração foi obtido com auxílio do programa Microsoft Office® Excel 2003. A curva analítica para fipronil e seus metabólitos foi preparada em acetona em níveis de concentração variando de 0,001 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, também com 7 pontos. Neste caso, cada solução foi injetada 6 vezes.

### 3.9.2 Linearidade

A partir das curvas analíticas, avaliou-se a linearidade do método. Para verificar se um ponto encontra-se ou não dentro da faixa linear, realizou-se o cálculo dos resíduos (equação 6) entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão (INMETRO, 2003).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r/\sqrt{n}} \quad (6)$$

onde:

resíduo =  $[X_{\text{medido}} - X_{\text{calculado}}]$

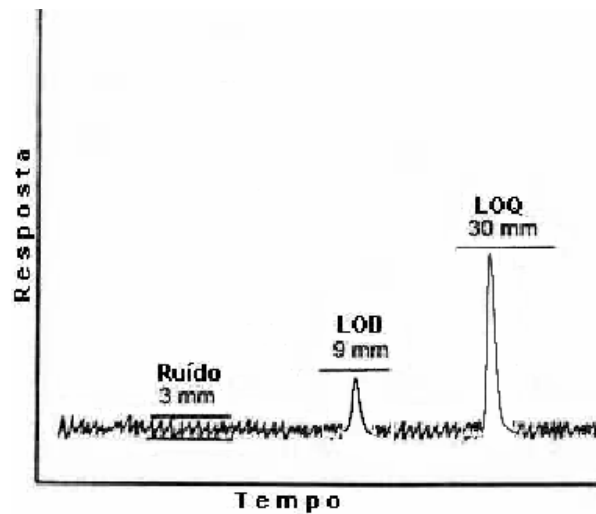
$s_r$  = desvio padrão dos resíduos

$n$  = número de pontos

Se o valor de  $t$  calculado para um ponto duvidoso for menor ou igual ao valor de  $t$  unilateral tabelado (Anexo A), para a confiança desejada e  $(n-1)$  graus de liberdade, considera-se que o ponto pertence à curva e a faixa até ele é linear (INMETRO, 2003).

### 3.9.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Nesse trabalho, o LOD e o LOQ foram estabelecidos com base na Figura 10, onde o LOD corresponde a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponde à concentração que produz uma relação sinal-ruído superior a 10. Mediu-se, com auxílio de um paquímetro, a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos compostos e determinou-se a concentração que corresponde a 3 e 10 vezes essa altura.



**Figura 10 - Diagrama demonstrando a forma de estabelecimento dos valores de LOD e LOQ**

#### 3.9.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

O valor numérico usado para avaliar a precisão, RSD, pode ser calculado através da equação (7) (CAUSON, 1997; GARP, 1999).

$$RSD = \frac{s}{x_m} \times 100 \quad (7)$$

onde:

s = estimativa de desvio padrão absoluto

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

$x_i$  = valores individuais

$x_m$  = média das medidas em replicatas

n = número de medidas.

Neste trabalho, o estudo da precisão do instrumento foi realizado efetuando-se três injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema HPLC-DAD e seis vezes no sistema GC-ECD.

A precisão do método, em termos de repetitividade ( $RSD_r$ ) foi efetuada procedendo-se a extração e análise das amostras fortificadas. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e cada extrato injetado três vezes.

Para avaliar a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) do método por HPLC-DAD, utilizaram-se 2 dias e 2 operadores diferentes para a análise. Já para a precisão intermediária do método por GC-ECD, foram testados 2 dias diferentes.

### 3.9.5 Exatidão (recuperação)

Neste trabalho, a exatidão foi calculada pela equação (8) e é expressa em porcentagem (INMETRO, 2003):

$$R (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (8)$$

onde:

$C_1$  = concentração determinada na amostra fortificada

$C_2$  = concentração determinada na amostra não fortificada

$C_3$  = concentração fortificada

Para os ensaios de recuperação, foram usadas amostras de água de superfície (açude), descrita no item 3.8.5. Fortificou-se a amostra com adição de pequenos volumes de uma solução estoque contendo os pesticidas avaliados no estudo, a fim de se obter os níveis de fortificação desejados.

A recuperação para os herbicidas foi avaliada nos níveis de 1, 5 e 10 vezes o LOQ do método. Para os metabólitos de fipronil a recuperação foi avaliada nos níveis de 1; 2,5; 5 e 50 vezes o LOQ e para fipronil foi avaliada nos níveis de 1, 2, 20 e 200 vezes o LOQ do método, uma vez que as amostras analisadas diferem bastante no nível de concentração esperado.

### 3.10 Aplicação do método

#### 3.10.1 Estudo de degradação em lavouras de arroz irrigado

O método desenvolvido foi aplicado no estudo de degradação dos compostos em um experimento de campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Seguindo as Boas Práticas Agrícolas (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998) foram aplicadas as doses recomendadas dos pesticidas para a cultura de arroz irrigado (Tabelas 12 e 13).

O estudo foi realizado em dois anos agrícolas, 2004/2005 e 2005/2006. Na safra 2004/2005, utilizou-se a variedade de arroz IRGA417, o qual foi cultivado no sistema pré-germinado, com parcelas de 40 m<sup>2</sup> (10 x 4 m) e com altura da lâmina de água de 10 cm. A semeadura foi feita no dia 02/12/2004 e a aplicação dos pesticidas foi realizada no dia 21/12/2004. A aplicação foi realizada com pulverizador costal (pressão de pulverização: 275 kPa; pontas: 4 pontas Teejet XR110.01 e vazão de 111 L ha<sup>-1</sup>). As amostragens foram feitas no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º, 63º e 70º dias após a aplicação dos pesticidas.

Na safra 2005/2006, utilizou-se a variedade de arroz IRGA422CL, o qual foi cultivado no sistema pré-germinado, com parcelas de 54 m<sup>2</sup> (12 x 4,5 m) e com altura da lâmina de água de 10 cm. A semeadura foi feita no dia 08/11/2005 e a aplicação dos pesticidas foi realizada no dia 06/12/2005. A aplicação foi realizada como descrito anteriormente e as amostragens foram feitas no 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 21º, 28º, 35º, 42º, 49º, 56º, 63º e 70º dias após a aplicação dos herbicidas, e aos 1º, 2º, 3º, 5º, 7º, 12º, 19º, 26º, 33º, 40º, 47º, 54º, 61º dias após a aplicação de fipronil.

As amostragens foram feitas em frascos de vidro âmbar, em 4 diferentes pontos dos canteiros: no centro, nas extremidades norte e sul e na lateral até o volume de 1 L. As coletas foram feitas na superfície da camada de água para evitar a amostragem excessiva do material sólido presente no fundo da lâmina. As datas das coletas foram escolhidas com base em estudos posteriores de degradação, sendo que nos primeiros dias foram mais freqüentes e, após, a cada 7 dias.

**Tabela 12 - Pesticidas aplicados nos experimentos de degradação realizados na safra 2004-2005**

Pesticidas aplicados	Marca comercial	Concentração (g L <sup>-1</sup> ou g kg <sup>-1</sup> )	Formulação comercial	Dose ha <sup>-1</sup>		Concentração teórica na água (µg L <sup>-1</sup> )
				g (i.a.)	PC (kg ou L)	
Bispiribaque-sódico	Nominee 400 SC <sup>®</sup>	400	SC	50	0,125	50
Imazetapir	Vezi <sup>®</sup>	100 (eqa)	SA	100	0,600	60
				200	1,200	120
Pirazossulfurom etílico	Sirius <sup>®</sup>	250	SC	20	0,080	20
Fipronil	Klap <sup>®</sup>	200	SC	24	0,120	24
				48	0,240	48

eqa = equivalente ácido; i.a. = ingrediente ativo; SA = solução aquosa concentrada; SC = suspensão concentrada; PC = produto comercial



**Tabela 13 - Pesticidas aplicados nos experimentos de degradação realizados na safra 2005-2006**

Pesticidas aplicados	Marca Comercial	Concentração (g L <sup>-1</sup> ou g kg <sup>-1</sup> )	Formulação comercial	Doses ha <sup>-1</sup>		Concentração inicial teórica na água (µg L <sup>-1</sup> )
				g (i.a.)	PC (kg ou L)	
Bispiribaque-sódico	Nominee 400 SC <sup>®</sup>	400	SC	50	0,125	50
				100	0,250	100
Imazetapir	Vezir <sup>®</sup>	100 (eqa)	SA	100	1,00	100
				200	2,00	200
Imazetapir + imazapique	Only <sup>®</sup>	75 + 25	SA	75+25	1,00	75 e 25
				150+50	2,00	150 e 50
Pirazossulfurom etílico	Sirius <sup>®</sup>	250	SC	20	0,080	20
				40	0,160	40
Fipronil	Klap <sup>®</sup>	250	SC	24	0,120	24
				36	0,180	36
				48	0,240	48

eqa = equivalente ácido; i.a. = ingrediente ativo; SA = solução aquosa concentrada; SC = suspensão concentrada; PC = produto comercial

### 3.10.1.1 Cinética de degradação e tempos de meia-vida

Modelos descritivos da dissipação de pesticidas são importantes para assegurar que a quantidade aplicada é adequada para o controle da peste e para reduzir a chance de resíduos excessivos. Os modelos mais usados para descrever o decaimento de pesticidas são resumidos abaixo (Equações 9 a 14) (MORTON *et al.*, 2001). Todos os modelos relacionam o resíduo (R) a uma função de tempo após aplicação do pesticida (t) e podem ser utilizados para se determinar a cinética de reação.

$$\ln R = a + bt \quad (9)$$

$$\ln R = a + bt^{1/2} \quad (10)$$

$$R^{-1/2} = a + bt \quad (11)$$

$$R^{-1/2} = a + bt^{-1/2} \quad (12)$$

$$R^{-1} = a + bt \quad (13)$$

$$R^{-1} = a + bt^{1/2} \quad (14)$$

O modelo mais comum usado para descrever a degradação de pesticidas está expresso na Equação (15), a qual corresponde a uma cinética de 1ª ordem.

$$-\ln C/C_0 = kt \quad (15)$$

Onde:

C = resíduo no tempo t

C<sub>0</sub> = resíduo no tempo zero

k = constante de reação

Se for construído um gráfico de  $\ln C$  em função de  $t$  obter-se-á uma reta cujo coeficiente angular é  $-k$ , que é determinado pela natureza dos reagentes e pela temperatura, e é um valor numérico característico de cada reação (PEÑUELA, 1998).

Outra maneira de se caracterizar os sistemas é pela determinação do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) do composto. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para o pesticida sofrer degradação até a metade de sua concentração inicial. A determinação do  $t_{1/2}$  em estudos de campo depende fortemente das condições ambientais e ele é influenciado por diferentes processos, incluindo degradação biótica e abiótica, migração por volatilização, escoamento superficial, lixiviação, adsorção na planta, entre outros (BARCELÓ & HENNION, 1997).

Para calcular o tempo de meia-vida na água de lavoura de cada composto em estudo foi usada a Equação 16, onde  $k$  é a inclinação da reta (BARCELÓ & HENNION, 1997) e a cinética de reação é de 1ª ordem.

$$t_{1/2} = (\ln 2)/k \quad (16)$$

Muitos dos dados sobre tempo de meia-vida disponíveis na literatura foram obtidos em estudos realizados nos EUA e Europa, e eles normalmente não são aplicáveis a países tropicais, onde as condições climáticas e a composição dos solos são completamente diferentes (BARCELÓ & HENNION, 1997).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Avaliação do potencial de risco de poluição ambiental pelos pesticidas em estudo**

De acordo com os critérios de Goss (item 2.4.3), usados para avaliar se um agrotóxico apresenta potencial de transporte podendo, conseqüentemente atingir águas superficiais, os compostos são classificados em dois grupos: aqueles que podem ser transportados dissolvidos em água e aqueles que são transportados associados ao sedimento em suspensão.

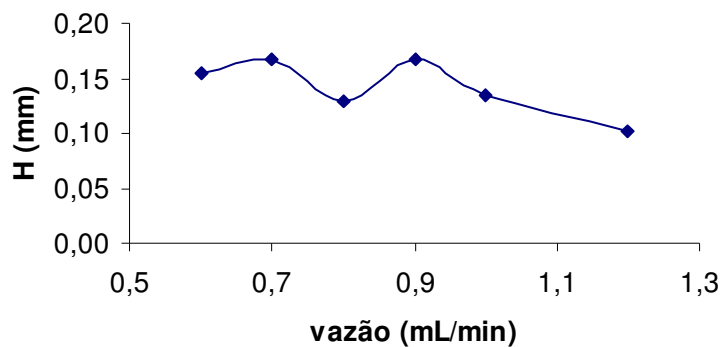
Comparando-se as propriedades físico-químicas dos pesticidas com os critérios propostos pelo Método de Goss para avaliação do potencial de poluição de águas superficiais por pesticidas, conclui-se que o pirazossulfurom etílico possui baixo potencial de transporte associado ao sedimento; o imazetapir possui alto potencial de transporte dissolvido em água; o fipronil possui alto potencial de transporte associado ao sedimento e o bispiribaque-sódico possui médio potencial para poluição de águas superficiais, uma vez que não se enquadra em nenhum dos critérios de avaliação.

### **4.2 Condições cromatográficas otimizadas para análise dos herbicidas por HPLC-DAD**

#### **4.2.1 Escolha da fase móvel e da vazão**

Dentre as composições apresentadas no item 3.5.1, a que forneceu melhor separação dos analitos e menos interferências foi a mistura acetonitrila:água (55:45, v/v), acidificada até pH 3,0 com ácido fosfórico (1:1, v/v).

A melhor vazão foi obtida após a construção da curva de van Deemter. A curva de van Deemter obtida para o herbicida imazetapir é apresentada na Figura 11. Pode-se perceber que valores de vazão de 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 mL min<sup>-1</sup> são pontos de mínimo na curva de van Deemter e correspondem à máxima eficiência da coluna. No entanto, à vazões muito baixas (0,6 mL min<sup>-1</sup>), o tempo de análise torna-se excessivo. Com maiores valores de vazão (1,0 ou 1,2 mL min<sup>-1</sup>) a pressão do sistema torna-se grande e os compostos começam a eluir mais rapidamente, coeluyendo com as interferências iniciais. Então, concluiu-se que a melhor vazão a ser utilizada é de 0,8 mL min<sup>-1</sup> pois permite separações com pressões de cerca de 160 atm e tempo de análise de cerca de 15 min.



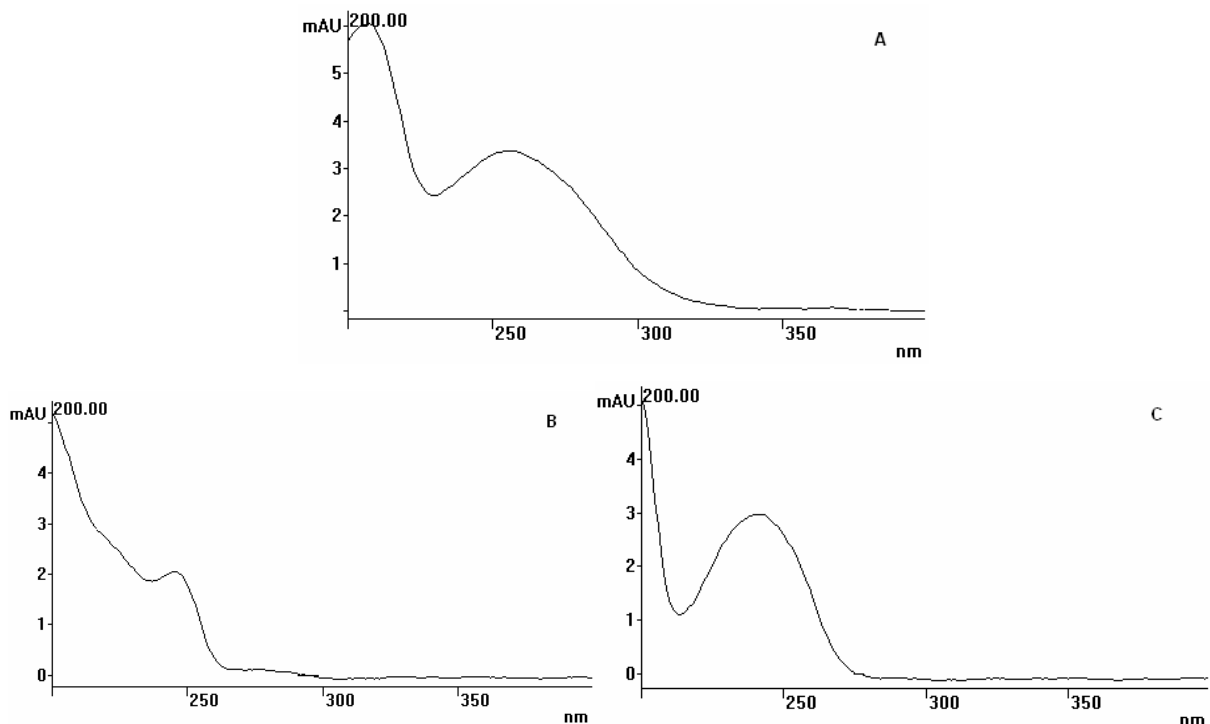
**Figura 11 - Curva de van Deemter para o herbicida imazetapir**

Os picos e os respectivos princípios ativos foram identificados de duas maneiras: primeiro injetando, separadamente, um a um cada princípio ativo no sistema sob as mesmas condições e observando o tempo de retenção, e segundo, fazendo uma adição de padrão em uma mistura dos três compostos e observando o aumento de sinal do respectivo herbicida.

#### 4.2.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada herbicida

Os espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para soluções individuais do herbicidas na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram utilizados para se obter o comprimento de onda máximo de cada herbicida, e também para confirmar a identidade dos analitos comparando-se o espectro obtido para os padrões e os obtidos para as amostras.

Com base nos espectros, foram escolhidos o comprimento de onda máximo para cada herbicida, os quais foram monitorados em cada análise. Para imazetapir, o comprimento de onda escolhido foi 254 nm e para bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico foi escolhido o comprimento de onda de 247 nm.



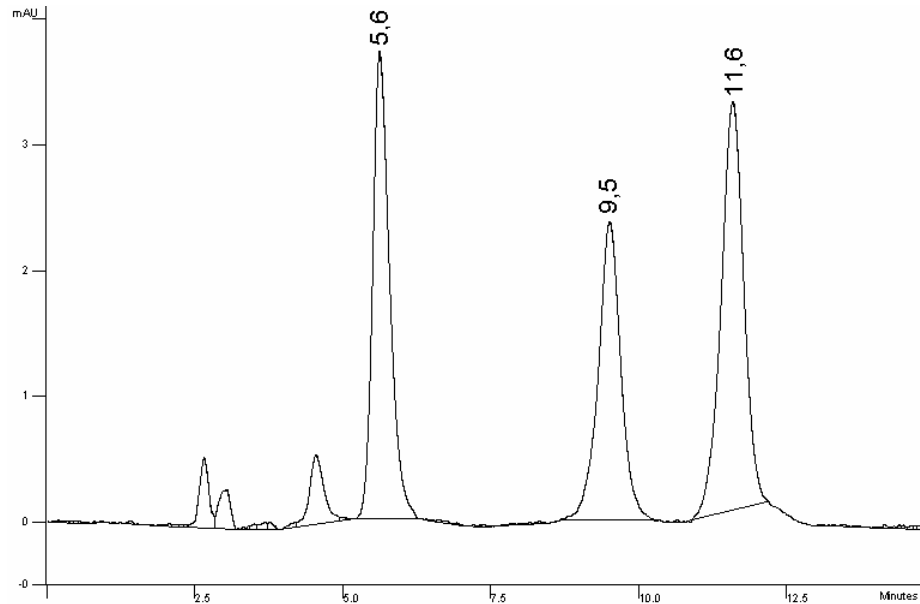
**Figura 12 - Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por HPLC-DAD para os herbicidas: (A) imazetapir, (B) bispiribaque-sódico e (C) pirazossulfurom etílico**

As melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e detecção dos herbicidas estão demonstradas na Tabela 14.

**Tabela 14 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos herbicidas por HPLC-DAD**

Coluna analítica	Synergi 4 $\mu$ Fusion RP-80 C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 4 $\mu$ m)
Fase móvel	Acetonitrila:Água (55:45, v/v), ajustada a pH 3,0 com H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1:1, v/v)
Vazão da fase móvel	0,8 mL min <sup>-1</sup>
Pressão	160 atm
Detector	Por arranjo de diodos, monitorando em 254 nm para imazetapir e em 247 nm para bispiribaque-sódico e pirazossufurom etílico
Alça de injeção	20 $\mu$ L

Com estas condições, o perfil de um cromatograma típico de separação dos três herbicidas pode ser observado na Figura 13, obtido com a injeção de 20  $\mu$ L de uma solução analítica contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> de cada herbicida.



**Figura 13 - Cromatograma típico de uma solução analítica contendo 1,0 mg L<sup>-1</sup> dos herbicidas imazetapir ( $t_R$  5,6 min), bispiribaque-sódico ( $t_R$  9,5 min), e pirazossulfurom metílico ( $t_R$  11,6 min)**

#### **4.3. Condições cromatográficas otimizadas para análise de fipronil e metabólitos por GC-ECD**

##### **4.3.1. Coluna cromatográfica e programação de temperatura**

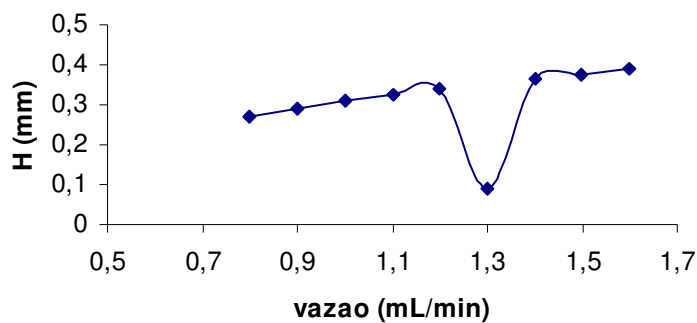
O programa de temperatura do forno da coluna selecionado foi o P13\* (conforme Tabela 8) o qual proporcionou melhores resultados na separação dos compostos em estudo, totalizando em 18 min o tempo de corrida cromatográfica.

A coluna capilar apolar DB-5 de sílica fundida, com 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25  $\mu$ m de espessura do filme proporcionou separação eficiente dos pesticidas em tempo relativamente rápido, não ocorrendo sobreposição de picos, apesar do fipronil e fipronil sulfeto estarem bem próximos. No entanto nenhuma das outras programações de temperatura testadas proporcionou melhor separação para estes dois compostos.



#### 4.3.2. Escolha da vazão ótima do gás de arraste

A vazão ótima do gás de arraste foi obtida através da construção da curva de van Deemter para cada composto em estudo, conforme itens 2.7.4 e 3.6.2, e utilizando a programação de temperatura P13\*. A vazão que proporcionou a menor altura equivalente a um prato teórico da coluna para os pesticidas avaliados foi a de  $1,3 \text{ mL min}^{-1}$ , a qual foi mantida constante durante toda a corrida. A Figura 14 apresenta a curva de Van Deemter para o fipronil sulfeto, a qual é semelhante para os demais compostos.



**Figura 14 - Curva de van Deemter para o metabólito fipronil sulfeto**

#### 4.3.3 Sistema de injeção e de detecção

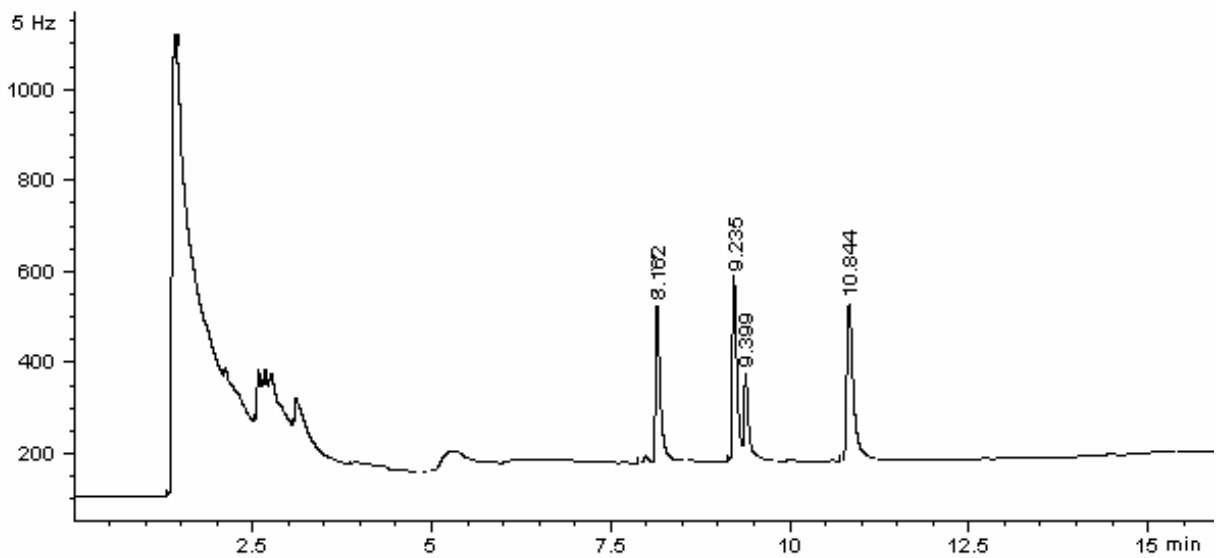
Para o injetor, a melhor temperatura foi a de  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , com um volume de injeção de  $1 \text{ } \mu\text{L}$  no modo *splitless*; para o detector, a melhor temperatura foi  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para o detector, utilizou-se  $\text{N}_2$  na vazão de  $6 \text{ mL min}^{-1}$  como gás para o ânodo e  $60 \text{ mL min}^{-1}$  como gás *make-up*.

Dessa forma, as melhores condições cromatográficas para a separação dos compostos em estudo foram as seguintes:

- Temperatura do injetor:  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ ;

- Programação da válvula do *split* do injetor: injeção *splitless*, abertura após 3,0 min, vazão da purga do septo: 3 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 1,0 µL;
- Gás de arraste: He, pressão na entrada da coluna de 11,0 psi, e vazão constante de 1,3 mL min<sup>-1</sup>;
- Coluna capilar: apolar DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)
- Programação de temperatura do forno da coluna (P13\*) temperatura inicial de 80 °C (1min), com rampa de 25 °C min<sup>-1</sup> até 215 °C, seguida de rampa de 3 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C, totalizando em 18 min de corrida cromatográfica;
- Temperatura do detector: 300 °C, N<sub>2</sub> na vazão de 6 mL min<sup>-1</sup> no ânodo e 60 mL min<sup>-1</sup> como gás *make-up*.

A Figura 15 apresenta o cromatograma obtido para uma solução analítica contendo fipronil e metabólitos, empregando-se as condições cromatográficas selecionadas.



**Figura 15 - Cromatograma de uma solução analítica contendo fipronil e metabólitos na concentração individual de 0,1 mg L<sup>-1</sup>; identificação dos picos: desulfenil fipronil (t<sub>R</sub> 8,2 min), fipronil sulfeto (t<sub>R</sub> 9,2 min), fipronil (t<sub>R</sub> 9,4 min) e fipronil sulfona (t<sub>R</sub> 10,8 min ).**

#### 4.4 Avaliação da separação cromatográfica

Os parâmetros  $t_R$ ,  $k$ ,  $R_S$  e  $\alpha$  foram utilizados para avaliar a separação cromatográfica. As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados obtidos para a mistura dos herbicidas e para fipronil e metabólitos, respectivamente. O tempo de saída do analito não retido ( $t_M$ ), nas condições selecionadas, foi 2,4 min, tanto para os compostos analisados por HPLC-DAD quanto para os compostos analisados por GC-ECD.

**Tabela 15 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos herbicidas, empregando uma solução analítica na concentração de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e condições cromatográficas descritas no item 4.2.2**

Pesticidas	$t_R$ (min)	$k$	$R_S$	$\alpha$
Imazetapir	5,2	1,17	-	-
Bispiribaque-sódico	9,5	2,96	7,07	2,53
Pirazossulfurom etílico	11,9	3,96	3,11	1,34

**Tabela 16 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação de fipronil e metabólitos, empregando uma solução analítica na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> e condições cromatográficas descritas no item 4.3.3**

Pesticidas	$t_R$ (min)	$k$	$R_S$	$\alpha$
Desulfinil fipronil	8,2	4,59	-	-
Fipronil sulfeto	9,2	5,32	8,20	1,16
Fipronil	9,4	5,44	1,18	1,02
Fipronil sulfona	10,8	6,43	9,75	1,18

Conforme os dados apresentados, observa-se que os valores de  $k$  são bons para todos os compostos, estando dentro dos intervalos ideais para múltiplos componentes, sendo aceitáveis valores de  $k$  entre 0,5 e 20.

Para o parâmetro  $\alpha$  obteve-se valores acima de 1 para todos os pares de compostos, o que é recomendado para separação entre dois picos adjacentes.

Os valores de  $R_S$  obtidos comprovam uma separação de 100% entre os pares de compostos, já que se obtiveram valores de  $R_S$  superiores a 1,5, indicando separação completa, com exceção de fipronil sulfeto e fipronil. Para estes dois compostos a resolução ficou entre 1 e 1,25 permitindo, mesmo assim, a quantificação (COLLINS *et al.*, 2006).

#### **4.5 Estudo da extração em fase sólida dos pesticidas em estudo**

Para testar a eficiência da extração e definir o melhor método de extração para os compostos, foram testados diferentes procedimentos.

Para a pré-concentração dos herbicidas, foram testados 2 diferentes cartuchos e diferentes solventes de eluição. Os resultados estão demonstrados na Tabela 17.

**Tabela 17 - Recuperações obtidas para os herbicidas, utilizando-se diferentes cartuchos de fase estacionária e diferentes solventes de eluição**

Fase estacionária	Recuperação (%)*					
	C18			Strata-X		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Imazetapir	101,4 ± 3,8	50,4 ± 4,9	108,7 ± 7,4	105,8 ± 5,9	96,9 ± 10,3	99,7 ± 9,5
Bispiribaque-sódico	93,8 ± 5,7	71,8 ± 8,1	84,1 ± 10,2	40,7 ± 8,3	36,3 ± 3,7	36,5 ± 11,1
Pirazossulfurom etílico	96,3 ± 8,3	62,0 ± 9,5	93,3 ± 5,6	30,9 ± 4,7	25,7 ± 12,7	21,3 ± 7,9

\*Nível de fortificação: 2,5 µg L<sup>-1</sup>; amostra: pH ajustado em 2,0; 100 mL de água Milli-Q; volume de eluição 2 mL, evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de fase móvel; M1 = mistura diclorometano:metanol (65:35, v/v); M2 = mistura diclorometano:metanol (80:20, v/v); M3 = mistura diclorometano:acetonitrila (50:50, v/v)

Tanto o sorvente C18 quanto a fase polimérica proporcionaram bons resultados para o herbicida imazetapir. Estes resultados também concordam com os obtidos por VIGNA *et al.* (2006), os quais obtiveram boas recuperações para imazetapir tanto com C18 quanto com cartuchos poliméricos. No entanto, para o bispiribaque-sódico e o pirazossulfurom etílico não se obteve boas recuperações com os cartuchos de Strata-X. Por isso, o sorvente C18 foi o escolhido para a pré-concentração da mistura de herbicidas em água.

Quanto ao solvente de eluição para o sorvente escolhido, as misturas de diclorometano:metanol (65:35, v/v) e diclorometano:acetonitrila (50:50, v/v) proporcionaram bons resultados. No entanto, percentuais mais próximos de 100% foram obtidos com a mistura de diclorometano:metanol 65:35 (v/v), a qual foi escolhida como ideal para eluição dos herbicidas. Metanol e acetonitrila também foram testados, mas não proporcionaram bons resultados (recuperações muito baixas), principalmente para o pirazossulfurom que tem características mais hidrofóbicas. Em cromatografia de fase reversa, a solubilidade dos compostos na fase móvel é muito importante e muitos compostos hidrofóbicos têm uma limitada solubilidade em metanol ou acetonitrila, sendo então necessário um grande volume para eluição (BARCELÓ & HENNION, 1997). A adição de diclorometano aumenta a solubilidade dos analitos e ajuda a dar melhor contato com o sorvente, uma vez que traços de água sempre estão presentes no cartucho.

Definido o sorvente e o solvente de eluição, foi testado o volume de solvente necessário para eluir quantitativamente os herbicidas. Os resultados estão demonstrados na Tabela 18.

A eluição com 2 x 1 mL da mistura diclorometano:metanol (65:35, v/v) foi a que proporcionou melhores resultados. Esse volume é posteriormente evaporado e o extrato redissolvido em 500 µL de fase móvel para que o volume final seja exato e o fator de pré-concentração seja maior.

**Tabela 18 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes do solvente de eluição**

Volume de solvente	Recuperação (%)*	
	1 mL	2 mL
Imazetapir	66,0 ± 5,6	92,9 ± 6,2
Bispiribaque-sódico	117,7 ± 7,4	91,5 ± 9,1
Pirazossulfurom etílico	113,5 ± 9,3	99,8 ± 4,9

\*Nível de fortificação: 2,5 µg L<sup>-1</sup>; 100 mL de água Milli-Q; amostra: pH ajustado a 2,0; mistura de eluição DCM:MeOH (65:35, v/v), evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de fase móvel

Também foram testados diferentes valores para o pH da amostra. Avaliou-se valores de pH de 2 e 3, os quais foram obtidos com adição de ácido fosfórico 1:1 (v/v), e amostra sem correção de pH. Os resultados estão demonstrados na Tabela 19.

**Tabela 19 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes valores de pH**

Valores de pH	Recuperação (%)*		
	pH 2,0	pH 3,0	pH 6,0
Imazetapir	98,3 ± 6,2	89,3 ± 8,4	72,0 ± 11,2
Bispiribaque-sódico	99,5 ± 9,4	90,9 ± 5,6	95,6 ± 7,3
Pirazossulfurom etílico	96,2 ± 7,1	83,7 ± 10,1	78,8 ± 9,8

\*Nível de fortificação: 2,5 µg L<sup>-1</sup>; 100 mL de água Milli-Q; eluição com 2 mL da mistura DCM:MeOH (65:35, v/v), evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de fase móvel

Herbicidas da classe das sulfoniluréias ou imidazolinonas são normalmente determinados em amostras com valores de pH entre 2,0 e 3,0 (FURLONG *et al.*, 2000; VIGNA *et al.*, 2006). Quando o pH da amostra torna-se menor, os compostos ácidos passam a ter maiores interações com o sorvente e por este motivo tendem a ficarem mais retidos no sorvente. Por outro lado, quando as amostras de águas são

acidificadas a baixos valores de pH (2,0 ou 3,0) surgem nos cromatogramas picos interferentes, devido aos ácidos húmicos e fúlvicos. Com pH ajustado em 3,0 e amostra sem correção de pH foram obtidas recuperações entre 70 e 120%. No entanto, como os herbicidas estudados apresentam valores de pKa entre 2,1 e 3,9, melhores resultados foram obtidos com pH 2,0, sendo esse o valor utilizado na validação do método. Neste caso a presença dos ácidos húmicos e fúlvicos não interferiu na análise, como demonstram as Figuras 17 e 20, estando separados dos compostos de interesse.

O volume de *breakthrough* para os herbicidas foi estudado utilizando-se volumes de amostra variando de 50 a 500 mL. Os resultados estão demonstrados na Tabela 20.

**Tabela 20 - Recuperações obtidas para os herbicidas utilizando-se diferentes volumes de amostra**

Volume (mL)	Recuperação (%) <sup>*</sup>		
	Imazetapir	Bispiribaque-sódico	Pirazossulfurom etílico
50	103,7 ± 6,0	106,0 ± 11,9	110,2 ± 8,3
100	96,9 ± 1,9	80,7 ± 6,2	99,6 ± 9,3
150	80,0 ± 12,9	75,9 ± 9,9	93,3 ± 5,4
200	55,6 ± 7,8	65,4 ± 1,2	101,2 ± 4,8
250	51,7 ± 11,8	65,4 ± 7,4	102,1 ± 0,6
300	42,3 ± 9,5	58,5 ± 5,4	102,8 ± 5,3
500	36,8 ± 8,2	41,7 ± 7,1	78,2 ± 11,8

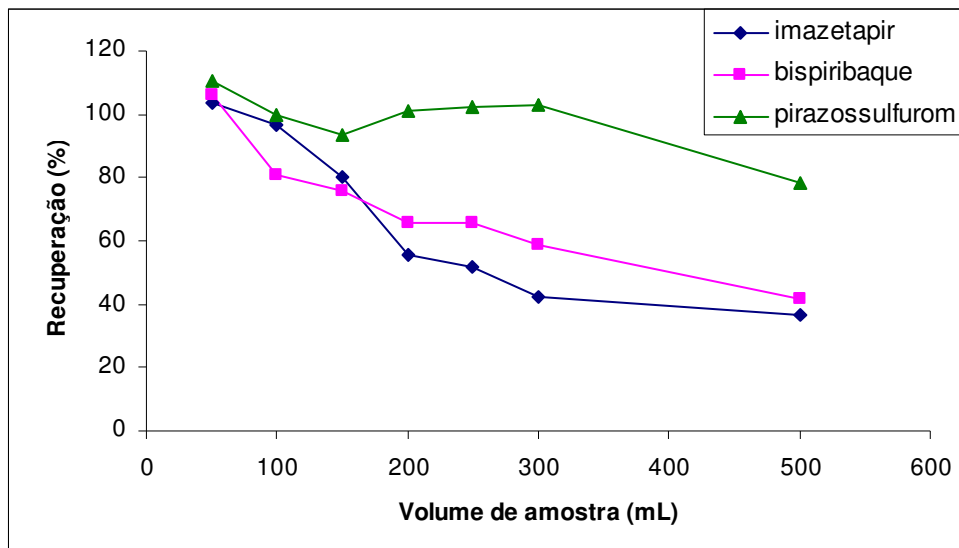
<sup>\*</sup>Massa de cada herbicida: 0,1 µg; amostra a pH 2,0; eluição com 2 mL da mistura DCM:MeOH (65:35, v/v), evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de fase móvel

Para imazetapir e bispiribaque-sódico ocorre diminuição na recuperação a partir de 100 mL, sendo que a partir de 150 mL já não se obtém mais recuperações aceitáveis para esses 2 compostos. Para pirazossulfurom etílico, a diminuição na recuperação ocorre apenas com um volume de amostra de 500 mL.



O volume de *breakthrough* normalmente ocorre quando os pesticidas não são fortemente retidos pelo sorvente. Em cromatografia de fase reversa, o volume de *breakthrough* é função da hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada (SIMPSON, 2000) e compostos hidrofóbicos são bem retidos com água como fase móvel enquanto que analitos polares são difíceis de separar com uma fase móvel aquosa. Isso justifica os resultados obtidos, uma vez que pirazossulfurom etílico, com  $K_{ow}$  log P de 3,16, é o mais hidrofóbico dos herbicidas e bispiribaque-sódico, com  $K_{ow}$  log P de -1,03, é o menos hidrofóbico.

A Figura 16 apresenta as curvas de *breakthrough* obtidas para os 3 herbicidas.



**Figura 16 - Gráfico demonstrando o volume de *breakthrough* para os três herbicidas**

A otimização do sistema SPE para a análise de fipronil e seus metabólitos incluiu a escolha do volume e do solvente de eluição, bem como do volume e do pH da amostra. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 21 e 22.

**Tabela 21 - Recuperações obtidas para fipronil e metabólitos utilizando-se diferentes volumes de amostras**

Volume (mL)	Recuperação (%)*					
	50	100	150	200	250	500
Desulfinil fipronil	108,0 ± 8,1	106,8 ± 3,7	94,5 ± 4,8	78,4 ± 5,1	82,9 ± 9,8	87,9 ± 10,4
Fipronil sulfeto	73,6 ± 7,4	84,8 ± 9,1	94,9 ± 3,0	79,1 ± 10,4	84,5 ± 5,8	111,5 ± 8,7
Fipronil	95,0 ± 4,4	98,9 ± 10,5	72,5 ± 7,2	86,2 ± 2,3	86,4 ± 13,5	96,3 ± 5,2
Fipronil sulfona	73,6 ± 5,3	105,3 ± 4,7	95,1 ± 8,6	87,4 ± 11,7	95,1 ± 2,4	112,1 ± 6,0

\*Massa de cada composto: 0,0025 µg; eluição com 2 mL da mistura hexano:isopropanol (3:1, v/v), evaporação com auxílio de N<sub>2</sub> e redissolução em 500 µL de acetona

**Tabela 22 - Recuperações obtidas para fipronil e metabólitos utilizando-se diferentes valores de pH, diferentes solventes de eluição e diferentes volumes do solvente de eluição**

	pH 6,0				pH 3,0			
	Acetato de etila		Hexano:Isopropanol (3:1)		Acetato de etila		Hexano:Isopropanol (3:1)	
	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL	1 mL	2 mL
Desulfinil fipronil	63,4 ± 6,8	107,1 ± 9,4	80,4 ± 2,6	100,5 ± 5,2	70,6 ± 9,1	73,2 ± 4,7	103,4 ± 12,3	124,0 ± 6,9
Fipronil sulfeto	119,9 ± 5,9	79,3 ± 4,7	112,2 ± 6,0	92,2 ± 1,9	111,4 ± 4,0	122,5 ± 6,5	124,7 ± 8,2	118,4 ± 9,0
Fipronil	70,9 ± 8,4	134,6 ± 8,4	118,9 ± 8,4	102,2 ± 7,9	148,8 ± 3,4	149,0 ± 9,7	149,0 ± 7,1	104,3 ± 8,2
Fipronil sulfona	104,8 ± 9,1	64,0 ± 10,7	115,0 ± 10,1	103,7 ± 4,8	140,0 ± 8,1	108,8 ± 6,1	153,5 ± 11,4	131,3 ± 12,4

\*Nível de fortificação: 0,025 µg L<sup>-1</sup>, 100 mL de água Milli-Q

A análise de fipronil e metabólitos empregando SPE e GC-ECD apresentou algumas interferências provenientes da matriz aquosa, as quais interferiram nos valores de recuperação, sob determinadas condições. O procedimento SPE foi otimizado de forma a minimizar essas interferências e se obter valores adequados de recuperação.

Considerando a escolha do pH, melhores resultados foram obtidos com amostra sem correção de pH do que a pH 3,0. A pH 3,0 obtém-se cromatogramas com mais interferências, resultante da presença de ácidos húmicos e fúlvicos, os quais possuem  $pK_a$  igual a 3,0 ou menor (BARCELÓ; HENNION, 1997), resultando em valores de recuperação muito maiores de 100%. Na escolha do solvente, 2 mL da mistura de hexano:isopropanol (3:1) foi a que proporcionou melhores resultados para a mistura dos compostos.

O estudo do volume de *breakthrough* mostrou que esse fenômeno não ocorre para fipronil e metabólitos, até um volume de 500 mL, uma vez que obteve-se recuperações entre 70 e 120% para todos os volumes para todos os compostos. Então, o volume de amostra de 100 mL foi escolhido principalmente em função do tempo necessário para extração, considerando que quanto maior o volume extraído, maior o tempo necessário para pré-concentração. Isso é importante principalmente para as amostras de lavoura de arroz as quais apresentam grande quantidade de sólidos em suspensão e material particulado, os quais causam entupimento dos poros das membranas de filtração e também dos cartuchos de SPE. No caso de se trabalhar com amostras contendo menos interferências e/ou necessitar-se um fator de pré-concentração maior, pode-se trabalhar com volumes maiores de amostra, como por exemplo 250 mL, obtendo-se também boas recuperações.

#### 4.5.1 Procedimento experimental otimizado

A partir dos testes previamente apresentados, obteve-se o procedimento de extração otimizado, utilizado posteriormente na validação do método e para pré-concentração das amostras do experimento de degradação.

#### 4.5.1.1 Procedimento experimental otimizado para análise dos herbicidas

O sistema de extração em fase sólida para análise dos herbicidas é primeiramente condicionado com 3 mL de metanol, 3 mL de água Milli-Q para retirar o excesso de metanol e 3 mL de água Milli-Q pH 2,0. A solução (100 mL de água de superfície pH 2,0 com ácido fosfórico 1:1, v/v) contendo os analitos de interesse é percolada através do sorvente à uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup> sob vácuo. Após a etapa de pré-concentração passou-se 3 mL de água desionizada para minimizar substâncias interferentes solúveis na mesma, seguida de vácuo por 15 minutos. Na seqüência, fez-se a eluição dos analitos retidos na C18 utilizando-se 2 alíquotas de 1,0 mL da mistura diclorometano:metanol (65:35, v/v). Recolheu-se o analito em tubo de ensaio e reduziu-se o volume até securo com auxílio de N<sub>2</sub>. Para a análise via HPLC-DAD foi feita a redissolução em 500 µL da fase móvel, resultando em um fator de pré-concentração de 200 vezes.

#### 4.5.1.2 Procedimento experimental otimizado para análise de fipronil e metabólitos

O sistema de extração em fase sólida para análise de fipronil e metabólitos é condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água Milli-Q para retirar o excesso de metanol. Uma solução de 100 mL de água de superfície, sem ajuste de pH, contendo os analitos de interesse é percolada através do sorvente a uma vazão de 5 mL min<sup>-1</sup> com auxílio de vácuo. Após a etapa de pré-concentração passou-se 3 mL de água desionizada para minimizar substâncias interferentes solúveis na mesma, seguida de vácuo por 15 minutos. Na seqüência, fez-se a eluição dos analitos retidos na C18 utilizando-se 2 alíquotas de 1,0 mL da mistura hexano:isopropanol (3:1, v/v). Recolheu-se o analito em tubo de ensaio e reduziu-se o volume até securo com auxílio de N<sub>2</sub>. Para a análise via GC-ECD foi feita a redissolução em 500 µL de acetona, o que também resulta em um fator de pré-concentração de 200 vezes.

## 4.6 Validação dos métodos em amostras aquosas

### 4.6.1 Curva analítica

As Tabelas 23 e 24 apresentam as equações da curva analítica para os herbicidas e a mistura de fipronil e metabólitos, respectivamente.

**Tabela 23. Resultados obtidos para calibração dos herbicidas**

Herbicida	Equação da reta ( $y=ax+b$ )	$r^2$	Intervalo linear ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Imazetapir	$y= 167,780x - 0,657$	0,9999	0,05 – 5,0
Bispiribaque-sódico	$y= 54,641x - 0,226$	0,9998	0,1 – 2,5
Pirazossulfurom etílico	$y= 19,816x + 1,340$	0,9989	0,1 – 2,5

**Tabela 24 - Resultados obtidos para a calibração de fipronil e metabólitos**

Pesticida	Equação da reta ( $y=ax+b$ )	$r^2$	Intervalo linear ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Desulfinil fipronil	$y= 14,651x - 100,130$	0,9949	1,0 - 1000
Fipronil sulfeto	$y= 22,165x - 118,510$	0,9968	1,0 - 1000
Fipronil	$y= 5,627x + 48,688$	0,9974	5,0 - 1000
Fipronil sulfona	$y= 24,240x - 209,850$	0,9956	1,0 - 1000

A partir desses resultados pode-se concluir que a faixa linear por HPLC-DAD é mais estreita (2 ordens de grandeza) que para GC-ECD (4 ordens de grandeza), sendo que o primeiro ponto da curva corresponde ao limite de quantificação do instrumento.

Pelos coeficientes angulares ( $a$ ) das equações das retas pode-se perceber que o imazetapir apresenta a maior sensibilidade dentre os herbicidas, assim como o fipronil sulfona dentre os compostos analisados por GC-ECD.

Analisando-se as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) foram todos maiores que 0,9949, o que segundo a literatura é satisfatório. (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003)

#### 4.6.2 Linearidade

Os resultados obtidos para o teste da linearidade estão demonstrados nas Tabelas 25 e 26. As concentrações medidas correspondem às concentrações utilizadas na construção das curvas analíticas; as concentrações calculadas correspondem aos correspondentes valores de concentração obtidos através da curva analítica; o resíduo é a diferença entre a concentração medida e a concentração calculada; o desvio e o valor de  $t$  são obtidos conforme descrito no item 3.9.2. O valor de  $n$ , correspondente ao número de pontos da curva, é igual a 7 para imazetapir e os metabólitos do fipronil; igual a 6 para o fipronil e igual a 5 para bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico.

Considerando-se um intervalo de confiança de 95% e  $(n-1)$  graus de liberdade, o valor de  $t$  teórico é de 1,94 para  $n=7$ ; de 2,02 para  $n=6$  e de 2,13 para  $n=5$ . Então, como todos os valores de  $t$  obtidos são menores do que o  $t$  tabelado considera-se que todos os pontos das curvas analíticas estão dentro da linearidade, tanto para os herbicidas quanto para fipronil e metabólitos.

Tabela 25 – Valores obtidos no teste de linearidade para os herbicidas

IMAZETAPIR							
C medida	5,0000	2,5000	1,0000	0,5000	0,2500	0,1000	0,0500
C calculada	4,9986	2,5251	0,9754	0,4837	0,2507	0,1172	0,0516
Residuo	0,0014	-0,0251	0,0246	0,0163	-0,0007	-0,0172	-0,0016
Desvio	2,4000	0,5000	3,2000	0,4000	2,1000	10,0000	7,6000
<b>t</b>	<b>0,0016</b>	<b>-0,1327</b>	<b>0,0203</b>	<b>0,1077</b>	<b>-0,0008</b>	<b>-0,0045</b>	<b>-0,0006</b>
BISPIRIBAQUE SÓDICO							
C medida	2,5000	1,0000	0,5000	0,2500	0,1000		
C calculada	2,4033	0,9650	0,4446	0,2243	0,1080		
Residuo	0,0967	0,0350	0,0554	0,0257	-0,0080		
Desvio	7,1000	6,9300	12,6146	11,1283	6,4754		
<b>t</b>	<b>0,0361</b>	<b>0,0133</b>	<b>0,0116</b>	<b>0,0061</b>	<b>-0,0033</b>		
PIRAZOSSULFUROM ETÍLICO							
C medida	2,5000	1,0000	0,5000	0,2500	0,1000		
C calculada	2,6324	1,2161	0,4344	0,3075	0,1271		
Residuo	-0,1324	-0,2161	0,0656	-0,0575	-0,0271		
Desvio	2,4000	6,8000	9,2000	9,0000	13,6000		
<b>t</b>	<b>-0,1460</b>	<b>-0,0841</b>	<b>0,0189</b>	<b>-0,0169</b>	<b>-0,0053</b>		

Tabela 26 – Valores obtidos no teste de linearidade para fipronil e metabólitos

DESULFINIL FIPRONIL							
C medida	1,0000	0,5000	0,1000	0,0500	0,0100	0,0050	0,0010
C calculada	0,9937	0,5102	0,1114	0,0533	0,0041	0,0014	-0,0082
Residuo	0,0063	-0,0102	-0,0114	-0,0033	0,0059	0,0036	0,0092
Desvio	12,4100	7,2800	3,2500	4,5000	6,2100	5,7000	5,2300
<b>t</b>	<b>0,0013</b>	<b>-0,0037</b>	<b>-0,0093</b>	<b>-0,0020</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0047</b>
FIPRONIL SULFETO							
C medida	1,0000	0,5000	0,1000	0,0500	0,0100	0,0050	0,0010
C calculada	0,9974	0,5028	0,1104	0,0531	0,0069	0,0015	-0,0061
Residuo	0,0026	-0,0028	-0,0104	-0,0031	0,0031	0,0035	0,0071
Desvio	11,6000	6,9000	3,5000	4,2000	6,5000	6,9000	6,6000
<b>t</b>	<b>0,0006</b>	<b>-0,0011</b>	<b>-0,0079</b>	<b>-0,0019</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0028</b>
FIPRONIL							
C medida	1,0000	0,5000	0,1000	0,0500	0,0100	0,0050	
C calculada	0,9983	0,5053	0,0920	0,0461	0,0149	0,0055	
Residuo	0,0017	-0,0053	0,0080	0,0039	-0,0049	-0,0005	
Desvio	12,0000	6,8000	9,2000	9,0000	9,0000	4,2000	
<b>t</b>	<b>0,0004</b>	<b>-0,0021</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0011</b>	<b>-0,0014</b>	<b>-0,0003</b>	
FIPRONIL SULFONA							
C medida	1,0000	0,5000	0,1000	0,0500	0,0100	0,0050	0,0010
C calculada	0,9953	0,5010	0,1006	0,0479	0,0098	0,0065	0,0008
Residuo	0,0047	-0,0010	-0,0006	0,0021	0,0002	-0,0015	0,0002
Desvio	12,9000	8,1000	3,8000	4,9000	7,8000	7,2000	9,2000
<b>t</b>	<b>0,0010</b>	<b>-0,0003</b>	<b>-0,0004</b>	<b>0,0012</b>	<b>0,0001</b>	<b>-0,0005</b>	<b>0,0001</b>

#### 4.6.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de determinação estão nas Tabelas 27 e 28.

**Tabela 27 - Valores de LOD e LOQ para os herbicidas**

Pesticida	Limites do instrumento (mg L <sup>-1</sup> )		Limites do método (µg L <sup>-1</sup> )	
	LOD	LOQ	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>
Imazetapir	0,01	0,05	0,05	0,5
Bispiribaque-sódico	0,05	0,1	0,25	0,5
Pirazossulfurom etílico	0,05	0,1	0,25	0,5

a = teórico; b = experimental

**Tabela 28 - Valores de LOD e LOQ para fipronil e metabólitos**

Pesticida	Limites do instrumento (µg L <sup>-1</sup> )		Limites do método (µg L <sup>-1</sup> )	
	LOD	LOQ	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>b</sup>
Desulfínil fipronil	0,5	1,0	0,0025	0,005
Fipronil sulfeto	0,5	1,0	0,0025	0,005
Fipronil	1,0	5,0	0,005	0,0125
Fipronil sulfona	0,5	1,0	0,0025	0,005

a = teórico; b = experimental

Os limites de detecção foram semelhantes para todos os herbicidas (da mesma ordem de grandeza), inclusive para o pirazossulfurom etílico, contrariando a citação da literatura de que os herbicidas da classe das sulfoniluréias não são facilmente identificáveis por detectores HPLC comuns porque não possuem forte

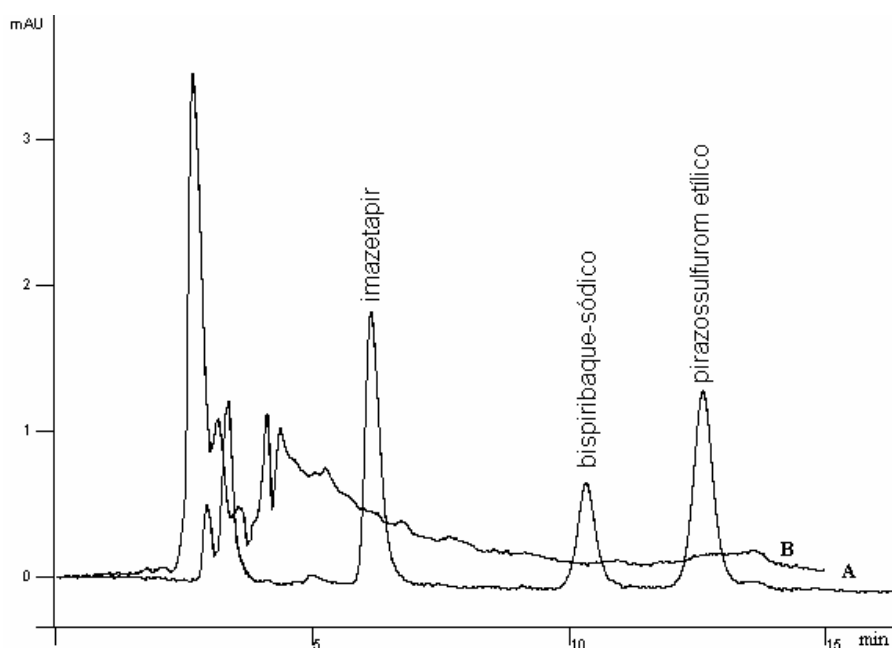


absorção de luz UV ou visível que permita detecção seletiva e de alta sensibilidade (AYANO, 2004).

Os valores de LOQ obtidos para os herbicidas não foram muito baixos, como seria necessário para a análise de sulfoniluréias em águas de superfície, por exemplo (BATTAGLIN *et al.*, 2000). No entanto não existe na literatura brasileira ou americana valores de limites máximos para nenhum destes compostos em águas, e os valores obtidos estão abaixo dos recomendados para outros herbicidas (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; EUA, 2001), dos limites gerais recomendados pela Comunidade Européia para águas de superfície ( $1 - 3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (SLOBODNÍK *et al.*, 1997), e dentro do limite para a soma dos pesticidas em água potável ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (EEC DRINKING WATER DIRECTIVE, 1980).

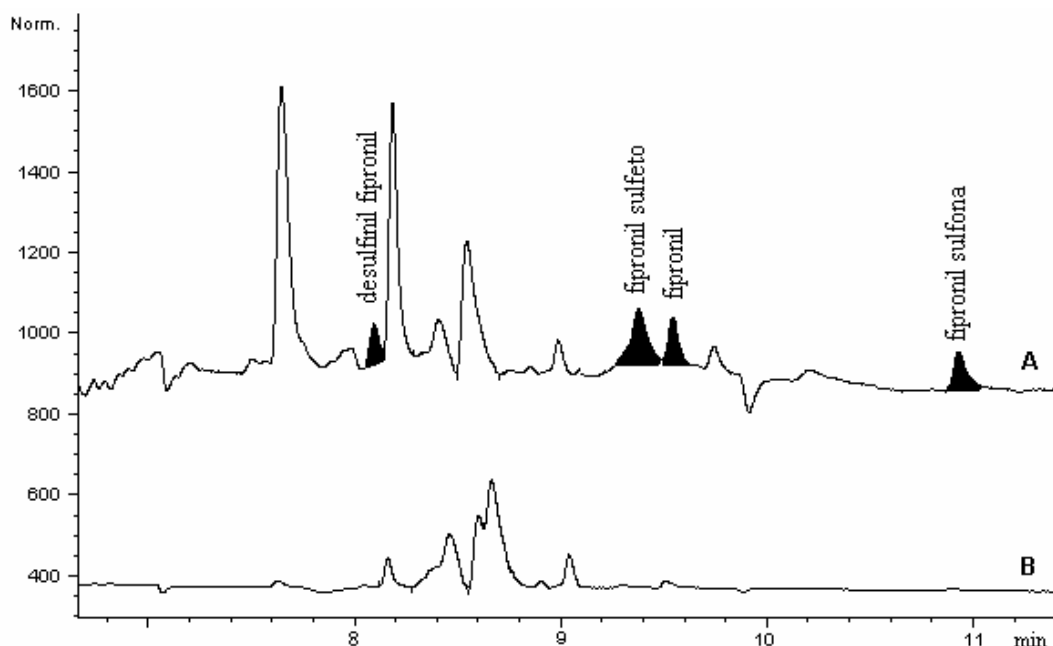
Já os limites obtidos por GC-ECD para fipronil e metabólitos são bastante baixos, permitindo a detecção destes compostos em nível de  $\text{ng L}^{-1}$ .

Os cromatogramas das amostras branco estão demonstrados nas Figuras 17 e 18. Para os herbicidas, não aparece nenhum pico interferente no tempo de retenção dos compostos, como demonstra a Figura 17.



**Figura 17 - Cromatogramas: (A) amostra fortificada com a mistura dos herbicidas no nível de  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e (B) de uma amostra “branco” de água de superfície**

Já a análise de fipronil e metabólitos em amostras de água de superfície apresentou interferências, principalmente no tempo de retenção do fipronil. Nesse caso, recomenda-se que os valores do branco não devem ser maiores que 30% do nível de resíduos correspondendo ao LOQ e que, as recuperações devem ser corrigidas pelos valores do branco (EUROPE COMMISSION, 2004).



**Figura 18 - Cromatogramas: (A) amostra fortificada com fipronil e metabólitos no limite de quantificação do método (B) de uma amostra “branco” de água de superfície**

#### 4.6.4 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A repetitividade ( $RSD_r$ ) e a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o instrumento ( $n=6$ ), para os níveis de concentração utilizadas na elaboração das curvas analíticas de fipronil e metabólitos, ficaram entre 0,09 e 7,33% e 0,02 e 9,51%, respectivamente. A repetitividade ( $RSD_r$ ) e a precisão intermediária ( $RSD_{pi}$ ) para o instrumento ( $n=3$ ), para os níveis de concentração utilizadas na elaboração das curvas analíticas dos herbicidas, ficaram entre 3,08 e 6,96% e 0,02 e 9,51%,

respectivamente. O teste de precisão intermediária foi realizado empregando-se dias diferentes dos utilizados para os estudos de repetitividade.

Os resultados de precisão para o método estão demonstrados juntamente com os resultados de recuperação, nas Tabelas 29 e 30. A precisão intermediária para os herbicidas foi realizada empregando-se dias e operadores diferentes daqueles dos estudos de repetitividade; já a precisão intermediária para fipronil e metabólitos foi obtida variando-se apenas o dia. Os valores para a repetitividade dos herbicidas ficaram entre 0,9 e 13,4% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,8 e 12,0%. Os valores de repetitividade para fipronil e metabólitos ficaram entre 4,8 e 14,2% e para a precisão intermediária ficaram entre 2,3 e 13,2%.

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% (HUBER, 2001).

Para validação de métodos cromatográficos, na faixa de concentração avaliada nesse trabalho, recomenda-se que a precisão deve apresentar  $RSD \leq 20\%$  (RIBANI *et al.*, 2004). Portanto, todos os resultados obtidos estão dentro dos limites sugeridos.

#### 4.6.5 Recuperação dos analitos

As Tabelas 29 e 30 apresentam os valores de recuperação obtidos para as fortificações, em diferentes níveis de concentração, para os herbicidas e para fipronil e metabólitos, utilizando-se o procedimento descrito no item 4.5.1.

As recuperações para os herbicidas ficaram entre 90,8 e 114,2%, com precisão menor que 13,4%. Para fipronil e metabólitos, as recuperações ficaram entre 81,3 e 112,3%, com precisão menor que 14,2%.

A recuperação depende da matriz da amostra, do procedimento de extração e da concentração do analito. Neste trabalho, seguiu-se a recomendação de que, para validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos, as recuperações devem estar entre 70 e 120% (RIBANI *et al.*, 2004). Todos os valores obtidos apresentaram-

se dentro desse intervalo e, portanto, o método está de acordo com os parâmetros exigidos.

**Tabela 29 - Recuperação, RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>pi</sub> do método para os herbicidas**

Herbicida	Nível de fortificação (µg L <sup>-1</sup> )	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Recuperação (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Imazetapir	0,5	102,1	7,3	90,8	12,0
	2,5	102,9	9,9	93,9	6,6
	5,0	94,6	8,7	94,2	8,4
Bispiribaque-sódico	0,5	103,3	0,9	99,7	7,5
	2,5	105,9	7,0	95,3	2,8
	5,0	94,7	7,0	98,1	3,2
Pirazossulfurom etílico	0,5	106,4	4,7	99,8	7,0
	2,5	105,5	13,4	96,2	8,3
	5,0	99,1	8,8	114,2	5,5

n=9 (3 extrações × 3 injeções) de cada extrato

**Tabela 30 - Recuperação, RSD<sub>r</sub> e RSD<sub>pi</sub> do método para fipronil e metabólitos**

Pesticida	Nível de fortificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Repetitividade		Precisão intermediária	
		Recuperação (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	Recuperação (%)	RSD <sub>pi</sub> (%)
Desulfinil fipronil	0,005	83,8	9,0	109,8	5,2
	0,0125	98,9	4,8	94,3	10,9
	0,025	103,3	7,4	88,7	3,1
	0,25	102,2	5,5	82,6	6,2
Fipronil sulfeto	0,005	89,6	12,4	81,3	2,3
	0,0125	92,5	9,8	95,3	2,8
	0,025	103,4	8,9	98,1	13,2
	0,25	97,8	10,7	105,4	8,6
Fipronil	0,0125	110,4	14,2	112,3	11,2
	0,025	99,4	3,3	100,7	5,8
	0,25	102,3	6,6	95,8	7,1
	2,5	105,9	7,9	103,4	8,6
Fipronil sulfona	0,005	105,5	13,9	83,4	3,4
	0,0125	91,3	6,2	98,4	9,4
	0,025	95,5	13,3	109,9	2,3
	0,25	106,2	9,7	95,7	10,5

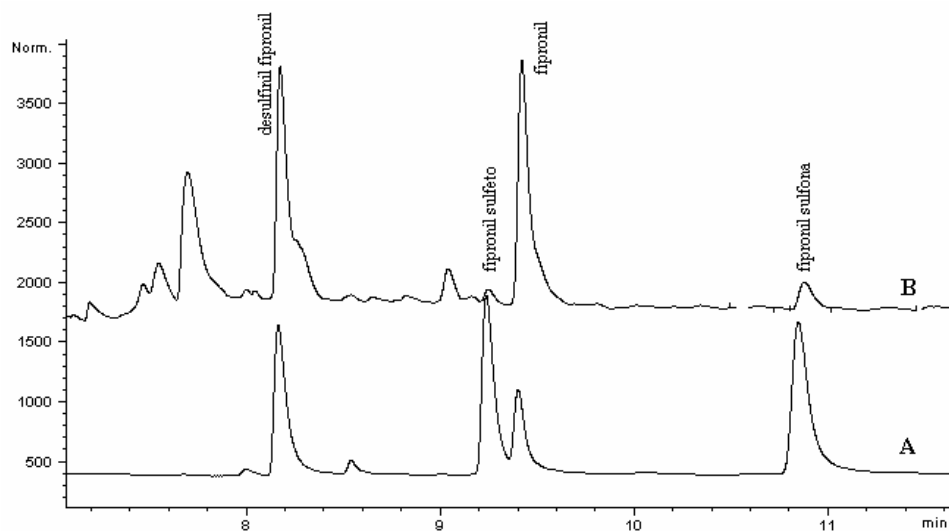
n= 9 (3 extrações x 3 injeções cada)

#### 4.7. Aplicação do método

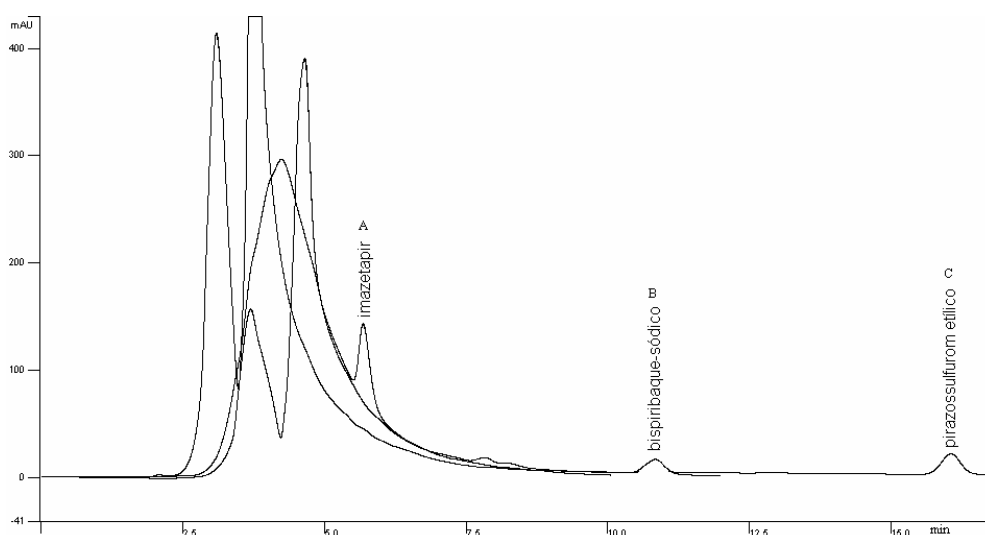
##### 4.7.1 Estudo de degradação em lavouras de arroz irrigado

Os métodos desenvolvidos foram aplicados no estudo de degradação dos compostos em um experimento de campo, realizado na várzea experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria. O estudo foi realizado em dois anos agrícolas, 2004/2005 e 2005/2006.

O perfil cromatográfico obtido para amostras de água de lavoura, coletadas aos três dias após aplicação dos pesticidas, está demonstrado nas Figuras 19 e 20.



**Figura 19 - Cromatogramas: (A) de uma solução analítica contendo fipronil e metabólitos na concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e (B) uma amostra de água de lavoura coletada 3 dias após aplicação de fipronil na dose recomendada**



**Figura 20 - Cromatogramas de amostras de água de lavoura contendo os herbicidas, coletadas aos 3 dias após aplicação do dobro da dose recomendada de (A) Vezir (imazetapir), (B) Nominee (bispiribaque-sódico) e (C) Sirius (pirazossulfurom etílico)**

As amostras foram analisadas conforme o método validado e os resultados obtidos para a degradação dos herbicidas estão demonstrados nas Figuras 21 e 22, respectivamente para as safras 2003/04 e 2004/2005.

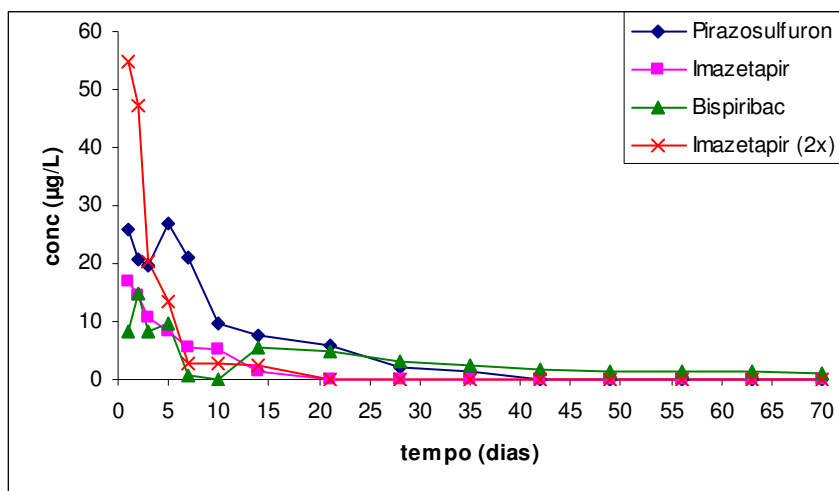


Figura 21 - Perfil da degradação dos herbicidas na safra 2004-2005

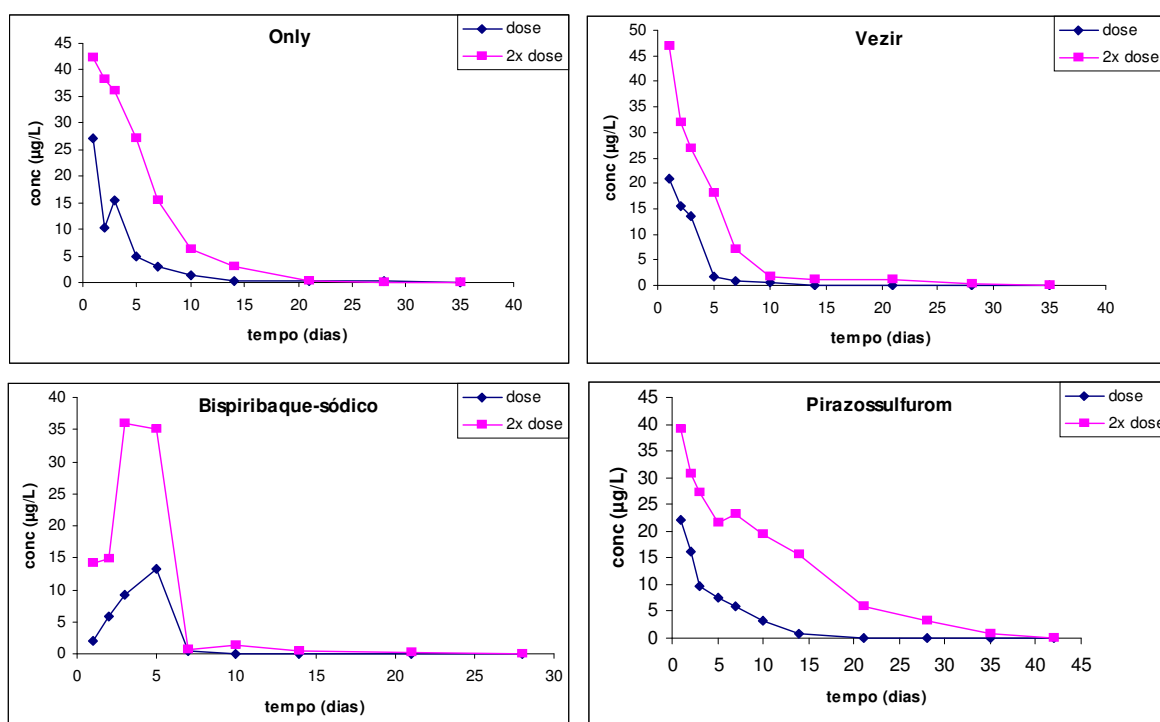


Figura 22 - Perfil da degradação dos herbicidas: imazetapir, nas formulações Only e Vezir, bispiribaque-sódico e pirazossulfurom etílico, para duas diferentes doses, na safra 2005-2006

O herbicida pirazossulfurom etílico apresentou resíduos até 35 dias após aplicação, nos dois anos de estudo. Aos 35 dias após aplicação, a concentração deste composto na lâmina de água foi de  $1,44 \mu\text{g L}^{-1}$ , na safra 2004/05 e de  $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ , na safra 2005/06. Noldin *et al.* realizaram um estudo semelhante a este, em 2 anos agrícolas, com o objetivo de avaliar a persistência do herbicida pirazossulfurom etílico na lâmina de água no cultivo de arroz irrigado no sistema pré-germinado. Os resultados indicaram a presença do composto até 32 dias após a aplicação (NOLDIN *et al.*, 2003), concordando com os resultados obtidos nesse estudo.

Para bispiribaque-sódico, no primeiro ano de estudo, foram encontrados resíduos até 35 dias após aplicação e a concentração encontrada foi de  $2,38 \mu\text{g L}^{-1}$ ; já no segundo ano de estudo foram encontrados resíduos até 21 dias, para ambas as doses e a concentração encontrada foi de  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Macedo *et al.* (2005) avaliaram a persistência desse herbicida em uma lavoura de arroz irrigado, cultivada no sistema pré-germinado, no município de Camaquã, nos anos de 2003/04 e 2004/05. Foram encontrados resíduos até 28 dias após aplicação no primeiro ano, e até 31 dias após aplicação no segundo ano de estudo.

O herbicida imazetapir, no primeiro ano de estudo, foi detectado até 14 dias após aplicação e apresentou concentração de  $1,35 \mu\text{g L}^{-1}$ , quando aplicado na dose recomendada e  $2,46 \mu\text{g L}^{-1}$  no dobro da dose recomendada. No segundo ano de estudo, foram encontrados resíduos até 28 dias, tanto na dose quanto no dobro da dose recomendada, para o herbicida na formulação Only; já na formulação Vezir, o herbicida apresentou resíduos até 14 e 21 dias, respectivamente para a dose e o dobro da dose recomendada. Para a formulação Only, aos 28 dias, a concentração foi de  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  e para a formulação Vezir, aos 14 dias a concentração foi de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  e aos 21 dias a concentração foi de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

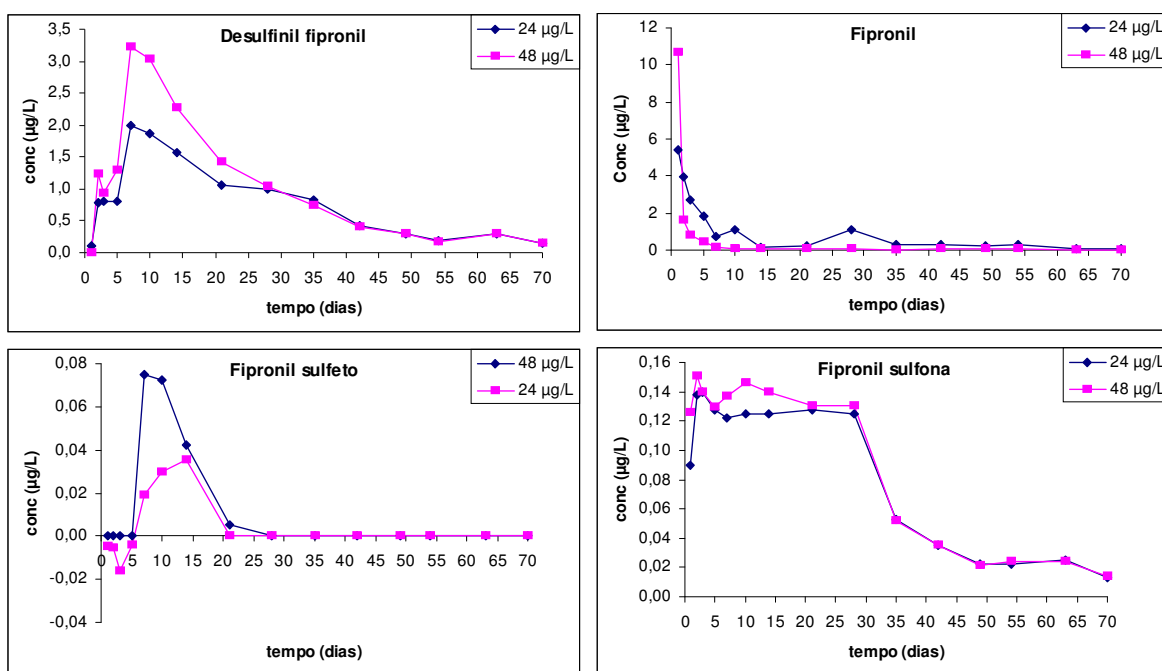
Marcolin *et al.* (2005) realizaram um estudo para avaliar a persistência do herbicida imazetapir, aplicado na formulação Only, na lâmina de água em 3 diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado: cultivo convencional em linhas (SC), plantio direto (PD) e pré-germinado (PG). A maior concentração de imazetapir foi observada no sistema pré-germinado na primeira amostragem, aos 4 dias após aplicação. No entanto, houve grande redução já na segunda amostragem, aos 11 dias. No sistema de PD essa redução foi menos acentuada e no SC a redução foi pequena. Aos 30 dias após aplicação, nos três sistemas de cultivo, os resíduos do herbicida na lâmina de água ficaram abaixo de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ , limite máximo estabelecido



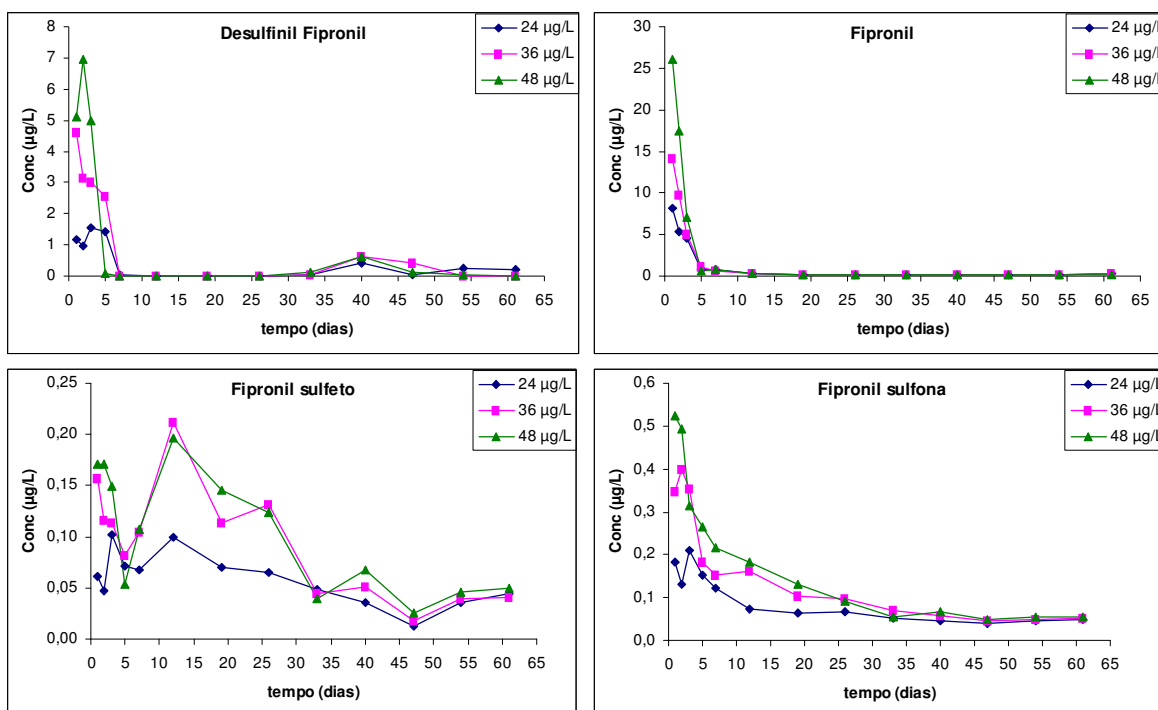
por algumas agências ambientais da Comunidade Européia para águas superficiais (SLOBODNIK, 1997), e aos 40 dias não foi mais detectada a presença do composto.

Conclui-se, pelos resultados obtidos, que há persistência dos herbicidas na lâmina de água. Portanto, recomenda-se a retenção da água na lavoura de arroz, onde foram aplicados estes compostos, por no mínimo, 35 dias. Nesse período, a concentração máxima encontrada seria próximo de  $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para o bispiribaque-sódico e de  $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$  para o pirazossulfurom etílico, limite esse considerado seguro para águas de superfície. O herbicida imazetapir estaria em concentração menor que  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$  (o LOD do método), uma vez que ele não foi mais detectado. Durante esse período, a irrigação deve ser feita apenas para manutenção da lâmina, evitando-se que a água contendo herbicidas seja drenada para os mananciais, com risco de contaminação das águas.

Os resultados obtidos para a degradação de fipronil e a conseqüente formação/degradação dos seus metabólitos estão demonstrados nas Figuras 23 e 24, respectivamente para as safras 2004/05 e 2005/2006. As concentrações de 24, 36 e  $48 \mu\text{g L}^{-1}$  correspondem, respectivamente, a dose, a uma dose e meia e ao dobro da dose recomendada para aplicação de fipronil em lavouras de arroz.



**Figura 23 - Perfil da degradação para fipronil e metabólitos na safra 2004-2005, para duas diferentes doses**



**Figura 24 - Perfil da degradação para fipronil e metabólitos na safra 2005-2006, para três diferentes doses**

Pode-se perceber, pelos gráficos de degradação, que fipronil apresenta uma rápida redução na concentração, com valores em torno de 50% menores já no segundo dia após aplicação. A partir do 5º dia a concentração decai lentamente, até atingir a concentração de  $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$  no último dia de amostragem. Esse comportamento é independente da dose e do ano de aplicação. Os tempos de meia-vida ficaram entre 10,3 e 13,9 dias, para as 2 safras agrícolas e para todas as doses.

Neste trabalho, o maior produto de degradação do fipronil foi o metabólito desulfenil fipronil, o qual apresentou as maiores concentrações dentre os metabólitos. Esse composto foi detectado desde o primeiro dia de amostragem (24 h após aplicação de fipronil) e sua concentração se elevou até o 7º dia, com concentração máxima de  $3,23 \mu\text{g L}^{-1}$ . No segundo ano de estudo, a concentração máxima observada foi  $6,93 \mu\text{g L}^{-1}$ , no segundo dia após aplicação, no dobro da dose recomendada. A partir daí, houve lento decréscimo na concentração, até atingir o valor de  $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$  no último dia de amostragem. Isto indica que a decomposição fotocatalítica do fipronil, com conseqüente formação do desulfenil, é rápida.

O metabólito fipronil sulfona apareceu em todas as coletas realizadas, tanto no primeiro quanto no segundo ano agrícola. As concentrações variaram de 0,01 a

0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  no primeiro ano, com concentração máxima no 2º dia, e de 0,04 a 0,52  $\mu\text{g L}^{-1}$  no segundo ano, com concentração máxima no 1º dia.

O metabólito fipronil sulfeto não foi detectado nos primeiros dias após aplicação do fipronil, na safra 2004/05. Sua presença só foi detectada do 7º ao 21º dias, com concentração máxima de 0,08  $\mu\text{g L}^{-1}$ , no sétimo dia. Na safra 2005/06, esse metabólito foi detectado em todas as coletas, com concentrações que variaram de 0,01 a 0,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  (no 12º dia). Esse aparecimento num período posterior à concentração máxima do fipronil, é consistente com o processo de degradação uma vez que esse metabólito é um produto de redução, mais frequentemente detectado no solo (DEMCHECK & SKROBIALOWSKI, 2003).

Águas de lavouras de arroz são compostas por grande quantidade de sólidos em suspensão, resultando em alta turbidez. Fipronil e seus metabólitos são relativamente insolúveis em água e rapidamente particionam nas matrizes orgânicas de solos e sedimentos, com aproximadamente 95% dos resíduos sendo encontrados nos sedimentos dentro de uma semana após aplicação (SCHLENK *et al.*, 2001; PESTICIDE ACTION NETWORK, 2006).

Durante o período de cultivo de arroz no RS, de outubro a fevereiro, os campos inundados (com lâmina de água de 10 cm de profundidade) são sujeitos a intensa radiação solar e à variações diárias de pH e temperatura (dados no Anexo B), fazendo com que a fotólise, a hidrólise ou a volatilização sejam possíveis. Produtos de transformação oxidativa prevalecem na água, enquanto que em toda a camada de água e na camada superficial do solo inundado (< 1 cm) pode ocorrer redução (NGIM & CROSBY, 2001).

Avaliando-se a volatilização, através dos valores de pressão de vapor e da constante da Lei de Henry, percebe-se que fipronil e desulfinil praticamente não volatilizam (CONNELLY, 2001; NGIM & CROSBY, 2001), o que explica as concentrações encontradas e contribui para a observada persistência destes dois compostos na lâmina de água.

Um estudo realizado com o objetivo de avaliar o metabolismo aquático desse composto fez uso de incubações contendo sedimento e água e tratamento com fipronil radioativo (CONNELLY, 2001). O maior metabólito em condições aquáticas anaeróbicas foi o sulfeto, enquanto que amida e sulfona foram os produtos de condições de solo aeróbicas. O tempo de meia-vida para fipronil, sob condições aquáticas aeróbicas, foi de 14,5 dias. O fipronil rapidamente particionou da camada

aquosa para o sedimento, sendo grande parte deste encontrado no sedimento 7 dias após aplicação.

FENET *et al.* (2001) estudaram a degradação de fipronil em solos e vegetais. Observaram que o declínio de fipronil foi rápido durante os primeiros 15 dias, e os dados indicaram uma cinética de pseudo-primeira ordem. O tempo de meia-vida estimado variou de 95 a 130 h (5,4 dias). A degradação do fipronil foi concomitante com o aparecimento de 2 metabólitos, o desulfinil e a sulfona. Os níveis destes metabólitos aumentaram até o 4º dia; a partir daí houve um lento desaparecimento, assim como ocorreu com o fipronil, até o 60º dia após aplicação.

#### 4.7.1.1 Cinética de degradação e tempos de meia-vida

As Tabelas 31 e 32 apresentam os resultados obtidos para a cinética de degradação dos herbicidas estudados, para os dois anos agrícolas.

De maneira geral, uma cinética de 1ª ordem se aplica bem à degradação dos herbicidas, comprovado pelos valores de  $r^2$  obtidos, todos acima de 0,82, exceção apenas para o bispiribaque-sódico. Para este herbicida ocorre uma elevação na concentração nos primeiros dias para posterior decréscimo. Por isso os valores de  $r^2$  obtidos ficaram entre 0,70 e 0,79.

**Tabela 31 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2004-2005**

Herbicida	Dose (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Equação da reta (y= ax + b)	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dias)
Imazetapir (Vezir)	100	y= 0,1771x + 6790,4	0,9499	3,9
	200	y= -0,2637x + 10109	0,8231	7,8
Bispiribaque-sódico	50	y= 0,2916x + 11,392	0,7684	2,4
Pirazossulfurom etílico	20	y= 0,0891x + 3417,8	0,9459	2,6

**Tabela 32 - Cinética de degradação para os herbicidas, na safra 2005-2006**

Herbicida	Dose (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Equação da reta (y= ax + b)	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dias)
Imazetapir (Only)	75	y= -0,1817x + 2,6844	0,8784	3,8
	150	y= -0,2599x + 4,3464	0,9837	2,7
Imazetapir (Vezir)	100	y= -0,4254x + 3,3384	0,9422	1,6
	200	y= -0,1801x + 3,5158	0,8808	3,9
Bispiribaque-sódico	50	y= -0,3550x + 2,1273	0,7063	2,0
	100	y= -0,2836x + 3,4373	0,7921	2,5
Pirazossulfurom etílico	20	y= -0,2253x + 3,215	0,9744	3,0
	40	y= -0,1029x + 3,7964	0,9552	6,7

Para pirazossulfurom etílico, o tempo de meia-vida foi de 2,6 dias no primeiro ano, e de 3,0 e 6,7 dias, respectivamente para a dose e o dobro da dose, no segundo ano de estudo. Dados da literatura indicam que este composto apresenta um tempo de meia-vida no solo < 15 dias e de meia-vida na água de 28 dias (SILVA *et al.*, 2005), quando aplicado na razão de 0,08 L ha<sup>-1</sup>, a mesma utilizada nesse estudo.

Para bispiribaque-sódico, o tempo de meia-vida foi de 2,4 dias no primeiro ano de estudo e de 2,0 e 2,5 dias, respectivamente para a dose e o dobro da dose recomendada, no segundo ano de estudo.

Para imazetapir, aplicado na formulação Vezir, no primeiro ano de estudo, os tempos de meia-vida foram de 3,9 e 7,8 dias, respectivamente para a dose e o dobro da dose recomendada. No segundo ano de estudo, os tempos de meia-vida foram de 3,8 e 2,7 dias para Only, respectivamente na dose e dobro da dose recomendada, e de 1,6 e 3,9 dias para Vezir, respectivamente na dose e dobro da dose recomendada.

Observando os dados climáticos, apresentados no Anexo B, observa-se que os valores de precipitação e de temperaturas médias em 2004/05 foram abaixo da média, principalmente a precipitação nos meses de dezembro/2004 a março/2005. Já na safra 2005/06, as temperaturas médias ficaram levemente acima da média em todos os meses, assim como a precipitação, nos meses de outubro e janeiro; e o

número de horas de insolação foi levemente maior que em 2004/05. Este fato pode justificar o fato de os tempos de meia-vida para o imazetapir terem sido maiores no primeiro do que no segundo ano.

A precipitação pluvial, o escoamento superficial e a suplementação de água podem modificar a concentração dos pesticidas resultando em perdas e/ou picos de concentração (MACHADO, 2003). As concentrações atingidas por um pesticida nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada e das condições ambientais (condições de fotólise, temperatura, pH da água, presença de microorganismos) (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004; BARCELÓ & HENNION, 1997). Os tempos de meia-vida dependem fortemente da temperatura. Estudos realizados com o inseticida fenitrothion indicaram uma redução no  $t_{1/2}$  de 49,5 para 4,7 dias quando a temperatura foi elevada de 23 para 49,7 °C (BARCELÓ & HENNION, 1997).

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que a degradação do bispiribaque-sódico foi independente da dose e das condições climáticas, uma vez que os tempos de meia-vida foram semelhantes, nos dois anos de estudo. Já a degradação do pirazossulfurom etílico parece ser influenciada pela dose, uma vez que o  $t_{1/2}$ , quando foi aplicado o dobro da dose, foi 2 vezes maior do que quando a dose recomendada foi aplicada. Para a degradação do imazetapir pode-se dizer que tanto a dose quanto a formulação e as condições climáticas tiveram influência na persistência do herbicida. Para Vezir<sup>®</sup>, aplicado no dobro da dose recomendada, o tempo de meia-vida foi 2 vezes maior do que quando aplicado na dose recomendada e esses valores foram menores (1,6 e 3,9 dias) no segundo ano comparativamente ao primeiro (3,9 e 7,8 dias). Já para a formulação Only<sup>®</sup>, os valores obtidos para o  $t_{1/2}$  foram ligeiramente maiores para a dose do que para o dobro da dose recomendada.

As Tabelas 33 e 34 apresentam os resultados obtidos para a cinética de degradação dos herbicidas estudados, para os dois anos agrícolas.

**Tabela 33 - Cinética de degradação para fipronil e metabólitos, na safra 2004-2005**

Pesticida	Dose (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Equação da reta (y= ax + b)	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dias)
Desulfinil fipronil	24	y= -0,0213x + 0,0236	0,2926	32,5
	48	y= -0,0197x - 0,0264	0,092	35,2
Fipronil sulfeto	24	y= -0,1329x - 0,9112	0,7212	5,2
	48	y= 0,0213x - 1,4851	0,0915	32,5
Fipronil	24	y= -0,0498x + 0,7157	0,711	13,9
	48	y= -0,0642x - 0,4705	0,6367	10,8
Fipronil sulfona	24	y= -0,0335x - 1,8173	0,8708	20,7
	48	y= -0,0353x - 1,7055	0,8981	19,6

**Tabela 34 - Cinética de degradação para fipronil e metabólitos, na safra 2005-2006**

Pesticida	Dose (g i.a. ha <sup>-1</sup> )	Equação da reta (y= ax + b)	r <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (dias)
Desulfinil fipronil	24	y= -0,0324x - 0,1683	0,244	21,4
	36	y= -0,1151x + 1,6913	0,714	6,0
	48	y= -0,0715x + 0,979	0,610	9,7
Fipronil sulfeto	24	y= -0,0169x - 2,546	0,433	41,0
	36	y= -0,0259x - 1,9366	0,634	26,8
	48	y= -0,0233x - 1,8955	0,546	29,8
Fipronil	24	y= -0,0513x + 0,5493	0,528	13,5
	36	y= -0,0611x + 0,8813	0,582	11,3
	48	y= -0,0674x + 1,0905	0,542	10,3
Fipronil sulfona	24	y= -0,0247x - 1,9295	0,797	28,0
	36	y= -0,0342x - 1,3072	0,857	20,3
	48	y= -0,0379x - 1,0868	0,858	18,3

Os valores de  $t_{1/2}$  para o fipronil ficaram entre 10,3 e 13,9 dias, para as 2 safras agrícolas e para todas as doses. Ngim (2001) realizou um estudo semelhante a este, de 1995 a 1997, aplicando fipronil em diferentes formulações em lavouras de arroz. A degradação de fipronil resultou em tempos de meia-vida de 10,5 a 125 h (5,2 dias) em água e 44,5 a 533 h (22 dias) em solos, indicando persistência baixa a moderada para fipronil em lavouras de arroz.

De maneira geral, o metabólito desulfinil foi mais persistente que o fipronil. Os tempos de meia-vida, na safra 2004/05, foram altos, 32,5 e 35,2 dias, respectivamente para fipronil aplicado na dose e no dobro da dose recomendada. Na safra 2005/06, a cinética de degradação foi mais rápida, com  $t_{1/2}$  de 21,4; 6,0 e 9,7 dias, respectivamente para fipronil aplicado na dose (24 g i. a. ha<sup>-1</sup>), uma dose e meia (36 g i. a. ha<sup>-1</sup>), e no dobro da dose recomendada (48 g i. a. ha<sup>-1</sup>). Para o metabólito fipronil sulfona, o tempo de meia-vida médio foi de 21,4 dias e para o fipronil sulfeto foi de 27 dias.

Na degradação do fipronil, cujos valores de  $r^2$  ficaram entre 0,528 e 0,711, ocorre um rápido decaimento do 1º para o 5º dia, de forma que a relação entre o tempo e a concentração não apresenta-se linear. Neste caso, pode-se dizer que a reação é de pseudo primeira ordem (FENET *et al.*, 2001). Para os metabólitos, os baixos valores de  $r^2$  encontrados são justificados uma vez que deve haver primeiro a sua formação e posteriormente sua degradação.

Um estudo de degradação, usando-se sementes e solos tratados com fipronil, foi realizado em campos de arroz do Mississippi, Texas e Califórnia (CONELLY, 2001). Na Califórnia, onde o cultivo de arroz é no sistema irrigado, o  $t_{1/2}$  para fipronil foi de 1,7 dias em sementes e 2,9 dias em solos; para o metabólito desulfinil, o  $t_{1/2}$  em sementes foi de 17,4 dias e em solos foi de 18,8 dias. Para os demais metabólitos, sulfeto, sulfona e amida, o  $t_{1/2}$  ficou abaixo do limite de quantificação. De acordo com os autores, os metabólitos combinados mostraram uma menor razão de degradação que o fipronil, indicando uma degradação contínua destes analitos.



## 5 CONCLUSÃO

A SPE provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras aquosas. É rápida, pois permite o preparo simultâneo de até 20 amostras e possibilita extração e pré-concentração dos pesticidas ao mesmo tempo, tem baixo consumo de solvente e, conseqüentemente, gera poucos resíduos. Os cartuchos contendo C18 possibilitaram a extração tanto dos herbicidas quanto do inseticida fipronil e seus metabólitos com rapidez e eficiência.

O método por HPLC-DAD mostrou-se adequado para a análise dos herbicidas, permitindo a análise em um tempo de 15 min. A fase móvel de acetonitrila:água (55:45, v/v) separou adequadamente os compostos entre si e também das interferências provenientes da matriz. A detecção por DAD foi adequada, atingindo-se bons limites de detecção e possibilitando, também, a confirmação da identidade dos compostos pelo espectro molecular.

Destaca-se também o desenvolvimento de um método para a determinação do bispiribaque-sódico em águas, para o qual não existe nenhum método de análise disponível na literatura.

O método por GC-ECD para análise de fipronil e metabólitos mostrou-se bastante sensível, permitindo a separação dos compostos em um tempo total de 18 min em nível de  $\text{ng L}^{-1}$ .

Comparando-se a análise por GC-ECD e HPLC-DAD, pode-se dizer que ambas apresentaram resultados satisfatórios, permitindo a adequada separação dos compostos em um tempo menor que 20 min. A análise por Cromatografia Líquida acoplada ao Detector por Arranjo de Diodos apresenta a vantagem de fornecer informação qualitativa através da comparação dos espectros moleculares dos compostos e apresentou menos interferências que a análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao Detector por Captura de Elétrons; no entanto, este último permite a obtenção de limites de quantificação bem menores.

Na validação dos métodos obtiveram-se resultados satisfatórios. As curvas analíticas apresentaram valores de  $r^2$  maiores que 0,9949 para as faixas de

concentração necessárias às aplicações. Os valores de limite de detecção e de quantificação foram adequados para análise de pesticidas em águas de superfície. Para os herbicidas, obtiveram-se valores de LOQ de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  e para fipronil e metabólitos obteve-se valores entre  $0,005$  e  $0,0125 \mu\text{g L}^{-1}$ . A recuperação apresentou valores entre  $90,8$  e  $114,2\%$ , com boa precisão ( $\text{RSD} < 13,4\%$ ), para os herbicidas, e recuperações entre  $81,3$  e  $112,3\%$ , com  $\text{RSD} < 14,2\%$ , para fipronil e metabólitos.

Os resultados obtidos no estudo de degradação dos herbicidas em lavoura de arroz irrigado permitem concluir que há persistência dos herbicidas estudados na lâmina de água. Portanto, recomenda-se a retenção da água na lavoura de arroz, onde foram aplicados estes compostos por, no mínimo, 35 dias. Nesse período, a concentração máxima encontrada seria próxima de  $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$  para bispiribaquesódico e de  $1,4 \mu\text{g L}^{-1}$  para pirazossulfurom etílico, valores aceitáveis para águas de superfície. O herbicida imazetapir estaria em concentração menor que  $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ . Durante esse período inicial, a irrigação deve ser feita apenas para manutenção da lâmina, evitando-se que a água contendo herbicidas seja drenada para rios e riachos, com risco de contaminação das águas.

No estudo de degradação do fipronil em lavoura de arroz foi possível observar o rápido decaimento do mesmo, mediante reações de fotólise, oxidação e redução, e a conseqüente formação dos seus metabólitos desulfenil fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona. O metabólito formado em maior concentração foi o desulfenil fipronil comprovando que a fotodegradação é a principal rota de degradação do fipronil.

No 10º dia após aplicação do fipronil, o valor encontrado foi de  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , no primeiro ano de estudo, e de  $0,83 \mu\text{g L}^{-1}$ , no 7º dia, no segundo ano de estudo. Para desulfenil fipronil, a concentração máxima foi de  $3,23 \mu\text{g L}^{-1}$  no 7º dia após aplicação do fipronil, no primeiro ano de estudo, e de  $6,93 \mu\text{g L}^{-1}$ , aos 2 dias após aplicação de fipronil, no segundo ano de estudo. Os outros metabólitos apresentaram valores menores de concentração, com valores máximos de  $0,21 \mu\text{g L}^{-1}$  para o fipronil sulfeto e de  $0,52 \mu\text{g L}^{-1}$  para o fipronil sulfona.

Estes resultados indicam que é necessário reter a água na lavoura pelo menos até 14 dias após aplicação de fipronil para se chegar a um limite seguro para água de superfície quanto à presença de fipronil e seus metabólitos, sendo que as concentrações encontradas seriam de  $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$  para fipronil,  $2,27 \mu\text{g L}^{-1}$  para o desulfenil fipronil,  $0,21 \mu\text{g L}^{-1}$  para o fipronil sulfeto e de  $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$  para fipronil

sulfona. Indicam também, que além dos pesticidas é necessário o monitoramento da presença dos metabólitos, os quais também são tóxicos e podem alcançar as águas de superfície, gerando impacto ambiental.

Através dos estudos de degradação também foi possível a determinação da cinética de degradação e dos tempos de meia-vida desses compostos, os quais são importantes para prever a persistência dos compostos nos compartimentos ambientais. Dos compostos estudados, fipronil e seus metabólitos apresentaram maior persistência (tempos de meia-vida maiores) que os herbicidas.

Pesticidas usados na cultura do arroz irrigado têm um efeito prejudicial potencial para a vida aquática, pois a drenagem da água da lavoura das culturas de arroz coincidem com a época de reprodução dos peixes. Então, todo sistema de cultivo de arroz que libera água para o meio ambiente precisa ser monitorado com relação à concentração de pesticidas, e planos de gerenciamento, de manejo da cultura de arroz irrigado e de desempenho para proteger a vida aquática precisam ser implementados.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Aplicar os métodos desenvolvidos no monitoramento de águas de superfície e/ou profundidade para avaliar a sua contaminação pelos compostos estudados.

Aplicar a tecnologia de Processos Oxidativos Avançados para a degradação em laboratório dos compostos estudados com o objetivo de comparar com a degradação a campo.

Estudar a rota de degradação dos compostos através do emprego de técnicas como GC-MS e LC-MS.

Desenvolver um método para análise destes compostos em amostras de solo para avaliar o destino destes em outros compartimentos ambientais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAJOUD, A.; RAVANEL, P.; TISSUT, M. Fipronil metabolism and dissipation in a simplified aquatic ecosystem. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1347-1352, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Brasília. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_pesquisa\\_ingrediente.asp](http://www.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_pesquisa_ingrediente.asp)>. Acesso em: 13 nov. 2006.

AKIYAMA, Y.; YOSHIOKA, N. TSUJI, M. Determination of ten sulfonyl urea herbicides in unpolished rice by solid-phase extraction cleanup and LC-diode array detection. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 43, p. 99-103, 2002.

ALISTER, C.; KOGAN, M. Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone-resistant maize and their carryover effect on rotational crops. **Crop Protection**, v. 24, p. 375-379, 2005.

ALISTER, C.; KOGAN, M. ERI: Environmental risk index. A simple proposal to select agrochemicals for agricultural use. **Crop Protection**, v. 25, p. 202-211, 2006.

ANGLADETTE, A. **El Arroz**. Barcelona: Editorial Blume, 1ª ed. 1969. p. 9-14; 66-71; 467-555.

ANISUZZAMAN, A. K. M. *et al.* Synthesis of dimethyl derivatives of imidazolinone herbicides: Their use in efficient gas chromatographic methods for the determination of these herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5893-5902, 2000.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. Análise quantitativa por cromatografia. Campinas, 2003. Disponível em: <[www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com)>. Acesso em 20 abril 2006.

AYANO, E. *et al.* Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 211-218, 2004.

AYANO, E. *et al.* Analysis of herbicides in water using temperature-responsive chromatography and an aqueous mobile phase. **Journal of Chromatography**, v. 1069, p. 281-285, 2005.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. 2002. p. 313-400.

BALINOVA, A. Ion-pairing mechanism in the solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of acidic herbicides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 728, p. 319-324, 1996.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. p. 15-34.

BARCELÓ, D. Occurrence, handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. A review. **Analyst**, v. 116, p. 681-689, 1991.

BARCELÓ, D.; HENNION M. C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. 3. ed. The Netherlands: Elsevier, 1997. 542 p.

BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 2-11, 2007.

BATTAGLIN, W. A. *et al.* Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in th Midwestern United States, 1998. **The Science of the Total Environment**, v. 248, p. 123-133, 2000.

BECEIRO-GONZÁLEZ, E. *et al.* Optimization and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 165-173, 2007.

BERRADA, H.; MOLTO, J. C.; FONT, G. Gas Chromatographic behaviour of urea herbicides. **Chromatographia**, v. 54, p. 360-364, 2001.

BEYRUTH, Z.; TOMITA, R. Y. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. Instituto Biológico, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.geocities.com/~esabio/tomita.htm>>. Acesso em 23 nov. 2006.

BEZEMER, E.; RUTAN, S. Study of hydrolysis of a sulfonylurea herbicide using liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry by three-way multivariate curve resolution-alternating least squares. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 4403-4409, 2001.

BIZIUK, M. *et al.* Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BOBÉ, A. *et al.* Kinetics and mechanisms of abiotic degradation of fipronil (hidrolysis and photolysis). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2834-2839, 1998.

BOLETIM INFORMATIVO DA CORI, A água na América Latina, 2000. Disponível em: <<http://www.cori.unicamp.br/pdr/outubro2000/boletim-outubro2000.pdf>> Acesso em 25 set 2006.

BRASIL. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 março 2004. Disponível em: <[dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518\\_25\\_03\\_04.pdf](http://dtr2004.saude.gov.br/dab/saudebucal/legislacao/portaria518_25_03_04.pdf)>. Acesso em 23 nov. 2006.

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

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

BRITO, N. M. *et al.* Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

BRITO, N. M. *et al.* Risco de contaminação de águas por pesticidas aplicados em plantações de eucaliptos e coqueiros: análise preliminar. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 93-104, 2001.

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

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. *et al.* Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. **Journal of Chromatography A**, v. 950, p. 157-166, 2002.

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

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis - Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CAVALIER, T. *et al.* Capillary electrophoresis determinative and LC/MS confirmatory method for the determination of imazapyr, imazamox, imazapic, imazethapyr, imazaquin, and imazamethabenz-acid (meta and para) residues in drinking water and pond water. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 219, U62-U626-AGRO Part 1, 2000.

CHAO, J. *et al.* Determination of sulfonylurea herbicides by continuous-flow liquid membrane extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 955, p. 183-189, 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 453 p.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). Quarto levantamento de avaliação da safra 2006/2007. 2007. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 16 jan 2007.

CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil. Sacramento, 2001. Disponível em: <<http://pw.ucr.edu/textfile/fipronil.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2006.



D'ASCENZO, G. *et al.* Development of a method based on liquid chromatography electrospray mass spectrometry for analyzing imidazolinone herbicides in environmental water at part-per-trillion levels. **Journal of Chromatography A**, v. 800, p. 109-119, 1998.

DEGELMANN, P. *et al.* Development of a class-specific ELISA for sulfonylurea herbicides (sulfuron screen). **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 6795-6802, 2004.

DEGELMANN, P. *et al.* Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water and Food Samples Using Sol-Gel Glass-Based Immunoaffinity Extraction and Liquid Chromatography-Ultraviolet/Diode Array Detection or Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2003-2011, 2006.

DEMCHECK, D. K.; SKROBIALOWSKI, S. C. Fipronil and degradation products in the rice-producing áreas of the Mermentau River Basin, Louisiana, february-september 2000. **United States Geological Survey National Water-Quality Assessment Program. USGS.** Estados Unidos, 2003. Disponível em: <<http://water.usgs.gov/nawqa>>. Acesso em: 01 fev. 2006.

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

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

EMBRAPA, Cultivo do arroz irrigado no Brasil. Embrapa Clima Temperado, 2003. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/arroz/?cao=07>>. Acesso em 20 ago 2005.

EUA. National Primary Drinking Water Standards. **Environmental Protection Agency**, março 2001. Disponível em: <[www.epa.gov/safewater](http://www.epa.gov/safewater)>. Acesso em 23 nov. 2006.

EUROPE COMISSION. **Quality control procedures for pesticide residues analysis.** 3<sup>a</sup> ed., Documento N<sup>o</sup> SANCO/10476/2003, 5 de fevereiro de 2004, Bruxelas, Bélgica. Disponível em: <[http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)>. Acesso em 21 mar. 2006.

EXTOXNET. Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles. 2006. Disponível em: <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet>>. Acesso em 28 dez 2006.

FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). Rice is life. Italy, 2004a. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004>>. Acesso em 16 nov. 2006.

FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations). Economics and the International Year of Rice. Italy, 2004b. Disponível em: <<http://www.rice2004.org>>. Acesso em 30 nov 2006.

FENET, H. *et al.* Fate of a phenylpyrazole in vegetation and soil under tropical field conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 49, p. 1293-1297, 2001.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **Journal of Chromatography B**, v. 686, p. 77-83, 1996.

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

FURLONG, E. T. *et al.* Routine determination of sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides at nanogram-per-liter concentrations by solid-phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. **The Science of the Total Environment**, v. 248, p. 135-146, 2000.

GARP. ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos**. 1999, p. 66-73.

GEERDINK, R. B.; NIESSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. TH. Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 65-93, 2002.

GODOY, J. Alarme por inseticidas assassinos de abelhas. 2007. Disponível em: <<http://www.tierramerica.net/2004/0313/pacentos.shtml>>. Acesso em 15 jan 2007.

GONÇALVES, F. F. **Desenvolvimento de um método por SPE e HPLC-UV para a determinação de herbicidas em água de rio e avaliação da degradação por**

**processos oxidativos avançados.** 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

GRIST, D. H. **Rice.** New York: Longman Inc., 5. ed. 1975. p. 3-10; 62-75; 432-457.

HARMAN-FETCHO, J. A. *et al.* Pesticide occurrence in selected South Florida Canals and Biscayne Bay during high agricultural activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6040-6048, 2005.

HASSANI, A. K. EL *et al.* Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, p. 30-39, 2005.

HATRÍK, S.; TEKEL, J. Extraction methodology and chromatography for the determination of residual pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 217-233, 1996.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3-54, 1999.

HICKES, H. A.; WATROUS, M. Independent laboratory validation of an analytical method for the quantitation of selected sulfonylurea herbicides in surface water using capillary electrophoresis. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 219, p. U61-U614-AGRO Part 1, 2000.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. 2001. Disponível em <<http://www.labcompliance.com>>. Acesso em 12 nov. 2006.

HUG, S.; DIXON, A.; TEUSCHER, J. Simplified Method Development for the Extraction of Acidic, Basic and Neutral Drugs with a Single SPE Sorbent - strata™ X. In: Application Note Phenomenex, Inc. Torrance, CA USA: 2003. Disponível em: <<http://www.phenomenex.com>>. Acesso em 08 jan 2007.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Produção Agrícola Municipal – Cereais, Leguminosas e Oleaginosas, 2005. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pamclo/2005/pamclo2005.pdf>>. Acesso em 19 mar 2007.

ICEPA (INSTITUTO CEPA). Agroindicadores – Índice de produtividade. 2004. Disponível em: <<http://cepa.epagri.sc.gov.br>>. Acesso em 04 ago 2006.

ILLMAN, D. L. New technologies coupled with human factors are key reaching safety goals. **Analytical Chemistry**, p. 5266-5272, 2006.

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

JIMÉNEZ, J. J. *et al.* Determination of pesticide residues in waters from small loughs by solid-phase extraction and combined use of gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection and high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 778, p. 289-300, 1997.

JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 737, p. 67-74, 1996.

KANG, C. A. *et al.* Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of pyrazosulfuron-ethyl in soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, p. 745–751, 2006.

LAGANA, A.; FAGO, C.; MARINO, A. Simultaneous determination of imidazolinone herbicides from soil and natural waters using soil column extraction and off-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with UV detection or liquid chromatography electrospray mass spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 121-130, 1998.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em Fase Gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 240 p.

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

LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1999. 230 p.

LEE, M.; DURST, R. A. Determination of imazethapyr using capillary column flow injection liposome immunoanalysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 4032-4036, 1996.

LEKKAS, T. *et al.* Evaluation of the pollution of the surface waters of Greece from the priority compounds of List II, 76/464/EEC Directive, and other toxic compounds. **Environmental International**, v. 30, p. 995-1007, 2004.

LISKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 3-16, 2000.

LISKA, I.; SLOBODNÍK, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analyzing polar pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 733, p. 235-258, 1996.

LIU, J. *et al.* Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water by on-line continuous flow liquid membrane extraction–C18 precolumn liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, v. 995, p. 21-28, 2003.

MACEDO, V. R. M. *et al.* Persistência de bispyribac-sodium na água de irrigação da lavoura de arroz, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., 2005, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: Editora Orium, 2005, v. 2, p. 558-559.

MACHADO, S. L. O. **Sistemas de Implantação da Lavoura de Arroz Irrigado, Consumo de Água, Perdas de Nutrientes na Água de Drenagem, Persistência de Herbicidas na Água e Efeito no Jundiá.** 2003. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UFSM, Santa Maria, RS.

MADSEN, J. E. *et al.* Methods of analysis by the U. S. Geological Survey National Water Quality Laboratory – A method supplement for the determination of fipronil and degradates in water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. USGS, Colorado, 2003. Disponível em: <<http://nwql.usgs.gov/Public/pubs/OFR02-462/OFR02-462.pdf>>. Acesso em 13 março 2006.

MAJORS, R. E. A review of EPA sample preparation techniques for organic compound analysis of liquid and solid samples. In: LCGC. Estados Unidos, 2001a. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com>>. Acesso em 12 jul. 2006.

MAJORS, R. E. New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa, 2001b. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com>>. Acesso em 12 jul. 2006.

MAJORS, R. E. Trends in sample preparation. In: LCGC. Europa, 2003. Disponível em: <<http://www.lcgceurope.com>>. Acesso em 12 jul. 2006.

MARÍN, J. M. *et al.* Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, p. 204-214, 2006.

MARCOLIN, E.; MACEDO, V. R. M.; JUNIOR, S. A. G. Persistência do herbicida imazethapyr na lâmina de água em diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4., 2005, Santa Maria, **Anais...** Santa Maria: Editora Orium, 2005, v. 2, p.560-562.

MARTINS, M. L. **Determinação de pesticidas e compostos relacionados em água de superfície e efluente industrial empregando Extração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.** 2004. 144 f. Dissertação (Mestrado em Química) – UFSM, Santa Maria, RS.

MELOAN, C. E. (Ed). **Pesticides Laboratory Training Manual**, Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 1996. p.190-192.

MISZCZYK, M.; PYKA, A. Investigation of selected sulfonylurea herbicides by TLC and HPLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 2437-2449, 2006.

MIYAKE, S. *et al.* Simple determination of herbicides in rice paddy water by immunoassay. **Environmental Fate and Effects of Pesticide ACS Symposium Series**, v. 853, p. 124-138, 2003.

MORTON, R. *et al.* Statistical analysis of decay of organophosphorus and pyrethroid insecticides and carbaryl on paddy rice, maize, sunflowers and field peas. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p. 277-285, 2001.

MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 267-273, 2002.

NATIONAL GEOGRAPHIC BRASIL. A poluição interior, outubro 2006, p. 96-123. Disponível em: <<http://ngbrasil.com.br>>. Acesso em 16 jan 2007.

NETO, B. B. *et al.* Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, p. 856-865, 2002.

NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic processes influencing fipronil and desthiofipronil dissipation in Califórnia, USA, rice fields. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 972-977, 2001.

NGIM, K. K.; MABURY, S. A.; CROSBY, D. G. Elucidation of fipronil photodegradation pathways. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4661-4665, 2000.

NOLDIN, J. A.; DESCHAMPS, F. C.; EBERHARDT, D. S. Dissipação do herbicida Sirius, aplicado em benzedura em lâmina de água, na cultura do arroz irrigado, sistema pré-germinado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 3., 2003, Balneário Camboriú, **Anais...** Itajaí: EPAGRI, 2003, p. 539-541.

NUNES, V. da S. Agricultura Irrigada x Saúde Ambiental: Existe um conflito?, 2002. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php>>. Acesso em 16 nov. 2006.

OLIVEIRA, C. F. Censo da lavoura de arroz irrigado do Rio Grande do Sul – safra 2004/5. Porto Alegre: IRGA - Política Setorial, 2006. 122 p. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em 16 jan 2007.

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

PEI, Z. *et al.* Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v. 57, p. 1691-1696, 2004.

PEÑUELA, G. A.; BARCELÓ, D. Photodegradation and stability of chlorothalonil in water studied by solid-phase disk extraction, followed by gas chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 823, p. 81-90, 1998.

PESTICIDE ACTION NETWORK. PAN. Union King. Disponível em: <<http://www.pan-uk.org/pestnews/actives/fipronil.htm>>. Acesso em 31 out. 2006.

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

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D., Calibration: A review for analytical chemists. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

PLANAS, C. *et al.* Analysis of pesticides and metabolites in Spanish surface waters by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry with previous automated solid-phase extraction. Estimation of the uncertainty of the analytical results, **Journal of chromatography A**, v. 1131, p. 242-252, 2006.

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

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

RAVETON, M. *et al.* Phototransformation of the insecticide fipronil: Identification of novel photoproducts and evidence for an alternative pathway of photodegradation. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 4151-4157, 2006.

REBOUÇAS, A., BRAGA, B., TUNDISI, J. G., **Águas Doces no Brasil – Capital Ecológico Uso e Conservação**, São Paulo, Escritura Editora e Distribuidora de Livros, 2002.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2004, p. 44-47.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. de. **Guia de Herbicidas.** 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648 p.

RODRIGUEZ, M.; ORESCAN, D. B. Confirmation and quantitation of selected sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides in surface water using electrospray LC/MS. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 2710-2717, 1998.



SALVADÓ, V.; QUINTANA, X. D.; HIDALGO, M. Monitoring of Nutrients, Pesticides, and Metals in Waters, Sediments, and Fish of a Wetland. **Archives of Environmental, Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 377-386, 2006.

SAMAE, Consumo de água. Disponível em: <<http://www.samae.com.br>>. Acesso em 02 set 2005.

SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. *et al.* Determination of linuron in aqueous soil extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 295-299, 1996.

SANTOS, T. C. R.; ROCHA, J. C.; BARCELÓ, D. Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 879, p. 3-12, 2000.

SCHLENK, D. *et al.* Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 325-332, 2001.

SEITZ, W.; SCHULZ, W.; WEBER, W. H. Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2281-2285, 2006.

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

SHORT, P.; COLBORN, T. Pesticide use in the U.S. and policy implications: A focus on herbicides. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 240-275, 1999.

SILVA, C. *et al.* Pesticides in Esteros del Ibera (AR): evaluation of impacts and proposal of guidelines for water quality protection. **Ecological Modelling**, v. 186, p. 85-97, 2005.

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

SINDAG. Vendas – Culturas – 2004 – US\$. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso em 16 jan 2007.

SLOBODNÍK, J. *et al.* Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic systems with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 239-258, 1997.

SPADOTTO, C. A. *et al.* Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2004, 29 p. disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br>>. Acesso em 22 ago 2006.

SOSBAI. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil**. Balneário Camboriú: Elf Editora e Indústria Gráfica Ltda. 2003, 126 p.

STEINHEIMER, T. R.; SCOGGIN, K. D. Estimation of imazethapyr in agricultural water by its cross-reactivity with either imazaquin or imazapyr ELISA kits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1883-1886, 1998.

STOUT, S. J. *et al.* Simplification of analytical methods in pesticide residue analysis by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 81, p. 685-690, 1998.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. de; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 535-552, 2004.

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

Van ZONEN, P. *et al.* Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 584-593, 1999.

VIDA INTEGRAL, Jornal on line – notícias. Disponível em: <<http://www.vidaintegral.com.br>>. Acesso em 16 nov. 2006.

VENCILL, W. K. **Herbicide Handbook**. Lawrence: Weed Science Society of America, 8 ed. 2002. p. 51; 256-258; 378.

VIGNA, C. R. M. *et al.* Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica as a sorbent for solid-phase extraction of some pesticides. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, p. 211-215, 2006.

VÍLCHEZ, J. L. *et al.* Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 215-221, 2001.

WARE, G. W. **The Pesticide Book**. Fresno: Thomson Publications, 4 ed. 1994. p. 3-12.

WATERS CORPORATION, OASIS® Sample Preparation Products, 2003. Disponível em: <<http://waters.com>>. Acesso em 09 jan 2007.

WELLS, M. J. M.; YU, L. Z. Solid-phase extraction of acidic herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 237-250, 2000a.

WELLS, M. J. M. Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) **Solid-phase extraction: principles, techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000b. p. 97-123.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, p. 624-632, 1999.

WORLD WIDE WATER FOUNDATION, Disponível em: <<http://www.wwwf.org>>. Acesso em 14 nov. 2006.

YING, G. G.; KOOKANA, R. Laboratory and field studies on the degradation of fipronil in a soil. **Australian Journal of Soil Research**, v. 40, p. 1095-1102, 2002.

YOSHII, K. *et al.* Supercritical fluid extraction of ten chloracetanilide pesticides and pyriminobac-methyl in crops: Comparison with the Japanese bulletin method. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 1239-1245, 1999.

ZAFFARONI, E.; TAVARES, V. E. O licenciamento ambiental dos produtores de arroz irrigado no Rio Grande do Sul, Brasil. 1999. Disponível em: <<http://www.iica.org.uy/p2-8.htm>>. Acesso em 18 out 2006.

ZANELLA, R. *et al.* Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicides in surface and agricultural waters. **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 935-938, 2003.

ZAUGG, S. D. *et al.* Methods of analysis by the U. S. Geological Survey National Water Quality Laboratory – Determination of Pesticides in Water by C-18 Solid-Phase Extraction and Capillary-Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Selected-Ion Monitoring. U.S. Geological Survey Open File Report 95-181; U.S. Geological Survey: Reston, VA, 1995.

ZHANG, R. *et al.* Separation of sulfonylurea herbicides and determination of bensulfuron-methyl residues in tap water by HPTLC. **Journal of Planar Chromatography – Modern TLC**, v. 16, p. 127-130, 2003.

ZHU, Q. Z. *et al.* Selective trace analysis of sulfonylurea herbicides in water and soil samples based on solid-phase extraction using a molecularly imprinted polymer. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 5411-5420, 2002.

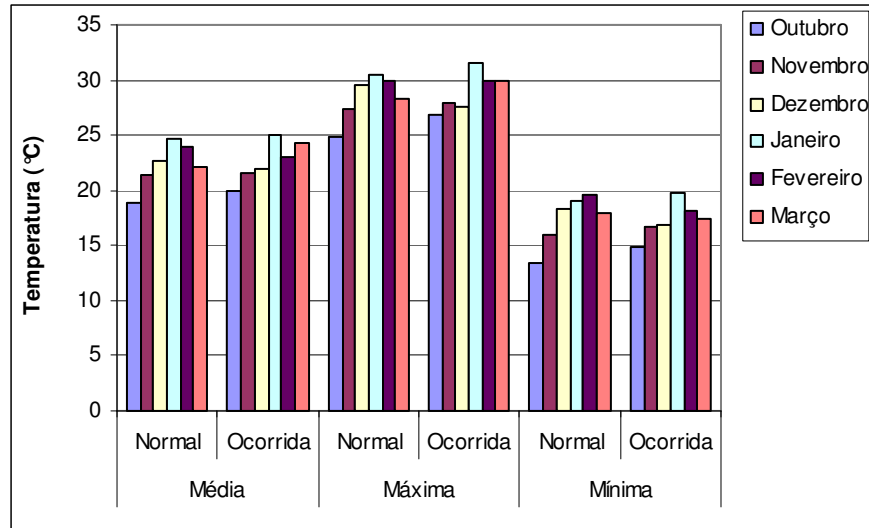
## ANEXOS

### ANEXO A – Distribuição *t*

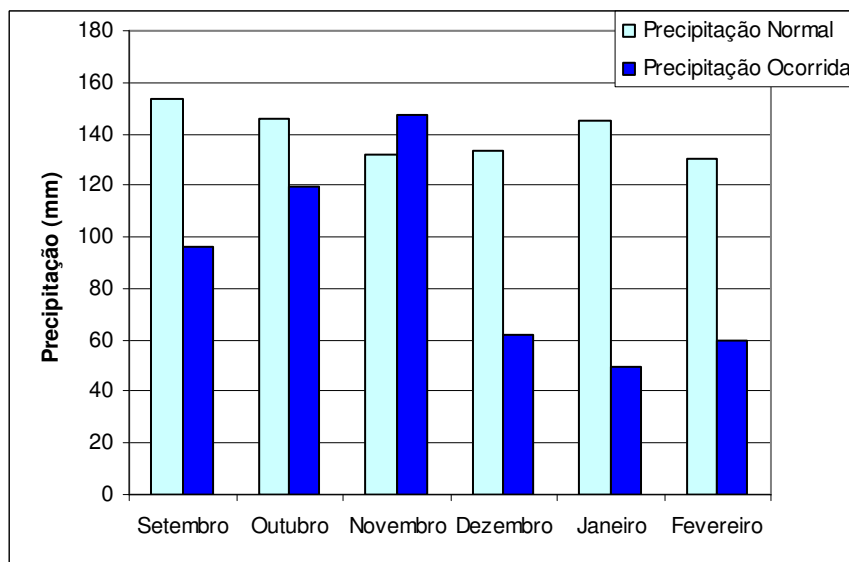
Valor de <i>t</i> para um intervalo de confiança de Valor crítico de <i>t</i> para P valores de número de graus de liberdade	90% 0,10	95% 0,05	98% 0,02	99% 0,01
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
∞	1,64	1,96	2,33	2,58

Os valores críticos de *t* são apropriados para um teste bilateral. Para um teste unilateral o valor é tomado a partir da coluna para 2 vezes o valor de P desejado, por exemplo, para um P=0,05 e 5 graus de liberdade, o valor crítico é lido a partir da coluna de P=0,10 e é igual 0,02.

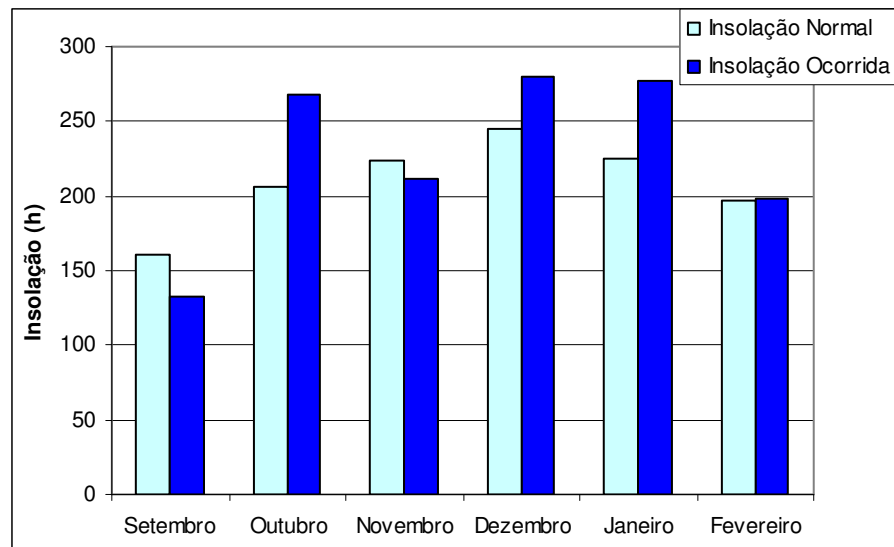
**ANEXO B – Dados climáticos referentes ao período de cultivo de arroz irrigado, nos dois anos de estudo**



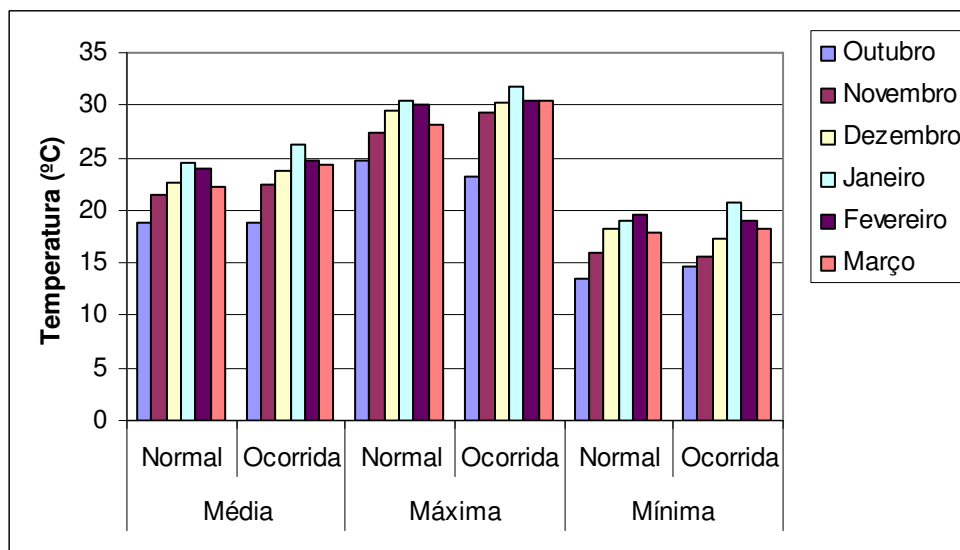
**Figura 1 - Temperaturas normais da região (média, máxima e mínima), de outubro de 2004 a março de 2005**



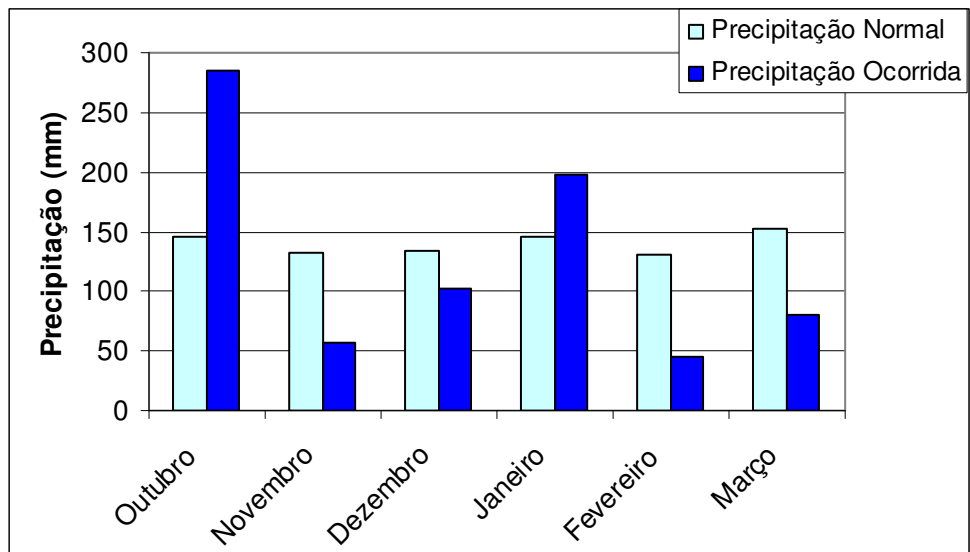
**Figura 2 - Precipitação (mm) normal e ocorrida de setembro de 2004 a fevereiro de 2005**



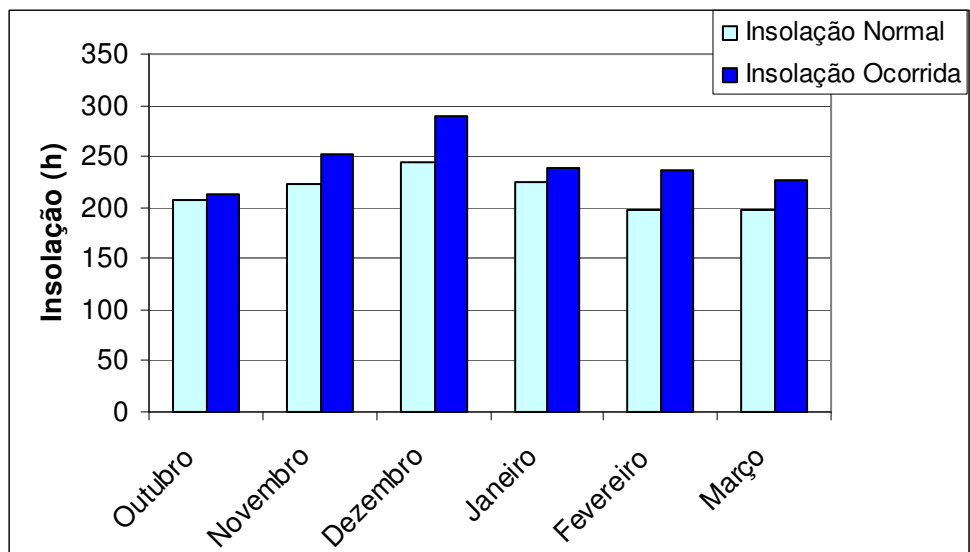
**Figura 3 - Insolação (h) normal e ocorrida de setembro de 2004 a fevereiro de 2005**



**Figura 4 - Temperaturas normais da região (média, máxima e mínima), de outubro de 2005 a março de 2006**



**Figura 5 - Precipitação (mm) normal e ocorrida de outubro de 2005 a março de 2006**



**Figura 6 - Insolação (h) normal e ocorrida de outubro de 2005 a março de 2006**



## PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DO PRESENTE TRABALHO

ZANELLA, R.; VARELI, Catiucia S.; GONÇALVES, F. F.; REIMCHE, G. B.; KURZ, M. H. S.; MACHADO, S. L. de O. Determinação da Persistência dos Herbicidas Imazetapir, Bispiribaque e Pirazossulfurom em Águas de Irrigação de Lavoura de Arroz Empregando EFS e CLAE-UV. In: XX Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria, 2006.

ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; MARTEL, S.; GONÇALVES, F. F.; MACHADO, S. L. de O.; REIMCHE, G. B. Desenvolvimento e validação de método empregando SPE e GC-ECD para a determinação do inseticida fipronil e metabólitos em água. In: II Simpósio de Cromatografia - (SIMCRO), 2006, São Pedro. II Simpósio de Cromatografia - (SIMCRO), 2006

KURZ, M. H. S. Desenvolvimento e validação de metodologia, empregando EFS e CLAE-UV, para determinação de resíduos de herbicidas em águas agrícolas. 2005. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

ZANELLA, R.; MACHADO, S. L. de O.; MARCHEZAN, E.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; ÁVILA, L. A. de; PRIMEL, E. G.; REIMCHE, G. B. Resíduos de Herbicidas Utilizados na Cultura do Arroz na Água de Irrigação. In: IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2005, Santa Maria. IV Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2005. v. II.

ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; MARTEL, S.; ROEHRS, M.; GONÇALVES, F. F. Desenvolvimento e Validação de Metodologia, Empregando EFS e CLAE-UV, para a Determinação de Resíduos de Herbicidas em Águas Agrícolas. In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2005, Niterói. A Química Analítica e o Desenvolvimento Sustentável, 2005.